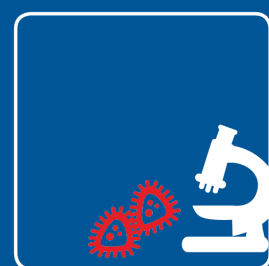


Jan Trige Rasmussen:

Nye og innovative ingredienser indeholdende beta-kaseinfragmenter (BETAFRAG)

Formation, isolation, and functional characterization of beta-casein fragments in milk (BETAFRAG)



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

DK: Nye og innovative ingredienser indeholdende beta-kaseinfragmenter (BETAFRAG)

UK: Formation, isolation, and functional characterization of beta-casein fragments in milk (BETAFRAG)

2. Projektleder

Jan Trige Rasmussen, seniorforsker, ph.d.

Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi & Genetik (<http://mbg.au.dk/>), Laboratorium for Proteinkemi.

Tlf.: +45 28 83 51 04

E-mail: jatr@mbg.au.dk

3. Øvrige medarbejdere

Ingen.

4. Finansieringskilder

- a) Mejeribrugets ForskningsFond/Mælkeafgiftsfonden (45% af finansieringen)
- b) Grønt Udviklings- og Demonstrationsprogram (GUDP) (35% af finansieringen)
- c) Institut for Molekylærbiologi & Genetik, Aarhus Universitet (20% af finansiering)

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: 1.1. 2017 - 31.12.2020

6. Projektresume

DK: Almindelig tankmælk indeholder ~3,5-4,0 % protein. I komælk udgør kaseinerne 80% af proteinet og β -kasein ca. 1/3-del af dette. Kasein og fragmenter heraf er en vigtig næringskilde, men tilskrives også interessante egenskaber og funktioner så som emulgering, samt ernæringsmæssige- og/eller helsefremmende effekter. I et tidligere projekt støttet af MFF og inSPIRe har vi sammen med mejerierne vist, at rentabel produktion af β -kasein er mulig. Under lagring og ostning af mælk kløves β -kasein i fortrinsvis 5-6 fragmenter.

Nedbrydning af β -kasein kan have favorable eller uheldige konsekvenser for tekstur og smag af mælkeprodukter. Under vellykket ostning giver β -kasein-nedbrydning den tilstræbte smag og konsistens, mens ukontrolleret nedbrydning kan give uønsket udfældning og gelering. Der findes store mængder af kaseinfragmenter i ostevalle. Det kalder på evaluering af det afledte kommercielle potentiale.

I god overensstemmelse med projektets projektbeskrivelse er hensigtsmæssige metoder til monitorering af β -kasein-fragmenter blevet afprøvet og etableret. Større mængder af store β -kaseinfragmenter blev isoleret til gennemførelse af detaljerede funktionelle, fysisk/kemiske analyser, og endeligt undersøgelser af mulige bioaktiviteter. Den sekventielle, plasmininducerede nedbrydning af β -kasein blev evalueret og viste sig at være en markant mere kompleks proces, end litteraturen antyder. I sidste ende er diversiteten af dannede fragmenter lille, og det iagttages, at de store C-terminale fragmenter forsvinder over tid. Undersøgelser af en række mejeritekniske fraktioner viser, at fragmenter af β -kasein optræder meget tidligt i procestrinene, måske allerede inden mælken møder mejeriet. I valle vil tilstedeværelse af β -kasein-fragmentet PP5, og i mindre grad PP8 slow, være fremherskende. Separation af store β -kasein-fragmenter kan kun foregå under delvist denaturerende betingelser, hvilket vil komplicere indførelse af hensigtsmæssig mejeriindustriel teknologi til isolering eller fjernelse af sådanne fragmenter. De store β -kasein-fragmenter PP8 slow og PP5 stimulerer tilsyneladende tarmcellers evne til at danne et stabilt og tæt cellelag, set forhold til andet protein. Dertil antyder studierne, at fragmenterne kan stimulere et cellulært optag af jern, især efter en simuleret mave/tarm-fordøjelse.

Projektets resultater er delt med fagfeltet. Det er nu op til branchen at afgøre, om den vil videreudvikle på metoder til enten isolation eller fjernelse af de store β -kasein-fragmenter. Hvilket måske ikke er helt så enkelt som først antaget pga. β -kaseins og de afledte fragmenters aggregerende egenskaber.

UK: Ordinary dairy milk constitutes 3.5-4.0% protein and caseins account for 80% of that with β -casein as a major component (1/3 of casein). Caseins and derived fragments are important sources of nutrition but have also been attributed to interesting features such as emulsifying, nutrition-and/or health-promoting properties. We have in a previous DDRF/InSPIRe project together with dairy companies demonstrated that it is possible to purify β -casein in a cost-effective manner. When milk is stored or used for cheese making, β -casein tends to be degraded in 5-6 large fragments. The degradation of β -casein may have favourable or undesirable textual or organoleptic consequences for milk products. Controlled breakdown of β -casein during cheese making is essential for reaching good taste and texture, but if the process runs astray, unwanted aggregation and gelation may be the consequence. The presence of high amounts of β -casein fragments in cheese whey prompts for an evaluation of their commercial potential.

In good agreement with the project objectives appropriate methods for monitoring β -casein fragments were tested and established. Relatively large quantities of β -casein fragments were isolated to conduct detailed functional-, physico/chemical-, and eventually bioactivity studies. The sequential plasmin-induced degradation of β -casein was evaluated, and it turned out to be far more complex than anticipated from the literature. In the end, the diversity of the generated fragments was decreased, and the big C-terminal fragments are disappearing over time. It is seen that fragments of β -casein appear early during processing, maybe already before the milk arrive at the dairy plant. In whey the β -casein fragment PP5 is dominating and to a smaller extend PP8 slow. Separation of large β -casein fragments can only be achieved under partly denaturing conditions, implying that it might be challenging to setup suitable dairy unit operations for the sake of isolation or removal of such fragments. The large β -casein fragments PP8 slow and PP5 seem to stimulate the ability of intestinal cells to form a stable and tight cell barrier when compared with other protein. Another set of

experiments suggests that the fragments might stimulate cellular uptake of iron, especially after a simulated gut/intestinal degradation. The results from the project have been communicated to the field, and it is now up to the dairy industry to assess whether it is feasible and profitable to further develop methods for either isolation or removal of large β -casein fragments. This might not be straight forward due to the aggregation properties of β -casein and the derived fragments.

7. Projektets formål

DK: Omkring 25% af proteinet i mælk er β -kasein, hvortil der knyttes en lang række biologiske og funktionelle egenskaber. Samtidig er det velkendt, at β -kasein nedbrydes i et afgrænset antal store fragmenter, dels forud for og dels under den første del af ostemodningsprocessen. Nærværende projekts formål er at tilvejebringe god generisk og grundlagsskabende viden om dannelse af β -kaseinfragmenter i mælk, eftersom denne proteolytiske nedbrydning kan have både ønskede og/eller utilsigtede effekter, samt eventuelt influere på osteudbyttet. Erkendelserne vil forsyne mejeriindustrien med ekspertise til at skabe merværdi for eksisterende produkter og vise vejen til fremstilling af nye og innovative produkter.

UK: Approximately 25% of the protein in milk is β -casein, which is associated with a long row of biological and functional properties. It is a well-established fact that β -casein is degraded to a few large fragments perhaps before but also during the first parts of the cheese making process. The objective of current project is to provide generic and fundamental knowledge about the formation of β -casein fragments in milk, as this proteolytic breakdown can have both desirable and/or unwanted effects and might even influence the cheese yield. This should provide the dairy industry with knowledge enabling them to add extra value to existing products and set the way for creation of new and innovative products.

8. Projektets baggrund

Komælks- β -kasein (β -CN, ~24 kDa) indeholder 209 aminosyrerester, og 17% af disse er prolin, hvilket kan være noget af årsagen bag proteinets åbne og fleksible struktur. Proteinets egenskaber er godt tilpasset til neonatal ernæring, idet det normalt opfattes som værende let nedbrydeligt. β -CN har fem fosforylerede aminosyrer, der har stor betydning for egenskaber som fx varmemestabilitet, ladning og metalbinding.

I mælkesammenhæng er den proteolytiske nedbrydning af kasein hovedårsagen til de ændringer i tekstur og smag, som er karakteristiske for ostemodningsprocessen. Kasein nedbrydes initialt til store velkendte fragmenter som følge af rester af koagulant (chymosin og pepsin), men også i et vist omfang pga. endogene proteaser (plasmin, cathepsin D, og måske også peptidaser fra somatiske celler). Under modningen deltager de proteinedbrydende enzymer fra løbe, og mælken selv, i varierende grad afhængigt af fremstillingsprocessen. Plasmin er dog det mest betydningsfulde af disse enzymer.

I β -CN er der tre dominerede plasmin-sensitive områder ved følgende aminosyrer: Lys28-Lys29, Lys105-His106 and Lys107-Glu108. Figur 2 viser de fremherskende β -CN-fragmenter, der er beskrevet i mælk og den varme- og syrestabile fraktion kaldet Proteose Peptone (PP): **PP8 fast** (res 1-28), **PP5** (res 1-105/7), **PP8 slow** (res 29-105/7), **gamma-1** (f 29-209), **gamma-2** (f 106-209) og **gamma-3** (f 108-209). Det er ligeledes

foreslået, at gamma-fragmenterne synes at ende op i koaglet under ostefremstilling, imens PP-fragmenterne fortrinsvis går med vallen. Studier viser, at PP-fragmenter udgør op mod 10% af det totale protein i "sød" valle.

Der er en del interessante bioaktiviteter forbundet med fragmenter af mælkeproteiner, som dannes ved mave/tarm-fordøjelse. Mange af disse fragmenter dannes ud fra β -CN og er foreslået at have gunstig indflydelse på blodtryk samt immun- og nervesystemet.

Med baggrund i de fysiologiske og funktionelle egenskaber, som potentielt kan forbindes med β -CN-fragmenter i mælk eller afledte produkter, fx diverse proteinpulvere, var udgangspunktet, at det ville være gavnligt at tilvejebringe mere grundlæggende viden og forståelse af disse komponenter. Dertil kommer information om molekylære egenskaber og interaktioner med andre mælkekomponenter, og data vedr. det enkelte β -CN-fragments bioaktivitet. Til sammen kan sådan viden være med til at øget værdien af nye, innovative proteinprodukter beriget med β -CN-fragmenter. Alternativt kan det være ønskeligt at fjerne/reducere indholdet af β -CN-fragmenter, såfremt de ikke bedrager positivt til produktets kvalitet og fremtoning. Nærværende projekt sigtede imod at erhverve god generel og grundlagsskabende viden om dannelse og konsekvens af β -kaseinfragment-forekomst i mælk, idet de kan have både tilsigtede og/eller uønskede effekter på smag, konsistens, bioaktivitet og måske osteudbytte.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet bestod af seks milepæle (MP):

1. Etablering af værktøjer og metoder til sporing af β -kaseinfragmenter.
2. Evaluering/måling af β -kaseinfragmentdannelse.
3. Udvikling af en separationsmetode til isolering af store β -kaseinfragmenter.
4. Kemisk og fysisk karakterisering af udskilte PP- og gamma- β -kaseinfragmenter.
5. Funktionel karakterisering.
6. Bioaktivitet af udvalgte fragmenter.

Tidsplan	2017	2018	2019	2020
Milepæl 1	XXXXXXXXXXXX	XXX		
Milepæl 2	XXXXXXXXXXXX	XXX XXX	XXX XXX	XXX
Milepæl 3	XXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	
Milepæl 4		XXXXXXXXXXXX	XXXXXX	
Milepæl 5		XXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXX
Milepæl 6		XXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXX
Rapportering/afslutning	XX XX	XX XX	XX XX	XXXXXX

Figur 1. Tidsplan for projektet med angivelse af milepæle.

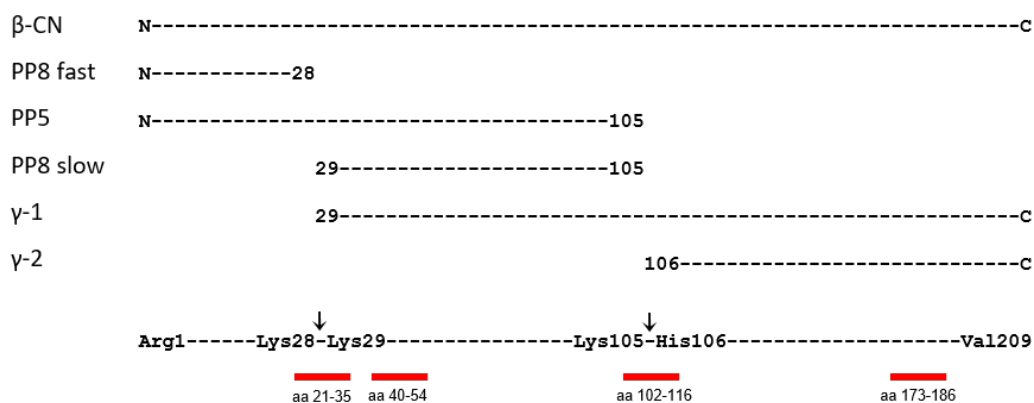
10. Afvigelser

Aktiviteter i MP4 og MP5 blev sammenlagt (godkendt af godkendt af GUDP pr. 30-07-2017). Se i øvrigt pkt. 11.

11. Projektets resultater

Fokus i projektet: Dannelse, isolering og funktionel karakterisering af β -CN-fragmenter i mælk. Til slut søges imod en evaluering af isolerede β -CN-fragmenters bioaktivitet om muligt i relation til intakt β -CN og andre relevante proteiner/fragmenter. Projektperiode: 4 år, med overlappende indsatser imellem de enkelte MP.

MP1. Etablering af værktøjer og metoder til sporing af β -kaseinfragmenter. Antistoffer kan benyttes til at identificere og spore proteiner/makropeptider i en blanding. Indledningsvist blev peptidantistoffer imod Asp40-Gln54 fremstillet, og derpå Glu21-Ser35, Met102-Val116 og Val173-Pro186 (se figur 2 nedenfor).



Figur 2. Illustration af de store β -kaseinfragmenters oprindelse og deres nomenklatur. Genkendelsesområder for anvendte antistoffer er angivet.

Aktiviteter i denne fase vurderes succesfuldt færdiggjort. Redskaber til visualisering af β -CN-fragmenter er til rådighed. Peptidantistofferne rettet imod områder i β -CN gav mulighed for at detektere de på figuren viste fragmenter, og følge om der er sket kløvning i det første og/eller andet labile område. Det blev aftalt, at vi i et vist omfang kunne benytte LC-MS hos Arla Foods Innovation Center til detektion af de tilstedeværende β -kasein-fragmenter. Der blev indkørt en RP-HPLC-metode til monitorering af fragment-mønstre i diverse blandinger understøttet af Maldi-tof MS. Eventuelt kan nyopståede proteolytiske fragmenter præferentielt opmærkes med biotin, hvis interne lysiner blokeres indledningsvist (bachelorprojekt af Pernille Moldrup Sørensen).

MP2. Evaluering/måling af β -kaseinfragmentdannelse. Den sekventielle plasmininducerede nedbrydning af β -CN er blev undersøgt. Vi har set på, om der er forskelle i nedbrydningen af de to mest forekommende β -CN-varianter A1/A1 og A2/A2. Histidin-67 i A1 er i A2 udskiftet med en prolin, men der var ikke nævneværdige forskelle i fragmenteringen, hvilket stemmer overens med at der ikke er oplagte plasmin-kløvningssteder i dette område. Fragmentdannelsen er blevet beskrevet visuelt ved brug af SDS-PAGE og RP-HPLC. Det bemærkes, at der initialt dannes et relativt afgrænset antal fragmenter, og at der til slut hovedsagligt kun er et eller flere fragmenter af samme størrelse tilbage. Naturligvis dannes der til sidst mange

forskellige små fragmenter/peptider. Indledningsvist blev det antaget, at det ville være enkelt at dechifrere nedbrydningsmønstret, hvilket ikke helt har holdt stik, men der er nu skabt et mere klart billede af dette. Kronologien i den plasmin-inducerede nedbrydning er blevet undersøgt i et eksperimentelt studenterprojekt udført af Natacha Roed Roin. Dette arbejde er efterfølgende ført videre i et specialeprojekt af Thea Lyk-kegaard Møller, hvorved der nu samlet set er en god beskrivelse af den i mælk optrædende fragmentdannelsen som følge af mælkeproteasen plasmin. Sitet imellem Lys105-His106/Lys107-Glu109 synes at være mest tilgængeligt for plasmin, efterfulgt af Lys28-Lys29. Lys28-Lys29 foretrækkes sammenlignet med Lys29-Ile30. Lys113-Tyr114 er det tredje mest labile kløvnings-site. Tabel 1 viser en vurdering af den relative forekomst af β -CN-fragmenter efter plasminfordøjelse (visualiseret ved SDS-PAGE). Som det ses, dominerer γ -fragmenterne og **PP5**. Undersøgelser af en række mejerifraktioner viser, at fragmenter af β -kasein optræder meget tidligt, måske allerede inden mælken møder mejeriet. Det bemærkes, at der til slut hovedsagligt kun ses et eller flere fragmenter med størrelse som **PP5**. Naturligvis dannes der til sidst mange forskellige meget små fragmenter/peptider. I kommerciel valle er **PP5** langt det mest forekommende fragment efterfulgt af **PP8 slow** og **PP8 fast**, hvor sidstnævnte kun findes i lille udstrækning. Det er en væsentlige observation, idet det viser overensstemmelse med de simulerede langtidsstudier gennemført med plasmin, og det viser, at antallet af fragmenter i industrielle fraktioner formodentlig er begrænset. Til denne fase aktiviteter hørte også det løbende arbejde, der har været forbundet med at isolere fraktioner indeholdende store β -kasein-fragmenter. Metodikken hertil blev udviklet i **MP3**. Fraktioner med højt indhold af **PP8 fast**, **PP5**, **PP8 slow** er blevet oprenset til brug i **MP6**.

Tabel 1. Kvantitativt estimat af den relative forekomst af β -kaseinfragmenter efter plasminfordøjelse (4 timer ved 37°C og i et forhold på 1:3000 i plasmin og β -kasein) visualiseret ved SDS-PAGE.

Bånd nr.	Fragment	Forekomst
1	γ1 (Lys29-Val209)	+++
2	(Arg1-Lys169)	+
	(Ile49-Val209)	+
3	(Arg1-Lys113)	++
	PP5 (Arg1-Lys105/Lys107)	++++
5	γ2 (His106-Val209)	+++
	γ3 (Glu108-Val209)	+++
	(Tyr114-Val209)	+
6	PP8s (29-105/7)	+

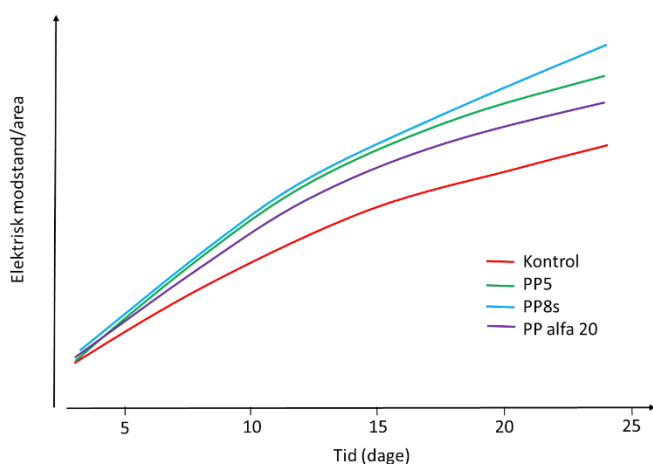
MP3. Udvikling af en separationsmetode til isolering af store β -kaseinfragmenter. Det blev undersøgt om det var muligt ved ionbytningskromatografi, at isolere β -CN-fragmenter fra industrielle valleproteinprodukter. Her blev både kation- og anion-bytning benyttet med 15 forskellige set up af buffersammensætning, pH og gradientløsninger. Efter at have evalueret disse blev det tydeligt, at det ikke var en ideel indgang. Det er nødvendigt at reducerer antallet af komponenter ved en forbehandling, hvor proteose-pepton fasen isoleres (100°C i 20 min, pH ↓ 4,6, centrifugering, dialyse og frysetørring). Indledningsvist blev der benyttet en WPC-20 og en Lacprodan-20 fra Arla Foods Ingredients (AFI), begge med et angiveligt højt indhold af β -CN-fragmenter. Det viste sig imidlertid, at prøverne ikke var velegnede, da de viste høj grad af laktosylering og havde højt indhold af glykomakropeptid (stammer fra kappa-kasein). Alfa-20 viste sig at være et godt udgangsmateriale, og alternativt kan man bruge skummetmælk, der lagres i 12dg, 37°C, uden ilt. Til separe-

ring af fragmenter fra PP-fraktionen bruges bedst en buffer med myresyre. Relativt rene fragment-præparationer er opnået, indeholdende hhv. **PP5** og **PP8 slow**. Og ved et efterfølgende trin med RP-HPLC er **PP8 fast** blevet isoleret.

MP4 og MP5. Kemisk og fysisk karakterisering af udskilte PP- og gamma- B-kaseinfragmenter samt funktionel karakterisering. Aktiviteter i **MP4** og **MP5** blev sammenlagt (godkendt af GUDP pr. 30-07-2017). Det skyldes bl.a., at vi sammen med AFI konkluderede, at der er størst interesse for at afdække mulige bioaktiviteter knyttet til β -CN-fragmenterne. Det er imidlertid tydeligt, at der sker en aggregering af fragmenterne, idet separation vha. gelfiltrering ikke lykkedes under ikke-denaturerende betingelser. Dette er en afgørende oplysning, idet det vanskeliggør en procesmæssig separation af β -CN-fragmenter fra industrielle valle uden introduktion af mere komplekse og måske ikke rentable metoder.

MP6. Bioaktivitet af udvalgte fragmenter. Mulige biologiske effekter af β -CN-fragmenter, primært mave/tarm-relaterede, er blevet undersøgt i to modelsystemer.

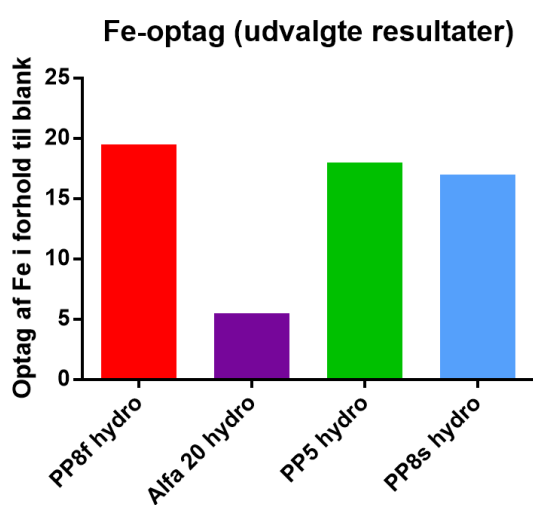
Modning af beskyttende tarmcellelag: Vi har etableret et modelsystem, hvor man følger tarmderiverede CaCo-2 cellers dannelse af et monolag på et permeabelt underlag. Systemet kan bruges til at vurdere fragmenternes indflydelse på modning og etablering af et tæt beskyttende tarmcellelag. Det gøres ved at følge den elektriske modstand hen over cellelaget. Jo større modstand, desto tættere et cellelag er der dannet. Eksperimenter gennemført med denne model viser, at fraktioner med højt indhold af **PP5** og **PP8 slow** har en positiv indflydelse på fremkomst af et tæt og stabilt tarmcellelag hen over en periode på 24 dage set i forhold til, når der ikke var tilsat proteinprøver. Effekterne var også større end for intakt β -kasein, sojabønneprotein, PP fra 12 dage valle og PP fra Alfa 20. Figur 3 viser stilistisk udvalgte resultater vedr. **PP5-** og **PP8 slow** pools, og **PP** fra Alfa 20, hvor det iagttages, at kurvene for disse fraktioner ligger over kontrolværdierne.



Figur 3. Måling af elektriske modstand hen over er cellelag angiver øget tæthed ved stigende værdier. På illustreres på stilistisk vis effekten af udvalgte fraktioner henover en periode på 24 dage.

Binding og transport af mineralet jern: Til disse undersøgelser har vi etableret et assay, hvorved et cellulært optag af jern kan bestemmes (CaCo-2 celler). Thea Lykkegaard Møller har lagt grunden til dette arbejde i specialeperioden, og hendes arbejde er fulgt op i Mads Eg Andersens bachelor- og specialeprojekt inden for

molekylærbiologi og endelig fuldført af det erfarne, tekniske personale. Brugen af en mere hensigtsmæssig cellelinje blevet indkørt (FHs 74 Int). I en række meget omfattende eksperimenter har vi forsøgt at vurdere store β -kasein-fragmenters indflydelse på jernoptag. Det er vanskeligt at give en summarisk evaluering af de opnåede resultater (endnu ikke opgjort til offentliggørelse). Eksempelvis ses det af figur 4, at **PP8 fast**, **PP8 slow** og **PP5** efter simuleret mave-tarm-fordøjelse alle stimulerer jernoptaget, mens dette i mindre grad er tilfældes for udgangsmaterialet Alfa 20 PP. Forudgående kompleksdannelse imellem proteinhydrolysaterne og jern resulterer i et lignede cellulært jernoptag for de samme fraktioner undtaget **PP5** (ikke vist). Således er det sandsynliggjort, at de store β -CN-fragmenter kan facilitere jernoptag, hvis de er en del af kosten. Det relative bidrag i forhold til andre komponenter kunne eventuelt blive testet *in vivo*, men væsentligt er det samtidigt, at β -CN-fragmenterne ikke har negative effekter på cellerne og deres jernoptag.



Figur 4. Udvalgte resultater af store β -kasein-fragmenters indflydelse på et cellelært jernoptag i procent. Optaget er vurderet i forhold til kontroller med ingen tilsætning af proteinhydrolysater.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Projektets eksperimentelle arbejde søgte imod en afklaring af fremkomst og tilstedeværelse af β -CN fragmenter i mælk, men væsentligst i valle. Til det brug fik vi fremstillet og testet en række peptid-antistoffer. Et detaljeret tidsstudie af plasmins nedbrydning af β -CN har fundet sted i to specialeprojekter. I disse projekter har vi samarbejdet med Arla Foods Innovation Centre omkring brug af LC-MS til peptididentifikation. Ud fra velegnede udgangsmaterialer har vi isoleret større mængder af PP-fragmenter til bioaktivitetsstudier af betydning under konsumering. I den forbindelse har vi studeret effekter af fragmenter på modning og tæthed af et beskyttende tarmcellelag. Et assay til vurdering af jernoptag er etableret og benyttet til vurdering af β -CN-fragmenters indflydelse på dette optag. Projektets eksperimentelle aktiviteter er i væsentlig grad forløbet i henhold til tidsplanen.

Væsentlige resultater (output) i punktform:

- Hensigtsmæssige metoder til monitorering af β -CN-fragmenter blev afprøvet og etableret.

- Den sekventielle plasmininducerede nedbrydning af β -CN blev evalueret. Det ses, at Lys105-His106/Lys107-Glu109 synes at være det mest tilgængelige sted for plasmin-hydrolyse, efterfulgt af Lys28-Lys29 og dernæst Lys113-Tyr114.
- Fremkomsten af store β -CN-fragmenter som følge af plasmin er markant mere kompleks end litteraturen antyder, men i sidste ende er diversiteten lille og det iagttages, at gamma-fragmenterne forsvinder over tid.
- Undersøgelser af en række mejerifraktioner viser, at fragmenter af β -kasein optræder meget tidligt i procesleddene, måske allerede inden mælken møder mejeriet.
- I valle vil tilstedeværelse af **PP5** og i mindre grad **PP8 slow** være fremherskende.
- Separation af store β -CN-fragmenter kan kun foregå under delvist denaturerende betingelser, hvilket vil komplicere indførelse af hensigtsmæssig mejeriindustriell teknologi til isolering eller fjernelse af sådanne fragmenter.
- De store β -CN-fragmenter **PP8 slow** og **PP5** stimulerer tilsyneladende tarmcellers evne til at danne et stabilt og tæt cellelag, set forhold til andre proteiner.
- Fragmenterne **PP8 fast**, **PP8 slow** og **PP5** kan muligvis virke fremmede på optag af mineralet jern, specielt efter hydrolyse med mave-tarm associerede peptidaser.

Implementering af resultater i praksis:

Det var projektets præmis, at der skulle udveksles information med branchen. Vi har via MFFs projektmøder sikret, at vores erfaringer er blevet kommunikeret, men der udestår stadig lidt publikationsaktivitet. Vi har endvidere holdt møder med AFI, hvor vores erfaringer er blevet videregivet. Det er op til branchen at afgøre, om den vil videreudvikle på metoder til enten isolation eller fjernelse af de store β -CN-fragmenter. Som antydnet ovenfor, så er det sandsynligvis forbundet med uforudsete tekniske vanskeligheder. Branchen er dog nu i det store hele klar over, hvordan det forholder sig med store β -CN-fragmenter, hvilket også kan have betydning, hvis produktion af β -CN i sig selv sættes i mere faste rammer, end det er nu.

I GUDP-projektansøgningen blev regnestykker med overslag vedr. bedre ressourceudnyttelse og økonomiske effekt præsenteret. Præmisserne for disse er stadig gældende, idet der er ikke tale om at stille imod et højere udbytte, men at opnå mindre spild, begrænsning af fejlslået produktion og sikre en bedre udnyttelse af sidestrømme. Det vil i sidste ende kunne give bedre bæredygtighed, energibesparelse og ressourceudnyttelse. Den forretningsmæssige afgørelse vedr. rentabiliteten og indførelse af ny teknik ligger imidlertid hos mejeribranchen, idet kun den kan evaluere implementeringspotentialerne. Det var også en forudsætning ved projektets påbegyndelse.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

- ERFA-udveksling med branchen i form af halvårlige statusmøder i MFF-regi.
- Direkte kommunikation med AFI Nr. Vium (Colin Ray). Disse samtaler videreføres med Mie Rostved Bechshøft. AFI har interesse i at følge β -CN-fragmenter i produktionstrinene.

- Natacha R. Roin. Isolation and identification of fragments from plasmin-induced proteolysis of bovine β -casein. Biologiopgave, 10 ECTS (juli-august 2017).
- Jan Trige Rasmussen. Udnyttelse af beta-kaseinfragmenter – Funktionelle og biologiske egenskaber af hyppigt forekommende store kaseinfragmenter. Mælkeritidende, nr. 15-16, 2018.
- Natacha R. Roin. Description and effects of the sequential pattern of plasmin-induced protein fragmentation of bovine β -casein – Physiological effects of the β -casein on Caco-2 cell barrier function. Afhandling (MSc), 60 ECTS (eksamen 28. juni 2018).
- Pernille Moldrup Sørensen. Preferentially biotinylation of N-terminal alpha-amino groups in peptides derived from plasmin-induced proteolysis of bovine beta-casein. Afhandling (BSc), 20 ECTS (evalueret i juni 2019).
- Thea Lykkegaard Møller. Characterization of the sequential plasmin-mediated fragmentation of bovine beta-casein and derived effects on iron uptake in cultured intestinal cells – Development of a chromogenic-based iron-quantification assay. Afhandling (MSc) (eksamen 21. juni 2019).
- Jan Trige Rasmussen. Præsentation ved ERFA-møde med repræsentanter fra AFI (arr. Jesper Christensen). 3. februar 2020.
- Mads Eg Andersen, Iron Transport across the Intestinal Barrier, Thesis, Afhandling (BSc), 20 ECTS (evalueret i september 2020),
- Mads Eg Andersen. Iron Transport across the Intestinal Barrier – A Basolateral Perspective. Molekylærbiologi-opgave, 10 ECTS (december 2020/januar 2021).

Planlagt:

- Isolation and bioactivity of large β -casein fragments obtained from bovine whey. Authors: Project participants. Food or Dairy Technology oriented paper.
- Artikel i Mælkeritidende, som opsummerer projektets resultater.

14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse

Antal bacheloropgaver og specialer i projektet: 1 biologi-projektarbejde, 2 bacheloropgaver (BSc), 1 molekylærbiologi-projektarbejde og 2 masteropgaver (Msc) er afsluttet.

15. Nye kontakter/projekter

Se punkt 13.

16. Underskrift og dato

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

Dato: 25. januar 2022 Projektleders underskrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Tom Byg', written over a faint rectangular stamp.

Dato: 25. januar 2022 MFF-repræsentants underskrift:

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized initial 'C' followed by a horizontal line, written over a faint rectangular stamp.