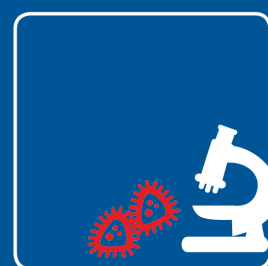


Esben Skipper Sørensen: Mineral Mælk – mælkeprotein og optag af zink, jern og magnesium

Mineral Milk – milk protein and uptake of zinc, iron
and magnesium



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Mineral Mælk – mælkeprotein og optag af zink, jern og magnesium

Mineral Milk – milk protein and uptake of zinc, iron and magnesium

2. Projektleder

Professor Esben Skipper Sørensen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet, Universitetsbyen 81, 8000 Aarhus C. Tlf. 20270979. Email: ess@mbg.au.dk

3. Øvrige medarbejdere

Brian Christensen (bc@mbg.au.dk), Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University.

Jan J. Enghild (jje@mbg.au.dk), Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University.

4. Finansieringskilder

Mælkeafgiftsfonden DKK 1.944.000

Institut for Molekylærbiologi og Genetik, AU DKK 1.944.000

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: 01/2022 - 12/2023

6. Projektresume

Magnesium, zink og jern er essentielle mineraler i den human diæt. Indhold og optag af disse mineraler er større fra animalske end vegetabiliske fødevarer. Dette skyldes tilstedeværelsen af anti-nutritionelle faktorer i vegetabiliske fødevarer som kan komplekse mineralerne, så de ikke er tilgængelig for optag ved tarmbarrieren. Modsat indeholder animalske fødevarer proteiner, som kan holde mineralerne på en biotilgængelig form som fremmer optaget. Projektets formål er at undersøge hvorledes specifikke mælkeproteingredienser, som osteopontin og α -laktalbumin, samt proteiner i en kompleks mælkematrix kan binde, transportere og øge biotilgængeligheden af magnesium, zink og jern. Osteopontin og α -laktalbumins evne til at binde jern, zink og magnesium blev analyseret med kolorimetriske assays og isothermal titration calorimetry (ITC), som er en højfølsom og kvantitativ teknik til bestemmelse af binding mellem molekyler. Det påvistes, at osteopontin binder ~ 30 jern- og zinkmolekyler, hvorimod osteopontin havde lav affinitet for magnesium. Bindingen sker med relativt lav affinitet ($K_D \sim 0.1$ mM), og den er afhængig af fosfatgrupperne på osteopontin. α -laktalbumin vistes at binde mineralerne i meget mindre grad ($\sim 1-4$ mol:mol). Derudover påvistes også at osteopontin binder signifikant flere jern ioner end lactoferrin og valleproteinkoncentrater.

I modeller der simulerer gastrointestinal fordøjelse, bevarer osteopontin bindingen af zink og jern ved de forskellige pH-værdier og i tilstedeværelse af fordøjelsessystemets enzymer. Derudover har jernbinding også en effekt på hastigheden, hvorved osteopontin nedbrydes af pepsin i den gastriske fase af fordøjelsessystemet. Efter de simulerede fordøjelser, undersøgte vi om komplekserne af mælkeprotein, zink og jern kan optages i tarmen. Hertil benyttede vi Caco-2 celler, som er en human cellelinje, der ofte benyttes til at modellere tarmbarrieren. Ved at måle niveauet af det intracellulære protein ferritin, som er cellens vigtigste jerndepot, eller ved tilsætte en fluorescerende probe, der er specifik for zink, blev det påvist, at osteopontin forøgede cellernes optag af jern og zink. Og at jernoptaget medieret af osteopontin var langt højere end optaget af jern medieret af α -laktalbumin og lactoferrin. Ydermere kunne osteopontin, men ikke dephosphoryleret osteopontin eller α -laktalbumin, levere jern og zink i tilstedeværelse af fytinsyre, en velkendt anti-nutritionel komponent i de fleste vegetabiliske fødevarer. Optaget af jern i Caco-2 celler fra ærte, soja og ris proteinekstrakter tilsat jern var ikke signifikant ændret ved tilsætning af osteopontin til matricerne. Jern- og zinkoptag medieret af osteopontin, men ikke α -laktalbumin, påvirker tarmcellers udtryk af gener involveret i normalt optag, lagring og transport af disse mineraler. Projektets resultater indikerer, at osteopontin kunne benyttes i funktionelle fødevarer og modermælks-erstatninger for at øge biotilgængeligheden og derved tarmcellers optag af jern og zink.

Project summary

Magnesium, zinc and iron are essential minerals in the human diet. Content and absorption of these minerals is greater from animal than vegetable foods. This is due to the presence of anti-nutritional factors in plant foods which can complex the minerals so that they are not available for absorption at the intestinal barrier. Conversely, animal foods contain proteins that can keep the minerals in a bioavailable form that promotes absorption. The aim of the project is to investigate how specific milk protein ingredients, such as osteopontin and α -lactalbumin, as well as proteins in a complex milk matrix can bind, transport and increase the bioavailability of magnesium, zinc and iron. The ability of osteopontin and α -lactalbumin to bind iron, zinc and magnesium was analyzed with colorimetric assays and isothermal titration calorimetry (ITC), which is a highly sensitive and quantitative technique for determining binding between molecules. Osteopontin was shown to bind ~ 30 iron and zinc molecules, whereas osteopontin had low affinity for magnesium. The binding occurs with relatively low affinity ($K_D \sim 0.1$ mM), and it is dependent on the phosphate groups on osteopontin. α -lactalbumin was found to bind the minerals to a much lesser extent ($\sim 1-4$ mol:mol). In addition, it was also demonstrated that osteopontin binds significantly more iron ions than lactoferrin and whey protein concentrates.

In models simulating gastrointestinal digestion, osteopontin preserves the binding of zinc and iron at the different pH values and in the presence of digestive system enzymes. In addition, iron binding also influences the rate at which osteopontin is broken down by pepsin in the gastric phase of the digestive system. After the simulated digestions, we investigated whether the complexes of milk protein, zinc and iron can be absorbed in the intestine. For this we used Caco-2 cells, which is a human cell line that is often used to model the intestinal barrier. By measuring the level of the intracellular protein ferritin, which is the cell's main iron depot, or by adding a fluorescent probe specific for zinc, it was demonstrated that osteopontin increased the cells' uptake of iron and zinc. And that the iron uptake mediated by osteopontin was far higher than the uptake of iron mediated by α -lactalbumin and lactoferrin. Furthermore, osteopontin, but not dephosphorylated osteopontin or α -lactalbumin, could supply iron and zinc in the presence of phytic acid, a well-known anti-nutritional component in most plant foods. The uptake of iron in Caco-2 cells from pea, soy and rice protein extracts supplemented with iron was not significantly altered by the addition of osteopontin to the matrices. Iron and zinc uptake mediated by osteopontin, but not α -lactalbumin, affects intestinal cell expression of genes involved in normal uptake, storage and transport of these minerals. The project's results indicate that osteopontin could be used in functional foods and breast milk substitutes to increase the bioavailability and thus the absorption of iron and zinc by intestinal cells.

7. Projektets formål

Projektets formål er at undersøge hvorledes mælkeprotein i form af valleproteinkoncentrater, specifikke oprensede mælkeprotein ingredienser, som osteopontin og α -laktalbumin, samt protein i en kompleks mælkematrix kan øge biotilgængelighed og optag af zink, jern og magnesium. Det er ikke målet at undersøge optaget af mælkens eget indhold af mineralerne, men hvorledes mælkeproteinet kan øge biotilgængelighed og optag af mineraler, der indtages sammen med mælkeprotein, enten i form af berigede produkter, kosttilskud eller i andre kostemner hvor mineralerne naturligt findes.

The aim of the project is to investigate how milk protein in the form of whey protein concentrates, specific purified milk protein ingredients such as osteopontin and α -lactalbumin, as well as protein in a complex milk matrix can increase bioavailability and uptake of these minerals. The purpose is not to investigate the uptake of milk's own content of minerals, but how milk protein can increase bioavailability and uptake of minerals ingested along with milk protein, either in the form of fortified products, supplements or in other dietary items where the minerals are naturally found.

8. Projektets baggrund

Magnesium, zink og jern er essentielle mineraler i talrige fysiologiske processor. F.eks. er mere end 300 enzymer afhængige af zink for at udføre aktiviteter indenfor blandt andet DNA-syntese og immunforsvaret (Prasad, 2013). Jern er en vital faktor i oxygen transport, DNA-deling og cellens energiproduktion (Walters et al., 2018) og magnesium er vigtig for især knogle- og muskelsundhed (Oh and Deeth, 2017). Mangel på disse mineraler eller utilstrækkeligt optag fra kosten har alvorlige sundhedsmæssige konsekvenser og repræsenterer et globalt problem (Prasad, 2013).

Den vigtigste årsag til mineralmangel er lavt indhold i kosten eller manglende biotilgængelighed. Biotilgængeligheden begrænses ofte af fødevarematrixer, som indeholder antinæringsstoffer. F.eks. indeholder plantebaserede fødevarer som fuldkorn, bælgfrugter og grøntsager høje niveauer af fytinsyre og polyfenoler, som kan danne uopløselige komplekser med mineralerne og derved hæmme deres optag (Gibson et al., 2010).

Mineralmangel behandles normalt med kosttilskud eller tilføjelse af mineralerne til mad, men effekten begrænses af lav optagelighed, og desuden kan mineralsalte være forbundet med gastrointestinalt ubehag. Berigelse med mineraler i kompleks med proteiner eller peptider er en alternativ strategi, der kan øge biotilgængeligheden uden bivirkninger. Mælk indeholder flere proteiner, der udover at have en næringsmæssig funktion, også besidder vigtige biologiske funktioner. Fx har flere mælkeproteiner et stort indhold af negativt ladede aminosyrer samt fosfatgrupper, der muliggør at disse kan binde og transportere positivt ladede mineraler. Disse kan derfor fungere som transportører af mineraler til optag ved tarmcelleoverfladen. I mejeriproduktionen kan flere af disse mineralbindende proteiner, som fx osteopontin og alfa-lactalbumin, desuden isoleres til stor renhed.

Osteopontin har en struktur og et højt indhold af negative ladede aminosyrer, der muliggør en høj affinitet for de positivt ladede mineraler zink, jern og magnesium. Osteopontin findes i de fleste væv og fysiologiske væsker, men langt den højeste koncentration findes i mælk (Bruun et al., 2018). Flere kliniske studier har vist at osteopontin fra mælk er involveret i tarmens udvikling og funktion hos spædbørn, samt aktivering af immunforsvaret (Jiang and Lønnerdal, 2020). Osteopontin binder desuden kalcium med høj affinitet, og proteinet kan delvist modstå gastrointestinal fordøjelse, samt blive optaget og transporteret over tarmbarrieren (Sørensen and Christensen, 2023). Dermed kunne osteopontin potentielt binde og transportere zink, jern og magnesium til tarmen og facilitere deres optag.

α -laktalbumin udgør omkring en fjerdedel af proteinet i human mælk og α -laktalbumin isoleret fra komælk er derfor en meget vigtig komponent i modernælkserstatninger. Mange kliniske studier har påvist gavnlige effekter af α -laktalbumin, hvor det er vist, at forberede søvnen og reducere fordøjelsesproblemer hos de nyfødte (Layman et al., 2018). Alfa-laktalbumin kan binde to kalcium-ioner via motiver i proteinet, som også kan binde zink og jern (Layman et al., 2018).

Det er vist, at peptider dannet ved fordøjelse af α -laktalbumin kan binde jern og promovere optag af jern i tamceller (Wang et al., 2014).

De oprensede og kommercielt tilgængelige mælkeproteiner osteopontin og α -laktalbumin, samt mælkeproteinfractioner (f.eks. WPI'er), undersøges i dette projekt for binding af zink, jern og magnesium, og hvorledes de påvirker optaget af disse mineraler i modeller af tarmbarrieren. Desuden undersøges mælkeproteinernes evne til at levere mineralerne med og uden tilstedeværelse af fytinsyre og polyfenoler fra korn og planter, samt forskellige planteproteinekstrakter.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Fase 1: Bestemmelse af zink-, magnesium- og jernbinding

Fase 2: Identifikation af mineralbindende komponenter

Fase 3: Zink-, magnesium- og jernbinding under gastrointestinal transit

Fase 4: Effekt på biotilgængelighed

Fase 5: Mælkematrix effekt og sammenligning med vegetabilsk matrix

Estimeret tidsplan (x=1 måned):

	2022	2023
Fase 1:	xxxxxxxxx	xxxx
Fase 2:	xxxxxxxxx	
Fase 3:	xxxxxxx	xxxxxxxxx
Fase 4:		xxxxxxxxxxxxx
Fase 5:		xxxxxxxxxxxxx

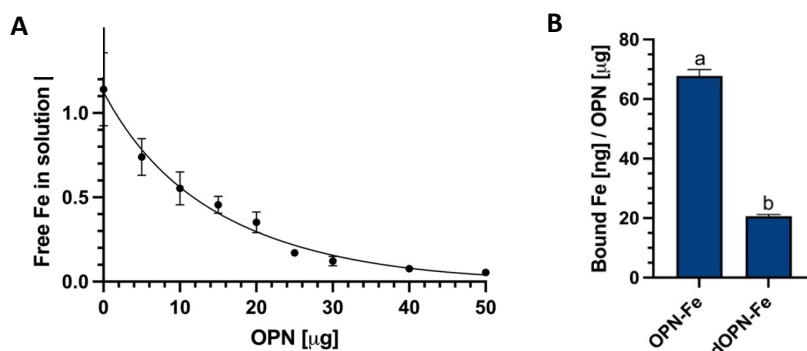
10. Afvigelser

Grundet den lave bindingsaffinitet mellem osteopontin og magnesium, blev det i projektet besluttet at prioritere indsatsen på osteopontin og dens binding og effekter på biotilgængeligheden af zink og jern. Der er foretaget flest analyser på osteopontin og noget færre på α -laktalbumin, da osteopontin viste sig at være langt den bedste mineralbinder.

11. Projektets resultater

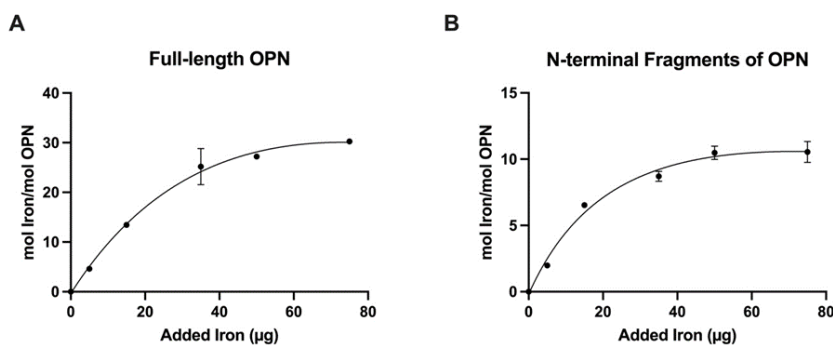
Fase 1. Bestemmelse af zink-, magnesium- og jernbinding.

For at analysere osteopontins jernbindende egenskaber, blev en fast mængde jern tilsat stigende mængder af osteopontin. Mængden af frit jern i opløsningen blev bestemt ved hjælp af den jernbindende kromofor (Ferene-S). Mængden af frit jern faldt tydeligt, jo mere osteopontin der blev tilsat (Figur 1A). Derefter blev osteopontin defosforileret, hvorefter en kraftigt nedsat evne til at binde jern blev observeret (~20 ng jern/ μ g protein) i forhold til det normalt modificerede protein (~70 ng jern/ μ g protein) (Figur 1B).



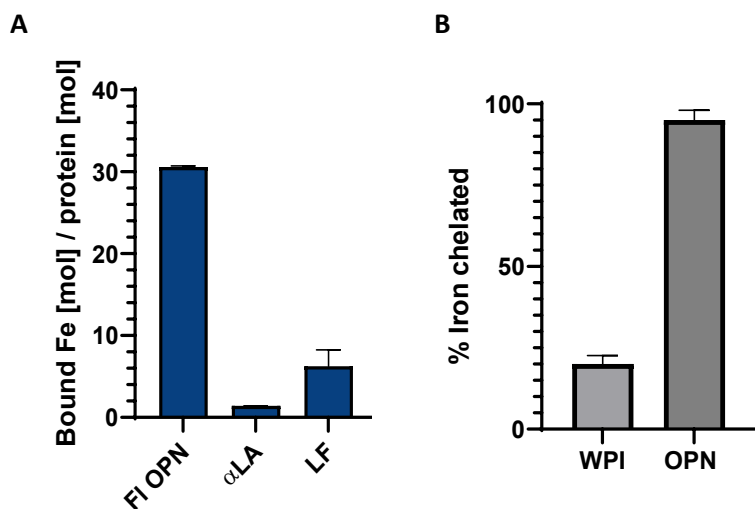
Figur 1. (A) Jernbinding af osteopontin (OPN) inkuberet med 1 μ g jern som funktion af OPN-koncentrationen ved pH 6,7. (B) Jernbinding af nativt OPN (OPN) og defosforileret OPN (dOPN).

Jernbindingsanalysen blev udført med Lacprodan® OPN-10 (Osteopontin oprenset fra mælk fra Arla Foods Ingredients). Lacprodan® OPN-10 indeholder en blanding af det intakte protein (262 aminosyrer), og en gruppe af kløvede fragmenter af OPN (Aminosyrerne 1-151). Det intakte OPN-protein blev adskilt fra fragmenterne ved Reverse-phase-HPLC (data ikke vist), og derefter blev intakt OPN og fragmenterne inkuberet med varierende mængder jern for at bestemme den maksimale jernbindingskapacitet (Figur 2). Bindingskurverne viste, at fragmenterne og det intakte protein bandt henholdsvis ~10 og ~30 mol jern.



Figur 2. Maksimal jernbinding af osteopontin. Intakt osteopontin (A) eller fragmenter af osteopontin (B) blev tilsat stigende jernmængder (0-75 µg). Den proteinbunde mængde jern blev herefter kvantificeret og normaliseret til proteinkoncentrationen.

På tilsvarende vis blev de jernbindende egenskaber af osteopontin, α-laktalbumin og lactoferrin sammenlignet. Intakt osteopontin bandt ~30 mol jern, α-laktalbumin og lactoferrin bandt hhv. ~1 og ~6 mol jern (Figur 3A). Desuden var osteopontins evne til at binde jern betydeligt højere end bindingskapaciteten af valleproteinkoncentrat (WPI) (Figur 3B).



Figur 3. (A) Jernbinding af intakt osteopontin (FI OPN), α-laktalbumin (αLA) og lactoferrin (LF). Protein bundet jern blev normaliseret til mængden af protein. (B) 50 µg osteopontin eller valleprotein koncentrat (WPI) blev inkuberet med 2 µg jern.

Derefter blev de zinkbindende egenskaber af intakt osteopontin og fragmenter undersøgt vha. isothermal titration calorimetry (ITC). ITC-analyserne viste at osteopontin har ca. 36 bindingssites for zink, mens fragmenterne af osteopontin binder ca. 18 zink-ioner (Tabel 1). Som for jern viste fosforylering af osteopontin sig at være vigtig for bindingen, da defosforylering reducerede zinkbindingskapaciteten til 10 mol zink. Det var ikke muligt at detektere binding af zink til α-laktalbumin via ITC, hvilket indikerer, at proteinet binder meget lave mængder zink.

Proteins	Støkiometri (n)	K_D (μ M)	ΔH (kcal/mol)
Intakt OPN	36 ± 4	73 ± 22	5.63 ± 0.9
OPN Fragmenter	18 ± 4	113 ± 20	7.39 ± 1.7
Defosforyleret OPN	10 ± 0.5	190 ± 75	2.87 ± 0.4
α -laktalbumin	Low signal	Low signal	Low signal

Tabel 1. Termodynamiske parametre for zink binding til osteopontin og α -laktalbumin målt med ITC

Magnesiumbindingen af osteopontin og α -laktalbumin blev analyseret vha. af både ITC og kolorimetriske assays, men begge proteiner bandt meget lave mængder magnesium (data ikke vist).

Fase 1. Opsummering

Osteopontin binder høje mængder jern og zink (~30 mol), mens proteinet ikke har affinitet for magnesium. Osteopontins evne til at binde zink og jern er langt højere end bindingen af disse mineraler til α -laktalbumin og lactoferrin. Disse resultater danner grundlag for to artikler som er antaget til publikation.

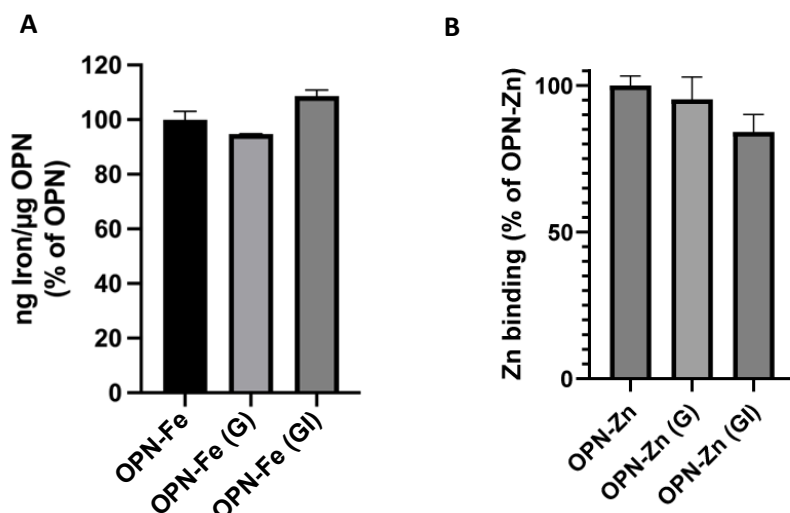
Fase 2: Identifikation af mineralbindende komponenter

En affinitetssøjle med jern- eller zink-ioner (Fe/Zn-IMAC) blev benyttet til at identificere zink og jernbindende proteiner i valleprotein koncentratet. WPI-pulver opløses og køres over søjlen, og efter at have vasket uspecifikt bundet protein af, frigøres proteinerne der har bundet sig til zink/jern affinitetssøjlen ved at tilsætte buffer der kompleks op dermed fjerner bundet jern og zink. De frigjorte proteiner blev derefter identificeret vha. massespektrometri. Analyserne på jern- og zinkaffinitetssøjlerne understøttede at osteopontin har høj affinitet for jern, samt at BSA i WPI-pulveret også binder jern (data ikke vist). Protein, Nucleobindin-1 i WPI blev observeret at binde zink. Det lykkedes ikke at fremstille en brugbar magnesiumaffinitetssøjle.

Fase 3: Zink- og jernbinding under gastrointestinal transit

Osteopontin i kompleks med jern eller zink blev udsat for simuleret gastrointestinal fordøjelse, og resultatet blev derefter analyseret ved western blotting. Forsøget viste, at efter en times gastrisk fordøjelse ved pH ~3, og derefter en times intestinal fordøjelse blev osteopontin nedbrudt uanset om proteinet var i kompleks med mineraler. Dog kunne bindingen af jern til osteopontin nedsætte hastigheden hvorved proteinet blev nedbrudt af pepsin i mavesækken (data ikke vist).

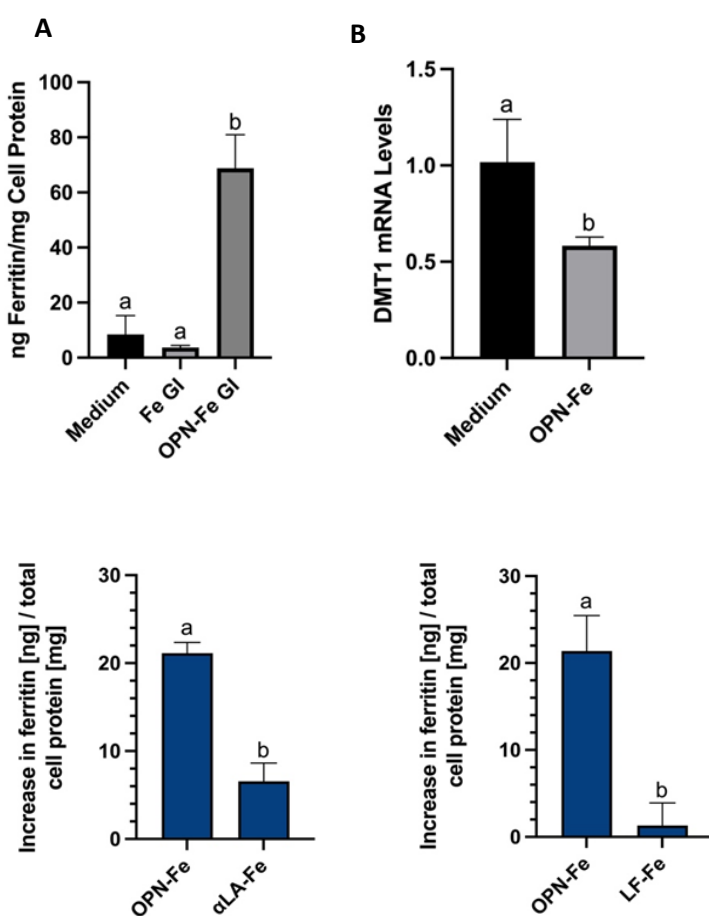
Der var desuden ikke nogen forskel i den mængde jern eller zink som var bundet til osteopontin før og efter de forskellige trin i den simulerede gastrointestinale fordøjelse (Figur 4).



Figur 4. Osteopontin i kompleks med jern (A) eller zink (B) blev gastrisk (G) fordøjet med pepsin ved pH 2,5 i 1 t, efterfulgt af intestinal fordøjelse (GI) med trypsin, chymotrypsin og elastase ved pH 7 i 1 t. Protein bundet jern/zink blev normaliseret til mængden af protein.

Fase 4: Effekt på biotilgængelighed

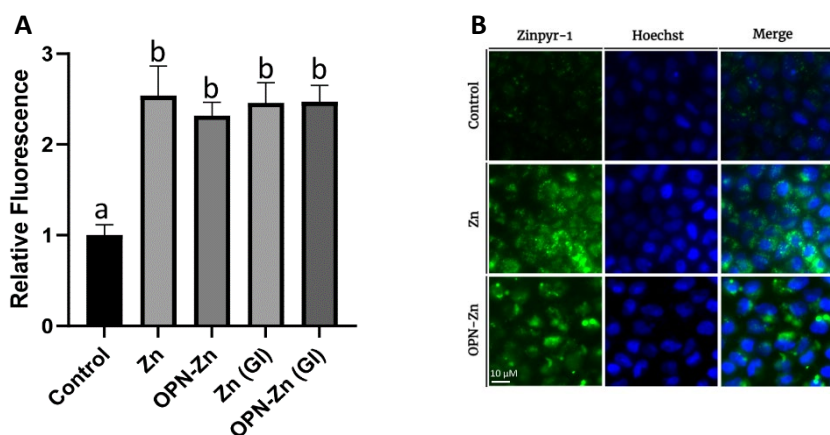
Da de hidtil opnåede resultater viste, at osteopontin kan binde jern og zink, blev det i denne fase undersøgt om de bundne mineraler også blev optaget ved tarmbarrieren. Hertil blev Caco-2 celler anvendt som model for tarmbarrieren. Cellerne blev udsået og dyrket i 21 dage, hvorefter de danner et sammenvokset lag af polariserede celler, der har strukturelle og funktionelle egenskaber som modne tarmceller i tarmen. Dernæst blev jernoptaget i Caco-2-celler behandlet med FeSO_4 eller osteopontin i kompleks med jern (OPN-Fe) efter den simulerede gastrointestinale fordøjelse evalueret (Figur 5A). Resultaterne viser, at OPN-Fe-komplekser signifikant forbedrede jernoptaget sammenlignet med celler inkuberet med FeSO_4 . Desuden var mRNA-ekspressionen af DMT1 (en receptor på tarmcelleroverfladen som medierer jern optag) reduceret efter behandling med OPN-Fe-komplekser sammenlignet med ubehandlede celler, hvilket yderligere indikerer jernabsorption (Figur 5B). Osteopontin, α -laktalbumin og lactoferrin blev herefter sammenlignet med hensyn til at mediere jernoptag i tarmceller. Forsøget viste, at osteopontin medierede et markant større jernoptag end de andre proteiner (Figur 6).



Figur 5. Caco-2 celler blev inkuberet med frit jern eller jern i kompleks med osteopontin (OPN-Fe) efter simuleret gastrointestinal fordøjelse (GI). (A) Jernoptaget blev målt ved bestemmelse af det intracellulære indhold af ferritin (cellens jerndepot). (B) Cellernes udtryk af DMT1 (receptor for jernoptag) blev kvantificeret ved real-time kvantitativ PCR og normaliseret til den endogene kontrol β -actin.

Figur 6. Osteopontin (OPN), α -laktalbumin (α LA) og lactoferrin (LF) inkuberes med jern (Fe). Derefter blev cellerne tilsat ens proteinmængder og jernoptaget blev bestemt ved måling af det intracellulære indhold af ferritin (cellens jerndepot).

Optaget af zink i Caco-2 celler medieret af osteopontin blev analyseret ved brug af zinpyr-1 (en intracellulær fluorescerende probe, der specifikt detekterer zink). Forsøget viste, at osteopontin kunne levere og mediere optaget af zink i en dosis-afhængig måde til Caco-2 cellerne (data ikke vist). Zinkoptaget medieret af osteopontin-Zn-komplekser efter simuleret gastrointestinal fordøjelse blev evalueret (figur 7A). Resultaterne viser, at både før og efter fordøjelse medierede osteopontin zinkoptag i Caco-2-celler. Zinkoptaget i Caco-2 celler blev også visualiseret ved hjælp af mikroskopi for at bekræfte internalisering af zink i cellerne (Figur 7B). Ved qPCR observerede vi desuden at zink leveret af osteopontin til Caco-2 cellerne øger genudtrykket af metallothionein (som binder og transporterer zink inde i cellen) samt af receptoren ZnT1 som transporterer zink ud af cellen (data ikke vist). Dermed er det stærkt indikeret at osteopontin kan levere zink til cellerne og påvirke genudtrykket af proteiner involveret i en normal zink optag og transport.



Figur 7. (A) Caco-2 celler blev inkuberet med frit zink eller zink i kompleks med osteopontin (OPN-Zn) efter prøverne havde gennemgået simuleret gastrointestinal fordøjelse (GI). (B) Internalisering i cellerne af zink blev visualiseret med Zinpyr-1. Cellekernen er farvet med Hoechst.

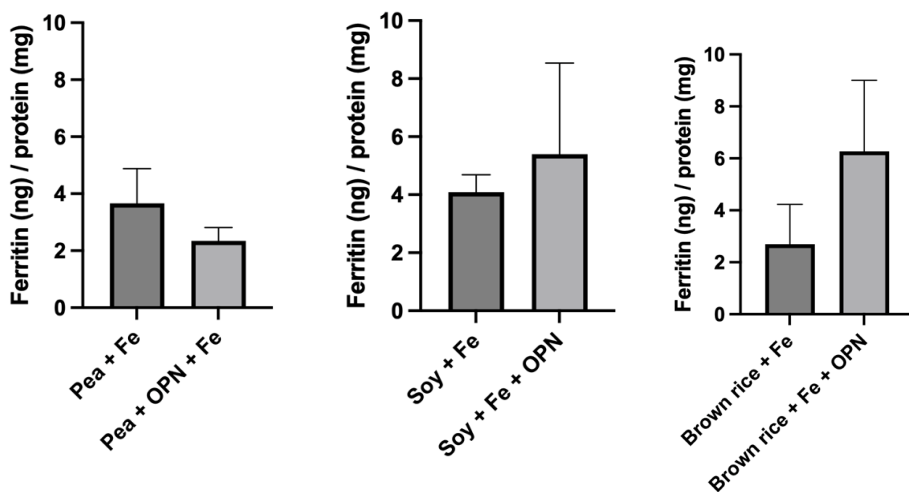
Fase 4. Opsummering

Osteopontin kan binde jern og zink, samt transportere og mediere optaget af disse essentielle mineraler i en tarmcellemodel. Osteopontin medierer et højere optag af jern end α -laktalbumin og lactoferrin. Osteopontin kan påvirke genudtrykket af receptorer og intracellulære proteiner involveret i cellens normale mekanismer for optag, lagring og udskillelse af jern og zink. Disse resultater danner grundlag for to artikler som er antaget til publikation.

Fase 5: Mælkematrix effekt og sammenligning med vegetabilsk matrix

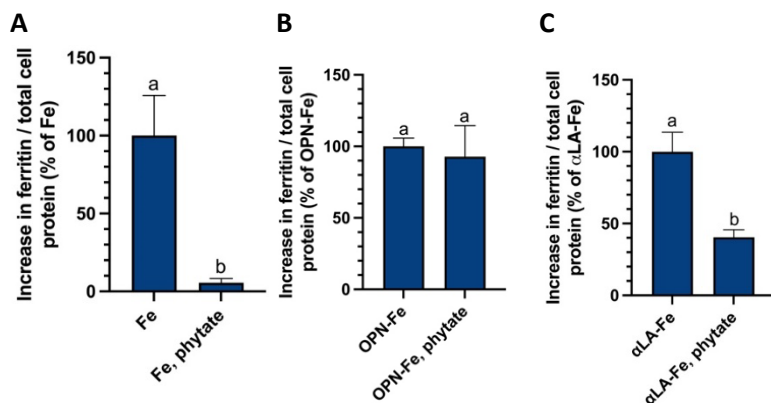
For at undersøge effekten af mineraloptag medieret af osteopontin i en mere kompleks matrix, blev jern blandet med ærte, soja eller ris proteinekstrakter med eller uden tilsat osteopontin. Derefter blev prøverne fordøjet i en model der simulerer human fordøjelse mht. holdetider, pH, galdesalte og enzymkoncentrationer (Brodkorb et al., 2019).

Der var ingen væsentlig forskel i jernoptaget ved tilsætning af osteopontin (Figur 8). Den største forskel blev observeret i prøven med ris, hvor en lille, men ikke signifikant, forøgelse blev observeret i tilstedeværelse af osteopontin. Dernæst blev det undersøgt, om virkningerne af osteopontin mht. jernoptag afhang af mængden af ærteprotein. Jernoptaget ved tilstedeværelse af osteopontin og 0.125 mg, 0.25 mg eller 0.375 mg ærteproteinekstrakt var ikke signifikant forskelligt fra prøver uden osteopontin (data ikke vist).



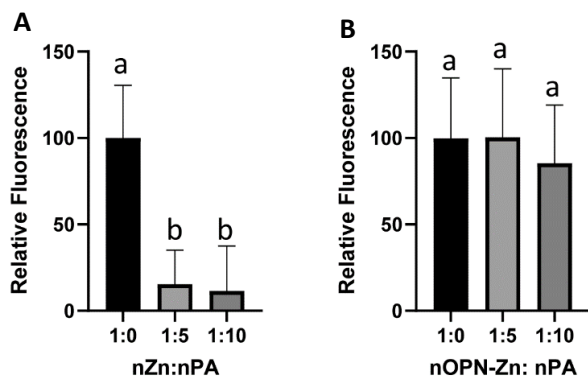
Figur 8. Jern og 0.2 mg proteinekstrakt fra ærter, soja eller brun ris gennemgik simuleret gastrointestinal fordøjelse (Infogest) med eller uden tilstedeværelse af osteopontin. Derefter blev prøverne tilsat Caco-2 celler, og efter inkubation med cellerne blev jernoptaget målt ved bestemmelse af cellernes indhold af ferritin.

Fytinsyre findes i de fleste planter og er kendt som en stærk hæmmer af jernoptag. Derfor undersøgtes osteopontins evne til at levere jern i tilstedeværelse af fytinsyre. Der var en total hæmning af jernoptaget i celler tilsat frit jern sammen med fytinsyre (Figur 9A), hvorimod jernoptaget i tilstedeværelse af osteopontin ikke var påvirket af fytinsyre (Figur 9B). Til sammenligning kan ses, at jernoptaget medieret af α -laktalbumin i kompleks med jern mindskes kraftigt af tilstedeværelsen af fytinsyre (Figur 9C).



Figur 9. Caco-2 celler blev inkuberet med FeSO_4 (A), osteopontin i kompleks med jern (OPN-Fe) (B), eller α -laktalbumin i kompleks med jern (α LA-Fe) (C) med eller uden tilstedeværelse af fytinsyre.

Ligeledes havde fytinsyre en hæmmende effekt på zinkoptaget i Caco-2 celler, men ingen indflydelse på optaget i tilstedeværelse af osteopontin (Figur 10).



Figur 10. Caco-2 celler blev inkuberet med ZnCl_2 (A) eller osteopontin i kompleks med zink (OPN-Zn) (B) med eller uden tilstedeværelse af fytinsyre. Zinkoptaget blev målt med zinpyr-1, som er en intracellulær fluorescerende probe, der detekterer zink.

Fase 5. Opsummering

Osteopontin kan mediere jern- og zinkoptag i tilstedeværelse af antinæringsstoffet fytinsyre. Der var ikke noget signifikant forskel på jernoptaget i Caco-2 celler fra en matrix af ærte, ris eller soja proteinekstrakter.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Viden om optag af essentielle mineraler, hvad enten de allerede findes i mælken, eller indtages sammen med mælkeprodukter, er vigtig information der kan anvendes i udvikling og dokumentation af mejeriprodukter og mælkeprotein- ingredienser. Dette projekt har beskrevet hvorledes specifikke mælkeproteiner, kan benyttes til at transportere og øge optaget af de essentielle mineraler jern og zink. Specielt interessant er, at proteiningrediensen Lacprodan® OPN-10, kan øge biotilgængeligheden og optaget af zink og jern i tilstedeværelsen af fytinsyre.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

Emilie H. Buhl, Brian Christensen, Freja H. Pedersen and Esben S. Sørensen (2025) Milk Osteopontin has High Iron-Binding Capacity and Facilitates Iron Absorption in Intestinal Cells. *Journal of Dairy Science*. 108:90-100. doi: 10.3168/jds.2024-25305.

Brian Christensen, Thomas F. Krüger, Thilde P. Hjorth, Emilie Holkgaard Buhl, Esben S. Sørensen (2025) Milk osteopontin mediates zinc uptake in intestinal cells in the presence of phytic acid. *International Dairy Journal*. 161:106113. doi: 10.1016/j.idairyj.2024.106113

Populærvidenskabelige artikler:

Brian Christensen & Esben S. Sørensen. Mælkeproteiner og livsnødvendige mineraler, *Mælkeritidende*, 2023 nr. 7

Brian Christensen, Emilie H. Buhl & Esben S. Sørensen. Mælkeprotein og mineraloptag, *Mælkeritidende*, 2025, in press

Studenteropgaver:

Zinc-binding and zinc transporting properties of osteopontin, Thomas Frank Krüger, Specialerapport, juni 2023.

Milk osteopontin and iron bioavailability, Emilie Holkgaard Buhl, Specialerapport, juni 2023.

Characterization of iron absorption mediated by Osteopontin in Caco-2 cells, Albert Lund Andersen, Specialerapport, juni 2024.

Zinc Binding Properties of Milk Proteins, Thilde Phie Hjorth, Bachelorrapport, juni 2022.

Mælkeproteiners jernbindende egenskaber, Albert Lund Andersen, Bachelorrapport, juni 2022.

Iron Delivery Mediated by Bovine Milk Osteopontin Following Gastrointestinal Digestion, Freja Hyllekvist Pedersen, Bachelorrapport, juni 2023.

Magnesium Binding Properties of Osteopontin and Alpha-lactalbumin from milk, Jenni Olesen. Bachelorrapport, juni 2023.

14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse

Følgende studerende har været tilknyttet projektet:

Bachelorstuderende og Kandidatstuderende: Thomas Frank Krüger, Emilie Holkgaard Buhl, Albert Lund Andersen.

Bachelorstuderende Freja Hyllekvist Pedersen, Jenni Olesen, Thilde Phie Hjorth.

15. Nye kontakter/projekter

Projektet har dannet basis for det nye MFF-støttede projekt "PROMISE" som undersøger mælkeprotein-mineralkompleksers effekter inflammation i tarmceller og dyremodeller.

16. Referenceliste

- Brodkorb, A., L. Egger, M. Alming, P. Alvito, R. Assuncao, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carriere, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, M. Minekus, R. Portmann, C. N. Santos, I. Souchon, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies, and I. Recio. 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* 14(4):991-1014.
- Bruun, S., L. N. Jacobsen, X. Ze, S. Husby, H. M. Ueno, K. Nojiri, S. Kobayashi, J. Kwon, X. Liu, S. Yan, J. Yang, G. Zachariassen, L. Chen, W. Zhou, B. Christensen, and E. S. Sørensen. 2018. Osteopontin Levels in Human Milk Vary Across Countries and Within Lactation Period: Data From a Multicenter Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 67(2):250-256.
- Gibson, R. S., K. B. Bailey, M. Gibbs, and E. L. Ferguson. 2010. A review of phytate, iron, zinc, and calcium concentrations in plant-based complementary foods used in low-income countries and implications for bioavailability. *Food Nutr Bull* 31(2 Suppl):S134-146.
- Jiang, R. and B. Lönnerdal. 2020. Effects of Milk Osteopontin on Intestine, Neurodevelopment, and Immunity. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 94:152-157.
- Layman, D. K., B. Lönnerdal, and J. D. Fernstrom. 2018. Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews* 76(6):444-460.
- Oh, H. E. and H. C. Deeth. 2017. Magnesium in milk. *International Dairy Journal* 71:89-97.
- Prasad, A. S. 2013. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr* 4(2):176-190.
- Sørensen, E. S. and B. Christensen. 2023. Milk Osteopontin and Human Health. *Nutrients* 15(11):2423.
- Walters, M. E., R. Esfandi, and A. Tsopmo. 2018. Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods* 7(10).
- Wang, X., T. Ai, X. L. Meng, J. Zhou, and X. Y. Mao. 2014. In vitro iron absorption of α -lactalbumin hydrolysate-iron and β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science* 97(5):2559-2566.