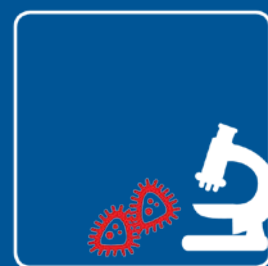
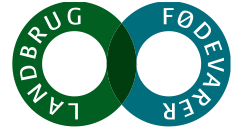


Kvalitet og aktivitet af industrielt fraktioneret kasein





Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Kvalitet og aktivitet af industrielt fraktioneret kasein

Quality and activity of industrially separated casein

2. Projektleder

Seniorforsker Jan Trige Rasmussen, Laboratorium for Proteinkemi (LfP), Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet, Gustav Wieds Vej 10C, 8000 Aarhus C. Tlf. 87 15 54 62, e-post: jatr@mbg.au.dk

3. Øvrige medarbejdere

Professor Lotte Bach Larsen (LBL), Institut for Fødevarer, FOOD, Foulum, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, lbl@food.au.dk

Lektor Jette Feveile Young (JFY), Institut for Fødevarer, FOOD, Foulum, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, jettef.young@food.au.dk

Postdoc Bjørn Petrat-Melin, Ph.d. (BPM), Institut for Fødevarer, FOOD, Foulum, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele, bjornpetratmelin@food.au.dk

Postdoc Thao Thi Thu Le, Ph.d. (TL), Institut for Fødevarer, FOOD, Foulum, Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, 8830 Tjele,

Tilknyttede studerende:

Rasmus Kock Haislund Jensen (RKHJ), Kandidat E2014, MBG, AU

Kenneth Dyrmosé Nielsen (KN), Kandidat E2014, MBG, AU

Sidsel Madsen (SM), start aug 2014, Kandidat sept. 2015. MBG, AU

Maria E. Nunez (MN), start sept 2014, kandidat dec 2015, MBG/FOOD, AU

Lisa Christiansen (LC), Kandidat S2015 (KU, projektarbejde v FOOD, AU)

Cecilie Refsgaard Olesen (CRO), Kandidat S2015 (KU, projektarb. v FOOD, AU)

Nina Gemke (NG), Bachelor juni 2015, MBG, AU

Mathias F. Glahder (MG), start kandidat i Bioteknologi E2015, MGB/ENG, AU.

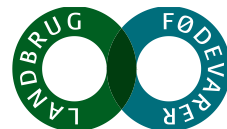
Shanjid Ahmed Shiplu (SAS), Erasmus praktikant, kandidatstuderende fra University of Camerino (tilknyttet FOOD, AU)

4. Finansieringskilder

Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

Arla Foods Ingredients (AFI)

Aarhus Universitet (AU)



5. Projektperiode

Projektperiode med MFF finansiering:

Projektstart (Måned/år): Januar 2014

Projektafslutning (måned/år): December 2016

6. Projektresumé

Det var projektets hensigt at etablere nye redskaber til vurdering af kaseinprodukters, og specielt β -kaseins, ernæringsmæssige og biologiske egenskaber. Det blev gjort ved grundlæggende karakterisering af industrielt fremstillede pulvere i relation til standardprøver og ved at opbygge modelsystemer til vurdering af biotilgængelighed og biokemisk betydning for recipienten.

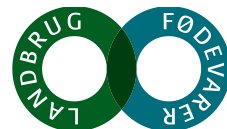
Med projektets udløb var der fremstillet fem forskellige industrielle β -kaseinholdige fraktioner/blandinger (gående fra 70 til 95% renhed). Således har projektet bidraget med viden om, hvorledes højere renhed kan nås, og hvad renhedsgraden betyder for eventuelle effekter. Fordøjeligheden er en vigtig parameter, når biotilgængeligheden skal vurderes. Vi har etableret og tilpasset fordøjelsesprocedurer, der simulerer *in vivo*-betingelserne ved både "adult"- og "infant" betingelser, og endvidere muliggør sammenligning med standardprøver. Hvilket er gjort på β -kasein fremstillet af AFI, et konkurrerende firma, og protein opnået fra human- og komælk. Der var ingen eller meget små forskelle i fordøjeligheden af prøverne fra AFI og LfP/FOOD, hvorimod konkurrentens produkt resulterede i et helt andet nedbrydningsmønster.

Projektet har undersøgt β -kaseins bioaktivitet vha. tre forskellige modeller. A. Et baseret på signalerende tarmcellers frigivelse og holdbarhed af signalstoffer (primært GLP-1), som vides at have indflydelse på mæthed, kroppens omsætning og velbefindende. B. Et cellebaseret system til vurdering af produkternes, og afledte fragmenters, indflydelse på modning og dannelse af et tæt beskyttende tarmcellelag. C. Endeligt er der opsat et system til inspektion af komponenters indflydelse på afgørende geners udtryk i tarmceller. Alle industrielle prøver med β -kasein var i stand til at fremme sekretion af GLP-1 fra enteroendokrine celler. Der var tegn på en lille stimulerende effekt af fordøjet og intakt β -kasein på cellelags modning/tæthed. Det statistiske grundlag herfor er dog ikke på plads. Modsat havde hverken intakt eller fordøjet β -kasein en hæmmende effekt på dannelsen af et godt og beskyttende tarmcellelag, hvilket eksempelvis ses for høns-ovalbumin. Genekspressionsanalyserne var ikke konklusive.

Fast ligger det dermed, at der ikke er tegn på reduceret aktivitet eller funktionalitet af de testede AFI fraktioner. Der er altså ikke teknologiske grunde til at se bort fra fremstilling af en hel eller delvis ren β -kasein fraktion med dokumenterede funktionelle egenskaber. Det er dermed op til mejeriindustrien at vurdere de afsætningsmæssige muligheder for et sådant produkt.

The focus of current project was to setup tools to evaluate casein protein ingredients, especially process-produced β -casein, and in this way facilitate accumulation of knowledge about their nutritional and biological properties. This was done by characterizing industrially produced samples and relating them to controls from the laboratory, and by establishment of tools to assess the bioavailability and the biochemical significance for the consumer.

At the end of the project, five different industrial β -casein fractions have been manufactured (with 70-95% purity). Consequently, through this project,



knowledge has been attained on how to get higher purity, and what impact this has on assumed effects. We have established experimental procedures to simulate *in vivo* protein degradation, because digestibility is an important parameter to estimate bioavailability. Upon comparison, no or very small differences was seen in the digestibility of industrial AFI β -casein and LfP/FOOD samples. However, proteolytic fragmentation of a β -casein sample from a competing company resulted in a very different peptide composition.

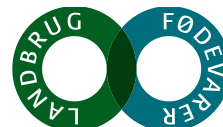
The bioactivity of β -casein was investigated by three different models. A. Measurement of release and stability of signaling molecules (mostly GLP-1) from cells originating from the intestinal epithelia, as these have impact on satiety, metabolism, and well-being. B. A cell-based systems to monitor the ability of pure or degraded β -casein to influence the appearance and maturation of intestinal cell barriers. C. Lastly, a model system was prepared to inspect the influence of components on expression of important genes in intestinal cells. Like the standard samples, all industrial β -casein samples were able to promote GLP-1 release from enteroendocrine cells. There were indications of a small stimulating effect of intact and digested β -casein on the maturation and integrity of a cell barrier of intestinal cells. Statistical significance for this was, however, not achieved. Never the less, no detrimental effects were observed of intact or fragmented β -casein on establishment of a good and protective layer of intestinal cells, which e.g. was seen with chicken ov-albumin. Conclusions could not be drawn from the performed gene-expression studies.

Thus, it was established that there were no signs of reduced activity or functionality of the tested AFI fractions. By that there are no technological arguments for letting down production of more or less pure β -casein fractions/ingredients. It is now up to the dairy industry to evaluate the possibilities for such a product on the market.

7. Projektets formål

Det har hidtil stort set ikke været muligt for mejeriindustrien på rentabel vis at fremstille en helt eller delvis ren β -kasein fraktion fra komælk. I nært samarbejde med Aarhus Universitet har dette imidlertid vist sig muligt for Arla Foods Ingredients. Det vurderes, at der nu er mulighed for fremstilling af en ny værdiforædlet fødevarer ingrediens. Den kan tænkes benyttet som tilsætning til modermælkserstatning, småbørnsmad og anden form for specialernæring. Med det som udgangspunkt, er det projektets formål at finde viden om disse nye fraktioneringsmetoder. Deraf følger et behov for at forstå værdien og funktionaliteten af nye proteinprodukter. Det er projektets hensigt at etablere nye redskaber til vurdering af produktets ernæringsmæssige og biologiske egenskaber. Projektet er opbygget af tre arbejdsopgaver, hvor der lægges vægt på grundlæggende at evaluere fraktioneringen af β -kasein, vurdere produktets biotilgængelighed og endelig om en indtagelse har betydning for recipienten.

Previously the dairy industry has refrained from producing and marketing pure or cruder β -casein protein fractions. It was considered too expensive. However, as a contribution of a recent collaboration between Aarhus University and Arla Foods Ingredients a possible route for manufacturing such an affordable product has now been sketched. It might turn out to be useful in baby formula, meals for young children or in other kinds of special nutrition. The aim of current project is to evaluate the process-produced β -casein, and thereby enabling a better understanding of the value and functionality of this putative new product. The project

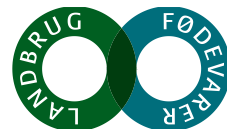


has three work packages dealing with establishment of tool to assess the fractioning methods, the bioavailability and biological value for the consumer.

8. Projektets baggrund

I komælk udgør kaseinerne (α_{S1} , α_{S2} , β og κ) ca. 80% af proteinet, hvorimod kasein kun repræsenterer 20-40% af det humane mælkeprotein (som dog ingen α_{S2} -kasein har). Forholdet mellem de enkelte kaseiner varierer en del indbydes imellem arter. Eksempelvis udgør β -kasein hhv. ca. $\frac{1}{3}$ -del og $\frac{3}{4}$ -dele af bovin og human mælk. Udover at være en basal næringskilde menes kasein også at være et vigtigt udgangsmateriale for en række peptider med forskellige biologiske aktiviteter, fx blodtryksænkning, immunomodulering, antimikrobiel, mineral (kalcium) binding og opioid virkning (Korhonen & Philanto 2007, Curr Pharm Des. 13, 829-43). Især β -kasein er en rig kilde til bioaktive peptider, når det nedbrydes med fordøjelsesenzymer, inkl. peptider med antimikrobiel, blodtryksænkende, antithrombotiske, kaseinofosfopeptider, immunmodulerende og opioide peptider (Meisel, 1998, Int. Dairy J. 8, 363-373 and Clare & Swaisgood, 2000, J. Dairy Sci 83, 1187-95). Peptiderne frigives ved enzymatisk hydrolyse eller mikrobiel fermentering. Efter fermentering med *Lactobacillus helveticus* genereres peptiderne Val-Pro-Pro (VPP) og Ile-Pro-Pro (IPP) fra β -kasein. VPP og IPP er potente inhibitorer af angiotensin-I converting enzyme (ACE). Det er vist, at disse ACE-hæmmere virker blodtryksænkende hos spontant hypertensive rotter (Nakamura et al, 1995, J. Dairy Sci 78, 1253-7) samt hos japanske og finske individer (Hata et al., 1996, Am J Clin Nutrit 64, 767-71 og Seppo 2003, Am J Clin Nutrit 77, 326-30). Bovin β -kasein er et 209-aminosyrerester langt protein, men er i øvrigt karakteriseret ved et relativt heterogent udtryk. Eksempelvis findes der både i dansk og udenlandsk mejerimælk en række genetiske varianter (A1, A2, B og I variant), forskellige fosforyleringsformer (4 og 5 P), samt forskellige plasminhydrolyseprodukter (γ_1 , γ_2 , γ_3 og de tilhørende PP5, og PP8 "fast" og "slow") (Farrell et al., 2004, J. Dairy Sci. 87, 1641-74 and Jensen et al., 2012, J. Dairy Sci 95, 6905-17). En specifik region i β -kasein (aminosyreresterne 60-70) er bl.a. fundet at indeholde og kunne frigive peptider med forskellige fysiologiske funktioner, og er blevet defineret som en "strategisk zone" i β -kasein. Denne region er umiddelbart beskyttet mod hydrolyse og videre nedbrydning pga. dens høje hydrofobicitet og indhold af prolin-rester (Miglioresamour & Jolles, 1988, Experientia 44, 188-93 and Ravinder et al., 2011, Food & Function, 2, 18-27), og det er dermed interessant i hvor høj grad fragmentet påvirkes af fordøjelsesprocesserne og kan have potentiel biologisk aktivitet i fordøjelseskanalen og tarmsystemet.

Gennem tiden har der været anvendt forskellige analytiske og/eller laboratoriebaserede metoder til oprensning af β -kasein fra mælk. Disse metoder har centreret sig omkring ionbytnings-kromatografi og brug af denaturerende forbindelser, som fx urea, der dog er uønsket i fødevarer. Arla Foods Ingredients (AFI) har på det seneste (sammen med LfP) evalueret muligheder for at udvikle en optimeret metode til industriel isolation af rent, food-grade, β -kasein. Baseret på det arbejde, forelå der ved projektstart to metoder til isolering af β -kasein fra bovin mælk, baseret på hhv. ionbytningskromatografi eller membranbaseret separation. Den umiddelbart mest lovende metode tager udgangspunkt i en regulering af kaseinmicellens stabilitet, hvorved en del af β -kaseinet gøres mere tilgængeligt. Ved brug af en passende membran-teknologi kan β -kasein da isoleres i en renhedsgrad på ca. 75%. Herved er regimet for en kommerciel udnyttelse sat, hvilket muliggør udnyttelse af produktet i fx modernemælksstatninger eller som anden fødevaringrediens.



Projektets ene del stilede mod at videreudvikle den eksisterende metode til oprensning af β -kasein med henblik på at forbedre renheden og funktionaliteten af produktet. Endvidere var der fokus på om forarbejdningsprocessen har indflydelse på produktets kvalitet og bioaktivitet. Effekten af spraytørrings-processen er her et vigtigt element sammen med en eventuel batch-variation.

Ved at tilsætte β -kasein til modernælkserstatninger vil produktet dermed kunne forventes at blive både mere let fordøjeligt samt ligne modernælk mere. Det var en del af formålet med dette projekt at undersøge fordøjeligheden af β -kasein, både det industrielt isolerede og sammenligne med β -kasein af anden herkomst. Udover fordøjelighed, så er den efterfølgende tarmpermeabilitet også en vigtig parameter til vurdering af det fremstillede β -kaseins potentiale i retning af at anvende β -kaseinen som generel fødevaringrediens. Projektet havde til hensigt at vurdere dette *in vitro* i et setup med tarmepitelceller groet på en semipermeabel membran.

Signifikansen af indtag af β -kasein, eller mindre rene produkter, kan følges ved at studere tarmcellers evne til at udtrykke primære fordøjelsesenzymer. Ligeledes er det interessant at studere fraktionernes evne til at påvirke tarmens modnings-hastighed og muligvis regenerative evne. Slutteligt blev der søgt opnået anden viden om bevaret bioaktivitet.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet var delt op i tre arbejdsopgaver/faser **A**, **B** og **C**. Der har løbende været vekselvirkning mellem aktiviteterne de enkelte arbejdsopgaver/faser, da de er indbyrdes forbundne og i større eller mindre grad er hinandens forudsætning.

A. Fremstilling og karakterisering af rene og mindre oprensede fraktioner af β -kasein.

1. Øget renhed
2. Kvalitet

B. Biotilgængelighed

1. Fordøjelighed
2. Transcellulær transport

C. Bioaktiviteter (Regenerative og modningsrelaterede effekter)

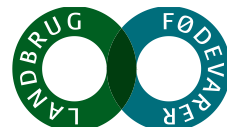
1. Regenerative og modningsrelaterede effekter
2. Enteroendokrin-aktivitet
- 3: Genekspression

10. Projektets resultater

A. Fremstilling og karakterisering.

1 & 2. Øget renhed og kvalitet: Fremstilling af β -kasein-holdige fraktioner/blandinger hos AFI, LfP og FOOD:

I perioden blev β -kasein fremstillet ved minimum syv forskellige protokoller. AFI har lavet pulvere med et β -kasein-indhold på lidt over 70% og til slut et produkt med en væsentlig højere renhed (som benævnes AFI-5). Et pulver fremstillet af et konkurrerende firma (Kon-1) blev inddraget til sammenligning. Desuden blev der lavet to forskellige laboratoriebaserede isolater af β -kasein hos hhv. LfP og FOOD.



Prøver	Prøve Id	Produktionsmetode	Tørringstårn	Protein (%)	Beta-kasein (% af protein)
AFI	AFI-1	M0	T0	90,6	71
AFI	AFI-2	M1	T1	82,9	70
AFI	AFI-3	M1	T2	87,7	73
AFI	AFI-4	M2	T2	90,8	73
AFI	AFI-5	Beskyttet	Beskyttet	89,6	94,2
Konkurrent	Kon-1	Beskyttet	Beskyttet	85,4	45,2
Lab. f. Proteinkemi	PCL-1	Urea + frysetørring		>95	>95
FOOD (AFI)	FOOD/AFI	AFI + syrefældning		89	>90

Forkortelser: AFI, Arla Foods Ingredients; PCL, Protein Chemistry Laboratory; M, Metode, Beskyttet, IP rettigheder hos producent; T, tørretårn. FOOD, Institut for Fødevarer

Protein fremstillet i laboratoriet er blevet benyttet som kontrol. FOOD-metoden bruges, når tilstedeværelse af urea undervejs er uønsket (LfP metode: Thesis af Maria E Nunez og Petrat-Melin et al., 2015 for FOOD metode). Indledningsvist er prøvernes sammensætning blevet vurderet ved 1D SDS-page og RP-HPLC.

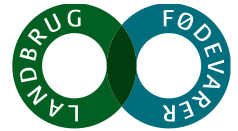
Til slut blev der på LfP indkørt en alternativ metode til en opskaleret separation af bovin β -kasein i laboratorieskala (se Thesis af Mathias F Glahder). Mindst 60x kan herved sættes på i ionbyttertrinet.

B. Biotilgængelighed

1. Fordøjelighed: Pulverne er blevet undersøgt for fordøjelighed under simulerede intestinale betingelser: Pepsin tilføres under sure betingelser, og derefter nedbrydes fragmenterne under simulerede pankreatiske betingelser med trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase og elastase ved neutral pH. Alternativt blev pankretin benyttet på dette trin. Efter fordøjelse blev de fremkomne peptider evalueret vha. SDS-Page, rp-hplc peptide-maps og hydrolysegraden blev vurderet ved brug af fluorescamine.

Der var meget små eller ingen nævneværdige forskelle i fordøjeligheden af prøverne fra AFI og LfP/FOOD. LC og LC/MS-analyser dokumenterede, at prøverne fra AFI med lavere indhold af β -kasein i øvrigt indeholdt betydelige mængder af valleprotein, især β -laktoglobulin. Derfor blev et valleproteinkoncentrat fordøjet parallelt for at kunne evaluere valleproteinernes bidrag i bioaktivitetsassays.

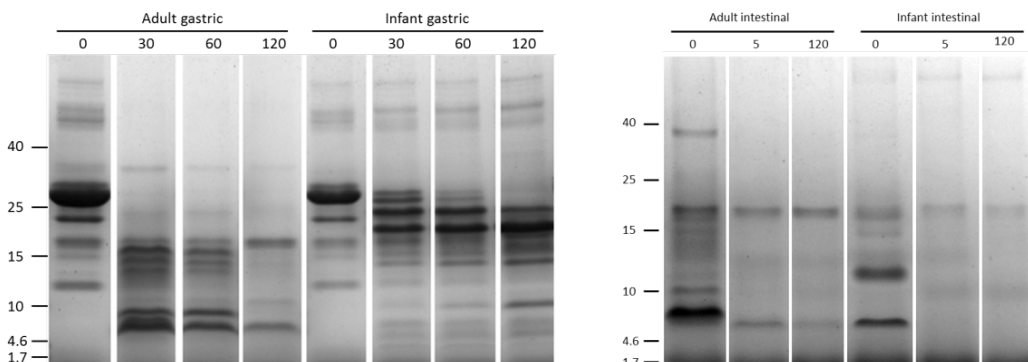
Derudover var det tydeligt, at fremstillingsmetoderne benyttet af AFI og konkurrenten må være forskellige, eftersom konkurrentens prøve var vanskeligere at opløse i en ikke-denaturerende buffer. AFI kan også opnå et produkt med en væsentlig højere renhed. Figuren herunder viser rp-hplc-analysen af et AFI og konkurrentens produkt før og efter hhv. pepsin- og pankreas-fordøjelse.



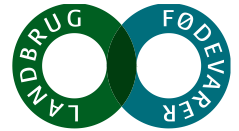
RP-HPLC Peptide-map af Arla- og Konkurrent β -CN (nederst). Intakt, pepsin- og "pankreas" fordøjet.

AFI og konkurrent β -kasein er tydeligvis meget forskellige. AFI-materialet er meget renere og intakt (blå kurve). Endvidere ses der efter "mavefordøjelse" med pepsin et afgrænset antal peptider i AFI-prøven, mens billedet for Kon-1 er mere komplekst (orange kurve). Modsat Kon-1, er AFI β -kasein efter endt procedure praktisk talt blevet fordøjet totalt til meget kort peptider. Kon-1 indeholder en del større peptider (eluerer senere!) efter den fulde fordøjelse (grøn kurve).

På FOOD har BPM (SAS) undersøgt fordøjeligheden af tre β -kasein fraktioner ved at gennemføre simuleret fordøjelse (AFI-5, Kon-1 og FOOD-fraktion). Modellen var sat op ifølge retningslinjerne publiceret under Cost Action Infogest (Minekus, et al., Food Funct, 2014), modificeret for at simulere betingelserne for gastrisk fordøjelse hos spædbørn (Bourlieu, et al., Crit Rev Food Sci Nutr, 2014). Således sammenlignes altså fordøjelse med pepsin ved pH 3 eller 6 for henholdsvis voksen og spædbarns betingelser, samt 5-fold lavere pepsinaktivitet ved spædbarns betingelser. Fra SDS-PAGE (se nedenfor) observeres det, at fordøjelsen forløber markant langsommere under spædbarns betingelser, og at der desuden lader til at være delvist resistente peptider under disse betingelser. Dette understøttes endvidere ved signifikant lavere hydrolysegrad, samt færre identificerede peptider ved LC-MS/MS analyse. Den videre pankreas-relaterede fordø-



SDS-PAGE af AFI-5 fordøjet ved henholdsvis voksen- eller spædbørnslignende betingelser (markeret ved "adult" og "infant") i den gastriske fase (venstre) og den intestinale fase (højre).



jelse blev foretaget ved ens betingelser i begge setups, da det ikke var muligt at finde tilstrækkeligt fyldestgørende information om intestinale betingelser hos spædbørn vs. voksne. De observerede forskelle mellem de to sæt betingelser blev således stærkt reduceret efter 60 – 120 minutters intestinal fordøjelse. Disse resultater demonstrerer, at der ses væsentlige forskelle i fordøjelsen i maven som resultat af ændret pH og pepsinaktivitet, også for et ellers letfordøjeligt protein som β -kasein

2. Transcellulær transport: Efter naturlig fordøjelse vil der forefindes større proteinfermenter tarmsystemet og i høj grad hos spædbørn. Det har været foreslået, at peptider fra β -kasein kan have biokemiske effekter, og projektet havde derfor til hensigt at lave en model, hvorved det kunne undersøges om sådanne fragmenter/peptider passerer over tarmens epitel og ud i blodet. Et sådant set-up til undersøgelse af transcellulær transport er blevet udviklet på LfP/FOOD. BPM har således erhvervet sig erfaring med udførsel af denne type assay. BPM har iagttaget, at anvendelse af Caco-2 celler resulterer i et monolag af celler med en relativt lav permeabilitet, hvorfor det vil være nødvendigt med et sensitivt analyse-set-up til detektion af transporterede/gennemtrængte peptider. Det kunne være vurdering vha. LC-MS/MS.

Maria Nunez (MN) har også gennemført transcellulær transportanalyser med fordøjet β -kasein. Analyserne af eventuelt overførte peptider blev gennemført i samarbejde med AU-FOOD. Evaluering af de opnåede resultater var imidlertid ikke konklusive. Det var tydeligt, at der var peptider, som kunne trænge igennem cellelaget. Det var tilsyneladende di- og tripeptider, og da de var så korte, kunne de ikke henføres til bestemte dele af β -kasein-molekylet.

Der var således ikke noget i de gennemførte analyser, som antydede, at tarmepitel er totalt impermeabelt over for β -kasein-peptider, hvilket er i overensstemmelse med resultater fra litteraturen. Det er stadig muligt, at peptider som VPP og IPP, der er foreslået som blodtrykssænkende inhibitorer af angiotensin-I convertering enzyme (ACE), kan passerer tarmen. Det sidste har projektet ikke dokumenteret.

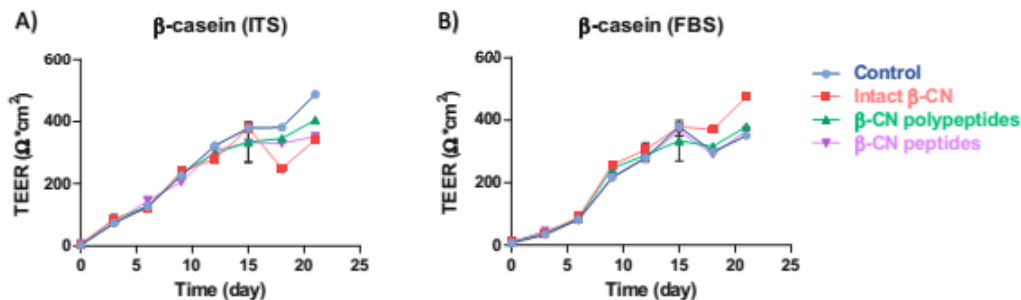
C. Bioaktiviteter

1. Modningsrelaterede effekter: Mælkeprotein er naturligt noget af det første protein, som en umoden tarm møder. Projektet havde derfor som målsætning at opstille assays til studier af fraktionernes evne til at stimulerer tarmens modningshastighed og regenerative evne. Samtidig er optagelse af protein og peptider i tarmen afhængigt af tarmens modningsgrad. Kenneth Dyrmosse Nielsen (KN) indarbejdede et modelsystem med tarmderiverede CaCo-2 celler med brug af cellemedie indeholdende føtal kalveserum (FBS). Modningsprocessen blev fulgt ved måling af alkalisk fosfatase- og aminopeptidase-aktivitet, samt bestemmelse af den elektriske modstand over cellelaget (TEER-værdier). Modelsystemet fungerer godt, men det var ikke informativt at måle aminopeptidase-aktiviteten.

Vi har endvidere set på, om det var muligt at følger niveauet af tight junction proteinet occludin under modningsprocesserne. Ved brug af modellen med FBS, så KN er svag modningsforbedrende effekt af både humane og bovine β -kasein-peptider og en betydelig effekt af peptider fra AFI-2, 3 og 4.

MN har efterfølgende yderligere vurderet modelsystemets brugbarhed. MN har endvidere set på mulighederne for at erstatte FBS med et Insulin-Transferrin-Selen medie (ITS-medie), for at kunne vurdere enkeltfaktorers betydning. ITS-mediet kan godt benyttes, men resultater opnået ved brug af FBS- eller ITS-medie kan ikke direkte sammenlignes. MN har mest koncentreret sig om at studere effekter af varierende koncentrationer af β -kasein-peptider på udviklingen af TEER og AP-aktivitet. Forsøg er blevet lavet i mange replika. Nina Gemke (NG)

har undersøgt, om intakt β -kasein (AFI-3 og PCL-1) har modningsrelaterede effekter. NGs resultater viste ingen forskelle mellem industrielt og laboratorie β -kasein, men antydede at disse produkter resulterede i en lidt højere celletæthed til sidst.



Transepithelial electric resistance (TEER) værdier for Caco-2 cellers modning ved brug af forskellige medier og forskellige β -kasein-behandlinger.

Som ses af figuren, så er der ikke nævneværdig forskel på, hvilken type cellemedie, der benyttes. Effekter af intakt og nedbrudt β -kasein er heller ikke signifikant forskellige.

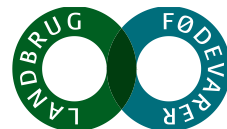
Som beskrevet af andre har vi også været i stand til at påvise, at delvist nedbrudt høns ov-albumin hæmmer dannelse af et fast og impermeabelt celleglag. I en række eksperimenter testede vi, om intakt eller fordøjet β -kasein kunne fremme heling efter en behandling med fragmenteret ov-albumin. Det var imidlertid ikke tilfældet.

Som delkonklusion kan man sige, at der indledningsvist blev observeret en lille stimulerende effekt af fordøjet og intakt β -kasein på celleglagets modning/tæthed. Det statistiske grundlag for denne effekt er ikke helt tilstrækkeligt, og tilsyneladende var effekten mere udvisket, når FBS blev erstattet med ITS i mediet. Det bemærkes dog, at hverken intakt eller fordøjet β -kasein har en hæmmende effekt på dannelsen af et godt og beskyttende tarmcelleglag, hvilket man jo eksempelvis ser for peptider fra høns ov-albumin.

2. Enteroendokrin aktivitet: I et tidligere MFF-projekt har vi arbejdet med at opstille og afprøve et cellebaseret assay (benytter humane NCI-H716 L-celler), som giver mulighed for at følge frigivelsen af GLP-1 som svar på fødevarerkomponenter. Frigivelse af GLP-1 fra tarmen er medvirkende til at regulere kroppens hormonspejl og give mæthedsfornemmelse. De opnåede resultater peger på, at intakt β -kasein giver høj sekretion af GLP-1.

Vi har undersøgt, om de under punkt A førstnævnte prøver kan stimulere frigivelsen af GLP-1. Resultaterne angiver, at mejeriteknisk udvundet β -kasein og kontrol β -kasein (PCL-1 og FOOD-præparat) alle kan stimulere frigivelsen af GLP-1. Vi har også testet konkurrent β -kasein (Kon-1), som måske lidt overraskende også resulterer i stimuleret GLP-1 frigivelse, eftersom det er mindre rent og har lavere opløselighed.

Udover effekter af β -kasein, så kan α_{S2} -kasein også stimulere GLP-1 frigivelse fra NCI-H716 celler. Sidsel Madsen (SM) har i sit speciale opsummeret sit arbejde med at kortlægge effekterne af α_{S2} -kasein (SMs kandidatafhandling). SM formåede at gøre selve assayet endnu mere stabilt med bedre standardkurver. SMs studier har undersøgt den stimulerende virkning af α_{S2} -kasein-dimeren på *in vitro*-sekretionen af GLP-1 i NCI-H716 celler, og berørt nogle af de mekanismer, der vedrører den cellulære optagelse af protein α_{S2} -kasein-dimeren og den følgende udskillelse af GLP-1. Desuden er muligheden for at anvende den humane intestinale FHS 74 Int cellelinje som alternativ blevet undersøgt. *In vitro*-sekretionen af



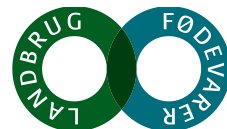
GLP-1 blev tydeligt og pålideligt stimuleret af α_{S2} -kasein-dimeren. Denne virkning blev observeret for både intakt og enzymatisk hydrolyseret α_{S2} -kasein-dimer. Dog skulle der relativt store mængder af α_{S2} -kasein-dimeren til for at observere en virkning på GLP-1-sekretionen. Derudover synes hverken ekstracellulært eller intracellulært calcium at være nødvendige for GLP-1-sekretionsmekanismerne. Endelig blev det konstateret, at den intestinale FHS 74 Int cellelinje godt kan fungere som en alternativ cellemodel for intestinal GLP-1 -sekretion fra L-celler.

GLP-1s biokemiske signal afhænger, af stoffets stabilitet/levetid i blodbanen. GLP-1 inaktiveres bl.a. af dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). Forsøg på FOOD med inhibering af DPP-4 er gennemført for fordøjede β -kasein-prøver (AFI prøver 1, 2, og 3 og valleprotein). Den inhiberende effekt af β -kasein på DPP-4 øges ved fordøjelse. Således indikerer disse resultater, at fordøjelse af mælkeprotein fraktioner muligvis kan øge deres positive indflydelse på GLP-1's funktionelle levetid ved at hæmme aktiviteten af DPP-4.

3. Genekspression: Ændringer af, hvorledes diverse cellers gener kommer til udtryk som følge af en behandling, kan give information om ændringer i cellernes tilstand og metabolisme. Det var bl.a. udgangspunkt for Rasmus Koch Haislund Jensens (RKHJs) specialearbejde, hvor han gennemførte analyser ved hjælp af Real Time-qPCR. Her studeredes effekten af β -kasein (og α_{S2} -kasein, κ -kasein og tre mælkeproteinhydrolysater, Lacprodan DI-2021, Lacprodan DI-3071 og Peptigen IF-3080) på ekspression af en række gener fra lipidomsætning og centrale metabolisk relevante proteiner. Desværre blev disse eksperimenter ikke foretaget mange gange, og burde også foretages med sammenligning med andre kontrolgener. Så data må betragtes som præliminære. Mathias F. Glahder (MG) har foretaget Q-PCR-studier af, hvorledes fordøjet α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ -kasein påvirker ekspressionen af fem gener, som er essentielle for kulhydrat-, aminosyre- og lipidmetabolismen. Kommercielt BSA blev benyttet som kontrol. Studierne blev gennemført ved brug af Caco-2 og FHs 74 int cellelinjerne. Her så vi, at der var en signifikant dosisafhængig regulering af genet for sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF-2), når FHs 74 Int celler blev behandlet med fordøjet κ -kasein. Samtidig blev det dokumenteret, at typen af celledyrkningsmedie også påvirker genekspressionen generelt. Efterfølgende så MG i en undersøgelse, hvor 2D-gelanalyse blev anvendt, at fordøjet β -kasein har en samlet, men kompleks betydning for cellernes overordnede proteinprofil ved sammenligning med BSA. Samlet støtter MGs resultater den aktuelt verserende hypotese om at fordøjet kasein kan have en unik regulatorisk effekt på den intestinale metabolisme.

På FOOD har BPM (LC, CRO) indkørt den murine GLUTag L-cellemodel for enteroendokrine sekretionsstimulering. Arbejdet indbefattede en evaluering af effekten af de intakte, samt fordøjede AFI prøver 1, 2, og 3 og valleprotein på GLP-1 sekretion. Resultaterne peger på at i denne model øges den stimulerende effekt på GLP-1 sekretionen efter fordøjelse af alle protein-fraktionerne. Desuden antyder præliminære data at udtrykket af generne *Cck* og *Gcg* (kodende for henholdsvis cholecystokinin og GLP-1 precursoren proglucagon) øges på mRNA niveau. Den videre behandling af resultaterne antyder, at der er signifikant overordnet effekt på udtrykket af begge gener, som dog ikke kan vises med stram statistisk signifikans ved enkelt-prøve sammenligning.

Kortfattet resumé: Projektet havde til formål at evaluere konsekvensen af at fraktionere β -kasein industrielt. Det er tydeligt, at proteinet bevarer sin integritet med en lav denatureringsgrad, og det burde derfor kunne optages på lige fod med mindre raffinerede former. Der er heller ikke tegn på at industrielt frembragt β -kasein har ændret bioaktivitet.



11. Afvigelser

11.1 Fagligt: Ingen. 11.2 Økonomisk: Ingen. 11.3 Tidsplan: Ingen.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribruget

Projektet var en fortsættelse af et relativt nyligt opstået formaliseret samarbejdsprojekt mellem to stærke grupperinger inden for mælkeforskning ved Aarhus Universitet: Laboratorium for Proteinkemi (mbg.au.dk) og Forskergruppen for fødevarerekemi og – teknologi (food.au.dk). Projektet havde fokus stramt rettet mod at give et grundlag for vurdering af funktionaliteten og den ernæringsmæssige betydning af en eventuelt kommende kasein-ingrediens. For at kunne gennemføre det, har vi søgt efter etablerede teknikker, som kunne validere kvaliteten af industrielt fremstillet β -kasein. Efter projektet forefindes øget viden om, hvorledes højere renhed kan nås, hvad renhedsgraden betyder for eventuelle effekter. Alle prøver med β -kasein fra AFI var i stand til at fremme sekretion af GLP-1 fra enteroendokrine celler. Det ligger endnu ikke fast, om de øvrige assays kan benyttes til at dokumentere biologiske effekter af β -kasein, hvorfor det er lidt svært at bruge disse i beslutninger vedrørende en mulig kommerciel udnyttelse. Fastslået er det imidlertid, at der ikke er tegn på reduceret aktivitet eller funktionalitet af de testede AFI-fraktioner.

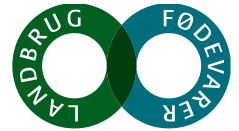
Projektet har endvidere klarlagt, at der stadig er rum for at finde nye assays, der dokumenterer β -kaseins bioaktivitet. Nærværende studier kan ses som en forløber for dette. Eksempelvis viser genekspressionsanalyserne, at der er cellulær respons på β -kasein.

Der er altså ikke teknologiske grunde, som udelukker industriel fremstilling af en hel eller delvis ren β -kasein-fraktion med dokumenterede funktionelle egenskaber. Det påhviler mejeriindustrien at vurdere de afsætningsmæssige muligheder for et sådant produkt.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

1. In vitro digestion of purified β -kasein variants A1, A2, B, and I: Effects on antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory capacity. Petrat-Melin, Bjørn; Andersen, Pernille; Rasmussen, Jan T.; Poulsen, Nina Aagaard; Larsen, Lotte Bach; Young, Jette F. I: Journal of Dairy Science, Vol. 98, Nr. 1, 2015, s. 15-26.
2. Tora Asledottir, Thao T Le, Bjørn Petrat-Melin, Tove G Devold, Lotte B Larsen, Gerd E Vegarud (2017). Identification and Quantification of Beta-Casomorphin-7 from Bovine Beta-Casein A1, A2 and I after Ex Vivo Gastrointestinal Digestion. Int. Dairy J., *accepted*
3. Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Response to Milk Proteins in the Human Enteroendocrine Cell Line NCI-H716 (2017). Marcel Jøhnke, Sidsel Madsen, Kenneth Dyrmosø Nielsen, Brian Christensen, Trine Andreasen, Lotte Schack, Jan Trige Rasmussen, Christian Würtz Heegaard. (draft)



4. Digestion of three beta-casein enriched fractions in an *in vitro* model simulating the gastric conditions of adults or infants (2017), Bjørn Petrat-Melin, Shanjid Ahmed Shiplu, Lotte Bach Larsen, Jan Trige, Rasmussen, Jette F. Young. (draft)

Populærvideenskabelige artikler:

Raffinering af kasein. Kenneth Dyrmosø Nielsen, Jesper Christensen, Jan Trige Rasmussen, Mælkeritidende 2014, 12, 14-5.

Kan kasein tåle at blive rensat op? Petrat-Melin, Bjørn; Young, Jette F; Larsen, Lotte Bach and Rasmussen, Jan Trige (tentativ titel). Mælkeritidende, to be drafted.

Studenteropgaver:

Master Thesis (aug 2014), Rasmus Kock Haislund Jensen, Effects of Milk Protein on GLP-1 Release and mRNA Expression of Genes Involved in Intestinal Lipid Metabolism *In Vitro*. Exam (Sept. 2014).

Master of Science Thesis (Sept 2014). Kenneth Dyrmosø Nielsen, The Effects of Selected Milk Components on Differentiation and Integrity of Human Epithelial Cells. Exam (okt 2014).

Master Thesis (jun 2015), Cecilie Refsgaard Olsen and Lisa Christiansen, Effects of *In Vitro* Gastrointestinal Digested Milk Proteins on GLP-1 Secretion and DPP-IV Inhibition. Exam (Jun 2015)

Bachelor Thesis (jun 2015), Nina Gemke, Effects of Intact Bovine β -Casein on Cellular Differentiation of the Human Intestinal Cell Line Caco-2.

Master's Thesis in Molecular Medicine (sept 2015). Sidsel Madsen, Effects of α 2-Casein Dimer on Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Secretion *In Vitro*. Exam (autumn 2016)

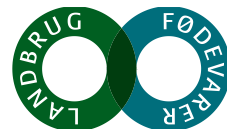
Master Thesis in Molecular Nutrition and Food Technology (nov 2015). María Eugenia Núñez Salces, Bioavailability and intestinal bioactivity of intact and *in vitro* digested beta-casein. Exam (dec 2016)

Master Thesis in Engineering (april 2016). Mathias Frost Glahder. Effects of Digested Bovine Milk Caseins on mRNA Expression of Genes and Protein Expression Profile in Cultured Intestinal Epithelial Cells. Exam (april 2016)

Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:

Tora Asledottir, Tove Devold, Bjørn Petrat-Melin, Thao T. Le, Lotte Bach Larsen and Gerd Vegarud (2016). *Ex Vivo* Digestion of Bovine Milk with Genetic Variants A1 and A2 of β -Casein and Identification of Bioactive peptides. 1.st International Conference of Food Bioactives and Health. Norwich, UK, Sep 13-15. 2016. Abstract and poster.

Bjørn Petrat-Melin, Thao T. Le, Nina Aagaard Poulsen, Jette F. Young, Lotte Bach Larsen (2015). Exploring the bioactive potential of purified bovine beta- and kappa-casein variants during *in vitro* digestion. Abstract for IDF World Dairy Summit, Vilnius, Lithuania, September 20-24., 2015.



B. Petrat-Melin, T. T. Le, J. F. Young, L. B. Larsen (2015). In vitro gastrointestinal digestion and peptide profiling of bovine beta- and kappa-casein variants. Abstract and poster, Infogest, Napoli, March 17-19, 2015.

B. Petrat-Melin, T.T. Le, H.S. Møller, L.B. Larsen, J.F. Young (2014). Characterization of the in vitro digestion and biological activity of bovine casein variants. Abstract and poster for the 11th International Symposium for Milk Ge-nomics and Human Health. Aarhus, Denmark, Oct. 6.-8. 2014.

Mødeindlæg:

Andet:

LB Larsen (2017). Der mangler viden om forskellen på mælkeproteiner. DCA nyt, 28.3.2017. <http://dca.au.dk/aktuelt/nyheder/vis/artikel/der-mangler-viden-om-forskellen-paa-maelkeproteiner/>

LB Larsen (2016). Ny mælk i Irma deler egenskaber med modermælk. Politiken 5.12.2016. <http://politiken.dk/mad/ECE3495081/ny-maelk-i-irma-deler-egenskaber-med-modermaelk/>

LB Larsen, TTT Le (2016). Thao forsker i mælkeproteiner. Viborg Stifts Folkeblad, 31.8.2016.

Larsen LB 2016. Fødevarerforskning og Innovation. Nordvestjysk Forum for Erhvervsledere (NVFL). Mundtligt indlæg, Foulum 10. marts 2016.

Larsen LB 2014. A2 mælken breder sig. Mejeri. Maj 2014

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

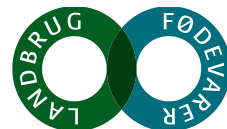
Shanjid Ahmed Shiplu (SAS), Erasmus praktikant, kandidatstuderende fra University of Camerino (tilknyttet FOOD, AU i 2016).

Projektet har medvirket i forskeruddannelser af post doc Bjørn Petrat-Melin og Thao T.T. Le ved AU-FOOD.

I øvrigt, vidne antallet af bachelorrappporter og kandidatafhandlinger om, at projektet har haft stor betydning for uddannelse af personer med viden indenfor nærværende fagområde.

15. Nye kontakter/projekter

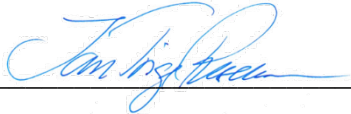
Om projektets eventuelle aftryk på andre/nye mejerirelaterede projekter kan det siges, at der er en klar linje mellem de to afsluttede MFF teknologi-projekter "Nye måder at undersøge struktur, aggregering og praktiske implikationer af kaseiner og kaseinmiceller", "Kvalitet og aktivitet af industrielt fraktioneret kasein" og det nystartede "BETAFRAG - Nye og innovative ingredienser indeholdende β -kaseinfragmenter" støttet af MAF/MFF og GUDP. De etablerede teknikker har relevans og vil naturligvis blive benyttet inden for andre mejerirelaterede projekter.



Kontakt til Gerd Vegarud omkring fordøjelse af forskellige genetiske varianter af β -kasein, Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway.

16. Underskrift og dato

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

03-04-2017
Dato: _____ Projektleders underskrift: _____ 

03-04-2017
Dato: _____ MFF-repræsentants underskrift: _____ 