

Nye måder at undersøge struktur, aggregering og praktiske implikationer af kaseiner og kaseinmiceller



Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond

Projektets titel

”Nye måder at undersøge struktur, aggregering og praktiske implikationer af kaseiner og kaseinmiceller”

(kort titel: ”Kasein fraktionering og struktur”)

Projektleder

Jan Trige Rasmussen (JTR), seniorforsker, Laboratorium for Proteinkemi (LFP), Institut for Molekylærbiologi og Genetik (MBG), Aarhus Universitet Gustav Wieds Vej 10C, 8000 Aarhus C, Tlf. 87155462, e-post: jatr@mbg.au.dk

Projektperiode

15. maj 2011 – 14. maj 2014

Deltagere

Adam Cohen Simonsen (ACS), Syddansk Universitet. adam@memphys.sdu.dk

Richard Ipsen (RI), Københavns Universitet. ri@life.ku.dk

Lotte Schack (LS), MBG, Aarhus Universitet. ls@mb.au.dk

Morten Christensen (MC), Syddansk Uni., morten.christensen@memphys.sdu.dk

Deltagende studerende:

Trine Andreasen (Msc)

Kasper Rørdam Jensen (Bsc)

Kenneth Dyrmosø Nielsen (Bsc, Msc)

Finansieringskilder:

Det Strategiske Forskningsråd (DSF), SPIR, inSPIRe

Mejeriernes ForskningsFond (MFF)

Aarhus Universitet (AU)

Syddansk Universitet (SDU)

Et koncist sammendrag

Der findes mange måder hvorpå man i laboratoriet kan separere kaseinerne, hvorimod industrielt anvendelige metoder er en mangelvare. Nærværende projekt har tillige haft til formål at studere forhold som regulerer kaseinmicellens stabilitet, derunder afgivelse af beta-kasein. Endvidere vil vi gerne nå frem til en optimeret metode til isolation af rent, food-grade, β -kasein.

Beskaffenhed og struktur af kasein og kaseinmicellen har hidtil været studeret intensivt. Trods det findes der endnu ikke en præcis beskrivelse af kaseinmicellens struktur eller gode billedlige gengivelser. Det var således dette projekts formål at opnå dette ved at benytte moderne biofysiske teknikker, så som scanning elektronmikroskopi, atomar kraftmikroskopi og eventuelt massespektrometri. Projektet ville derved visualisere kaseinmicellen og kaseinaggregaters morfologi. Målet var at udvikle et bedre integreret billede af kaseinerne i mejeriprodukter, rækkende fra protein/peptid-niveau, aggregatdannelse og til afledte makroskopiske egenskaber så som konsistens og struktur af mejeriprodukter.

Evidens findes imidlertid for, at de individuelle kaseiner udgør en vigtig ernæringsmæssig ressource og for gennem fordøjelse dannelse af for bioaktive peptider. Som et sidste delprojekt ville vi søge at opbygge et cellemodelsystem, med enteroendokrine celler, til screening efter virksomme komponenter og få viden om deres virkemåde. Cellesystemet forventes at kunne give indikationer om næringsstoffers evne til at regulere blodsukkeret og give mæthed. Kaseinernes bioaktivitet søges evalueret ved brug af dette cellebaserede system.

Det rent videnskabelige udbytte kan sammenfattes i fem punkter: a) Der er udviklet og anvendt en atomar kraftmikroskopi-metode til at fremstille billeder af miceller under forskellige kemiske betingelser; b) Værktøjer til billedanalyse er blevet skabt. De kan bruges til at vurdere partiklers ruhed (eng: roughness) ud fra atomar kraftmikroskopi data. En metode hvis anvendelse rækker langt ud over mælkebiologien; c) Karakteriseret kaseinmiceller vha. scanning elektromikroskopi og set på aggregerede strukturer under løbeenzym-induceret forstning; d) Indhentet ny viden om kaseiner og kaseinmicellers fysisk/kemiske egenskaber. Hvilket har betydning for etablering af en industrielt brugbar metode til isolering af enkelte kaseiner; e) Etableret modelsystem til måling af stimuleret udskillelse af enkretinet GLP-1 (en slags hormon) fra specielle tarmceller (L-celler, enteroendokrine celler). Testet effekten af β -kasein for GLP-1 sekretion og set på effekt af proteolyse herpå.

Innovativt kan udbyttet summeres sammen til: i) Et konstruktivt erfa-samarbejde med Arla Foods Ingredients har ført til, at der nu findes en rentabel kommerciel fremstillingsproces for β -kasein med renhed omkring 70%. Således kan der nu fremstilles en ny ingrediens; ii) Desuden foreligger der en strategi for hvorledes yderligere renhed kan opnås; iii) Metoderne opbygget under den videnskabeligt orienterede del forventes at kunne støtte mejeriindustrien under fremtidig produktudvikling og procesoptimering.

Et engelsk resumé af formål, resultater og konklusion.

The project aimed at shedding new light on the current knowledge concerning bovine milk caseins. This was done by addressing three subjects. A) Obtained fundamental knowledge on physico-chemical properties of the caseins and especially β -casein, B) establishing a reliable procedure for high resolution imaging of casein micelles using Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM), and C) an assay was sought established enabling evaluation of the bioactivity of milk constituents focusing on β -casein.

A method for isolation of β -casein using cation-exchange chromatography was communicated to Arla Foods Ingredients (AFI). Simultaneously, AFI has reached an alternative way to manufacture a β -casein product. Important knowledge has been collected concerning the physico-chemical properties of β -casein and other caseins will most likely be of use for the dairy industry for the production of beta-casein. A summary of the obtained results and the generic elements are presented in an article published in Mælkeritidende.

To analyze casein micelles by AFM, methods were setup to attach them to silicon wafers and perform experiments under native aqueous conditions using soft magnetic tapping (MAC-mode). A series of topography images of single micelles have been obtained including a study of the influence of different environmental conditions. Significant differences are observed and a newly developed automated MATLAB based image analysis procedure have been used for extracting precise quantitative information on surface roughness and other topographical features. Accordingly, this facilitated a discussion of the morphology of micelles observed under varying environmental conditions and industrial processing operations. A scientific publication of these results is submitted and another is planned.

High resolution visualization of aggregated casein micelles is best done using scanning electron microscopy (SEM) due to the significant porosity of the cheese gels. Focus has been on obtaining 3D information on the structure of gels in the earliest stage after growth and before further processing takes place. This allows closer insight into the mechanism behind the unique micelle aggregation structure. A procedure involving critical-point drying and gentle sputter coating of a few nm of metal gives optimal samples suited for SEM. Unique high-resolution images shows the porous network of casein micelles in the cheese gel. Experiments were supported with confocal fluorescence images revealing the location of fat globules in the network. A scientific publication of these results will be written.

Human enteroendocrine NCI-H716 cells secrete GLP-1 upon nutrient stimulation. GLP-1 is important for glucose homeostasis by stimulating insulin secretion and inhibiting glucagon release. An in vitro assay has been established to quantify the amounts of secreted GLP-1 upon stimulation by milk fractions and commercial available milk hydrolysates. Attempts were done to quantify the amount of secreted GLP-1 by several different inexpensive methodologies; however none of them were sensitive enough for detection of the relatively small quantity of secreted GLP-1. An in-house ELISA was established and proved able to detect and measure the quantity of GLP-1 released from NCI-H716 cells. Results indicate that casein and casein hydrolysates potently stimulate GLP-1 secretion from the human enteroendocrine NCI-H716 cell line. A manuscript describing obtained results is close to be ready for submission.

Projektets baggrund og mål, resultater og vurdering af disse i forhold til de opstillede mål.

Kasein udgør som bekendt cirka 80 % af proteinet i almindelig komælk, hvor det findes i form af kaseinmiceller. Kaseinmiceller er vandfyldte, næsten kugleformede partikler med de fleste i en størrelse på 80-200 nm. De består af fire forskellige slags kaseiner samt nanopartikler af kalciumfosfat. Selvom der findes megen viden om de individuelle kaseinmolekyler, er der stadig livlig debat om, hvordan kaseinerne er arrangeret rumligt inden i micellen. Denne uafklarethed kan umiddelbart forklares med, at kaseinmiceller eksisterer i et komplekst medie (mælk) og at almindelige mikroskopiteknikker har vanskeligt ved at tage nøjagtige billeder under disse forhold.

I kaseinmicellerne organiserer kaseinerne sig omkring nanopartikler af kalciumfosfat. Det vides at køling resulterer i frigivelse af kasein, hovedsageligt β -kasein, fra micellen. Det skyldes i hovedsagen to ting; at β -kasein er det mest opløselige kasein ved lave temperaturer og at ca. 1/3-del af β -kaseinet i micellen kun er løst bundet. Faktisk kan micelle-bundet β -kasein opdeles i tre omtrent lige store grupper: 1) Hårdt bundet via vekselvirkning med kalciumfosfat, 2) hårdt bundet uden interaktion med kalciumfosfat og 3) løst bundet og dissociér-bar ved lave temperaturer. Bovin β -kasein har amfifil natur, hvor den første del er meget vandopløseligt, mens den anden del er upolær. Ved bestemte betingelser resulterer det i at β -kasein spontant samler sig i aggregater.

Det var projektet intention at bidrage til en fundamental visuel og strukturel forståelse af mælkenes hovedkomponenter. Endvidere var det målet at visualisere nanostrukturer efter industrielle procestrin, med et håb om at generere viden, der muliggør skabelse af nye erkendelser. En bærende ide i projektet var således, at en øget forståelse af mælkenes mikroskopiske struktur er nøglen til udvikling og optimere fremstilling af mejeriprodukter. Ved brug af moderne biofysiske teknikker som fx Scanning Electron Microscopy (SEM) og Atomic Force Microscopy (AFM) blev der stillet imod at visualisere kaseinmicellen og kaseinaggregaters morfologi.

Udover, at være en basal næringskilde tilskrives kasein også en række interessante egenskaber og virkninger. For at kunne drage konklusioner om virkningen af mælk på organismen og den fysisk-kemiske opførsel af enkelte proteiner, er det vigtigt at have adgang til oprensede kaseiner. Oprensning af kasein er derfor en anden helt central del af projektet. Der har især været fokus på β -kasein. Både med interesse for effekter af det rene protein, men blikket har også været rettet mod om det rent procesteknologisk er muligt at fremstille et kraftigt beriget β -kasein ingrediens.

Under udførelsen var projektet opdelt i 7 faser/delaktiviteter, men resultaterne kan samles under fire punkter. A) Fraktionering af kasein, B) Kaseinernes vekselvirkning før og efter isolation, C) Morfologi og struktur af kaseinmiceller og micelaggregater og D) Etablering et tarmcellebaseret modelsystem for biokemisk respons.

A. Fraktionering af kasein.

Til at opnå morfologisk viden om kaseinmiceller og proteinernes individuelle egenskaber er der under projektet blevet arbejdet med at anvende de mest skånsomme og egnede oprensningsmetoder. Ved at tage udgangspunkt i rene systemer var det forventningen, at der kunne drages konklusioner om vigtigheden af specifikke elementer. I projektet løbetid, blev der bl.a. udført forsøg med monolag af rene

kaseiner på en vandoverflade og desuden undersøgelser af hvorledes rene kaseiner aggregerer (se punkt B).

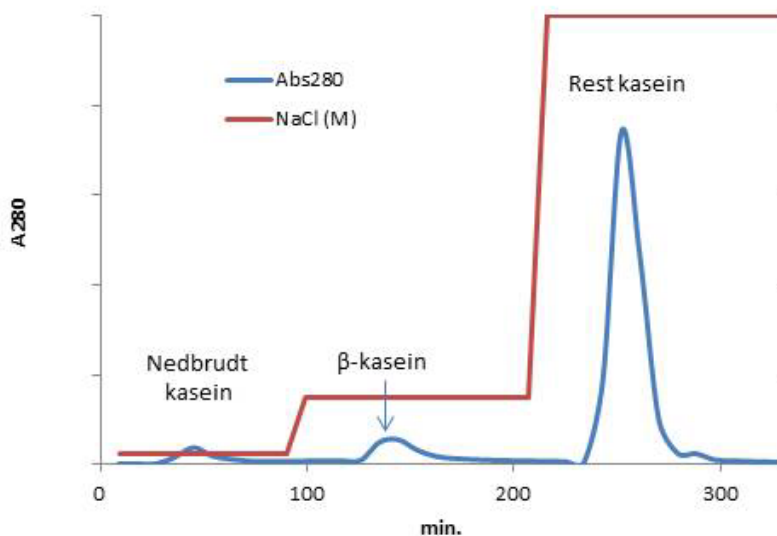
Under projektet har der været stor fokus på β -kasein, som med sine unikke funktionelle egenskaber ofte betragtes som en slags "golden standard" indenfor emulgatorer og foaming agents. Desforuden er β -kasein et vigtigt udgangsmateriale for en række bioaktive peptider, som frigives under fordøjelsen ved enzymatisk hydrolyse eller som følge af mikrobiel fermentering.

Indtil for nylig fandtes de enkelte kaseiner ikke som ingredienser på markedet. Inden projektets påbegyndelse blev det vurderet, at der var et stort markedsrettet potentiale for en ny værdiforædlet fødevaringrediens med højt indhold af β -kasein. Nærværende projekt har således undersøgt mulighederne for at opnå en rentabel produktion af et β -kasein ingrediens. Den kan blandt andet tænkes benyttet som tilsætning til modermælkserstatning, småbørnsmad og anden form for specialernæring. Ved brug af hårdhændede laboratoriebaserede metoder er ikke særlig vanskeligt at isolere β -kasein til analytisk brug, mens det er meget sværere og hidtil ubeskrevet, hvorledes det opnås ved brug af mere skånsomme metoder og i stor skala. Focus blev rettet mod to forskellige måder til at opnå en beriget β -kasein fraktion: a) Ion-bytningskromatografi og b) avanceret membranbaseret separation.

Ion-bytningskromatografi:

Efter nogle indledende undersøgelser viste det sig, at micellært kasein isolat udgjorde et udmærket udgangsmateriale for oprensning af β -kasein. Benytter man en kalcium-chelerende buffer med et pH lidt under neutral, så vil kaseinerne i et vist omfang være i opløsning og samlet set være negativt ladede. Ikke desto mindre vil der stadig være positivt ladede områder på β -kasein, og vi har med succes kunne benytte en kation-bytter til isolering af β -kasein (se figur nedenfor). Det viste sig endvidere, at man med fordel kunne benytte et specielt polystyren baseret søjlemateriale med store porer (POROS[®] HS), der er designet til separation af biomolekyler. Herved kunne der eksempelvis opnås et udbytte på 45% af det tilstedeværende β -kasein med en renhed på 72%. Andre undersøgelser har vist, at man også kan isolere β -kasein fra samme udgangsmateriale ved et pH lidt over 7 og ved brug af anion-bytningskromatografi.

Kation-bytning på POROS[®] SP



Membranteknologisk separation:

Som understøttende funktion har vi i samarbejde med Arla Food Ingredients undersøgt mulighederne for en målrettet storskalaproduktion af et β -kasein beriget ingrediens. En af procesmulighederne viste sig at involverer nedkøling af skummetmælk, hvorved en delmængde af β -kasein frisættes fra kaseinmicellerne, som efterfølgende kunne adskilles fra micellerne vha. en passende membran. Derpå opvarmes den β -kasein-holdige fraktionen, hvilket giver dannelse af rene β -kasein miceller. Efter membranfiltrering med nøje udvalgt membran og spraytørring forefindes herved en β -kasein beriget ingrediens. Projektet har været medvirkende til at der nu findes en dansk rettighedsbeskyttet metode til mejeriindustriel fremstilling af en hel eller delvis ren β -kasein fraktion fra komælk. Det vil stimulere mejeriindustriens muligheder for øget indtjening, og give et forspring på markedet for fødevarer ingredienser.

B. Kaseinernes vekselvirkning før og efter isolation.

Denne del af projektet har medvirket til at skabe baggrunden for hvilke betingelse der kunne give et godt udbytte for oprensningen af β -kasein ved ionbytning fra micellært kaseinisolat (MCI). Gode resultater blev opnået med 10 mM natrium-citrat-buffer, pH 5,5. Subsidiært har vi set på om ethanol og urea har en positiv betydning for udbyttet af beta-casein fraktionering ved kation-bytning på POROS SP søjle. Ethanol (5%) blev introduceret til prøven inden kromatografi i et forsøg på at forstyrre kaseinernes hydrofobe interaktioner i micellen. Det resulterede imidlertid i at der kom udfældning og at separationen/udbytte blev forringet. Derimod betød tilstedeværelse af 5M urinstof sammen med udgangsmaterialet, at udbyttet af β -kasein steg med 20%. Samlet set viser det, at udbyttet kan øges ved at kompromittere kaseinernes hydrofobe interaktioner, men det er ikke fødevarer teknologisk relevant at benytte tilsætning af urinstof.

Efter konsultation mellem AFI og LfP blev der igangsat undersøgelse af om β -kaseins fysiske-kemiske egenskaber kunne facillere opnåelse af en højere renhed på rentable vis. Ændringer af pH og temperatur var omdrejningspunkt. Arbejdet var omdrejningspunkt i Kenneth Dyrmoses Nielsens molekylærbiologiske projekt. Opvarmning til 40°C eller indstilling af pH til i nærheden af β -kaseins pI fører som antaget til aggregering, hvilket søges overført i en industriel sammenhæng (se i øvrigt afsnit om membranfiltrering ovenfor).

Viden om β -kaseins fysiske-kemiske egenskaber blev endvidere indhentet ved Langmuir monolags eksperimenter i et bachelorprojekt udført af studerende Kasper Rørdam Jensen. I dette studie blev molekylære kasein monolag på vand/luft grænsefladen komprimeret. Ved hjælp af Brewster-vinkel mikroskopi (BAM) kunne en kollaps-overgang observeres hvorved monolaget folder ned i vandfasen. Denne type studie giver grundlæggende viden om kaseiners amfile egenskaber og stabiliteten af dannede monolag.

C. Morfologi og struktur af kaseinmiceller og kaseinmicelleaggregater.

Fokus for denne del af projektet har været anvendelsen af teknikker til højopløst mikroskopi og en biofysisk tilgang til karakteriseringen af overfladetopografien af individuelle kaseinmiceller og aggregeringen af kaseinmiceller i mælk.

Individuelle kaseinmiceller

En karakterisering af kaseinmicellers overfladetopografi er mulig ved hjælp af atomar kraftmikroskopi (AFM) som gør det muligt at måle med nanometer rumlig opløsning på bløde materialer i deres oprindelige vandige miljø. Måling af kaseinmiceller med AFM kræver en immobilisering af partiklerne til et fast substrat. Der blev i projektet testet en række metoder til dette og en kovalent strategi baseret på carbodiimid funktionalisering viste sig at være den mest stabile og reproducerbare.

Ved hjælp af magnetisk exciteret tapping-mode (MAC-mode™) blev der foretaget AFM målinger af en mængde kaseinmiceller under fuld hydrering for at danne et statistisk grundlag for den efterfølgende analyse. Disse billeder blev efterfølgende analyseret med computerbaserede metoder.

En væsentlig del af dette projekt var at udvikle en kvantitativ metode til at karakterisere overflade topografien ved hjælp af ruheds ('roughness') analyse. Der blev derfor opbygget en analysemetode i programmet Matlab til analyse af AFM billeder af kaseinmiceller. Metoden involverer dels separation af partiklernes sfæriske form fra overflade-topografien. Dernæst en analyse af topografien og karakterisering med en række kvantitative ruheds-parametre.

Metoden blev valideret ved at analysere ændringer i størrelse, komprimering og overflade ruhed af kaseinmiceller rehydreret fra skummetmælkspulver og kaseinmiceller fra frisk mælk i en naturlig og i en simuleret mælkebuffer. Resultaterne fra denne undersøgelse viste at det er muligt at spore ændringer i overflade morfologien af individuelle casein miceller samt at kaseinmicellerne fra ovennævnte systemer ikke har samme parameterværdier. Den topografiske overfladeanalyse af enkelte partikler vurderes generelt anvendelig for mange typer af partikelsystemer i fødevarer og i farmaceutisk forskning.

Aggregater af kaseinmiceller

Osteløbe-induceret aggregering af kaseinmiceller i ostestrukturer blev undersøgt med scanning-elektronmikroskopi (SEM), konfokal-laserscanningsmikroskopi (CLSM) og coherent anti-Stokes Raman scattering mikroskopi (CARS). Formålet var at evaluere disse mikroskopiteknikkernes egnethed til visualisering af aggregatstrukturer.

Forberedelse af prøver til SEM forudsætter fixering og efterfølgende tørring af prøven. En række metoder til dette blev testet og optimeret. Blå fixering af gelen med glutaraldehyd og kritisk-punkt tørring ved hjælp af flydende CO₂. Staining med osmium tetraoxid (OsO₄) blev også i taget i anvendelse. En række højopløste SEM-billeder af ostegelens struktur umiddelbart efter aggregering blev opnået. Et karakteristisk pore-mønster i gelen kunne identificeres. Denne struktur kunne genfindes i billeder af ostegeler opnået med fluorescens (CLSM) og CARS mikroskopi. I evalueringen af mikroskopiteknikkerne var visualiseringen af vand i ostestrukturen ved hjælp af CARS den mindste invasive metode, da den ikke involverede mærkning af proteiner som i CLSM eller omfattende prøveforberedelse som i SEM.

For at forstå aggregeringsmekanismen i ost, blev der udviklet en konceptuel model for aggregering med udgangspunkt i mikroskopi-data. Der arbejdes videre med formuleringen af denne model i forbindelse med publicering af resultaterne.

D. Etablering af et tarmcellebaseret modelsystem.

Studier antyder at en mælkebaseret diæt bl.a. leder til nedsat lagring af fedt i kroppen. Der er stadig delte meninger om denne effekt og der mangler især forståelse for de bagvedliggende mekanismer. Vi har under dette projekt opbygget et cellemodelsystem, med enteroendokrine celler, til screening efter virksomme komponenter og få viden om virkemåden. Cellesystemet kan give indikationer om næringsstoffers evne til at regulere blodsukkeret og give mæthed. Basalt vurderes det om næringsstoffer kan påvirke enteroendokrine cellers evne til at secernere incretinet glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Arbejdet som var en central del af Trine Andreasens speciale har ført til etablering af system til måling af GLP-1 sekretion fra humane enteroendokrine celler. Ligeledes er der opsat et en ELISA til måling af GLP-1. Produceret og oprenset antistoffer fra kanin mod GLP-1. Hvilket har gjort det lidt billigere af at gennemfører et større antal målinger. Desuden giver det en lidt mere stabil og pålidelig standardkurve. Der er blevet gennemført målinger af mælkeprotein prøver, deriblandt kasein, valleproteiner og kommercielle hydrolysater. Resultaterne viser effekter på GLP-1 sekretion af kasein, β -kasein, kasein-hydrolysater og i et vist omfang valleprøver. Vi har desuden set på om proteolytisk nedbrydning har nogen betydning for en eventuel effekt. Resultaterne ventes offentliggjort i passende tidsskrift (Ref).

Konklusion.

Videnskabeligt udbytte:

- a. Metode til Atomar Kraftmikroskopi (AFM) udviklet og benyttet til at fremstille billeder af miceller ved forskellige bufferbetingelser (søges offentliggjort i selvstændigt arbejde).
- b. Udviklet billedanalyse værktøjer til at vurderer partiklers ruhed ud fra AFM data (artikel skrevet, in press).
- c. Karakteriseret kaseinmiceller vha scanning elektromikroskopi (SEM) og set på aggregerede strukturer under chymosin-induceret forstning. (offentliggøres evt. også i selvstændigt arbejde).
- d. Ny viden indhentet om kaseiner og kaseinmicellers fysisk/kemiske egenskaber (findes i studierapporter).
- e. Etableret modelsystem til måling af stimuleret udskillelse af incretinet GLP-1 (en slags hormon) fra specielle tarmceller (L-celler, enteroendokrine celler). Testet effekt af β -kasein for GLP-1 sekretion og set på effekt af proteolyse for evt. effekt (data søges offentliggjort snart, submittable).

Innovativt udbytte:

- f. Konstruktivt erfa-samarbejde med Arla Foods Ingredients har ført til at der nu findes en rentabel kommerciel fremstillingsproces for β -kasein med renhed omkring 70%. Således kan der nu fremstilles en ny ingrediens.
- g. Desuden foreligger der en strategi for hvorledes yderligere renhed af beta-kasein kan opnås (studieprojekt-rapport).
- h. Metoder fra videnskabelige pkt. a-c forventes at kunne støtte mejeriindustrien under fremtidig produktudvikling og procesoptimering.

En liste over publikationer og offentliggørelser i forbindelse med projektet:

1. "High Resolution microscopy for characterizing structure and aggregation of modified casein micelles". Poster at Food in Front – LMC Congress, May 23-24, 2011, Odense, Denmark (Authors: MC and ACS)
2. "High Resolution microscopy for characterizing structure and aggregation of modified casein micelles", 6th annual Biophysics PhD Meeting, May 25-27, 2011, Søminestationen, Holbæk Denmark (Poster (MC and ACS) and Presentation (MC))
3. Populized article: "Nanostrukturer i mælk: Fundamentale undersøgelser af kaseiner og kaseinmiceller som genvej til at optimere og udvikle mejeriprodukter. Mælkeritidende, 12. 2012. (Authors: MC, RI, ACS, JTR).
4. Poster ved 14th Food Colloids Conference 2012 (april). "High resolution
5. microscopy of casein monolayers, casein micelles and dairy products: Integration of complementary techniques" (Authors MC; JTR; ACS)
6. Poster ved inSPIRe-food konference "Konkurrencekraft i dansk fødevareresektor". 22 maj 2012, DTU, Nye måder at undersøge struktur, aggregering og praktiske implikationer af kaseiner og kaseinmiceller. Udarbejdet af JTR.
7. Poster ved 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, Integrating complementary high resolution microscopy techniques for visualizing casein micelles and aggregates, September 2012
8. Purification of Bovine β -casein. Bachelorrapport by Kenneth Dyrmosø Nielsen, June 2012. Supervisor: JTR
9. ACS participated in Conference Faraday Discussion 158: Soft Matter Approaches to Structured Food, 2 – 4 July, 2012, Hof van Wageningen, Netherlands med posteren " High resolution microscopy of casein micelles and casein monolayers: Integration of complementary techniques"
10. Kasper Rørdam Jensen har afsluttet bachelorprojektet (SDU): "Langmuir monolag af caseiner: Isothermer og afbildning af understøttede LB-film." with ACS as Supervisor
11. Self-assembly and Purification of Bovine β -casein. Molecular Biology Project (15 ECTS) by Kenneth Dyrmosø Nielsen. October 2012, Supervised by Jan Trige Rasmussen.
12. Fractionation of Bovine Casein. Kenneth Dyrmosø Nielsen, præsentation på AFI afdelingsmøde (22/11-2012).
13. Invited speaker (MC): "Visualisering af aggregerede kaseinmiceller– undersøgelser med AFM & SEM". Workshop arrangeret af Mejeriteknisk Selskab, Billund 6. december 2012: Protein koagulering i ostemælk.
14. Trine Andreasen, specialerapport, (April 2013) "Establishment of assays to monitor bioactivities of dairy proteins on human intestinal cells". Supervised by Jan Trige Rasmussen.
15. JTR participated at Mejeridag (May 11, 2013). Arrange by Danish Dairy Board, Hotel Legoland..
16. JTR invited as speaker: "Mælkeproteiners effekt på kroppens biokemiske signaler". Meeting arranged by Dansk Mejeriteknisk Selskab "Ost og Sundhed" (May 28th), Hotel Legoland.
17. Videnskabelig artikel indsendt til Food Hydrocolloids (april 2014): "Roughness Analysis of Single Nanoparticles applied to Atomic ForceMicroscopy Images of Hydrated Casein Micelles" Morten Christensen, Jan Trige Rasmussen, Adam Cohen Simonsen.
18. PhD afhandling "Structure and aggregation of casein micelles", Morten Christensen, maj 2014
19. Populærvidenskabelig artikel: Rafinering af kasein. Kenneth Dyrmosø Nielsen, Jesper Christensen, Jan Trige Rasmussen, Mælkeritidende 2014, 12, 14-5.
20. Jøhnke M, Madsen S, Nielsen KD, Christensen BS, Andreasen T, Schack L, Rasmussen JT, Heegaard CW. (2014). Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Response to Milk Proteins in the Human Enteroendocrine Cell Line NCI-H716. In prep.
21. Populærvidenskabelig artikel til gymnasieblad (MC); Om lysten til at forske i biofysikken , det smukke i det enkelte og det komplekse, Hjerneblod, nr. 2, 2014

En redegørelse for forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og evt. forskerophold ved andre institutioner.

Nærværende projekt udgjorde fundamentet for et PhD-studium (5+3) gennemført på SDU (Morten Christensen). Samtidig indeholdt projektet et Postdoc-forløb på 2 år (Lotte Schack). Endvidere har der været elementer af det foreslåede projekt, som har udgjort centrale dele af en eller flere bachelor og/eller kandidaters eksperimentelle arbejde mhp. at udarbejde afsluttende studierapporter (se liste på første side). Hermed understreges det, at projektet både har haft både et forskningsmæssigt- og uddannelsesmæssigt perspektiv. Hvilket er medvirkende til at branchen sikres i forbindelse med kommende rekruttering.

En redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt.

Qua projektets placering som en del af inSPIRe, har der selvsagt været en løbende kommunikation med de hertil tilknyttede industrielle partnere. Gode samarbejdsrelationer har der også været med AFI, hvilket samlet har ført til en rettighedsbeskyttet mulighed for at fremstille af en hel eller delvis ren β -kasein fraktion fra komælk. Samarbejdet med hele den danske mejeriindustri har været sikret gennem den løbende kommunikation i MFF regi. Med deltagelse fra SDU er der blevet skabt nye samarbejdsrelationer, hvilket konkret udmøntede sig i et forskerophold af Morten Christensen hos Atla Foods i Brabrand. Internationale interaktioner er blevet sikret gennem deltagelse i internationale møder og den efterfølgende offentliggørelse af opnåede resultater.

En vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribruget samt hvilke nye problemstillinger, projektet har afdækket.

En rettighedsbeskyttet mulighed for at fremstille af en hel eller delvis ren β -kasein fraktion fra komælk vil stimulere mejeriindustriens muligheder for øget indtjening, og give et forspring på markedet for fødevaringredienser. Anvendelsesområderne vurderes til at være tilsætning til modermælkserstatning, småbørnsmad og anden form for specialernæring. Ingrediensens tilvejebringelse, vil også give mulighed for hidtil ubeskreven brug. Der er en synlig innovativ vinkel på dette projekt, og det vurderes at fremstilling af en eller flere fraktioner, eller processerede blandinger med dokumenterede biofunktionelle egenskaber, som vil stimulere mejeriindustriens muligheder for øget indtjening. Undersøgelserne peger direkte i retning at opnå forståelse for med hvilken styrke mælken indholdsstoffer evner at påvirke konsumenten. Således er der blevet indhentet grundlæggende viden om molekylære interaktioner, som kan finde anvendelse ved udvikling af nye teknologier, eller situationer hvor kendte processer kan placeres i en ny sammenhæng. Projektet har kombineret strategier for separation af β -kasein og moderne biofysiske imaging teknikker. Projektet har ført til visualisering kaseinmicellen og kaseinaggregaters morfologi, samt implementeret teknikker til isolation af individuelle kaseinkomponenter for at sikre kompositionskontrol under aggregeringsprocesser. Biokemiske effekter af kaseinerne på kroppen kan nu endvidere evalueres ved brug af et cellebaseret system.

En vurdering af, om projektet har relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter.

Der er en klar linje mellem dette afsluttede projekt og det igangværende MFF teknologi-projekt "Kvalitet og aktivitet af industrielt fraktioneret kasein". Der etablerede teknikker kan formodentlig sagtens finde anvendelse inden for andre mejerirelaterede projekter.