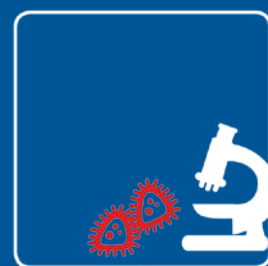


FIAF: Mælk som regulator af lipidmetabolisme og overvægt. Afdækning af mælks evn til at øge faste-induceret adipose faktor (FIAF)-aktivitet





Slutrapport for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

FIAF: Mælk som regulator af lipidmetabolisme og overvægt. Afdækning af mælks evne til at øge faste-induceret adipose faktor (FIAF)-aktivitet

FIAF – Milk in regulating lipid metabolism and overweight. Uncovering milk's ability to modulate the expression and activity of fasting-induced adipose factor FIAF

2. Projektleder

Professor, institutleder Arne V. Astrup, KU-LIFE, Institut for Idræt og Ernæring, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, tlf. 3533 2476, e-mail: ast@nexs.ku.dk (overordnet FØSU-projekt)

Lektor Trine Kastrup Dalsgaard Universitet, Institut for Fødevarer, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, tlf. 8715 7998, e-mail: trine.dalsgaard@food.au.dk (MFF)

3. Øvrige medarbejdere

- Trine Blædel, Institut for Idræt og Ernæring, Københavns Universitet, e-mail: trinebl@nexs.ku.dk
- Lesli Hingstrup Larsen, Institut for Idræt og Ernæring, Københavns Universitet, e-mail: lehla@nexs.ku.dk
- Karsten Kristiansen, Biologisk Institut, Københavns Universitet, e-mail: kk@bio.ku.dk
- Si Brask Sonne, Biologisk Institut, Københavns Universitet, e-mail: ssonne@bio.ku.dk
- Jacob Bak Holm, Biologisk Institut, Københavns Universitet, e-mail: jbholm@bio.ku.dk
- Hanne S. Tastesen, Biologisk Institut, Københavns Universitet, e-mail: hstastesen@bio.ku.dk
- Pia Kiilerich, Biologisk Institut, Københavns Universitet, e-mail: pkiilerich@bio.ku.dk
- Jette F. Young, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: jettef.young@food.au.dk
- Hanne C. Bertram, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: hannec.bertram@agrsci.dk
- Søren Drud Nielsen, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: Soren.DrudNielsen@food.au.dk
- Hong Zheng, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: Hong.Zheng@food.au.dk
- Madeleine Broman Toft, Aarhus Universitet, e-mail: matoft@badm.au.dk



- Bashar Amer, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: bashar.amer@food.au.dk
- Ulrik Kræmer Sundekilde, Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, e-mail: uksundekilde@food.au.dk

Endvidere er følgende partnere med i det bagvedliggende FØSU-projekt:

- Hanne Damgaard Poulsen og Karoline Blaabjerg, Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet
- Liisa Lähteenmäki, MAPP, Aarhus Universitet
- Jun Wang, BGI-Shenzhen, Kina
- Lise Madsen, Bjørn Liaset og Alexander Rønnevik, The National Institute of Nutrition and Seafood Research, Norge. Alexander Rønnevik er både tilknyttet NIFES og Københavns Universitet.
- Fredrik Bäckhed, Göteborg Universitet, Sahlgrenska Center for Cardiovascular and Metabolic Research, Sverige
- Henrik J. Andersen, Grith Mortensen, Janet Håkansson og Karin Arkbage, Arla Foods.

4. Finansieringskilder

DSF, FøSu

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF finansiering: 1. januar 2011 til 31. december 2015

Evt. revideret: 1. januar 2011 til 30. juni 2016

Projektperiode i alt, hvis del af større projekt: 1. januar 2011 til 31. december 2015.

Evt. revideret: 1. januar 2011 til 30. juni 2016

6. Projektresume

FIAF-projektets formål var at identificere den/de FIAF-inducerende komponent/er i mælk samt undersøge mælk indvirkning på fedtmetabolismen. I første del af projektperioden blev det vist, at den FIAF-inducerende komponent var en del af fedtfasen, og senere blev korte- og mellemkædede fedtsyrer i mælken identificeret til at være de primære faktorer for opregulering af FIAF-genet i *in vitro* forsøg. Disse resultater gav ophav til interventionsstudier på grise, mus og mennesker med henholdsvis kontroldiæt, + inulin og + mælk.

I griseinterventionsstudiet blev diæterne normaliseret i forhold til fedtniveauet, mens proteinniveauet var højere i mælkegruppen vs inulin- og kontrolgrupperne. Der blev observeret et øget FIAF-genudtryk i tyndtarmen efter 3 ugers mælkeind-



tag i forhold til kontrol- og inulingrupperne, hvorimod FIAF-udtrykket i fedtvæv, lever og muskler ikke blev påvirket af mælk. Kortkædede fedtsyrer var højere i den distale tyndtarm for inulinggruppen, mens udskillelse af langkædede fedtsyrer i fæces var højst i mælkegruppen. Udskillelsen af specifikke langkædede fedtsyrer blev eftervist i et humant interventionsstudie, hvor der diæterne dog var normaliseret i forhold til protein frem for fedt. I grisestudiet blev kort- og mellemkædede fedtsyrer (C4-C12) og de to oxidationsprodukter fra mellemkædede fedtsyrer 3-hydroxyadipic acid og suberic acid udskilt i et højere niveau via urinen i grisene, der fik mælk vs kontroldiæt. Undersøgelser af bakteriesammensætning i forskellige dele af tarmen, viste som forventet tydelige regionale forskelle. Overraskende var det mælkeinterventionen og ikke interventionen med inulin, der resulterede i de mest markante øgninger i antallet af butyratproducerende bakterier, hvilket dog ikke blev reflekteret i niveauet af butyrate (smørsyre).

Nyeste resultater fra litteraturen indikere, at FIAF-proteinet (ANGPTL4) kan hæmme aktiviteten af den pancreatiske lipase, som er ansvarlig for hydrolyse og optag af fedt fra tarm til blodbanen. Derfor blev udskillelsen af FIAF-proteinet undersøgt i henholdsvis cellestudier på plader med permeable membran og Ussing-kamre, hvor væv fra tyndtarmen fra grise blev anvendt. Eksponering af celler med fedtsyrerne C4-C8 viste, at FIAF-proteinet blev udskilt både til "tarm-" og "blod"-siden i det anvendte modelsystem med Caco-2-celler, således indikerende at FIAF-proteinet kan have en indflydelse på hydrolysegraden af triglycerid i tarmen og optag af fedtsyrer til blodbanen.

Til at forstå det mekaniske forhold omkring diætens indvirkning på mikrobiota i forhold til dyreart (mus versus gris) er der udført 12 ugers fodringforsøg på mus med den to af de samme diæter (basis-foder samt foder tilsat inulin) som blev anvendt til griseinterventionen. Forsøget viste 1) at mus fodret med grisefoder stadig bevarede et tarmmikrobiom, der lignede, det man finder hos mus fodret med normalt musefoder samt 2) at indtag af foder med tilsat inulin i mus som i gris kun gav mindre ændringer i tarmmikrobiomet.

Der blev fuldført et humant overkrydsningsforsøg med 3 interventioner af 3 uger med henholdsvis mælk, inulin og kontrol med fuld isokalorisk kost. Der blev ikke fundet forskelle på FIAF/ANGPTL4-niveauet i plasma eller på FIAF-geneexpression i fedtvæv for inulin- eller mælkegruppen sammenlignet med kontrolgruppen. Der blev dog fundet mindre ændringer i mikrobiomet, metabolitter og lipidkomposition i respons til inulin og mælk sammenlignet med kontrol. Prøverne fra det humane interventionsstudie er målt med henholdsvis NMR og GC-MS til henholdsvis untargetet metabolomics og kvantitativ analyse af FFA med ECF-FFA-metoden, der fornyligt blev optimeret til fæces. De primære resultater er en øget udskillelse af specifikke langkædede fedtsyrer i fæces fra mælkegruppen, hvilket understøtter resultaterne fra griseinterventionen samt et øget niveau af citrat af 2-hydroxyisobutyrat i urin.

Forbrugeranalysen med 1189 deltagende er færdig med Skyr som produkt. Fedtindholdet syntes at være den mest afgørende faktor for forbrugernes valg efterfulgt af produktets smag. Sundhedsteksten (health claim på kortkædede fedtsyrer) viste en mindre effekt på forbrugernes valg.

English

The main objective of the project was to **identify the FIAF-inducing milk compound (FIAF-IMC)** and to **elucidate the basic mechanisms by which FIAF-IMC affects induction of FIAF and subsequently weight and energy homeostasis in animals and humans**. The first aim was to identify the FIAF-imc and an *in*



in vitro screening assay we first isolated the compound to be situated in the fat fraction. Short- and medium chain fatty acids were shown to be the primary compounds responsible for the up-regulation of the FIAF-gene. In relation to these results three interventions in pig, mice and humans were conducted with a control diet, + inulin and + milk, given that inulin a dietary fiber is known to increase bacteria cultures that produce short chain fatty acids.

In the pig study the diets were normalized according to fat content resulting in a higher protein content in the milk diet than in the control and inulin groups. After three weeks of **milk** intervention the intestine showed a higher FIAF-gene expression than the other two groups, but no other tissue (fat, liver, and muscle) showed any changes in the FIAF-gene expression in any of the three groups. Analyzing the intestinal content and feces for individual FFAs revealed higher levels of short chain fatty acids (C2, C3, C4, iso-C5, 2-methyl-C4, and C6) in the distal small intestine in the inulin group while excretion of long chain fatty acids in the feces was higher in the milk group compared to the control- and inulin groups. The water soluble short- and medium chain fatty acids (C4-C12) and the two oxidation products origin from medium chain fatty acids 3-hydroxyadipic acid and suberic acid were excreted in higher levels in urine from the pigs given milk vs the control group.

To understand the mechanism behind species, diets and microbiota a mice study was conducted using two of the same diets (inulin, and control) used in the pig study. The experiment showed 1) that mice fed the pig feed maintained a gut microbiome similar to that observe in mice fed normal regular mouse feed and 2) that ingestion of feed supplemented with inulin as observed in the pig intervention studies only elicited minor changes in the composition of the gut microbiome.

A humane crossover intervention study was performed with 3 diets (milk, inulin and control) over a period of 3 weeks using a full isocaloric diet normalized according to protein instead of fat as in the pig and mice study. No differences was observe between levels of the FIAF-protein in plasma or FIAF gene expression in the adipose tissue for the milk or inulin vs the control group. Minor changes were observed in the microbiome, metabolites and lipid composition in response to inulin and milk vs. the control group. The primary changes were increased excretion of urinary citrate and 2-hydroxyisobutyrate and increased excretion of some of the long chain fatty acids in feces in the milk group the latter correlating with the results obtained in the pig study.

A consumer survey (N=1189) was carried out in co-operation between AU MAPP and Arla Foods. The study explored the role of values, self-identity, and health orientation in the perception of health messages that varied in congruency. Skyr was chosen as the target product as it has a high health image (high protein, low fat) and adding a fat-based benefit creates an incongruent health message. The findings from the survey confirm that Skyr is perceived as having a strong healthy image and, regardless of any additional benefits promised, low fat content remains as the most important feature when making their choices followed by not having added flavour (natural vs fruit). The possible new health benefits expressed in package information had no significant role in intentions

7. Projektets formål

Studier har vist, at indtagelse af mejeriprodukter kan have en vægtregulerende effekt. Der er foreslået forskellige forklaringer herpå, men ingen har knækket koden – sandsynligvis fordi forklaringen skal findes i en kombination af effekter.

Egne resultater viser, at der i tarmceller sker en opregulering af det gen, der koder for proteinet 'fasting-induced adipose factor' (FIAF), når tarmcellerne stimuleres



med mælk. FIAF stimulerer fedtforbrændingen og hæmmer lipoprotein lipase. Således er det muligt, at FIAF kan påvirke udviklingen af en række livsstilssygdomme positivt.

Med udgangspunkt i denne viden vil projektet:

- Undersøge mælkens effekt på opregulering af FIAF.
- Klarlægge mekanismerne bag en mulig vægtregulering.
- Klarlægge om mælk indirekte kan påvirke vægtreguleringen via tarmbakterierne.
- Identificere komponent(er) i mælken, der aktiverer genet, og udforske effekten i dyre- og menneskeforsøg.
- Klarlægge om stabiliteten af den FIAF-inducerende komponent i mælk påvirkes af fx forarbejdning.
- Undersøge forbrugernes holdning til specifikke sundhedsanprisninger af basisfødevarer og identificere mulige kommunikationsveje.

English:

Recent studies have indicated that milk and milk products, apart from serving as important nutrients, may regulate energy uptake and expenditure. One suggestion is that milk contains components, which may diminish uptake of lipids from the intestine, reduce uptake into fat cells, and/or increase lipid oxidation. In preliminary experiments, we have provided evidence for a novel mechanism by which milk may regulate body weight by showing the presence of components in milk that enhance the expression of the so-called fasting-induced adipose factor (FIAF; also named Angptl4). Increased levels of FIAF in circulation have been shown to inhibit lipoprotein lipase (LPL) and thereby reduce lipid uptake in target organs. FIAF was identified as a factor secreted from adipose tissue, but it is also produced in the liver and the intestinal mucosa. The gut microbiota has been shown to regulate expression and secretion of FIAF. Thus, **the main purpose of the project is to identify the component(s) in milk leading to enhanced expression of FIAF and to elucidate the mechanisms by which FIAF-inducing milk component(s) (abbreviated FIAF-IMC) may regulate body weight and energy homeostasis, using animal and human intervention studies.**

8. Projektets baggrund

Helt nye data fra vores laboratorium viser, at mælk kan øge faste-induceret adipose faktor (FIAF)-aktivitet. Projektets hovedformål er derfor at identificere og karakterisere den/de i mælk værende komponent(er)(FIAF-inducerende), der forhindrer fedtoplagering og stimulerer fedtmobilisering *in vivo*. Ydermere vil identifikation af målbare biomarkører for FIAF-aktivitet samt fedtlagring og -mobilisering i dyremodeller være med til at forklare de bagvedliggende mekanismer. Denne viden benyttes i humane interventionsstudier til at klarlægge effekten af mælks indflydelse på fedtoptag. Studiet vil endvidere klarlægge, hvor i mælkematrixen den FIAF-inducerende komponent findes, om der er indflydelse af korace, samt hvorledes aktiviteten påvirkes af forskellige mejeriteknologiske behandlinger. En påvist sundhedsunderstøttende effekt af mælk og mejeriprodukter vil have afgørende betydning for accepten af mejeriprodukters rolle i en sund og afbalanceret kost, og projektets resultater kan dermed få stor betydning i ernæringsdebatten.

Overvægt og fedme er den vestlige verdens største sundhedsmæssige udfordring i øjeblikket. The National Health and Nutrition Examination Survey's (NHANES) studie I2 og III3 har tydeligt vist, at højere indtag af calcium/fødevarer med



højt calciumindhold herunder mejeriprodukter er negativt korreleret med kropsvægt. Disse to studier har været baggrund for et stort antal undersøgelser, der har skullet klarlægge sammenhængen mellem calcium og/eller indtag af mejeriprodukter på kropssammensætning. Indtag af mælkecalcium er endvidere fundet at øge udskillelsen af fedt via fæces. Det er dog samtidigt erkendt, at denne specifikke fedtudskillelse ikke kan forklare hele den effekt, mejeriprodukter har vist sig at have på vægtregulering i observationsstudier. En anden mulig forklaring, kan være, at specifikke mælkeproteiner via regulering af plasmagaldesyre, kan øge forbrændingen af fedt i fedtceller. Et nyt studie har bekræftet den ovenfor nævnte omvendte korrelation mellem indtagelse af mælk og 'body mass index' (BMI) i 8-årige drenge. Mælken, der indgik i dette studie var fuldfed, hvilket kan virke noget overraskende taget det højere energiindhold i fuldfed mælk i betragtning. Dette kunne tyde på, at der er en helt ukendt vægtregulerende effekt af mælk, der er langt vigtigere end de hidtil belyste mekanismer. Helt nye forsøg i vores laboratorium har vist, at humane tarmceller, der eksponeres til mælk, opregulerer FIAF-genet, og resultaterne viser samtidigt, at fuldfed mælk har højere aktivitet end skummetmælk. **Det er vores hypotese, at den FIAF-inducerende komponent i mælk kan bidrage til at forhindre fedtoplagring og stimulere fedtmobilisering *in vivo*.**

I dyremodeller er det vist, at mængden af udtrykt FIAF-gen er negativt korreleret til fedtoptaget i tarmen, og overekspression af genet kunne reducere fedtvævet vægt med op til 50 procent. Karakterisering af komponenten vil derfor være af afgørende betydning for at opnå en klar forståelse af, hvordan næringsoptaget i tarmen virker, når mælk indtages som en del af måltidet. Set i forhold til samfundets største nuværende problemer med fedme, overvægt og livsstilssygdomme, kan en forståelse af, hvordan denne komponent påvirker fedtoptaget være af afgørende betydning for befolkningens sundhedstilstand, samt påvirke ernæringsvejlederes syn på indtagelse af mælk i det "hele måltid". **Formålet er derfor at identificere og karakterisere den aktive komponent i mælk og vise dens effekt i humane studier**

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet består af fem arbejdsopgaver:

WP1. Identification and stability of the FIAF-inducing milk component(s)

WP2. In vitro and in vivo animal model systems

WP3. Human intervention studies

WP4. Metabonomics

WP5. Consumer perception of health benefits

10. Projektets resultater

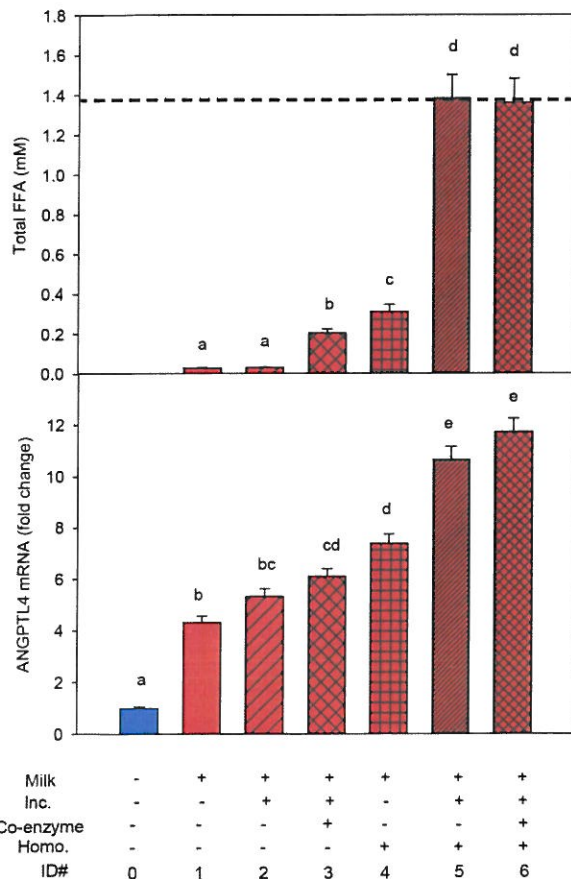
Identifikation og stabilitet af FIAF-inducerende komponent

FIAF-projektets formål var at identificere den FIAF-inducerende komponent i mælk samt undersøge mælks indvirkning på fedtmetabolismen. Da vi tidligere havde vist, at mælk opregulerer ekspressionen af FIAF-genet i en human tarmcellelinje, fortsatte vi detektivarbejdet med identifikationen af den/de FIAF-inducerende komponenter. Separation af mælken i fedt og skummet mælk viste, at de FIAF-opregulerende komponenter primært fandtes i mælkenes fedtfraktion. En hypotese var, at fedtsyrerne var de primære FIAF-inducerende komponenter. For at eftervise dette blev disse øget i mælken ved at aktivere mælkenes naturlige lipase



(LPL). Ikke-pasteuriseret mælk blev homogeniseret og LPLs co-enzym apo CII blev tilsat til mælken, hvilket skulle give højere niveauer af frie fedtsyrer, som kunne øge FIAF-gendtrykket yderligere. Homogenisering og co-enzymet øgede hver især FFA-niveauet og FIAF-gendtrykket, men tilsætning af co-enzym til homogeniseret mælk ikke gav nogen synergetisk effekt (Figur 1).

Udvalgte individuelle mælkerellevante fedtsyrer blev testet i det niveau, som den totale mængde fedtsyre fundet i den homogeniserede og lipaseaktiverede mælk, Dette viste, at de individuelle fedtsyrer kan opregulere FIAF-gendtrykket, men ikke i samme opfang som mælken med højt fedtsyreindhold. Derfor blev alle identificerede fedtsyrer fra mælken samlet i den koncentration, de har i homogeniseret og lipaseaktiveret mælk. Opreguleringen af FIAF-gendtrykket forårsaget af de samlede fedtsyrer svarede til opreguleringen fundet af den homogeniserede og lipaseaktiverede mælk, hvilket indikerer en synergetisk effekt fedtsyrerne imellem. Korte- og mellemkædede fedtsyrer (C4-C12) var de mest potente fedtsyrer i forhold til inducering af FIAF-gen-udtrykket (data ikke vist). Test af enkelte FFA viste at C12 havde den højeste påvirkning på FIAF-gendtrykket (Figur 2).

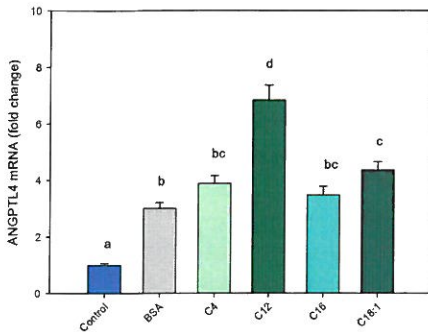


Figur 1 Effekten af forskellige behandlinger på niveauerne af frie fedtsyrer og FIAF(ANGPTL4)-gendtrykket *in vitro*. Inc = inkubering over nat ved stuetemperatur. Coenzyme = apo CII, homo= homogenisering før pasteurisering. Resultaterne er vist som middelværdi \pm SEM, n=3 (P<0.05).

Mekanismer bag FIAF-induktion

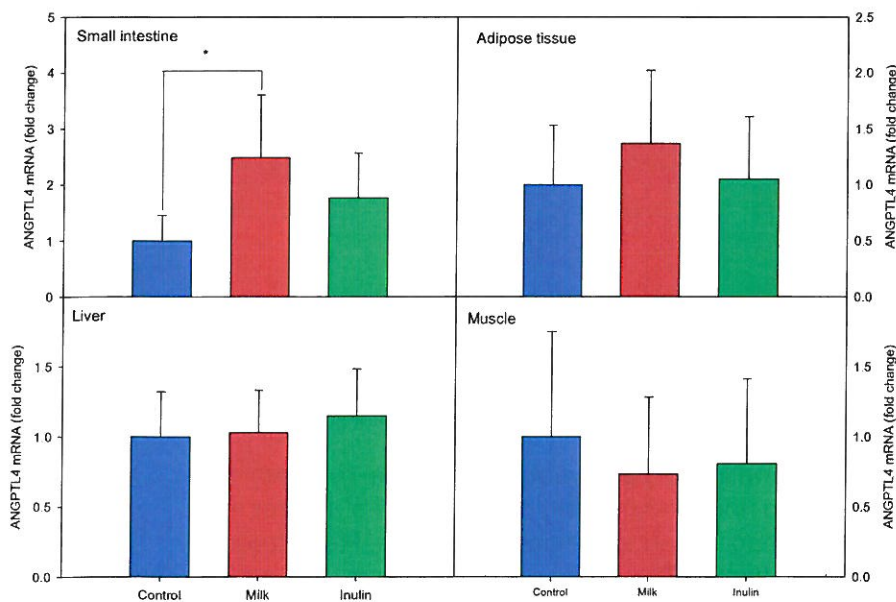
Den nederste del af tyndtarmen fra grise blev brugt i Ussingkammerforsøg, hvor grisetarmen blev eksponeret med henholdsvis 3 eller 9 mM kortkædede fedtsyrer (C4, C6 og C8 i forholdet 1:1:1) i 2,5 time. FIAF-gendtrykket blev bestemt i det øverste tarmcellevæv efter endt eksponering, og der blev fundet et øget FIAF-gendtryk i tarmcellerne, der havde været eksponeret for henholdsvis 3 og 9 mM

fedtsyre, men der var ingen signifikant forskel de to niveauer af kortkædede fedtsyrer imellem (data ikke vist).

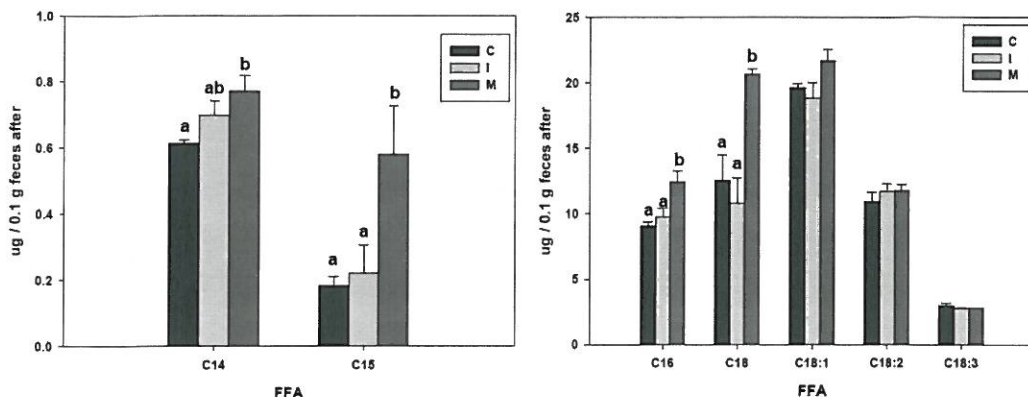


Figur 2 Forskellige fedtsyrer evne til at inducere opregulering af FIAF-genet *in vitro*.

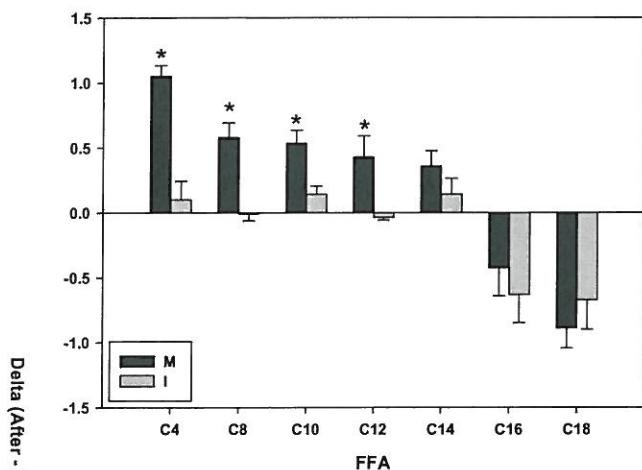
Et griseintervention med 9 kuld grise, inklusiv kontrol og behandling med mælk og inulin indenfor hvert kuld blev udført. Det overordnede resultat var et øget FIAF-udtryk i tyndtarmen hos grise, der havde fået mælk i diæten sammenlignet med kontrol- og inulingruppen (Figur 3). Serum fra alle grisene blev analyseret for triglycerider, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol. Den eneste forskel var et signifikant lavere niveau af HDL-kolesterol i inulin gruppen. Kortkædede fedtsyrer var højere i den distale tyndtarm for inulingruppen, mens udskillelse af langkædede fedtsyrer i fæces var højst i mælkegruppen (Figur 4). Udskillelsen af langkædede fedtsyrer blev eftervist i et humant interventionsstudie, hvor diæterne dog var normaliseret i forhold til protein. Udskillelse af korte- og mellemkædede fedtsyrer (Figur 5) samt oxidationsprodukter af mellemkædede fedtsyrer blev udskilt via urinen i griseinterventionen (data not shown).



Figur 3. FIAF/ANGPTL4-udtryk i tyndtarmen, fedtvæv, lever og muskelvæv efter indtag af kontrol-, mælk-, og inulindiæt.



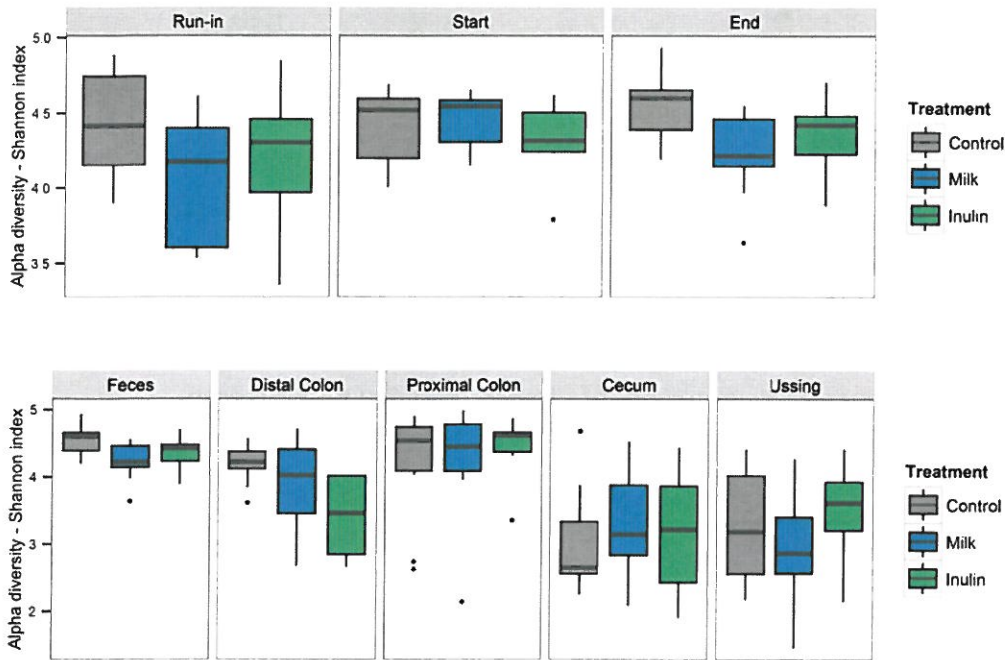
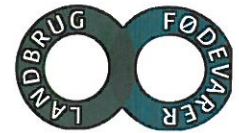
Figur 4. Forskelle i langkædede fedtsyreniveauer i fæces efter 3 ugers griser intervention med diæterne: C=kontrol, I= inulin og M= mælk.



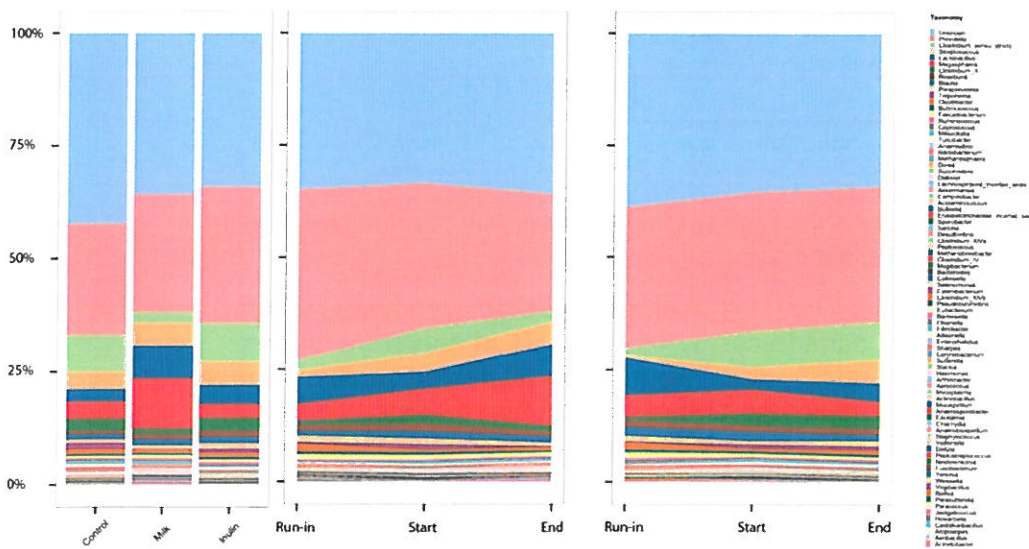
Figur 5 Udskillelse af fedtsyrer efter 3 ugers griseintervention. Ændringer i mælke- og inulingruppen beregnet relativt til kontrolgruppen.

I forsøget blev bakterielt DNA isoleret fra prøver af indholdet i tyndtarm, cecum, øvre og nedre del af tyktarm, samt fæces. DNA kvaliteten af prøver fra tyndtarmen var dog for dårlig til at foretage pålidelige analyser af mikrobiomet, og derfor blev disse prøver ikke underkastet 16S rDNA amplicon sekventering. Forsøget viste tydeligt betydningen af en run-in periode for at udjævne forskelle i mikrobiota mellem de enkelte grupper (Figur 6).

De forskellige fodertyper ændrede ikke den generelle diversitet af tarmmikrobiomet signifikant, hverken målt inden for en prøve (Figur 6) eller mellem prøver (ikke vist). På slægtniveau fandtes de største ændringer af tarmmikrobiomet i forhold til kontrolgruppen overraskende i mælkeintervention, hvor vi observerede en øget forekomst af *Megashaera* og ikke overraskende *Lactobacillus*, og en nedgang i *Clostridium* og *Prevotella* (Figur 7). Et manuskript omhandlende dette forsøg er under udarbejdelse.



Figur 6. Effekten af run-in og foder på sammensætningen af tarmmikrobiomet.

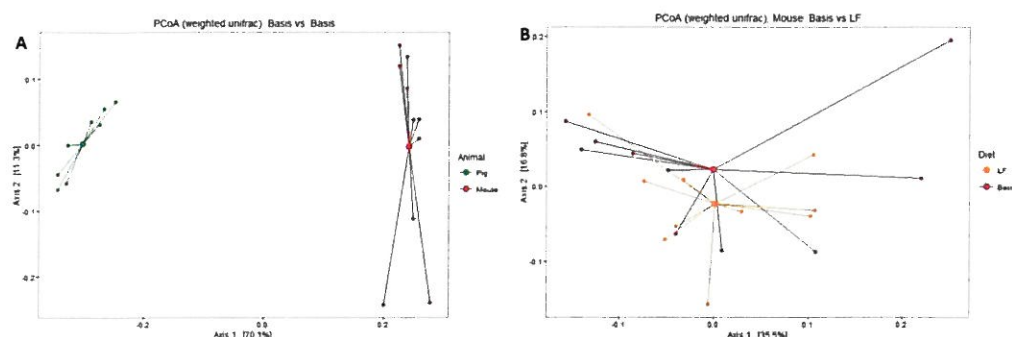


Figur 7. Ændringer i tarmmikrobiomet målt ved 16S rDNA analyser af bakterielkt DNA isoleret fra fæces prøver

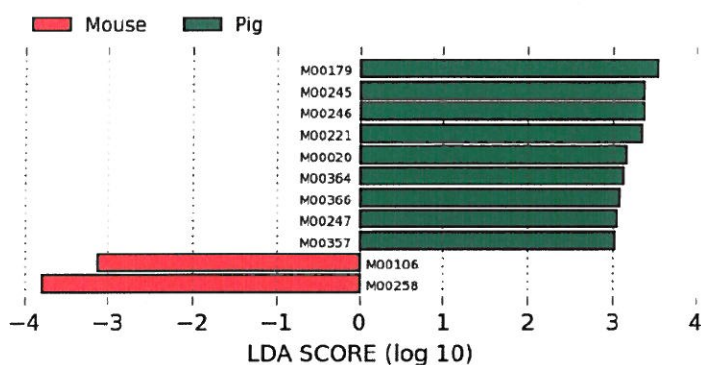
Der er foretaget et forsøg hvor mus gennem 12 uger er blevet fodret med det samme foder, som blev anvendt i griseinterventionsforsøget for at undersøge om 1) indtag af grisefoder ville ændre mikrobiomet i mus mod det, der findes hos grisen, og 2) for at undersøge om de ændringer i mikrobiomet, der kunne observeres i grise kunne repliceres i musen. I forsøget blev musene fodret med et normalt lav-fedt musefoder, basis-grisefoderet og grisefoder suppleret med inulin. Forsøget viste at indtag af basis-grisefoderet kun i meget begrænset omfang ændrede mikrobiotaen hos mus, hvor den store forskel i mikrobiotaen mellem gris og mus blev bibeholdt (Figur 8).

Forsøget viste også at mus og gris stadig udviser klare funktionelle forskelle selv efter fodring af mus med grisefoder (Figur 9).

I lighed med griseinterventionstudiet fandt vi kun mindre ændringer i mikrobiomet efter indtag af foder suppleret med inulin og ingen øget forekomst af butyratproducerende bakterier (Figur 10). Et manuskript omhandlende dette forsøg er under udarbejdelse.

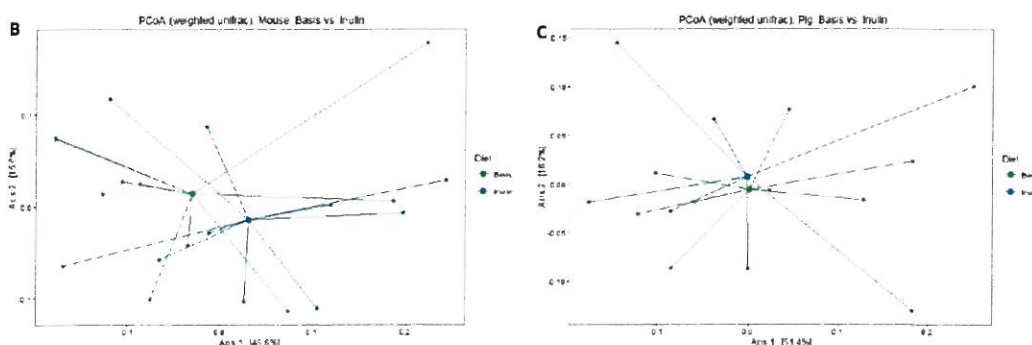


Figur 8. Indtag af grisefoder har kun ringe indvirkning på musens tarmmikrobiom.



Module Nr.	Predicted function of module from the KEGG database	
M00179	Genetic information processing	Ribosome, archaea
M00245	Environmental information processing	Cobalt/nickel transport system
M00246	Environmental information processing	Nickel transport system
M00221	Environmental information processing	Putative simple sugar transport system
M00020	Nucleotide and amino acid metabolism	Serine biosynthesis, glycerate-3P => serine
M00365	Carbohydrate and lipid metabolism	C10-C20 isoprenoid biosynthesis, bacteria
M00366	Carbohydrate and lipid metabolism	C10-C20 isoprenoid biosynthesis, plants
M00247	Environmental information processing	Putative ABC transport system
M00357	Energy metabolism	Methanogenesis, acetate => methane
M00106	Carbohydrate and lipid metabolism	Conjugated bile acid biosynthesis
M00258	Environmental information processing	Putative ABC transport system

Figur 9. Funktionelle forskelle mellem mikrobiomet i mus og gris.



Figur 10. Indtag af foder suppleret med inulin medfører kun mindre ændringer af tarmmikrobiomet i mus og gris.



Der er planlagt interventionsforsøg i kimfri mus. Disse er imidlertid blevet forsinket pga infektioner i den kimfri facilitet. Disse forsøg vil blive gennemført i løbet af efteråret 2016.

Der er fuldført et **humant overkrydsningsforsøg** med 3 interventioner af 3 uger med henholdsvis mælk, inulin og kontrol med fuld isokalorisk kost. Der blev ikke fundet forskelle i plasma FIAF eller FIAF ekspresion i fedtvæv for inulin eller mælk sammenlignet med kontrol kosten. Der blev dog fundet mindre ændringer i mikrobiomet, metabolitter og lipidkomposition i respons til inulin og mælk sammenlignet med kontrol. NMR-baseret metabolomics blev anvendt til at bestemme effekterne af det humane interventionsstudie. Metabolomet på urin- og blodprøver efter interventionen blev sammenlignet med baggrundsprøver for at fjerne individvariation. Metabolomanalyserne på urinprøver viste mindre ændringer i få metabolitter; 2-hydroxyisobutyrat, citrat og format blev fundet i signifikant forøgede mængder i urinen fra mælkeidæten sammenlignet med kontroldiæten. Der observeredes ingen ændringer i mellem inulin og kontroldiæten i urinprøver. Ligeledes kunne vi ikke identificere ændringer i metabolomet af blod eller fæces forårsaget af diæterne. GC-MS blev anvendt til kvantitativ analyse af FFA med ECF-FFA-metoden, der fornyligt blev optimeret til fæces. De primære resultater er en øget udskillelse af langkædede fedtsyrer i fæces fra mælkegruppen (Tabel 1), hvilket understøtter resultaterne fra griseinterventionen. Der sås derimod ingen ændringer i kort- og mellemkædede fedtsyrer i urinen i gruppen med mælkeidæten i det humane interventionsstudie, hvilket der sås i griseinterventionen.

Tabel 1. FFA i fæces efter endt intervention.

Fatty acid (µg/mL)	Control		Inulin		Milk		Inulin vs. Control	Milk vs. Control
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	P	p
C12:0	1.1	0.4	0.7	0.06	0.76	0.10	0.27	0.45
C14:0	1.8	0.2	1.7	0.2	2.17	0.15	1.00	0.52
Trans-16:1n-7	4.1	0.6	4.2	0.5	4.48	0.50	1.00	0.93
C16:0	27.0	2.5	30.0	2.3	36.3	3.0	0.91	0.046*
C17:1	0.7	0.05	0.7	0.03	0.7	0.03	1.00	0.95
C17:0	0.6	0.03	0.6	0.03	0.7	0.05	0.99	0.07
C18:2n-6	16.5	1.6	19.2	1.5	23.7	2.4	0.80	0.02*
C18:1n-9	45.0	6.0	48.1	3.7	53.0	3.3	0.99	0.55
C18:3n-3	1.6	0.2	1.4	0.2	1.9	0.2	0.95	0.57
C18:0	13.5	0.8	14.7	1.0	17.9	1.6	0.95	0.02*
Σ FFA	111.1	11.5	120.7	8.6	141.3	9.7	0.95	0.12

Data represent mean ± standard error (SE). Data were analyzed using mixed models with participants as random effect. All models were adjusted for age and weight. Significance was determined as $p < 0.05$. FFA: Free fatty acid.

A **consumer survey** (N=1189) was carried out in co-operation with AU MAPP and Arla Foods. The study explored the role of values, self-identity, and health orientation in the perception of health messages that varied in congruency. Skyr was chosen as the target product as it has a high health image (high protein, low fat) and adding a fat-based benefit creates an incongruent health message. The findings from the survey confirm that Skyr is perceived as having a strong healthy image and, regardless of any additional benefits promised, low fat content remains as the most important feature when making their choices followed by not having added flavour (natural vs fruit). The possible new health benefits expressed in package information had no significant role in intentions.

Although health messages did not have a major impact in intentions to choose products, the perception of weight-related benefits was rated higher among those



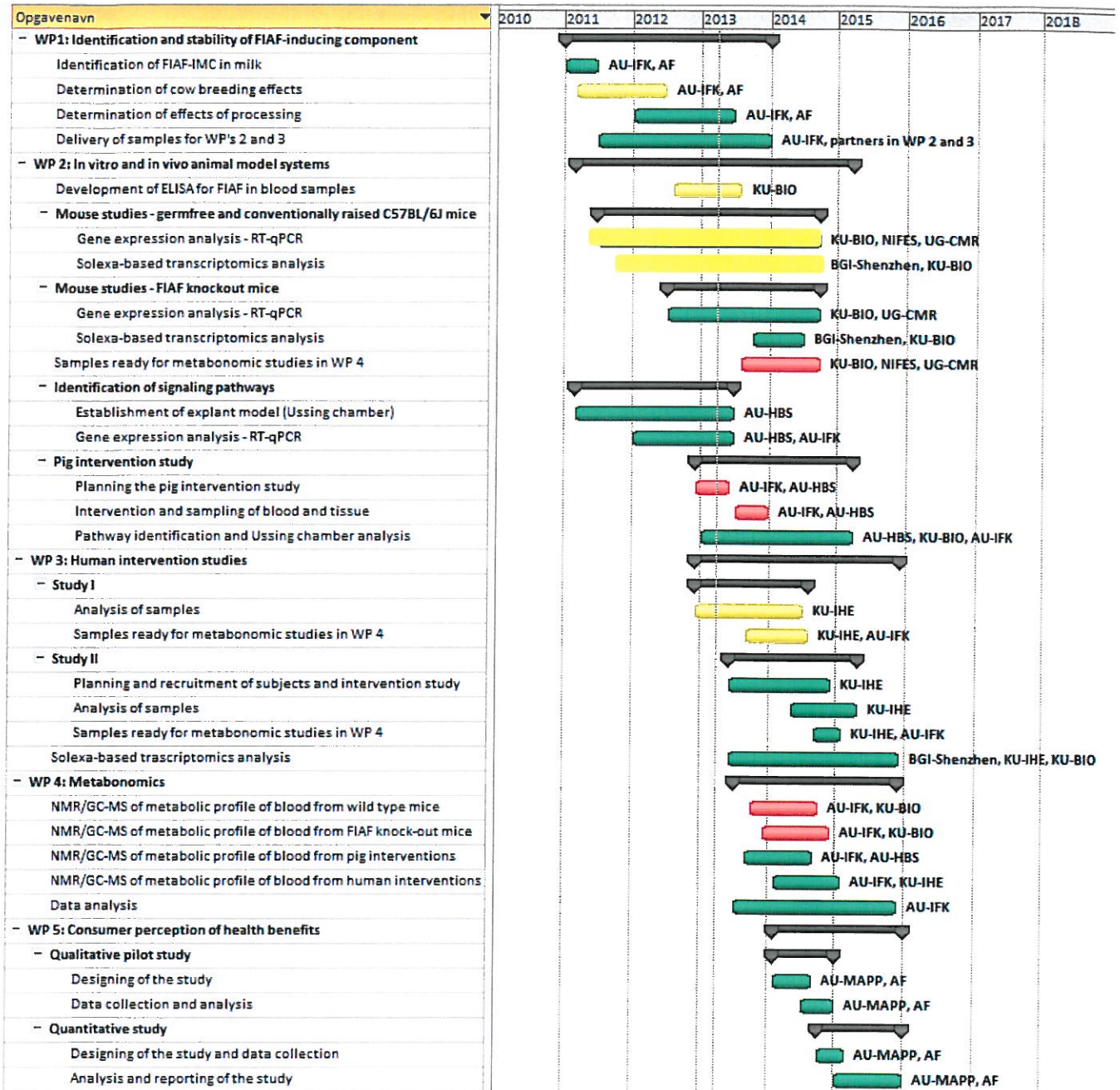
who found health more important in their choices, especially benefits related to protein content. The claim related to improved satiety was rated higher by those who wished to lose or maintain their weight than by those who did not pay attention to the weight. Thus, the messages in the claims were perceived, but in a product with high existing health image the claim did not provide additional value that would have been reflected on intentions to buy the products. For Danish consumers skyr is strongly positioned as a healthy product that trying to shift that image with information is hard to attain.

11. Afvigelser

Ændringer i den faglige del af projektet er illustreret i gantt-diagrammet nedenfor.

Opdateret ganttkort:

Grøn farve angiver aktiviteter, der kører som planlagt, gul angiver aktiviteter, der er ændrede i forhold til den oprindelige projektbeskrivelse, og rød angiver aktiviteter, der er forsinkede.



Kommentarer til gantt kort:

WP 1. Identification and stability of FIAF-inducing component

Effekt af korace er ikke undersøgt i detaljer, og dette forventes ikke gjort, da der ingen effekt er set med et begrænset antal dyr.

WP 2. In vitro and in vivo animal model systems

Eksisterende FIAF ELISA-systemer er usikre, og vi prøver i stedet i samarbejde med Hong Kong University at anvende Western blotting.

Interventionsforsøg med grise blev forsinket, men fuldført.



FIAF-knockoutmuseforsøget blev ikke gennemført. I stedet gennemførtes et musestudie, hvor diæterne fra griseinterventionen blev anvendt.

WP 3. Human intervention studies

De to humane interventionsstudier til et forsøg med flere interventionsperioder samt analyseres på prøver fra allerede udførte forsøg (+/- mejeriprodukter, undersøgelse af vægttab og vægtvedligeholdelse). Forsøget blev en anelse forsinket, men er fuldført

11.1 Fagligt

Projektet har måttet drejes en smule, da det ikke har været muligt at identificere en enkeltstående komponent, som er ansvarlig for den FIAF-inducerende effekt. Derfor blev mælk sammenlignet med en inulindiæt interventionsstudierne med mus, gris og human.

11.2 Økonomisk

11.3 Tidsplan

Projektet blev et år forsinket.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribruget

Tidligere studier har vist, at kortkædede fedtsyrer inducere FIAF/ANGPTL4- genet og dermed også produktionen af FIAF-proteinet, der kan hæmme lipoprotein lipasen og dermed hæmme optaget af fedt fra blodbane til fedtvæv. Ligeledes har der været et vægtparadoks i forhold til indtag af mælk, hvor FIAF-studiet giver indblik i én af de bagvedliggende mekanismer, der kan være med til at forstå, hvorfor indtag af mælk kan være med til at opretholde vægten.

FIAF-projektet har givet ny indsigt i, hvorledes **mellemkædede fedtsyrer** øger produktionen af FIAF/ANGPTL4-proteinet i tarmvævet, og hvorledes proteinet både udskilles til blodbane og tarm, hvor det kan hæmme henholdsvis lipoprotein lipasen i blodbanen, hvilket er velkendt, men i tarmen også den pancreatiske lipase og dermed sænke optaget af fedtsyrer fra tarmen, hvilket er ny viden. Disse resultater kan være med til at kaste lys over én af flere mulige mekanismer, der er med til at forklare mælks og mejeriprodukters positive effekt på vægt. Selvom der ikke i det humane interventionsstudie kunne vises nogen effekt på FIAF-udtryk eller vægt, har de mekanistiske studier i projektet belyst på de positive effekter, som mælkefedt og mejeriprodukter synes at have på metabolismen og vægtregulering.

Forståelse af mælks og inulins effekt på tarmfloraen kan være med til at forstå nogle af de uopklarede mekanismer omkring optag af næringsstoffer.

En ny GC-MS QToF metabolomics platform blev udviklet og denne synes at være et godt supplement til allerede eksisterende LC-MS og NMR platforme, og med hensyn til lipidmetabolitter, synes den at være overtruffen.

Ydermere blev der først i projektet udviklet en ny analysemetode til at kvantificere frie fedtsyrer i mælk, som efterfølgende blev optimeret til plasma og fæces. Mælksens indhold af frie fedtsyrer er vigtig både i relation til teknologisk/smagsmæssig kvalitet og ernæringsmæssig kvalitet, hvorfor denne analysemetode udgør et væ-



sentligt redskab i mælkerelateret forskning. Den udviklede metode kan bruges direkte som referencemetode til at optimere hurtigmetoder, hvis mejeriindustrien finder det fordelagtigt.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

1. Liisberg, U, Myrmel, LS, Fjære, E, Rønnevik, AK, Kristin, SB, Fauske, R, Holm, JB Basse, AL, Hansen, JB, Liaset, B, Kristiansen, K, & Madsen, L (2016). The protein source determines the potential of high protein diets to attenuate obesity development in C57BL/6J mice. Published pre-print. *Adipocytes*.
2. Nielsen, SD, Amer, B, Mortensen, G, Petersen, RK, Kristiansen, K, Young, JF, & Dalsgaard, TK. (2015). Medium chain fatty acids from milk induce angiopoietin-like 4 (*ANGPTL4*) gene expression. *Int. Dairy J.* 42, 34-41 DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.10.011.
3. Amer, B, Nebel, C, Bertram, HC, Mortensen, G, Dalsgaard, TK (2015). Direct derivatization vs. liquid extraction methods of fecal free fatty acids for GC-MS analysis. *Lipids*, 50, 681-689, DOI: 10.1007/s11745-015-4029-5.
4. Zheng, H Clausen, MR, Dalsgaard, TK and Bertram, HC (2015). Metabolomics to Explore Impact of Dairy Intake Nutrients, 7, 4875-4896. doi:10.3390/nu70x000x
5. Nielsen, SD, Jessen, R, Dalsgaard, TK, Young, JF. (2015). Secretion of angiopoietin-like 4 protein from intestinal cells. *J. Funct. Foods Health Disease*, 5, 57-66.
6. Nielsen, SD, Young, JF, Mortensen, G, Petersen, RK, Kristiansen, K, & Dalsgaard, TK (2014). Activation of the angiopoietin-like 4 (*ANGPLT4*) gene by milk fat and casein. *Int. Dairy J.* 36, 136-142.
7. Hong Zheng, Morten Rahr Clausen, Trine Kastrup Dalsgaard, Grith Mortensen & Hanne C. Bertram 2013. A time-saving design of experiment protocol for optimization of LC-MS data processing in metabolomics approaches. *Anal. Chem.* 85 (15), 7109-7116. DOI: 10.1021/ac4020325.
8. Blædel, T, Holm, JB, Sundekilde, UK, Schmedes, MS, Hess, AL, Lorenzen, JK, Kristiansen, K, Dalsgaard, TK, Astrup, A, Larsen, LH. A randomized, controlled, crossover study of the effect of diet on Angiopoietin-like protein 4 (*ANGPTL4*) through modification of the gut microbiome. Manuscript submitted to *Brit. J. Nutr.*

Planlagte publikationer i preparation

9. Nielsen, SD, Amer, B, Blaabjerg, K, Dalsgaard, TK, Jessen, R, Petrat-Melin, B, Krøyer, M, Poulsen, HD, Young, JF. Whole milk increases intestinal *ANGPTL4* expression and excretion of fatty acids through feces and urine. *Manuscript in prep.* Will be submitted to *J. Agrsci. Food Chem.*
10. Blædel, T, Kjølbaek, L, Hess, AL, Kersten, S, Lorenzen, JK, Astrup, A, Larsen LH. The association between Angiopoietin-like protein 4 and lipid metabolism during weight management. *Manuscript in prep.*



11. Blædel, T, Valsesia, A, Viuerie, N, Cara AD, Armenise, C, Lefebvre, G, Charon, C, Astrup, A, Langin, D, Hager, J, Saris, W, Larsen LH. Genetic variants and expression of Angiopoietin-like Protein 4 in obesity: The DiOGenes study. *Manuscript in prep.*
12. Hess, AL, Blædel, T, Valsesia, A, Hager, J, Astrup, A, Saris, W, Cara, AD, Larsen, LH. Analysis of Plasma Angiopoietin-Like Protein 3 Genetic Variants in Lipid Metabolism. *Manuscript in prep.*
13. Lamichhane, S, Sundekilde, UK, Blædel, T, Hess, AL, Lorenzen, JK, Astrup, A, Larsen, LH, Young, JF, Bertram, HC. Impact of sample preparation on stability of metabolites in human fecal metabolomics studies. *Manuscript in prep.* Will be submitted to *Analyst or Anal. Chem.*
14. Amer, B, Zheng, H, Nielsen, SD, Bertram, HC, Young, JF, Dalsgaard, TK. Short chain fatty acids in intestine section after intake of milk and inulin diets. *Manuscript in prep.*

Populærvideenskabelig formidling:

1. Søren Drud Nielsen, Jette Feveile Young, Dalsgaard, Trine Kastrup (2013). Virker mælk slankende? *Ny KvægForskning*, 11 (6): 3. ISSN 1603-600X.
2. Søren Drud Nielsen, Trine K. Dalsgaard, Jette F. Young, Grith Mortensen, Janne K. Lorenzen, Arne Astrup, Karsten Kristiansen og Lise Madsen. 2013. Mælk der slanker? *Mælkeritidende* 126 (2): 8-9.

Posters og conferenceindlæg:

1. Young, J.F., Nielsen, S.D., Amer, B., Mortensen, G., Petrat-Meling, B., Jessen, R., Dalsgaard, T.K. Milk fat derived FFA induces angiopoietin-like 4 gene expression and protein secretion from intestinal cells. 17th International Conference of Functional Food Center. 5th International Symposium of the Academic Society of Functional Foods and Bioactive Compounds, 18-19 November 2014, California, USA.
2. Young, J.F., Nielsen, S.D., Dalsgaard, T.K., Rasmussen, M.K., Ekstrand, B. qPCR for Food Quality and Identification of Bioactive Components in Foods. 2nd qPCR and Digital PCR Congress, 20-21. October 2014, London, UK.
3. Karsten Kristiansen, mundtligt indlæg: The gut microbiota and health promoting effects of dairy products. Danish Dairy Research Foundation symposium, Aarhus October 6, 2014.
2. Lesli H. Larsen og Trine K. Dalsgaard, fælles mundtligt indlæg: FIAF – Milk in regulating lipid metabolism and overweight. Uncovering milk's ability to modulate the expression and activity of fasting-induced adipose factor FIAF. Danish Dairy Research Foundation symposium, Aarhus October 5, 2014.



1. Nielsen, S, Amer, B, Young JF, Mortensen, G, Andersen, HJ, Dalsgaard, TK (2014). Can milk help protect against obesity? Abstract and poster session presented at Keystone Symposium on Lipid Pathways in Biology and Disease, 19 -24 March, Dublin, Ireland.
2. Blædel, T., Lorenzen, J.K., Brahe, L. K., Kersten, S., Astrup, A., Larsen, L.H. (2014). Angiotensin-like protein 4 concentration is positively correlated with weight, lipid oxidation and fasting triglycerides in overweight and obese participants. Abstract and poster to be presented at the International Conference on Obesity 17th to 20th of March 2014, Kuala Lumpur, Malaysia
3. Søren Drud Nielsen, Bashar Amar, Jette F Young, Grith Mortensen, Arne Astrup, Henrik J Andersen. Milk- Fat has Potential as Regulator of the Fasting-Induced-Adipose-Factor (FIAF). IDF World Dairy Summit, 28. October – 1. November 2013, Yokohama, Japan.
4. Søren Drud Nielsen, Bashar Amer, Jette F. Young, Rasmus K. Petersen, Grith Mortensen, Arne Astrup, Henrik J. Andersen & Trine K. Dalsgaard. 2013. Milk has Potential as Regulator of the Fasting-Induced-Adipose-Factor (FIAF). Food Biotechnology and Nutrigenomics, 30-31 May 2013, Vejle, Danmark.
5. Grith Mortensen. Mælk der slanker, indlæg til Mejeriforskningens dag – Forskning, der nytter, 11. april 2013 Hotel Legoland, Billund, Denmark.
6. Karsten Kristiansen. Tarmens bakterier og deres betydning for menneskets sygdomme, indlæg til Mejeriforskningens dag – Forskning, der nytter, 11. april 2013 Hotel Legoland, Billund, Denmark.
7. Trine K. Dalsgaard, Søren D. Nielsen, Bashar Amer, Grith Mortensen, Hanne C. Bertram, Arne Astrup, Karsten Kristiansen, Henrik J. Andersen & Jette F. Young. Milk has Potential as Regulator of the Fasting-Induced-Adipose-Factor (FIAF), IDF World Dairy Summit 2012, 4.-8. November 2012, Cape Town, South Africa.
8. Grith Mortensen. Erfaringer med ansøgningsprocedure og bevilling, Indlæg ved informationsmøde arrangeret af Det Strategiske Forskningsråd, 21. marts 2011, Århus.

Hjemmeside

Hjemmeside er etableret – se mere på www.fiaf.dk eller www.fiaf.eu

Presseomtale:

1. NordicLifeScience.org: How Milk Keeps You Slim. 06.10.2014. <http://nordiclifescience.org/blog/milk-keeps-slim/>
2. ScienceNordic: Drinking milk could keep you slim. 05.10.2014. <http://scienordic.com/drinking-milk-could-keep-you-slim>
3. Videnskab.dk På sporet af hvorfor mælk slanker 04.10.2014. http://videnskab.dk/kort-nyt/maelk-kan-vaere-slankende?utm_source=vores+nyhedsbrev&utm_campaign=8590d5ac2b-2014110411_4_2014&utm_medium=email&utm_term=0_d2f5c83eb4-8590d5ac2b-207954277



4. DCA: På sporet af hvorfor mælk slanker 31.10.2014 <http://dca.au.dk/aktuelt/nyheder/vis/artikel/paa-sporet-af-hvorfor-maelk-slanker/>
5. Effektivt Landbrug, side 7, 2. februar 2011: Mælk Indeholder stoffer, der slanker
6. Videnskab.dk, 3. februar 2011: Jagten på den slankende mælk
7. Viden, 8. februar 2011: Jagten på den slankende mælk
8. Børsen, FødevarerSundhed, p. 40, 16. december 2010: Milliarder til mælkeforskning

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

Søren Drud Nielsen, ph.d. "Milk regulate intestinal ANGPTL4 gene expression: An *in vitro* and *in vivo* study" blev forsvaret d. 30. oktober 2014 i Inst. for Fødevarer, Aarhus Universitet.

Alexander Krokedal Rønnevik, ph.d "Effect of various protein sources on body weight development" blev forsvaret sin afhandling d. 20. november 2014.

Hong Zheng, ph.d. "Potential of metabolomics to unravel the metabolic response to intake of dairy products" ved Inst. for Fødevarer, Aarhus Universitet d. 21 april 2015.

Jacob Bak Holm, ph.d, "The Gut Microbiota in Host Metabolism and Pathogen Challenges" ved Inst. for Biologi, Københavns Univerisitet, 21 december 2015.

I fremtiden vil Trine Blædel forsvare sin afhandligng: The role of Angiopoietin-like protein in obesity and obesity-related disease. Trine er i øjeblikket på barsel.

15. Nye kontakter/projekter

Ph.d.-studerende Søren Drud Nielsen, AU-FOOD, har i efteråret 2012 været hos KU-BIO for at lave forsøg med PPAR-regulering.

Ph.d.-studerende Alexander Rønnevik, KU-BIO, har gennemført et studieophold hos Professor Aimin Xu, Hong Kong University.

Ph.d.-studerende Trine Blædel, KU-NEXS, har i foråret 2013 gennemført i studieophold hos Professor Sander Kerstens, Wageningen Universitet.

Ph.d-studerende Søren Drud Nielsen, AU-FOOD har i foråret 2014 været på KU-NEXS for at køre ELISA-baseret kvantificering af ANGPTL4.

16. Underskrift og dato

Projektet er formeldt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.

Dato: 17/5-16 Projektleders underskrift: Trine Blædel

Dato: _____ MFF-repræsentants underskrift: _____



4. DCA: På sporet af hvorfor mælk slanker 31.10.2014 <http://dca.au.dk/aktuelt/nyheder/vis/artikel/paa-sporet-af-hvorfor-maelk-slanker/>
5. Effektivt Landbrug, side 7, 2. februar 2011: Mælk indeholder stoffer, der slanker
6. Videnskab.dk, 3. februar 2011: Jagten på den slankende mælk
7. Viden, 8. februar 2011: Jagten på den slankende mælk
8. Børsen, FødevarerSundhed, p. 40, 16. december 2010: Milliarder til mælkeforskning

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

Søren Drud Nielsen, ph.d. "Milk regulate intestinal ANGPTL4 gene expression: An *in vitro* and *in vivo* study" blev forsvaret d. 30. oktober 2014 i Inst. for Fødevarer, Aarhus Universitet.

Alexander Krokedal Rønnevik, ph.d "Effect of various protein sources on body weight development" blev forsvaret sin afhandling d. 20. november 2014.

Hong Zheng, ph.d. "Potential of metabolomics to unravel the metabolic response to intake of dairy products" ved Inst. for Fødevarer, Aarhus Universitet d. 21 april 2015.

Jacob Bak Holm, ph.d, "The Gut Microbiota in Host Metabolism and Pathogen Challenges" ved Inst. for Biologi, Københavns Univerisitet, 21 december 2015.

I fremtiden vil Trine Blædel forsvare sin afhandligng: The role of Angiopoietin-like protein in obesity and obesity-related disease. Trine er i øjeblikket på barsel.

15. Nye kontakter/projekter

Ph.d.-studerende Søren Drud Nielsen, AU-FOOD, har i efteråret 2012 været hos KU-BIO for at lave forsøg med PPAR-regulering.

Ph.d.-studerende Alexander Rønnevik, KU-BIO, har gennemført et studieophold hos Professor Aimin Xu, Hong Kong University.

Ph.d.-studerende Trine Blædel, KU-NEXS, har i foråret 2013 gennemført i studieophold hos Professor Sander Kerstens, Wageningen Universitet.

Ph.d-studerende Søren Drud Nielsen, AU-FOOD har i foråret 2014 været på KU-NEXS for at køre ELISA-baseret kvantificering af ANGPTL4.

16. Underskrift og dato

Projektet er formeldt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.

Dato: 17/5-16 Projektleders underskrift: 

Dato: 30.5 16 MFF-repræsentants underskrift: 