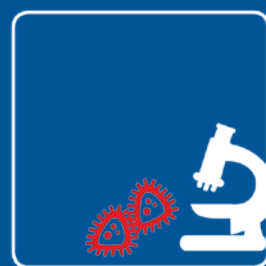


SLUTRAPPORT

NR. 2014-125

# Helsefremmende effekter af mælkeprodukter



## Afslutningsrapport

# Helsefremmende effekter af mælkeprodukter/ Helsefremmende effekter af mejeriprodukter

### Projektleder

Karsten Kristiansen  
Biologisk Institut  
Københavns Universitet  
Ole Maaløes Vej 5, 2200 København N

Tel. +45 3532 4443  
e-mail: kk@bio.ku.dk

### Projektperiode

1. januar 2009 – 31. december 2013

### Øvrige medarbejdere

Professor Arne V. Astrup, NEXS-KU; ast@nexs.ku.dk  
Janne K Lorenzen, NEXS-KU (per 15/8 2013 leder af Sundhedsstaben Kalundborg kommune)  
Ph.d.-studerende Line Q Bendtsen, NEXS-KU; lbe@nexs.ku.dk  
Professor Jun Wang, BGI-Shenzhen/BIO-KU; wangj@genomics.org.cn  
Lektor Hanne C. Bertram, FS-AU; HanneC.Bertram@agrsci.dk  
Senior Scientist Lise Madsen, NIFES, Norge; lise.madsen@nifes.no  
Senior Scientist Bjørn Liaset, NIFES, Norge; bjorn.liaset@nifes.no  
Adjungeret Professor Kim Overvad, AUH; KO@SOCIAU.DK

### Finansiering

Mejeribrugets ForskningsFond, Det Strategiske Forskningsråd, sags nr. 09-065171, medfinansiering af PhD stipendier fra Aarhus Universitet, Aalborg Universitet og Københavns Universitetet,

### **Baggrund, mål og resultater**

Mælkeprodukter er vigtige næringsmidler for den danske befolkning, og vigtig for dansk eksport og økonomi. Mens det er velkendt, at mælkeprodukter indeholder vigtige næringsmidler, er det endnu debatteret, hvorledes indtag af mælkeprodukter påvirker stofskifte og sundhedstilstand. Hidtil har undersøgelser hovedsageligt været fokuseret omkring betydningen af grupper af enkelte komponenter. I dette projekt har vi ved en kombination af avancerede cellestudier, dyreforsøg, og humane studier undersøgt, hvorledes de enkelte komponenter virker sammen.

Vi har undersøgt, hvordan sammensætningen af proteiner i mælken påvirker energiudnyttelse og energibalance, og hvorledes forarbejdning af mælkeproteinerne ændrer deres påvirkning af metabolisme og mæthedfølelse. Vi har vist at indtag af delvist hydrolyserede mælkeproteiner øger energiforbruget i mus delvis gennem en øget fedtforbrænding og afkoblet respiration i fedtvævet. Vi har vist at indtag af valleprotein har en slankende effekt i mus, og vi har vist at denne effekt i al fald delvist skyldes et tab af metabolitter i urinen.

I et humant interventionsstudie har vi testet effekterne af intakt valleprotein, intakt kasein og hydrolyseret kasein på energiforbrænding og appetit over 24 timer. 24 raske mænd og kvinder i alderen 22-40 år gennemgik i alt 3 interventionsbesøg i et respirationskammer. Energiforbrændingen samt substratoxidationer blev målt over 24 timer i et respirationskammer og appetit blev vurderet ud fra visuelle analoge skalaer (VAS), ad libitum energiindtag, appetitregulerende hormoner og en 24-timers kostregistrering. Proteinsupplementerne blev serveret som shakes til morgen, middag og aften. Forsøgspersonerne udviste ingen forskel med hensyn til appetit og energiforbrænding ved indtag af intakt valleprotein, intakt kasein eller hydrolyseret kasein. Modsat observerede vi, at valleprotein gav anledning til en højere fedtoxidation og lavere kulhydratoxidation end hydrolyseret kasein vurderet ud fra den respiratoriske kvotient. Disse data understøttes af respons i fede frie syre, som var højere efter intakt valleprotein sammenlignet med hydrolyseret kasein. Vi observerede ingen forskellige i insulin respons, men glukose var højere efter intakt kasein sammenlignet med hydrolyseret kasein. Vi har undersøgt hvorledes calcium modulerer optagelse og udskillelsen af fedt, og på hvilken måde calcium samspiller med de øvrige komponenter i mælkeprodukter. Mælkemineralers effekt på blod lipidprofilen og fækal fedt udskillelse blev undersøgt i et interventionsforsøg på 24 grise, hvor grisene i en periode på 10 dage blev vænnet til en høj fedt diæt, hvorefter de blev randomiseret til enten mælkemineral (Capolac®) eller placebo (kartoffelstivelse) i 14 dage. I forhold til placebo gruppen, så havde mælkemineral gruppen en signifikant mindre øgning af total-kolesterol og LDL-kolesterol over forsøgsperioden. Desuden havde mælkemineral gruppen en øget fækal fedtudskillelse i forhold til placebo gruppen, og den fækale fedtudskillelse var korreleret med fækal kalciumudskillelse.

Vi har i et interventionsforsøg på 15 raske mænd i alderen 18-50 år undersøgt effekten af fødevarematrix i mejeriprodukter på fækal fedtudskillelse, lipidprofil og appetit. Designet var et overkrydsningsforsøg, hvor effekten af 3 forskellige kosttyper på fedt- og energifordøjelighed, lipidprofil og appetit blev undersøgt. Forsøgspersonerne blev randomiseret til rækkefølgen af de 3 perioder, hvor forsøgspersonerne dagligt indtog en kontrolleret standardiseret kost med samme fedtindhold og fedtsyresammensætning (kontrol: 500 mg Ca; mælk: 1700 mg Ca; ost: 1700 mg Ca). Resultaterne viste, at den fedt-inducerede stigning i total og LDL kolesterol var mindre med mælke-baseret kost og oste-baseret kost sammenlignet med kontrolkosten. Fedtudskillelsen steg mere under indtagelse af en kost baseret på mælk end med kontrolkosten. Vi kan konkludere at sammenlignet med en fedtrig kontrolkost, mindsker både en mælke- og oste-baseret kost stigningen i total og LDL kolesterol og forårsager en øget fedtudskillelse. Fødevarematrix syntes ikke i udtalt grad at påvirke fedtudskillelse og lipidprofil, mens kalcium-indholdet formentlig forklarede de observerede effekter.

Typen af bakterier i tarmen kan have afgørende betydning for, hvor effektivt vi optager energi fra føden, og tarmbakterier kan ydermere udskille stoffer til blodet, og derved påvirke hele organismens energibalance. I forbindelse med projektet har vi i samarbejde med internationale forskere udarbejdet kataloger over tarmens bakterier i menneske, mus og grise. Vi har indledt undersøgelser til at belyse, hvorledes indtag af mælkeprodukter kan ændre tarmens indhold af bakterier i en gunstig retning.

Vi har gennem projektet opnået ny viden om, hvorledes indtaget af forskellige mælkeprodukter på forskellig måde påvirker hele kroppens metabolisme og energibalance og vi vil derved kunne bidrage til udviklingen af nye produkter med dokumenterede ernæringsmæssige effekter af betydning for folkesundhed, dansk landbrug og industri.

*English summary*

We have investigated how different milk components and processing of milk proteins affects metabolism and energy balance using a combination of mouse experiments and human intervention studies. We have demonstrated how intake of hydrolyzed casein compared with intact casein markedly increased energy expenditure and counteracted high-fat diet induced obesity, in part via an induction of UCP1 expression in adipose tissue leading to uncoupled mitochondrial respiration. Intake of whey protein was shown to reduce high-fat diet-induced obesity, and by analyses of metabolites in the urine we provided evidence that this at least in part could be explained by a loss of intermediates in the tricarboxylic acid cycle.

The effects of intact whey protein, casein and hydrolyzed casein were investigated in a human intervention study measuring energy expenditure and appetite during 24 hours. 24 healthy male and female between 22 and 40 years of age went through a total of 3 interventions in a respiratory chamber. With respect to appetite and energy expenditure no differences between the different types of protein were observed. However, we observed that intake of whey protein resulted in a higher oxidation of fatty acids and lower glucose oxidation that observed after intake of hydrolyzed casein. No difference in insulin response was observed, but blood glucose was higher after intake of intact casein compared with hydrolyzed casein.

The effect of calcium on fecal excretion of fat was investigated in pigs. Pigs receiving Capolac ® had significantly less increase in total cholesterol and LDL-cholesterol than the placebo group receiving starch. Additionally an increased excretion of fat in the feces was observed in the calcium group.

The effect of the dairy food matrix was analyzed in a human intervention. This experiment demonstrated that compared with a standard diet, intake of comparable diets based on milk or cheese resulted in a lower increase in total cholesterol and LDL-cholesterol, and additionally, increased fecal excretion of fat was also observed.

We have in collaboration especially with BGI-Shenzhen established comprehensive catalogs of the gut metagenomes in humans, mice and pigs. The effects of intake of dairy products on the gut microbiota are currently being determined.

The project have provide novel knowledge regarding the mechanisms by which intake of dairy products affects metabolism and energy balance, and we believe that this knowledge will be of importance for the development of novel dairy products with documented health beneficial effects.

## ***Forskningsmæssige resultater***

### **WP1. NIFES. Rodent models**

Arbejdet ved NIFES har været fokuseret på at belyse, hvorledes forskellige mælkeproteiner påvirker diæt-induceret fedme hos mus. Forsøgene har testet valle versus kasein samt kasein versus enzymatisk hydrolyseret kasein (korte peptider og frie aminosyrer). Forsøgene er foretaget med kontrolleret foderindtag (pair-feeding) og løbende bestemmelse af kropsvægt. Ved terminering er blod opsamlet ligesom væv (lever, hvidt og brunt fedtvæv, skeletmuskel og hjerte) er udtaget til gen-ekspressionsanalyser, ex vivo bestemmelser af fedtsyreoxidations-kapacitet og histologi. Leverprøverne er ydermere anvendt til lipidanalyser. Plasma/serum er anvendt til biokemiske analyser af metaboliske parametre. Urin, fæces og blod er anvendt til metabolomics analyser (WP5) og fæcesprøver er desuden anvendt til analyse af tarmmetagenomet (WP4). Endelig er der udført fysiologiske tests (glukose tolerance test og oral lipid tolerance test) på et separat sæt af mus. Resultaterne af disse forsøg er publiceret i 3 artikler + 1 manuskript indsendt til Plos One. Basalt har vi kunne vise at indtaget af hydrolyserede mælkeproteiner øger energiomsætningen i mus og rotter gennem en øget forbrænding af fedt i fedtvæv gennem en såkaldt afkobling af mitochondriernes respiration. Vi har desuden gennem analyser af metabolitter i urinen vist at indtag af valleprotein har en slankende effekt gennem en øget udskillelse af metabolitter fra den såkaldte citronsyrecyklus/trikarboksylyrecyklus.

Lillefosse H. et al.: ‘Hydrolyzed Casein Reduces Diet-Induced Obesity in Male C57BL/6J Mice’ J Nutr 2013 143:1367-1375.

Yde C.C. et al.: ‘Multi-block PCA and multi-compartmental study of the metabolic responses to intake of hydrolysed versus intact casein in C57BL/6J mice by NMR-based metabolomics’ Metabolomics 2014 DOI: 10.1007/s11306-014-0623-4.

Lillefosse H. et al.: ‘Urinary Loss of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates as Revealed by Metabolomics Studies – An Underlying Mechanism to Reduce Lipid Accretion by Whey Protein Ingestion?’ J Proteome Res 2014 DOI: 10.1021/pr500039t

Clausen M.R. et al.: ‘The effects of hydrolyzed versus intact casein feeding on the urinary metabolome and liver lipids in obesity prone C57BL/6J mice’ indsendt to PloS One.

Desuden har den PhD stipendiat, Haldis Lillefosse, der var tilknyttet projektet i 2012 forsvaret sin PhD afhandling med titlen ”Dietary protein – Effect of amount, source and form on development of diet-induced obesity”.

### **WP2. BIO-UoC. Cellular model systems, signaling and gene expression**

I forbindelse med forsøgene i WP1 er der udført analyser af genekspression ved hjælp af RT-qPCR og Solexa-baseret Digital Gene Expression. Desuden er der gennemført analyser af ændringer i protein med tilhørende netværksanalyser for at identificere mulige pathways, der er differentielt påvirket af de forskellige diæter. En del af dette arbejde indgår i artiklerne nævnt under WP1. Dette har bidraget til den molekylære forståelse af effekterne på indtag af mælkeproteiner og resultaterne er anvendt i artiklerne nævnt under WP1.

PhD stipendiat Kamil Borkowski, der var tilknyttet projektet, har i 2013 forsvaret sin PhD afhandling med titlen ”The interplay between cyclic AMP and insulin during obesity development”.

### **WP3. HN-KU. Effects of calcium and human intervention**

#### Projekt 1

Delprojekt 1A Mælke minerals effekt på blod lipidprofilen og fækalt fedt udskillelse

Studiet blev udført som et interventionsforsøg på 24 grise. I en periode på 10 dage blev grisene vænnet til en høj fedt diæt (11 E %), hvorefter de blev randomiseret til enten mælke mineral (Capolac ®) eller placebo (kartoffelstivelse) i 14 dage. I forhold til placebo gruppen, så havde mælke mineral gruppen en signifikant

mindre øgning af total-kolesterol (11 %;  $p = 0,004$ ) og LDL-kolesterol (13 %;  $p = 0,03$ ) over forsøgsperioden. Desuden havde mælke mineral gruppen en øget fækal fedtudskillelse (31 %;  $p = 0,04$ ) i forhold til placebo gruppen, og den fækale fedtudskillelse var korreleret med fækal calciumudskillelse ( $P < 0,0001$ ). Studiet er publiceret (Lorenzen et al, BJN 2014)

#### Delprojekt 1B

Baseret på resultaterne fra WP1, besluttede projektgruppen at ændre studiedesignet, således at vi har testet effekterne af intakt valleprotein, intakt kasein og hydrolyseret kasein på energiforbrænding og appetit over 24 timer. Calcium udgik af studiet. Studiet blev udført som et interventionsstudie, hvor 24 raske mænd og kvinder i alderen 22-40 år hver gennemgik i alt 3 interventionsbesøg i et respirationskammer. Studiet var et overkrydsningsforsøg, hvor effekten af 3 forskellige proteiner (intakt kasein, hydrolyseret kasein og intakt valleprotein) på energiforbrændingen og appetitreguleringen blev undersøgt. Energiforbrændingen samt substratoxidation blev målt over 24 timer i et respirationskammer og appetit blev vurderet ud fra visuelle analoge skalaer (VAS), *ad libitum* energiindtag, appetitregulerende hormoner og en 24-timers kostregistrering. Proteinsupplementerne blev serveret som shakes til morgen, middag og aften. Studiet viste at der ingen forskel er på appetit og energiforbrænding mellem intakt valleprotein, intakt kasein og hydrolyseret kasein. Modsat observerede vi at valleprotein påvirker en højere fedtoxidation og lavere kulhydratoxidation end hydrolyseret kasein vurderet ud fra den respiratoriske kvotient. Disse data understøttes af respons i fede frie syre, som var højere efter intakt valleprotein sammenlignet med hydrolyseret kasein. Vi observerede ingen forskellige i insulin respons, men glukose var højere efter intakt kasein sammenlignet med hydrolyseret kasein. Studiet er afsluttet juli 2013. Studiet er genindsendt til BJN (Bendtsen et al, genindsendt 2014)

#### Projekt 2 Kost indtag og fedtudskillelse - et observationelt studie (KIFU)

Studiets primære formål er, at undersøge sammenhængen mellem habituel calciumindtag og fækal fedtudskillelse hos overvægtige og normal vægtige voksne, samt at undersøge om der er en sammenhæng mellem indtaget af calciumindtag og kolesterol koncentrationen i blodet. I studiet blev 158 deltagere inkluderet hvoraf 139 gennemførte. Deltagerne har registreret deres kost i 7 dage samt opsamlet urin og fæces i henholdsvis 2 og 5 dage. Ved afslutningen af forsøget blev der taget blodprøver. Der inkluderes resultater fra et yderligere studie, som har kørt parallelt med KIFU, hvor vi ved baseline har indsamlet de samme oplysninger og biologiske prøver som i KIFU, hvilket øger den statistiske styrke. Således bliver hovedartiklen baseret på resultater fra 191 deltagere. Prøver fra blod, samt urin- og fæcesopsamling er blevet analyseret i løbet af 2013-2014 og de sidste analyser er afsluttet marts 2014. På nuværende tidspunkt er den antropometriske karakteristik (alder, højde, vægt, BMI), samt blodtryk og blod lipidprofil af deltagerne fuldført, mens resultaterne fra de sidste analyser er ved at blive analyseret. Artiklen indsendes medio 2014 (Kjølbaek et al).

Yderligere resultater inkluderer validering af fødevarerfrekvensskemaet (FFQ), som blev brugt ved inklusion af deltagerne. Der foreligger en validering af et lignende FFQ fra 1998, som er valideret på børn, men med det store datamateriale fra dette forsøg vil det være muligt at foretage en ny validering af det anvendte FFQ på voksne. FFQ bruges til hurtigt at estimere deltagerens habituelle calciumindtag og anvendes i mange studier af mejeriprodukter. Da studierne primært udføres med voksne (ofte overvægtige) vil det have stor relevans for fremtidige studier at validere skemaet, hvis man f.eks. vil rekruttere deltagere som har et lavt eller højt calciumindtag. Artiklen forventes indsendt i 2014.

#### Projekt 3 Effekt af mælk og ost på fækal fedtudskillelse og lipidprofil (MOFF)

Formålet var at undersøge effekten af fødevarermatrix i mejeriprodukter på fækal fedtudskillelse, lipidprofil og appetit. Studiet var et interventionsforsøg på 15 raske mænd i alderen 18-50 år, der hver gennemgik i alt 3 interventionsperioder af 14 dages varighed. Designet var et overkrydsningsforsøg, hvor effekten af 3 forskellige kosttyper på fedt- og energifordøjelighed, lipidprofil og appetit undersøges. Forsøgspersonerne blev randomiseret til rækkefølgen af de 3 perioder, hvor forsøgspersonerne dagligt indtog en kontrolleret standardiseret kost med samme fedtindhold og fedtsyresammensætning (kontrol: 500 mg Ca; mælk: 1700 mg Ca; ost: 1700 mg Ca). I hver interventionsperiode opsamlede forsøgspersonerne fæces fra dag 10-14, urin på dag 14, fastebloodprøver blev taget før og efter hver periode og appetitfølelse undersøges løbende. Alle 15 forsøgspersoner gennemførte hele studiet. Resultaterne viste, at den fedt-inducerede stigning i total og LDL kolesterol var mindre med mælke-baseret kost (hhv.  $0,57 \pm 0,13$  og  $0,53 \pm 0,11$  mmol/L) ( $P < 0,01$ ) og oste-baseret kost (hhv.  $0,41 \pm 0,15$  og  $0,47 \pm 0,12$  mmol/L) ( $P < 0,05$ ) sammenlignet med kontrolkosten (hhv.  $0,89 \pm 0,12$  og  $0,84 \pm 0,11$  mmol/L). Fedtudskillelsen steg mere under indtagelse af en kost baseret på mælk ( $5,2 \pm$

0,4 g/d) og ost ( $5,7 \pm 0,4$  g/d) end med kontrolkosten ( $3,9 \pm 0,3$  g/d) ( $P < 0,001$ ). Vi kan konkludere at sammenlignet med en fedt-rig kontrolkost, mindsker både en mælke- og oste-baseret kost stigningen i total og LDL kolesterol og forårsager en øget fedtudskillelse. Dog sås ikke signifikante forskelle mellem kost baseret på mælk og ost, der indeholdt samme mængde kalcium. Således synes fødevarematrix ikke i udtalt grad at påvirke fedtudskillelse og lipidprofil, mens kalcium-indholdet formentlig forklarer de observerede effekter. Studiet er publiceret (Sørensen et al, AJCN 2014).

#### **WP4. BIO-KU & BGI-Shenzhen. Metagenome and transcriptome analyses.**

I forbindelse med forsøgene i WP1 er der gennemført et stort antal genexpressionsanalyser ved hjælp af RT-qPCR kombineret med mere globale analyser ved hjælp af Solexa-baseret Digital Gene Expression. De opnåede resultater har givet indsigt i mulige molekulære mekanismer, der ligger under de metaboliske ændringer, der er fundet i forbindelse med arbejdet i WP1, og indgår i de to artikler, der er nævnt under WP1.

Der er gennemført dyb metagenomsekventering af fæcesprøver fra 184 mus, primært C57BL/6J (følsom for diæt-induceret fedme) og SV129 (resistent overfor diæt-induceret fedme), men også andre musestammer indgå i kataloget. I alt er der identificeret 2.6 mio. gener i populationerne af tarmbakterier. Resultaterne er præsenteret ved internationale møder og har ført til øget internationalt samarbejde med henblik på også at udarbejde en chip til metagenom ekspressionsanalyser. Det bioinformatiske analysearbejde har været ganske omfattende. Resultaterne viser hvorledes leverandør og det eksperimentelle laboratorium har afgørende indflydelse på musenes tarm-mikrobiota, og har samtidigt vist at der er meget lille sekvensmæssigt sammenfald mellem de 2.6 gener, vi har påvist i musemikrobiomet og de gener vi har identificeret i det human tarm-mikrobiome. Når man imidlertid sammenligner funktionerne af de fundne gener er der et meget stort sammenfald, og kun ganske få funktioner, der er specifikke for henholdsvis mus og menneske. I et andet studie, hvor vi har sammenlignet mikrobiomet i C57BL/6J og SV129 mus har vi påvist en bakterieklasse, der er associeret med fedme og en, der er associeret med slanke mus. En mulig kausal sammenhæng bliver nu undersøgt. To artikler er ved at blive sammenskrevet, den ene omhandler således den første omfattende beskrivelse af muse-metagenomet, mens den anden beskriver de ændringer i tarm-metagenomet, der observeres i forbindelse med diæt-induceret fedme. Begge arbejder blev præsenteret ved den internationale MetaHIT konference i Paris i foråret 2012 og ved Benzon Symposiet i August 2012 i København, i november 2010 ved 5th International Conference of Genomics, Shenzhen, Kina, og i november 2012 ved 7th International Conference of Genomics, Hong Kong.

#### **WP 5. IFK-AU metabonomics**

Analysen af blod og urin opsamlet fra mus fodret med kasein eller valleprotein.

Ved NIFES er der som beskrevet under WP1 gennemført studier med mus fodret med enten kasein eller valleprotein. Efterfølgende er der ved IFK-AU blevet udført højopløselige proton NMR spektroskopi og LC-MS analyser på blod- og urinprøver. Dataene er blevet analyseret ved hjælp af multivariat dataanalyse. Principal component analyse (PCA) viser en gruppering af både urin- og blodprøverne svarende til diæt (kasein versus valle), hvilket afslører, at der er ændringer i metabolitprofilerne afhængig af om musene som proteinkilde spiser enten kasein eller valleprotein. Efterfølgende er der arbejdet intenst med identifikation af de metabolitter, der ligger til grund for en differentiering af urinprøver fra mus fodret hhv. valle og kasein i LC-MS dataene. Dette viste, at metabolitter i TCA cyklus i høj grad bidrog til den observerede effekt svarende til at fodring med valleprotein medfører ændringer i TCA cyklus. En stor del af dette arbejde indgår i to artikler beskrevet under WP1.

Analysen af blod og urin opsamlet fra mus fodret med intakt eller hydrolyseret kasein

Som beskrevet under WP1 er der ved NIFES udført studier med mus fodret med enten intakt eller hydrolyseret kasein, og der er lavet NMR-baseret og LC-MS baseret metabonomics analyser på urinprøver fra disse mus. PCA analyse af LC-MS viser en klar og meget overbevisende gruppering af prøverne afhængig af om musene har fået intakt eller hydrolyseret kasein svarende til en stor effekt af hydrolysering på respons detekteret ved LC-MS analyse af urin. LC-MS analyserne detekterer over 1000 metabolitter i urinen, og der lagt intensivt arbejde i at identificere de metabolitter, der varierer som funktion af interventionen, bl.a. ved fragmenteringsstudier. På baggrund af dette arbejde, er det lykket at identificere, at mange af metabolitterne tilhører gruppen af konjugerede glukuronsyre, sulfat og glycin derivater fra fase II metabolisme. Effekten på

fase II metabolisme formodes at kunne kobles til effekter på kulhydrat og aminosyre metabolisme, og de spændende resultater er sammenskrevet i et manuskript der er submittet april 2014.

Udover NMR analyser på blod og urin, er der også arbejdet med NMR analyser af vævsprøver og fæcesprøver fra musene fodret med intakt eller hydrolyseret kasein. NMR dataene fra blod, urin, lever, nyre, muskelvæv, milt og fæces er blevet analyseret ved avancerede multivariate dataanalyse teknikker baseret på multiblok, der formår at ekstrahere information fra data på tværs af prøvetype. Vi var i stand til at vise, at ved at anvende denne avancerede dataanalyse, kunne vi i med større konfidens påvise effekter af fodringen end ved at analysere de forskellige prøvetyper separat, og den metaboliske tolkning blev også forbedret. Disse resultater er publiceret i artiklen:

Yde, C.C.; Clausen, M.R.; Ditlev, D.B.; Lillefosse, H.H.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Liaset, B.; Bertram, H.C.. Multi-block PCA and multi-compartmental study of the metabolic responses to intake of hydrolysed versus intact casein in C57BL/6J mice by NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 2014. (DOI 10.1007/s11306-014-0623-4)

Analyser af blodprøver opsamlet fra mennesker efter styrketræning og indtag af kasein eller valleprotein drik Der er lavet NMR-baseret metabonomics analyser på blodprøver fra et forsøg, der er udført på Bispebjerg Hospital i et samarbejde med Søren Reitelseder. I dette forsøg indgik der 17 raske unge mænd, der udførte 1 times styrketræning og derefter indtog enten kasein eller valledrik. Efterfølgende blev der opsamlet blodprøver op til 370 min efter træningen. Ved hjælp af metabonomics analyserne var det muligt at se de dynamiske fluktationer i metabolitterne alanine,  $\beta$ -hydroxybutyrate, for-grenede aminosyrer, kreatin, glukose, glutamin, glutamat, histidine and tyrosin som funktion af tid, men det var ikke muligt at identificere nogen ændringer, der var specifikke for enten kasein eller valle. Resultaterne er blevet sammenskrevet i en videnskabelig artikel, der er blevet publiceret, Yde, et al. (2013). *Metabonomic Response to Milk Proteins after a Single Bout of Heavy Resistance Exercise Elucidated by 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. *Metabolites* 3, 33-46.

## **WP 6 DCE-AUH: Epidemiologiske analyser**

Studiet af indtag af ruminante transfedtsyrer og ændringer i antropometri baseret på data fra Kost, Kræft og Helbred kohorten er afsluttet og publiceret. Et manuskript omhandlende et studie af transfedtsyrer i fedtvæv og ændringer i antropometri i den samme kohorte er ved at blive færdiggjort. Analyserne af indtag af mælkeproteiner og ændringer i vægt og taljeomkreds er påbegyndt i januar 2013. PhD projektet er endnu ikke afsluttet.

## ***Uddannelse og internationale samarbejder***

PhD stipendier tilknyttet projektet blev opslået internationalt og i alt 5 PhD studerende blev ansat (en fra Norge, en fra Polen og tre fra Danmark). Yderligere 4 PhD studerende og 2 postdocs finansieret fra andre kilder har yderligere deltaget i projektet. Desuden har 5 medarbejdere ved BGI-Shenzhen arbejdet med de metagenomiske sekventeringer og analyser, ligesom en postdoc ved Biologisk Institut har arbejdet i Professor Michiel Kleerebezem's laboratorie ved Wageningen Universitet, Holland, i forbindelse med arraybaserede analyser af musemetagenomet. Endelig skal det fremhæves at en PhD studerende (WP2) og en PhD studerende (WP5) har været på studieophold ved NIFES, Bergen (WP1) som et led i udviklingen af projektet. En PhD (WP2) studerende har desuden været på et 6 måneders studieophold ved Associate Prof. Fawaz G. Haj, UC-Davis. Endvidere har der gennem projektet indledt samarbejder med Prof. Michael Kjær's gruppe Bispebjerg hospital., Assoc. Prof. John Newman og PhD student Alison Keenan, UC-Davis (Metabolomics, Alison Keenan blev efterfølgende afsat som postdoc ved Biologisk Institut, Københavns Universitet). Endelig skal det fremhæves at der generelt - mellem de involverede PhD studerende og postdocs – har været en tæt og frugtbar interaktion.

To PhD studerende har afsluttet deres studier: Haldis Lillefosse, forsvarede i 2012 sin PhD afhandling med titlen ”Dietary protein – Effect of amount, source and form on development of diet-induced obesity”, og



stipendiat Kamil Borkowski, forsvarede i 2013 sin PhD afhandling med titlen ”The interplay between cyclic AMP and insulin during obesity development”.

### ***Betydning for mejerisektoren og afledte projekter***

Projektet har givet ny viden om hvorledes mælkeprodukter og forarbejdede mælkeproteiner påvirker metabolisme og energiomsætning – viden der vil være af betydning for fremtidig ernæringsmæssig rådgivning og eventuelt udviklingen af nye mejeriprodukter. Projektet har endvidere fungeret som springbræt for et nyt strategisk projekt omhandlende mælkeprodukter, ”F I A F: Milk in regulating lipid metabolism and overweight. Uncovering milk’s ability to increase expression and activity of fasting-induced adipose factor”, og endvidere tjent til at udbygge og intensivere samarbejdet mellem de involverede partnere og mejerisektoren.

### ***Foredrag***

DSF Temamøde, København, 26. marts 2009, Karsten Kristiansen: Mælkeprodukters sundhedsfremmende virkning

Novum meeting, Stockholm, 27. Oktober, 2009, Karsten Kristiansen: Macronutrient interactions controlling adipose tissue development and energy homeostasis

DSF milk projekter, fællesmøde, København, 10.-11. januar, 2010, Karsten Kristiansen: Health promoting effects of milk-derived products, Overview and metagenomics

Foods for Health Workshop: Foods for Health Institute, UC Davis and Centre for Advanced Food Studies, Denmark, København 21.-22. juni, 2010, Karsten Kristiansen: The gut microbiota as a regulator of energy homeostasis

ICG5, Shenzhen, 17. november, 2010, Karsten Kristiansen: Mouse energy homeostasis and the gut metagenome

Mejeriforskningens Dag, Billund, 17. marts 2011 Karsten Kristiansen: Helsefremmende effekter af mælkebaserede produkter, Mælkebaserede produkter som regulator af fedtforbrænding – ikke alle kalorier er lige

Benzon Symposium, København, 30. August 2012, Karsten Kristiansen: Dietary modulation of the mouse gut microbiota and regulation of energy homeostasis

ICG 7, Hong Kong, 30. november 2012, Karsten Kristiansen: Dietary Modulation of the Mouse Gut Microbiota and Regulation of Energy Homeostasis

USDA, UC-Davis, LMC First International Workshop Diet & Human Health: The inputs to Phenotype, from Genetics to Food choices, Washington DC, 30. april 2012 Karsten Kristiansen: The human genome meets the modern environment

MFF styregruppemøde Axeltorv, København 10. maj, 2012, Karsten Kristiansen: Health promoting effects of milk-derived products

Mejeriforskningens Dag, Billund 11. april 2013, Karsten Kristiansen: Tarmens bakterier og deres betydning for menneskets sygdomme

Desuden har projektet været præsenteret gennem posters ved flere nationale som internationale møder.

***Publikationer og manuskripter under udarbejdelse***

Hansen CP, Berentzen TL, Halkjaer J, Tjonneland A, Sorensen TI, Overvad K, Jakobsen MU. (2012). Intake of ruminant trans fatty acids and changes in body weight and waist circumference. *Eur J Clin Nutr* 66, 1104-1109.

Yde, C.C., Ditlev, D.B., Reitelseder, S. & Bertram, H.C. 2013. Metabonomic Response to Milk Proteins after a Single Bout of Heavy Resistance Exercise Elucidated by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolites* 3, 33-46.

Lillefosse, H.H., Clausen, M.R., Yde, C.C., Ditte B. Ditlev, D.B., Zhang<sup>3</sup>, X., Du, Z.-Y., Bertram, H.C., Madsen, L., Kristiansen, K. & Liaset, B. (2014). Urinary Loss of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates as Revealed by Metabolomics Studies – An Underlying Mechanism to Reduce Lipid Accretion by Whey Protein Ingestion? *J. Proteome Res.*, in press.

Lillefosse, H.H., Du, Z.-Y., Ditlev, D.B., Thorsen, F.A., Madsen, L., Kristiansen, K. & Liaset, B. (2013). Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. *J. Nutrition*, 143, 1367-1375.

Bendtsen, L.Q., Lorenzen, J.K., Bendtsen, N.T., Rasmussen, C., Astrup, A. (2013). Effect of dairy proteins on appetite, energy expenditure, body weight, and composition: a review of the evidence from controlled clinical trials. *Adv Nutr.* 4, 418-438.

Soerensen, K.V., Thorning, T.K., Astrup, A., Kristensen, M. & Lorenzen, J.K. (2014). Effect of dairy calcium from cheese and milk on fecal fat excretion, blood lipids, and appetite in young men. *Am J Clin Nutr.* Mar 12. [Epub ahead of print].

Lorenzen, J.K., Jensen, S.K., Astrup, A. (2014). Milk minerals modify the effect of fatintake on serum lipid profile: results from an animal and a human short-termstudy. *Br J Nutr.* 111, 1412-1420.

Bendtsen, L.Q., Lorenzen, J.K., Gomes, S., Liaset, B., Holst, J.J., Ritz, C., Reitelseder, S., Sjødin, A.M. & Astrup, A. (2014) Effects of hydrolysed casein, intact casein and intact whey protein on energy expenditure and appetite regulation – A randomized, controlled, cross-over study. *Resubmitted to BJN*

Kjølbæk, L., Larsen, L.H., Lorenzen, J.K. & Astrup, A. Effects of habitual calcium intake on fecal fat excretion and blood lipid profile. *In preparation*

Xiao, L. Sonne, S.B., Qin, J., Wang, J., Erlich, S.D., et al. Madsen, L., Kristiansen, K. A catalog of the mouse metagenome. (2014). *In preparation.*

Sonne, S.B., Qin, J., Wang, J., Erlich, S.D., Madsen, Kristiansen, K et al. Dietary modulation of of the mouse metagenome. (2014). *In preparation*