

Det er ikke lige fedt

Forekomst og biologiske egenskaber af naturlige nano-vesikler i mælk.

Forekomst af fosfolipider

Fosfolipider udgør cellevægge og afgrænser intracellulære organeller i højerestående organismer. Det specielle fosfolipid sfingomyelin regulerer cellevækst, celledifferentiering, og er vigtig for nervers overflader/funktion. Studier peger på, at sfingomyelin fra kosten giver en forbedret kognitiv udvikling og bedre sundhed i tarm- og immunsystemet. Sfingomyelin findes ikke i planter. Fødevareforskere og mejerifolk har haft den opfattelse, at hovedparten af fosfolipidet i komælk stammer fra flødefasen, hvor det udgør fedtkuglemembranen omkring smørfedtet. Vores forskning rokker imidlertid markant ved dette synspunkt. Komælk indeholder 1% fosfolipid, hvoraf ca. 60% findes i fedtkuglemembranen. Resten findes i skummetmælken (skummetmælksmembraner) og skulle angiveligt være fedtkuglemembranrester. Denne betragtning er ikke længere gangbar, idet der findes en anden form for fosfolipidstrukturer i mælk, som benævnes ekstracellulære vesikler. Vi har beskrevet forekomsten af ekstracellulære vesikler i mælk. Membranstrukturerne har en vandig kerne og en betydelig anderledes molekylær sammensætning end fedtkugler/membraner. Ekstracellulære vesikler består af exosomer og mikroversikler (Figur 1). Exosomer menes at kunne mediere celle-celle kommunikation, og i mælk at bidrage med information til udviklingen af afkommets immunforsvar. Det er

uklart, i hvilket omfang forskellige mejerifraktioner indeholder ekstracellulære vesikler og/eller fedtkugle-afledte membraner. I overensstemmelse med de forskellige former for bioaktivitet og funktionalitet, der kendetegner mælkens fosfolipidholdige fedtkuglemembraner og ekstracellulære vesikler, er det *”ikke lige fedt”*, hvilke komponenter en mælkefraktion eller ingrediens indeholder.

Projektindhold

Projektet sigter imod at opnå et større kendskab til de to forskellige mælke-membrantypers forekomst og biologi. I projektet ”Nye fosfolipidholdige fraktioner i mælk – PHLIP” undersøger vi tilstedeværelsen af ekstracellulære vesikler i mælkefraktioner for at opnå en kvalitativ og kvantitativ beskrivelse af disse i forhold til forekomsten i fedtkuglemembraner. Projektet er forbundet med et ph.d.-projekt, ”Biological activities of dairy EVs”, som beskæftiger sig med forståelse af effekter efter indtag af forefindende fosfolipid-fraktioner fra mælk.

Isolering af fosfolipid-fraktioner

I vores studier tager vi udgangspunkt i ubehandlet, rå mælk, idet al form for processering vil give anledning til sammenblanding og ændringer i de fysiske kemiske egenskaber. Først skummes mælken ved centrifugering. Flødes kærnes, og fedtkuglemembraner kan derpå bundfældes. Skummetmælken



AF MARIA STENUM HANSEN, PH.D.-STUDERENDE, JAN TRIGE RASMUSSEN, SENIORFORSKER, INSTITUT FOR MOLEKYLÆRBIOLOGI OG GENETIK, AU.

Resumé

Vi har dokumenteret tilstedeværelse af ekstracellulære vesikler i mælk. Disse fosfolipidstrukturer, kaldet ekstracellulære vesikler, findes i skummetmælk og har en helt anden sammensætning end fedtkugler. Ekstracellulære vesikler kan sandsynligvis via celle-celle kommunikation påvirke konsumenten, fx immunforsvaret. Det er uklart i hvilket omfang forskellige mejerifraktioner indeholder ekstracellulære vesikler og/eller fedtkugle-deriverede membraner. Projektet sigter mod at opnå et større kendskab til de to forskellige mælke-membrantypers forekomst og biologi.

centrifugeres ved 20.000g i en time, hvorved det meste af kaseinet bundfældes, og til sidst udvindes de ekstracellulære vesikler ved filtrering.

Analyse

Projektet har særlig fokus på ekstracellulære vesikler. Derfor foretager vi en omfattende karakterisering af en lang række komponenter. Størrelsen vurderes med NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). Mængden af protein, lipid og nukleotider bestemmes. Derudover benyttes specifikke antistoffer til at estimere tilstedeværelse af udvalgte proteiner. Et af projektets hovedformål er at komme med anvisninger om, hvilke proteiner der særligt findes i henholdsvis ekstracellulære vesikler og fedtkuglemembraner. Ud fra kendskab til proteinmarkørernes forekomst i særligt rene præparationer kan man vurdere det oprindelige ophav af fosfolipidstrukturer i en mejerifraktion. Desuden muliggør de eksakte specifikationer en vurdering af, hvorledes en given proces påvirker fosfolipidkomponenterne. Eksempelvis ser vi på, hvad procestrin som homogenisering, kavitation og pasteurisering betyder for vesiklernes integritet.

Funktion og bioaktivitet

I projektet studeres bioaktiviteten af ekstracellulære vesikler fra mælk, hvilket fortrinsvist gøres på cellekulturer. Først har vi udviklet en metode til at opmærke vesiklerne med en fluorescerende forbindelse, hvilket muliggør kvantificering og sporing

af vesiklerne under et cellulært optag. Ved brug af avanceret mikroskopi har vi skabt et overblik over mælkevesiklernes vej ind - og rundt i tarmceller (Figur 2). Vi har tjekket, at cellerne tolererer behandlingerne i forsøgenes koncentrationsområder via viabilitetsmålinger. Nu analyseres immunologiske effekter af ekstracellulære vesikler på en makrofagcellelinje. Det undersøges ved at måle secernering af signalstoffer (interleukiner). Vi har et samarbejde med Tim Wolfs forskergruppe (NL), hvor vi ser på om ekstracellulære vesikler fra mælk har indflydelse på tarmens tilstand. Disse studier er bygget op om et avanceret organoid-modelsystem, hvor tarmudsnit undersøges uden for deres normale miljø.

Resultaternes betydning

Nærværende projekt forventes at give nye erkendelser vedr. denne væsentlige, men upåagtede, bioaktive fosfolipidfraktion i mælk. Det er også med til at afgøre, hvilke biologiske funktioner der kan knyttes til disse vesikler, også set i forhold andre fosfolipid-strukturer fra mælk. Er funktionaliteten bibeholdt efter processering? Samtidig er vi med til at skabe grundlag for at vurdere, hvilke dele af en mælkefraktion/ingrediens, der stammer fra henholdsvis fedtkugler eller ekstracellulære vesikler. Mælkeekstracellulære vesikler er således sandsynligvis allerede et indholdsstof i en lang række mælkeprodukter og fraktioner, eftersom de har udgangspunkt i skummetmælken. ●

Projektinfo

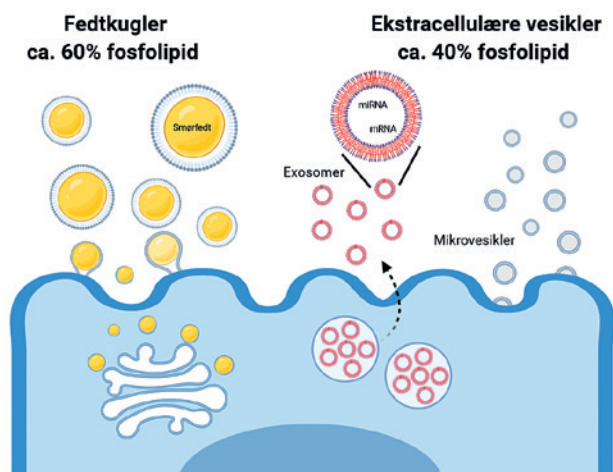
Titel: New phospholipid fractions in milk – PHLIP

Projektleder: Seniorforsker Jan Trige Rasmussen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet. Projektperiode: Januar 2019 – december 2021

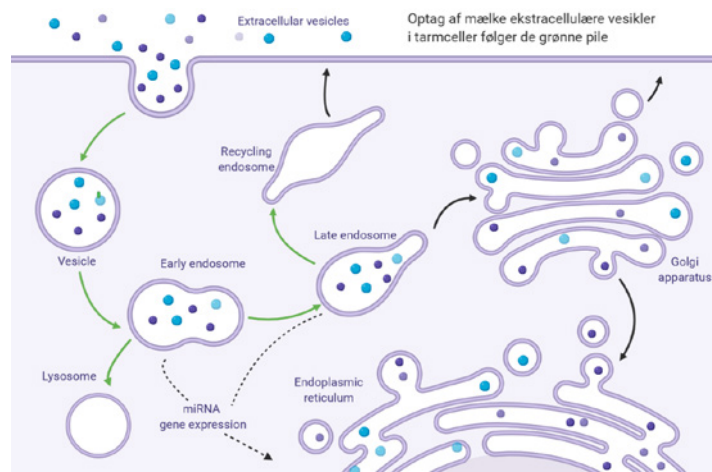
Hovedformål: Frembringe ny viden om ekstracellulære vesikler i mælkefraktioner, og opnå en kvalitativ og kvantitativ beskrivelse af disse i forhold til forekomsten af fedtkugler.

Finansiering: Mælkeafgiftsfonden, Arla Foods for Health og Aarhus Universitet. Information kan rekvireres ved henvendelse til Mejeribrugets ForskningsFond, email: gmo@lf.dk eller ved at læse om projektet på www.mejeri.dk/forskning.

MEJERIBRUGETS
FORSKNINGSFOND



Figur 1: Oversigt over fordelingen af fosfolipider i mælk i hhv. fedtkuglemembran og ekstracellulære vesikler, samt deres forskellige udskillelsesveje ud i mælken.



Figur 2: Extracellulære vesikler optages i tarmceller og processeres via det endosomale sorteringssystem.