

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## **Førord**

Masteroppgaven ” *In vitro* fordøyelse av margariner og smør- enzymatisk hydrolyse av lipider” ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), 2012.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Gerd Elisabeth Vegarud og mine biveiledere Dag Ekeberg, Hanne Marie Devle, Tove Gulbrandsen Devold og Elling- Olav Rukke for svært god veiledning og nyttige tilbakemeldinger på det skriftlige arbeidet.

En stor takk til Carl Fredrik Næss- Andresen for lærerike samtaler og for gjennomlesning av deler av oppgaven.

Videre vil jeg takke de ansatte ved laboratoriet; Ellen Kathrine Eriksen, Ragnhild Aaboe Inglingstad og Irene Comi for hjelp til innføring av det tekniske arbeidet og for alltid å sette av tid til å svare på spørsmål.

Takk også til Kristi Ekrann Aarak for hjelp til bearbeiding av resultatene.

Ås, desember 2012

---

Hege Rivedal Ødegaard

## Sammendrag

Smør og margariner er fettrike produkter som for mange er en naturlig del av det daglige kostholdet. En forutsetning for å kunne gjøre en ernæringsmessig vurdering av en matvare er å ha kjennskap til produktenes sammensetning. Matens fettsyresammensetning har i de senere år fått mye oppmerksomhet på grunn av helsemessige virkninger av fettsyrer. Spesielt har det blitt påpekt at inntaket av langkjedede omega-3 fettsyrer bør økes, og at mengden mettede fettsyrer bør begrenses. Sammenliknet med smør konsumeres det mye mer av margarinprodukter. De inneholder omega-3 fettsyren  $\alpha$ -linolensyre som mennesker til en viss grad kan omdanne til eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA). I tillegg til at fettsyresammensetningen har en helsemessig betydning, vil måten fettsyrene frigjøres og hvor raskt de frigjøres også kunne ha betydning.

I denne oppgaven har formålet vært å undersøke graden av hydrolyse av lipider i vann- i olje baserte produkter med forskjellig innhold og sammensetning av fett. En to trinns *in vitro* fordøyelsesmodell med human magesaft (HGJ) og tynntarmssaft (HDJ) ble brukt for å simulere fordøyelse av de kommersielle produktene smør, margarin og lettmargin. Første trinn med magesaft i 60 min og deretter trinn 2 med tarmsaft i 60 og 120 minutter. Etter fordøyelse ble fettklassene triacylglyserol (TAG) og frie fettsyrer (FFA) isolert ved bruk av fast fase ekstraksjon (solid phase extraction, SPE). Fettsyresammensetningen i de to fraksjonene ble kvalitativt og kvantitativt analysert ved gasskromatografi massespektrometri (GC-MS).

Triacylglyserolene i margarinprøvene hadde et høyt innhold av umettede fettsyrer (65 %), og sammensetningen reflekterte klart at produktene inneholder en god del rapsolje, som inneholder mye av fettsyren 18:1n-9. Smør hadde et høyt innhold av mettede fettsyrer (67 %), der 16:0 dominerte. Smørprøvene inneholdt i tillegg en del korte fettsyrer som 4:0; 6:0 og 8:0 som i stor grad stammer fra den mikrobielle fordøyelsen i vomma hos drøvtyggere.

I trinnet som simulerte magefordøyelsen ble det observert svært liten dannelse av frie fettsyrer i alle prøvene. Videre hydrolyse med tarmsaft i 60 min resulterte i en høy frigjøring av fettsyrer fra TAG. Mindre hydrolyse av TAG ble observert fra 60 min til 120 minutters inkubering med tarmsaft. I følge analyser i blod fordøyes 98 % av fett i kosten. Nedbrytingen av TAGs i dette prosjektet stanset ved ca 35 - 40 %. Årsaken kan være at FFA ikke ble fjernet som i en *in vivo* fordøyelse, og dette etablerer en likevekt i reaksjonen som hindrer at all TAG hydrolyseres.

Arbeidet med denne oppgaven har vist at bruk av human fordøyelsessaft i et *in vitro* fordøyelsessystem kan gi nyttig informasjon om hvordan fordøyelsen av fett i ulike matprodukter skjer. Resultatene i dette prosjektet la imidlertid ikke grunnlag for å konkludere med at det var forskjeller i fordøyelsen av de ulike produktene. Det gjenstår mye med hensyn til optimalisering av reaksjonsbetingelsene. I tillegg bør prøvetakingstidspunktene kanskje være oftere. Ekstraksjon og analyse av lipidene som dannes ved inkubering kan også forbedres.

## Abstract

Butter and margarine are products which are rich in fat and which for many people form a regular part of the daily diet. In order to perform a nutritional evaluation of a foodstuff, knowledge of the products composition is required. In recent years, foods fatty acid composition has been the center of a lot of focus. This is primarily due to the health-related effects of fatty acids. In particular, it has been highlighted that intake of long chained omega-3 fatty acids should be increased while that the amount of saturated fatty acids in the diet should be limited. In comparison with butter, consumption of margarine products is much higher. These margarine products contain the omega-3 fatty acid  $\alpha$ -linolenic acid which humans are capable of converting into eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA). In addition to the health related effects of the fatty acid composition of food, the manner in which the fatty acids are released and how quickly they are released, may also be significant.

The aim of the current study was to investigate the degree of lipid hydrolysis in water-oil based products, with varying fat content and fat composition. A two step *in vitro* human digestive model, with human gastric juice (HGJ) and human duodenal juice (HDJ), was employed to stimulate digestion of the following commercial products; butter, margarine and light margarine. The first step comprised of gastric juice for 60 minutes while the next step involved duodenal juice for 60 and 120 minutes respectively. Following digestion, the classes of fat triacylglycerol (TAG) and the free fatty acid (FFA) were isolated using solid phase extraction (SPE). The two sections of the fatty acid composition were qualitatively and quantitatively analyzed with the aid of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

The triacylglycerols in the margarine samples had a high content of unsaturated fatty acids (65%). Furthermore their composition clearly reflected the products high content of rapeseed oil, which contains a lot of the fatty acid 18:1n-9. Butter contained a lot of saturated fatty acids (67%), the majority of which were 16:0. Butter also contained a certain degree of short fatty acids such as 4:0; 6:0 and 8:0, which predominantly arise from microbial digestion in the paunch of ruminating mammals. In the gastric digestion stimulating step, very little free fatty acid formation was observed in all the samples. Further hydrolysis with duodenal juice in 60 minutes resulted in a high release of fatty acids from TAG. Reduced hydrolysis of TAG was observed from 60 to 120 minutes incubation with duodenal juice. According to analysis of blood, 98% of dietary fat is digested. However decomposition of TAGs in this project ceased at approximately 35-40%. The reason behind this may be that FFA was not removed, as would have occurred in an *in vivo* digestion. This may have established an equilibrium in the reaction, which subsequently prevented complete TAG hydrolysis.

The work carried out in connection with this study, has shown that the use of human digestive juice in an *in vitro* can provide useful information concerning how digestion of fat, in various food products, occurs. The results in this project cannot however provide a reliable basis for concluding that there is variations in the digestion of the various products. With respect to optimization of the conditions surrounding the various reactions in this study, a certain amount of work still remains. In addition should perhaps sampling frequency occur more often. Extraction and analysis of the lipids formed during the incubation may also be improved.

# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	1
1. Introduksjon .....	2
2. Teori .....	5
2.1 Generelt om lipider.....	5
2.1.1 Fosfolipider .....	11
2.2 Emulsjoner .....	12
2.3 Sammensetning av smør.....	13
2.4 Sammensetning av margarin .....	14
2.5 Mat og fordøyelse.....	16
2.6 Fordøyelse og absorpsjon av lipider.....	17
2.7 In vitro modellfordøyelse av lipider .....	21
2.8 Analysemetoder.....	22
2.8.1 Kjernemagnetisk resonans (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) .....	22
2.8.2 Teksturanalyse.....	23
2.8.3 Ekstraksjon .....	23
2.8.4 Separasjon av ulike fettklasser .....	23
2.8.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC-MS) .....	24
2.8.6 Internstandarder (IS).....	25
3. Materialer og metoder .....	26
3.1 Materialer .....	26
3.1.1 Kjemikalier .....	26
3.1.2 Humane fordøyelsessafter benyttet i in vitro forsøket .....	26
3.1.3 Kommersielle produkter .....	27
3.2 Metoder .....	28
3.2.1 In vitro fordøyelse av margariner og smør .....	28
3.3 Analytiske metoder.....	30
3.3.1 NMR analyse .....	30
3.3.2 Teksturanalyse.....	30
3.3.3 Beregning av fettprosent ved fordampningsmetoden .....	30
3.3.4 Internstandarder.....	31
3.3.5 Ekstraksjon av lipider.....	31
3.3.6 Solid fase ekstraksjon av FFAs og TAGs .....	32

3.3.7 Gass kromatografi og massespektrometri (GC-MS) av FAMES .....	33
3.3.8 Kontrollforsøk .....	34
4. Resultater.....	35
4.1 Bestemmelse av fettinnhold i prøvene. ....	35
4.2 Fasthet til produktene .....	35
4.3 Fettsyresammensetningen i TAG fraksjonen av ufordøyde produkter.....	36
4.4 Analyse av FAMES av frie fettsyrer (FFA) og triacylglyserol (TAG) i ufordøyde og fordøyde prøver. ....	40
4.5 Kontroll av kjemisk hydrolyse med HCl.....	45
4.6 Relativ mengde av TAG og FFA i produktene etter fordøyelse med HGJ i 60 min og HDJ i 60 og 120 min.....	46
5. Diskusjon.....	49
6. Referanser.....	54

## Forkortelser

ARA	Arakidonsyre
CLA	Conjugated Linoleic Acid (Konjugert linolsyre)
DAG	Diacylglycerol
DHA	Dokosaheksaensyre
EPA	Eikosapentaensyre
FA	Fatty acid (Fettsyrer)
FAME	Fatty Acid Methyl Esters (Fettsyremetylestere)
FID	Flame Ionization Detector (Flammeionisasjonsdetektor)
GC	Gas Chromatography (Gasskromatografi)
GI	Gastrointestinal
HDJ	Human Duodenal Juice
HDL	High Density Lipoprotein
HGJ	Human Gastric Juice
HUFA	Highly Unsaturated Fatty Acids
IS	Intern standard
LC-PUFA	Long-chain PUFAs (Langkjedede flerumettede fettsyrer)
LDL	Low Density Lipoprotein
MAG	Monoacylglycerol
MS	Massespektrometri/ Massespektrometer
MUFA	Mono Unsaturated Fatty Acids (Enumettede fettsyrer)
NMR	Nuclear Magnetic Reconance
O/W	Oil- in Water (Olje- i vann)
PL	Phospholipid (Fosfolipider)
PTV	Programmed Temperature Vaporizing
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acids (Flereumettede fettsyrer)
SFA	Saturated Fatty Acids (Mettede fettsyrer)
SPE	Solid Phase Extraction (Fast fase ekstraksjon)
TAG	Triacylglycerol
W/O	Water- in Oil (Vann- i olje)

## 1. Introduksjon

Smør og margariner er for mange en naturlig del av det daglige kostholdet og bidrar til å forsyne oss med viktige energigivende næringsstoffer, essensielle fettsyrer og fettløselige vitaminer. Det kvantitativt viktigste næringsstoffet i disse produktene er fett i form av triglyserider. Av det totale fettinnholdet i kosten blant nordmenn utgjør smør og margariner henholdsvis 3 og 17 % (Pedersen *et al.* 2010). Meieriprodukter som helhet var i 2007 de store kildene til mettet fett i Norge, mens margariner og oljer var en av de viktigste kildene til flerumettede fettsyrer.

En forutsetning for å kunne gjøre en ernæringsmessig vurdering av en matvare er å ha kjennskap til produktenes sammensetning, samt kunnskap om hvordan maten blir fordøyd. Fettsyrene i maten er blant de gruppene komponenter som de siste tiårene har fått mest helsemessig oppmerksomhet. Det generelle kostrådet som gis i dag er å redusere inntaket av mettede fettsyrer og øke inntaket av umettede fettsyrer, særlig de langkjedede omega-3 fettsyrene (Nasjonalt råd for ernæring, 2011). En rekke undersøkelser bekrefter positive helseeffekter av langkjedede omega-3 fettsyrer med hensyn til hjerte og karsykdommer (Psota *et al.* 2006). Omega-3 fettsyrer er også blitt foreslått å dempe andre sykdommer der betennelsesreaksjoner er involvert, og å hemme utviklingen av noen mentale lidelser, og å minske antallet av noen kreftformer (Lunn & Theobald 2006; Calder 2009; Hibbeln *et al.* 2006; Hedelin *et al.* 2007). Oljesyre 18:1 kan bidra til senkning av totalkolesterolet, low density lipoprotein (LDL)-nivået og triglyseridmengden i blodet. Transfettsyrer som kan finnes i meieriprodukter og mettede fettsyrer, som myristinsyre 14:0 og palmitinsyre 16:0, har vist seg å ha en negativ innvirkning på helsen ved å bidra til økt innhold av LDL-kolesterol i blodet. Dette øker risikoen for hjerte-karsykdommer (Ebringer *et al.* 2008; Hauge *et al.* 2001). Noen undersøkelser har imidlertid vist at enkelte transfettsyrer fra melk ikke kan påvise økt risiko for hjerte-karsykdommer (Willett *et al.* 1993). Rådene fra Nasjonalt råd for ernæring (2011) er blant annet å velge myk vegetabilsk margarin eller olje framfor hard margarin og meierismør. Rapsolje brukes vanligvis ved produksjon av margariner, og denne typen olje inneholder en betydelig mengde av omega-3 fettsyren  $\alpha$ -linolensyre (18:3n-3) som mennesker til en viss grad kan omdanne til de langkjedede omega-3 fettsyrene EPA og DHA.

Det er ikke nødvendigvis bare fettsyresammensetningen i fettene som har helsemessig betydning. Hvordan fettsyrene blir frigjort og absorbert kan også ha betydning. En rekke faktorer vil kunne påvirke dette. Dråpestørrelsen i ulike emulsjoner har vist seg å være av betydning for



hvor raskt enkelte fettsyrer fordøyes (Armand *et al.* 1999). Også fettmolekylenes egenskaper som lengde på fettsyrekjedene, grad av umettethet og posisjonering av fettsyrene i glyserolmolekylene kan påvirke effektiviteten av hydrolysen under fordøyelsen. Studier har blitt gjort for å undersøke om stereokjemien i triacylglyserol (TAG) kan påvirke fordøyelsen og absorpsjonen av fettsyrene. Resultatene kan tyde på at egenskapene kan ha helsemessige effekter. Lokaliseringen av n-3 flerumettede fettsyrener (polyunsaturated fatty acids, PUFA) er i ytterposisjon *sn-1* og *sn-3* i sel- og hvalolje, mens i TAG fra torskelleverolje er *sn-2* posisjonen beriket med n-3 PUFA. Studier på rotter har vist at fordøyeligheten av n-3 PUFA fra marine oljer ikke påvirkes i særlig grad av lokaliseringen av n-3 PUFA i TAG (Ackman 1988). Disse funnene ekskluderer imidlertid ikke mulige forskjeller i fordøyelse av n-3 PUFA eller andre fettsyrer. I en studie gjort på mennesker så man at hvalolje med eikosapentaensyre (EPA) i hovedsak i posisjon *sn-1/3* var en mer tilgjengelig kilde til EPA enn sildeolje med EPA i hovedsak i *sn-2* posisjon (Weaver *et al.* 1989).

Per i dag er man ikke helt sikker på hvordan hydrolysen av fett og absorpsjon av fettsyrer foregår i fordøyelseskanalen. Særlig synes det å gjelde hva som skjer i magesekken og betydningen av fordøyelsen her (Bernbäck *et al.* 1990). De studier som til nå har blitt utført har oftest omhandlet melkefett. Hydrolyse av vann- i olje baserte produkter som margariner og smør er ikke blitt studert, og derfor finnes det ingen nøyaktig kunnskap om hva som skjer når disse produktene fordøyes.

Oftest har studiene av fettfordøyelse blitt gjennomført *in vitro* ved å bruke rensede animalske fordøyelsesenzymene, og som påpekt av Ulleberg *et al.* (2011) vil dette kunne gi feilaktige resultater fordi enzymer i mennesker kan være forskjellig fra dyreenzymer. I tillegg kan enzymhemmere eller aktivatorer som er tilstede i fordøyelsestrakten ha blitt fjernet under isoleringen av enzymene. Eksempelvis er gallsalter nødvendig ved fordøyelsen, og det kan være vanskelig å simulere en virkelig situasjon ved tilsetning av slike til et modellsystem.

I denne oppgaven har formålet vært å undersøke fordøyelse av lipider i vann- i olje baserte produkter med forskjellig innhold og sammensetning av fett. En to trinns *in vitro* fordøyelsesmodell med human magesaft og tarmsaft ble brukt for å simulere fordøyelse av de kommersielle produktene smør, margarin og lettmargin. Smør består av animalsk fett fra melk og margariner består av oljer og fett fra planter. I tillegg inneholdt de to margarintypene ulike mengder vann. Hypotesen var at disse forskjellene mellom de ulike produktene kunne påvirke

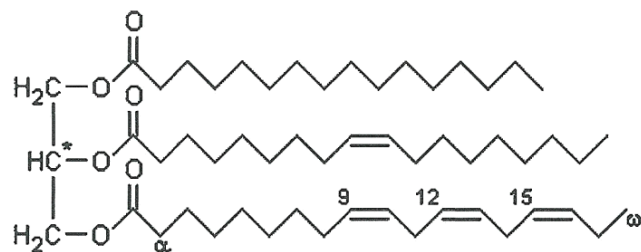
effekten av fordøyelsen. Fettsyresammensetningen ble analysert i to lipidklasser, TAG og frie fettsyrer (FFA), under hydrolyseforløpet. Det var forventet lite hydrolyse i mage, og deretter en ganske rask frigjøring av de fleste hydrolyseproduktene i tarm.

## 2. Teori

### 2.1 Generelt om lipider

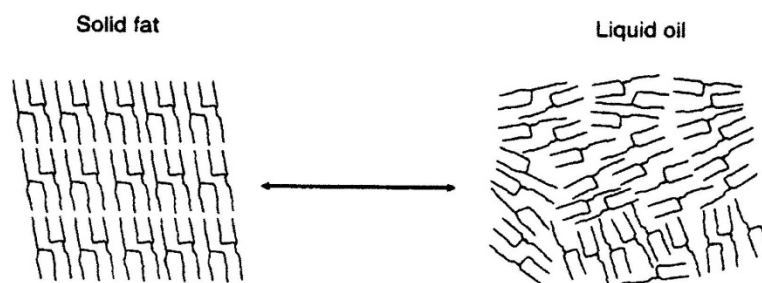
Lipider (fettstoffer) er fellesbetegnelsen for en stor gruppe biologiske stoffer som har til felles at de er løselige i organiske løsemidler og tilnærmet uløselige i vann. Viktige eksempler på lipider er triacylglyserol (TAG), voks, fosfolipider (PL), eikosanoider, kolesterol og kolesterolderivater. Lipidene kan inndeles i 3 hovedgrupper etter funksjon som energilager, som strukturelle komponenter i cellemembraner og som biologisk aktive (bioaktive) forbindelser. Mest kjent er rollen til triacylglyserol som energilager i de fleste dyr og planter. Voks fungerer blant annet som energilager i noen organismer. Fosfolipider og kolesterol er strukturelle lipider i membraner. Gruppen biologisk aktive lipider omfatter blant annet kolesterolderivater som for eksempel vitamin D, østrogen, testosteron, kortisol og gallesyre (gallesalter). Andre biologisk aktive lipider er vitaminene A, E og K, eikosanoider (fettsyrehormoner) og karotenoider.

De kvantitativt viktigste lipidklassene i et vanlig kosthold er triacylglyserol (tidligere kalt triglycerider), og fosfolipider. TAG utgjør ca. 95 % av fettstoffene i et vanlig kosthold. Triacylglyserol består av den treverdige alkoholen glyserol, der tre fettsyrer (FA) er forestret til hver sin hydroksylgruppe (Figur 1.1).



Figur 1.1. Triacylglyserol. Fettsyren i posisjon 1 er mettet, mens fettsyrene i posisjon 2 og 3 er henholdsvis enumettet og flerumettet (Pedersen *et al.* 2010).

De 3 karbonatomene i glyserolmolekylet er nummerert *sn*-1 (øverst), *sn*-2 (i midten) og *sn*-3 (nederst), hvor *sn* er forkortelsen for «stereospecific numbering». I virkeligheten peker fettsyrene i posisjonene 1 og 3 en vei i planet mens fettsyren i 2 posisjon peker motsatt vei. Dette er avgjørende for fasedannelsen til TAG molekyler (Figur 1.2).



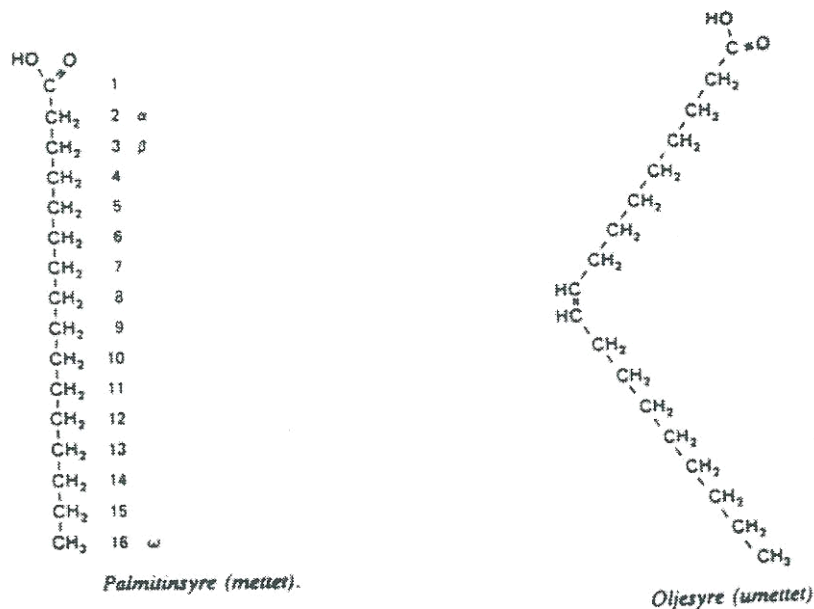
Figur 1.2. Strukturen og fettsyresammensetningen til triacylglycerolmolekylene er bestemmende for fasedannelsen i fett og olje (McClements & Decker 2008).

De tre fettsyrene avgjør fettets fysiske og biologiske egenskaper og kan være like eller forskjellige, med variasjon i lengde og i grad av umettethet (Figur 1.1).

En, to eller alle tre fettsyrene kan spaltes fra glyseroldelen ved hydrolyse, og på denne måten dannes frittstående glyserolmolekyler, monoacylglyserol (MAG), diacylglyserol (DAG) og frie fettsyrer. De frie hydroksylgruppene i glyseroldelen av DAG og særlig MAG gir molekylene delvis polare egenskaper (amfipatiske egenskaper). Fettsyrekjeden er imidlertid upolar, og dette gjør at MAG og DAG har emulgerende egenskaper. Rensede monoglyserider blir brukt som emulgatorer i næringsmiddelindustrien.

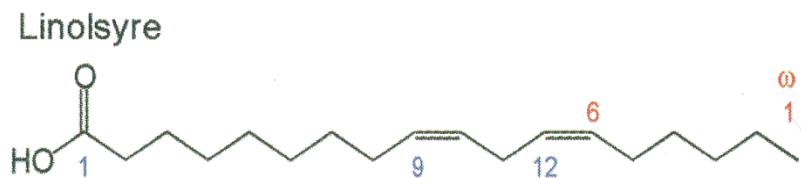
Lengden til hydrokarbonkjedene i fettsyrer i ulike råvarer som benyttes i mat kan variere fra 4 til rundt 24 karbonatomer. I plante og dyrefett er fettsyrer med 16 og 18 karbonatomer mest vanlig. Meierifett fra drøvtyggere kan ha opptil 20 % kortkjedete fettsyrer med 4 til 12 karbonatomer. De kortkjedete fettsyrene dannes av mikroorganismene i vomma hos drøvtyggere og absorberes av dyrene.

Fettsyrene kan være uten dobbeltbindinger og kalles da for mettede (Saturated Fatty Acids; SFA) eller umettede med fra 1 til 6 dobbeltbindinger (Unsaturated Fatty Acids). Fettsyrer med en dobbeltbinding kalles for en-umettede (Mono Unsaturated Fatty Acids; MUFA) (Figur 1.3). Fettsyrer som har fra 2 til 6 dobbeltbindinger kalles for flerumettede (Poly Unsaturated Acids; PUFA). Fettsyrer med fire til seks dobbeltbindinger kalles ofte for Highly Unsaturated Fatty Acids (HUFA). For å differensiere PUFA fettsyrene kalles de som har 20 eller 22 karbonatomer for langkjedede flerumettede fettsyrer (Long-chain PUFAs; LC-PUFA).


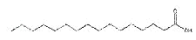





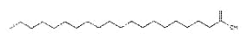
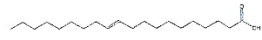
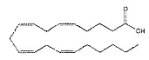

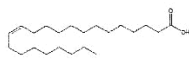
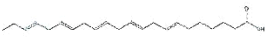



Figur 1.3. Strukturer av mettet fettsyre, palmitinsyre (16:0) og enumettet fettsyre, oljesyre (18:1 n-9) (Olsen 2007).

Fettsyrer har både et trivial- og et systematisk navn (Tabell 1.1). En vanlig nomenklatur for fettsyrene er å angi et tall som viser antall karbonatomer adskilt med et kolon, og et nytt tall som viser antall dobbeltbindinger. Stearinsyre som består av 18 karbonatomer og ingen dobbeltbindinger forkortes til 18:0, mens linolsyre som også består av 18 karbonatomer og har to dobbeltbindinger skrives 18:2. Siden den første dobbeltbindingen i linolsyre kommer på C-atom 6 fra metylenden (n-enden også kalt omegaenden fordi omega ( $\omega$  eller  $\Omega$ ) er den siste bokstaven i det greske alfabetet), er dette en omega-6 fettsyre. Trivialstrukturen (kortformelen) er derfor 18:2n-6 (Figur 1.4). Dersom man bruker den systematiske betegnelsen (International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC) for fettsyren, teller man fra karboksylenden. Kortformelen for 18:2n-6 blir da 18:2  $\Delta$ 9, 12, merket med blått under hydrokarbonkjeden.



Figur 1.4. Linolsyre (18:2n-6)

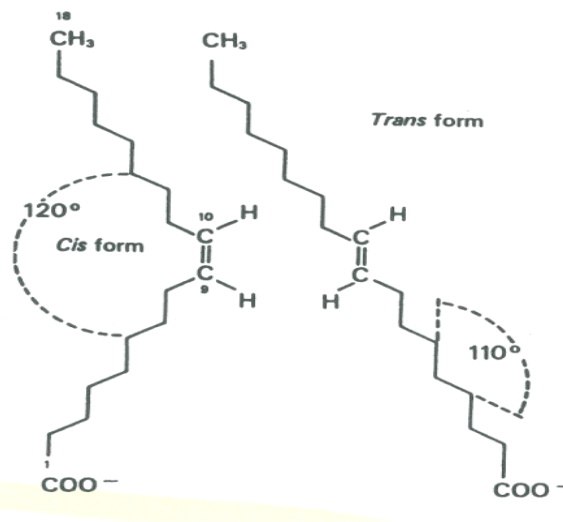
Forkortelse	IUPAC navn	Trivialnavn	Struktur
14:0	Tetradecanoic acid	Myristinsyre	
16:0	Hexadecanoic acid	Palmitinsyre	
16:1 n-7	9-Hexadecanoic acid	Palmitolensyre	
18:0	Octadecanoic acid	Stearinsyre	
18:1 n-9	9-Octadecanoic acid	Oljesyre	
18:2 n-6	9,12-Octadecadienoic acid	Linolsyre	
18:3 n-3	9,12,15-Octadecatrienoic acid	$\alpha$ -Linolensyre	
20:0	Eicosanoic acid		
20:1 n-9	11-Eicosenoic acid		
20:4 n-6	5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	Arakidonsyre	
20:5 n-3	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	EPA	
22:1 n-9	13-Docosenoic acid		
22:5 n-3	7,10,13,16,19-Docosapentaenoic acid	DPA	
22:6 n-6	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	DHA	

Tabell 1.1. Navn og strukturer for noen av de vanligste fettsyrene (Lipidmaps 2012).

Fettsyrenes fysiske egenskaper avhenger av lengden og graden av umettethet. Smeltepunktet til fett øker med kjedelengden til fettsyrene i TAG og minker med antall dobbeltbindinger. Lange kjedelengder gir sterkere interaksjoner mellom fettsyrene i ulike TAG molekyler (Figur 1.2). Umattede fettsyrer har en eller flere knekker i hydrokarbonkjeden, triacylglyserol-molekylene kan derfor ikke pakkes tett sammen, og mulighetene for interaksjonen mellom dem blir mindre. Planteoljer og fiskeoljer inneholder mye umattede fettsyrer og er derfor flytende ved romtemperatur. De fleste fettsyrer i matvarer har såkalt *cis* konfigurasjon, det vil si at

hydrogenatomene til de karbonatomene i dobbeltbindingen ligger på samme side i strukturen. Dette forårsaker knekken på fettsyrene (Figur 1.3).

Dobbeltbindinger kan imidlertid også foreligge som *trans* konfigurasjon og da ligger de 2 hydrogenatomene til de 2 karbonatomene i dobbeltbindingen på forskjellig side i strukturen (Figur 1.5). Den rette hydrokarbonkjeden til transfettsyrer fører til at fett som inneholder slike fettsyrer får et høyere smeltepunkt. Umettede fettsyrer i TAG kan omdannes industrielt til transfettsyrer ved såkalt delvis hydrogenering (herding). Mikroorganismer i vomma hos drøvtyggere kan også danne transfettsyrer som absorberes av dyret. Meieriprodukter vil derfor inneholde en liten andel transfettsyrer. Transfettsyrer betraktes som helsemessig ugunstig fordi de kan bidra til utvikling av hjertekarsykdommer. Kosthold med mye transfettsyrer og mettede fettsyrer bidrar til å øke LDL (Low Density Lipoprotein) kolesterol i kroppen og redusere innholdet av det sunne kolesterolet; HDL (High Density Lipoprotein) kolesterol. Et kosthold med umettet fett reduserer både totalkolesterolet og det ugunstige LDL kolesterolet (Willett 2012).



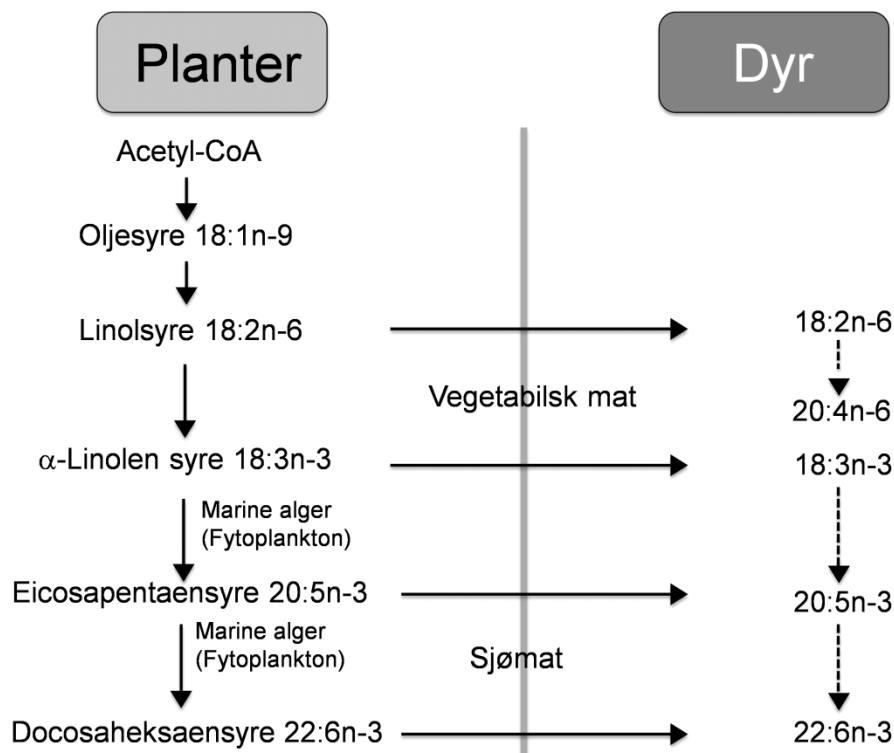
Figur 1.5. Oljesyre (18:1n-9) har *cis* konfigurasjon (venstre) og en knekk på kjeden. Oljesyre med *trans* konfigurasjon kalles elaidinsyre (elaidic acid) og har rett kjede (høyre) (Pedersen *et al.* 2010).

Enzymer i levende celler kan bryte ned og syntetisere fettsyrer. Nedbrytning av fettsyrer skjer ved  $\beta$ -oksidasjon når energi skal mobiliseres. Evnen til å syntetisere fettsyrer er imidlertid grunnleggende forskjellig hos planter og dyr, inkludert mennesker (Figur 1.6). Acetyl-CoA er utgangspunktet for syntesen av mettede fettsyrer, og alle organismer er i stand til å produsere

stearinsyre (18:0). Alle organismer kan også produsere oljesyre (18:1n-9) ved at de har et enzym ( $\Delta 9$  desaturase) som kan introdusere en dobbeltbinding i posisjon n-9 fra metylenden. Bare planter har enzymer som kan sette inn dobbeltbindinger i posisjon n-6 ( $\Delta 12$  desaturase) og n-3 ( $\Delta 15$  desaturase). Derved er det bare planter som kan produsere linolsyre (18:2n-6) og  $\alpha$ -linolensyre (18:3n-3) (Figur 1.6). Disse fettsyrene er essensielle for mennesker fordi de er utgangspunktet for de langkjedede flerumettede fettsyrene. Linolsyre danner arakidonsyre (ARA; 20:4n-6) mens  $\alpha$ -linolensyre gir opphav til eikosapentaensyre (EPA; 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA; 22:6n-3). Fra ARA og EPA syntetiseres eikosanoider (fettsyrehormoner) som er livsnødvendige blant annet ved reguleringen betennelsesreaksjoner. Produkter dannet fra DHA er også slike regulatorer og er i tillegg viktige komponenter i cellemembraner i spesielt hjerne og øyne (Calder 2009).

I planteverden er det bare marine planter (makro og mikroalger) som kan syntetisere EPA og DHA (Figur 1.6). Siden mikroalger (fytoplankton) er i bunnen av næringskjeden i havet så vil sjømat inneholde mye av disse fettsyrene. Oljer fra landplanter inneholder mye 18:2n-6 og mindre 18:3n-3, så når vi spiser vegetabilsk mat får vi i oss disse essensielle fettsyrene. Mennesker og de fleste dyr har enzymer som kan lage ARA fra 18:2n-6 og EPA og DHA fra 18:3n-3. Aktivitetene av enzymene er imidlertid lave, og omdannelsen til de langkjedede flerumettede fettsyrene er lite effektive (indikert med stiplede linjer i Figur 1.6). Det er de samme enzymene som virker på 18:2n-6 og 18:3n-3, og dersom forholdet mellom disse er for høyt i kosten kan man få for mye av n-6 produktene sammenlignet med n-3 produktene.

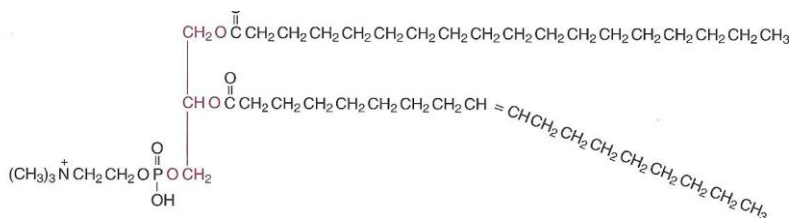




Figur 1.6. Alle organismer kan produsere oljesyre (18:1n-9). Bare planter, ikke dyr, kan produsere linolsyre (18:2n-6) og  $\alpha$ -linolensyre (18:3n-3) fra oljesyre, og bare marine planteplankton, ikke landplanter, kan omdanne disse videre til EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3). Mennesker kan i begrenset grad danne EPA og DHA og derfor er linolsyre og  $\alpha$ -linolensyre de essensielle fetttsyrene for oss (modifisert fra Olsen 2007).

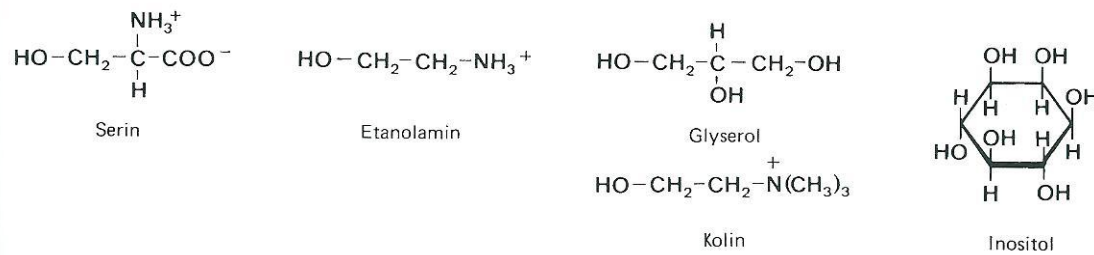
### 2.1.1 Fosfolipider

I motsetning til triglyserider er fosfolipider amfipatiske molekylar (Figur 1.8). Denne egenskapen er avgjørende for å danne biologiske membraner. Mange fosfolipider er bygd opp av en mettet fettsyre, en umettet fettsyre, glyserol, fosforsyre og en hydroksylforbindelse. Fetttsyrene er esterbundet i posisjon 1 og 2 i glyserolkomponenten (Figur 1.8).



Figur 1.8. Fosfolipidet fosfatidylcholin inneholder aminoalkoholen cholin (Hauge *et al.* 2001).

Andre alkoholer (hydroksylforbindelser) bundet til fosfatgruppen kan være etanolamin, glyserol, serin eller inositol (Figur 1.9).

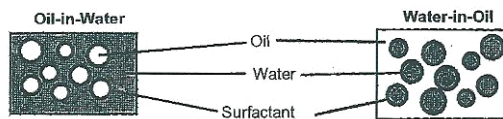


Figur 1.9. Eksempler på hydroksylforbindelser (alkoholer) som inngår i fosfolipidene (Hauge *et al.* 2001).

De amfipatiske egenskapene gjør fosfolipider egnet til å emulgere fett. En mye brukt emulgator i næringsmiddelindustrien er lecitin. Urenset lecitin inneholder i hovedsak fosfatidylkolin og mindre mengder av andre glycerofosfolipider som fosfatidyletanolamin og fosfatidylserin. Råstoffene kan være soyabønner, raps eller egg. Noen ganger brukes lecitin som et synonym for rent fosfatidylkolin.

## 2.2 Emulsjoner

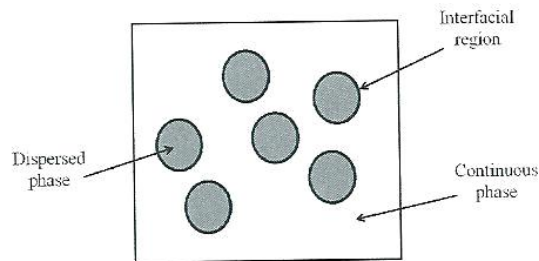
En emulsjon består av to væsker, olje og vann (Figur 2.1).



Figur 2.1. Emulsjoner vist som olje- i vann (O/W) og vann- i olje (W/O) (Frankel 2005).

For å danne en emulsjon kreves det energi som øker overflatearealet mellom olje- og vannfasen. Emulsjoners stabilitet er avhengig av dråpestørrelse og fordeling av dråpene. Mindre dråper gir mer stabile emulsjoner og krever mindre energi og mindre mengde emulgator i produktet (Frankel 2005). Emulgatorer er overflateaktive stoffer med både en hydrofob og en hydrofil egenskap bestående av en polar gruppe i den ene enden og en upolar i den andre. Den upolare enden kan binde seg til oljedråpene, og den polare hydrofile enden vender ut i vannfasen. Emulgatorenes affinitet til dråpeoverflaten gjør at det dannes et lag rundt dråpen som endrer

overflatespenningen, og en gjensidig frastøtning mellom dråpene holder emulsjonen stabil (Figur 2.2).

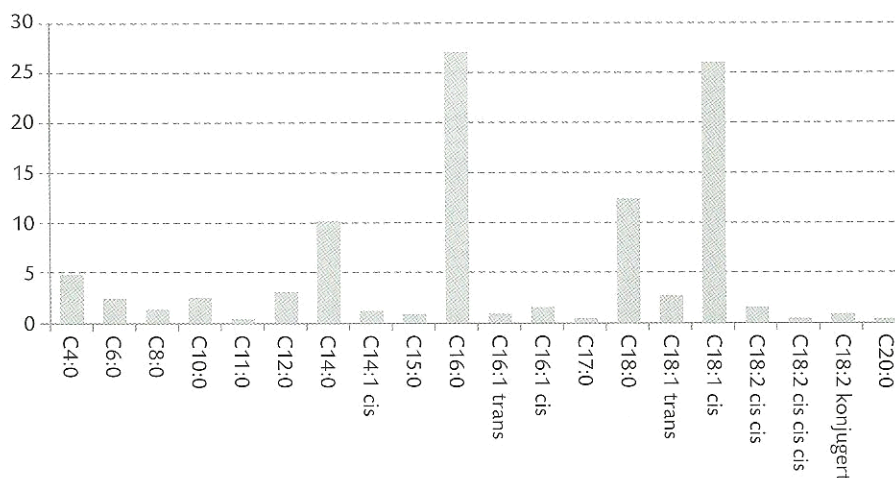


Figur 2.2. Skjematisk illustrasjon av en O/W blanding, hvor oljen er den dispergerte fasen som omslutes av vannet som er den kontinuerlige fasen. Ladninger på grenseflaten mellom olje og vann gjør at oljedråpene støtes fra hverandre og forhindrer sammensmelting. (McClements & Decker 2000).

Emulsjoner spiller en viktig rolle i produksjonen av en rekke matvarer og brukes for å oppnå ønskelig konsistensen og smak. Det finnes tre klasser emulgerende ingredienser; proteiner (f.eks casein og myse), bipolymerer (propylenglycol alginat, stivelse, acetyleret pectin og polysorbater) og polare lipider (lecitin, DAG og TAG).

### 2.3 Sammensetning av smør

Smør består hovedsakelig av melkefett (ca 80 %) og produseres av høypasteurisert fløte varmet opp til 95-98°C. Noen smørtyper er tilsatt melkesyre kulturer og salt og er beriket med vitamin D. Melkefettets komposisjon varierer avhengig av faktorer som årstid, foring og avl. Fettsyresammensetningen i smøret gjenspeiler i stor grad fettsyresammensetningen i melken. Størsteparten av det totale lipidinnholdet i melk er triglyserider, og ca 1 % består av fosfolipider som har en viktig funksjon i melkecellenes membraner (Martin *et al.* 2004). Andre komponenter i melk er diglyserider, monoglyserider, frie fettsyrer, steroler, proteiner og små mengder vitamin A, D og E (Fox & Mc Sweeney 1998). Melkefettet inneholder et bredt spekter av mettede fettsyrer, fra de aller korteste som smørsyre (4:0), til behensyre (dokosaheksasyre; 22:0) (Figur 2.3).



Figur 2.3. Fettsyresammensetning av melkefett (Pedersen *et al.* 2010). (Fettsyren oppført som C18:2 *cis cis cis* må være feiltrykk. Det riktige skal være C18:3 *cis cis cis* (n-3)).

Melkefett fra drøvtyggere er rikt på fettsyrer som smørsyre 4:0, myristinsyre 14:0, palmitinsyre 16:0, stearinsyre 18:0 og oljesyre 18:1. Vintersmør har lavere nivåer av 4:0 og 18:1 og høyere av 16:0 enn sommersmør og får gjerne en fastere konsistens. Konjugerte fettsyrer har bare en enkeltbinding mellom dobbeltbindingene og kan dannes ved herding og av mikroorganismer. Mest kjent er konjugert linolsyre (CLA) hvor de vanligste isomerene er *cis* 9, *trans* 11, 18:2 og *trans* 10, *cis* 12, 18:2. Som det framgår kan en dobbeltbinding ha *trans* konfigurasjon mens den andre kan ha *cis* konfigurasjon.

## 2.4 Sammensetning av margarin

Margarin består hovedsakelig av en blanding planteoljer og plantefett i tillegg til vann og skummet melk. Det finnes flere ulike typer margariner med ulike egenskaper, som for eksempel smeltepunkt og konsistens, avhengig av sammensetningen av oljene og fettene som brukes og mengden olje i forhold til vann. Margariner til brød er myke, også når de er kjøleskapskalde, og har gjerne en lipidandel fra 40 til 60 %. Margariner til baking og steking kan være faste eller flytende. Disse margarinerne har som regel en høyere lipidandel, ofte opp til 80 %.

Margarin er en vann- i olje emulsjon, det vil si at vannet er fordelt som små vanndråper i fettfasen. Vanndråpene inneholder små mengder salt og vannløselige proteiner, og emulgatorer som lecitin, mono og diglyserider danner grenseflater mellom vann og fett.  $\beta$ -karoten er ofte tilsatt for å gi farge, og aroma tilsettes for å gi smørsmak. Noen margarintyper er beriket med

vitaminene A, D og/eller E. Margarinenes ernæringsmessige kvalitet er avhengig av råstoffene som benyttes. Dagens margariner er utelukkende basert på vegetabiliske oljer, som soyaolje, rapsolje, olivenolje og solsikkeolje (Tabell 2.1).

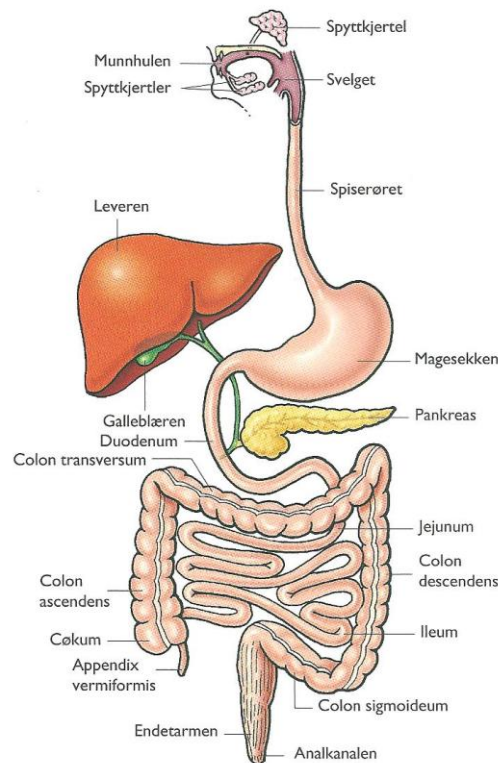
Olje	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:1	20:5	22:6
Kokosfett	6,5	7,0	47,5	19,0	8,5	2,5	7,0	1,5						
Palmeolje				1,5	42,0	5,0	42,0	11,0	0,5					
Soyaolje				0,5	9,5	3,5	24,5	53,0	7,0	0,5				
Rapsolje					4,5	1,5	62,5	19,0	9,5	1,5				
Solsikkeolje				0,5	7,0	4,0	21,5	65,0	0,5	0,5				
Olivenolje					11,0	4,5	73,0	8,5	1,0	0,5				

Tabell 2.1. Fettsyresammensettingen (%) av kokosfett, palmeolje, soyaolje, rapsolje, solsikkeolje, og olivenolje (Pedersen *et al.* 2010).

For at margarinen skal være fast og smørliknende er det nødvendig å benytte en viss mengde fett med høyt smeltepunkt, som kokosfett eller palmeolje. Tidligere ble flerumettede fettsyrer delvis herdet ved å tilsette hydrogen under høyt trykk og temperatur. I dag er alt delvis herdet fett fjernet fra margariner, og produktene er derfor fri for transfettsyrer. Margariner utgjør en viktig kilde til de essensielle fettsyrene linolsyre og  $\alpha$ -linolensyre. Dette gjelder særlig margariner som inneholder rapsolje. Faste margariner inneholder mer av de mettede fettsyrene myristin- og palmitinsyre og kan virke mindre gunstig på kolesterolnivå enn de myke margarinenene. Myke margariner er høye i innhold av flerumettede fettsyrer som virker gunstig på blodkolesterot. Noen margariner er tilsatt plantesteroler som stanoler, og disse har ytterligere positiv effekt på blodkolesterot.

## 2.5 Mat og fordøyelse

Fordøyelseskanalen hos mennesker strekker seg fra munnhulen til anus. Deler av denne, munn, magesekk og tarm, utgjør den gastrointestinale (GI) delen. Spyttkjertlene, bukspyttkjertelen, leveren og galleblæren inngår i fordøyelsessystemet, men ligger utenfor selve fordøyelseskanalen (Figur 2.4).

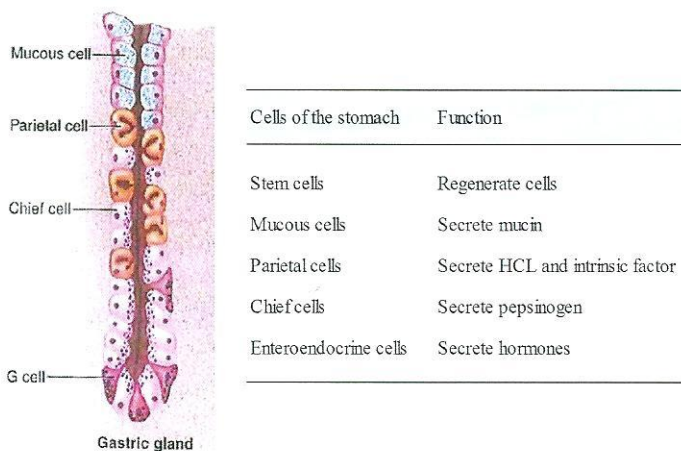


Figur 2.4. Fordøyelseskanalen med tilhørende kjertler (Sand *et al.* 2010).

Nedbryting av maten starter i munnhulen der fortykning med spytt og tygging deler maten ned til mindre partikler som dermed gir en større overflate for eksponering til fordøyelsesymer. I magesekken og tarmen blandes og eltes innholdet slik at maten brytes ned til mindre komponenter, og enzymenes spalting av næringsstoffene blir mer effektiv. Innholdet transporteres gjennom fordøyelseskanalen med en hastighet som gir maksimal effekt av fordøyelsen for absorpsjon av næringsstoffene. I tynntarmen transporteres maten langsomt slik at det blir tilstrekkelig tid til enzymatisk aktivitet og opptak av næringsstoffer.

## 2.6 Fordøyelse og absorpsjon av lipider

Som de andre makronæringsstoffene, karbohydrater og proteiner, må triacylglyseroler og fosfolipider brytes ned av enzymer før fettsyrene kan absorberes. I følge litteraturen (Brody 1994; Mu & Høy 2004) starter fettfordøyelsen hos mennesker i magesekken ved hjelp av enzymet gastrisk lipase. Når maten kommer til magesekken stimuleres sekresjonen av magesafter. Den mest åpenbare aktiviteten er sekresjon av HCl som stimuleres ved at magesekken strekkes. pH i tom mage ligger på 1-3 og øker i varierende grad avhengig av mengden mat som inntas og matens bufferkapasitet. Nerveceller i magesekkens vegg aktiveres og stimulerer sekresjon av gastrin fra G cellene og pepsinogen fra parietalcellene. Gastrin fra G cellene har en feedback mekanisme som stimulerer parietalcellene til ytterligere produksjon av HCl. Parietalcellene produserer også gastrisk lipase (Figur 2.5).



Figur 2.5. Lokaliseringen av forskjellige gastriske kjertelceller og deres funksjon (Saladin 2007).

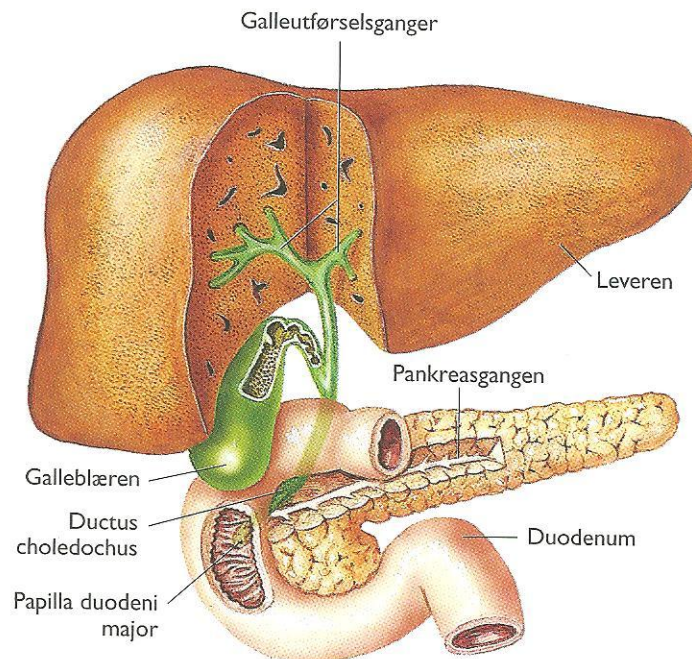
Peristaltiske sammentrekninger i magen blander maten med magesaften og fordeler fettpartiklene i mindre dråper, noe som gir en større grenseoverflate mellom vann og fett der lipasene kan binde seg. De emulgerte triglyseridene (TAGs) hydrolyseres til diglycerider (DAGs), monoglyceroler (MAGs), frie fettsyrer (FFAs) og glycerol. 10-30 % av lipidene blir hydrolysert i magesekken (Brody 1994; McClements & Li 2010).

Gastrisk lipase er et ekstremt stabilt enzym som ikke brytes ned av pepsin, og det blir heller ikke inaktivert av den lave pH forårsaket av utskilt HCl. Enzymet har også aktivitet når det

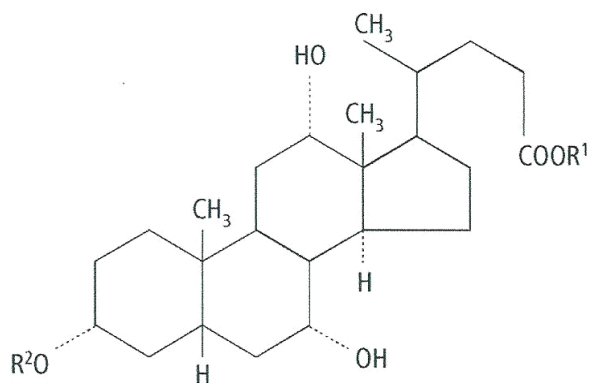
kommer over i duodenum. Hos noen pattedyr som mus og rotter blir et tilsvarende enzym kalt lingual lipase skilt ut allerede i munnhulen (Abrams *et al.*, 1988; Borel *et al.*, 1991). Gastrisk lipase spiller en særskilt viktig rolle i fordøyelsen av fettdråper i melkefett og er derfor spesielt viktig for nyfødte og andre som har redusert bukspyttproduksjon og gallesalter (Bernbäck *et al.* 1990). Fettsyrene som frigis i magesekken har også en videre funksjon for fordøyelsen i tynntarmen ved at de stimulerer til hormonutskillelse som medfører sekresjon av galle og bukspytt.

Med unntak av kortkjedete fettsyrer er det intet opptak av fett i magen. Mesteparten av fettfordøyelsen foregår i tynntarmen, der TAG hydrolyseres av pankreatisk colipase-avhengig lipase, også kalt 1,3-spesifikk pankreatisk lipase. Gallesalter er viktige komponenter i denne hydrolysen. Colipase, et protein som også skilles ut fra pankreas, forankrer lipasen til fettdråpene. Gallesaltene har en hydrofob del som løser seg i fett og en hydrofil del som vender ut fra fettdråpen i vannet. Sammen med gallesalter og segmenteringsbevegelser i tarmen emulgeres fett til mindre dråper (Figurene 2.6 og 2.7). Emulgeringen av fettdråpene opprettholdes ved å minke overflatespenningen ved olje-fett grenseflaten. Gallesaltene kan enten fremme eller hemme aktiviteten av pankreatisk lipase, avhengig av deres konsentrasjon (Lowe 2002). Ved relativt lave konsentrasjoner (5-15 mM) vil gallesaltene fremme lipaseaktiviteten, mens ved høye gallesalkonsentrasjoner hemmes lipasen (Hur *et al.* 2011). Emulgeringsprosessen er viktig for å øke overflatearealet på lipidene som øker tilgjengeligheten til lipasen. Lipasen kan inaktiveres av gallesalter ved at de fortrenger lipasen i olje-vann grenseflaten, der de utøver sin funksjon. Colipase forhindrer inaktivering ved å forankre lipasen til olje-vann grenseflaten når det er gallesalter tilstede. Når colipasen har festet seg til fettdråpenes overflate vil lipase binde seg til et bestemt sete på colipasen i et 1:1 forhold og bli i stand til å utføre sin lipolytiske funksjon med å bryte ned triglyserider til glyceroler, monoglyceroler og frie fettsyrer.





Figur 2.6. Leveren, galleblære, pankreas og utførselsgangene for galle og bukspytt (Sand *et al.* 2010).

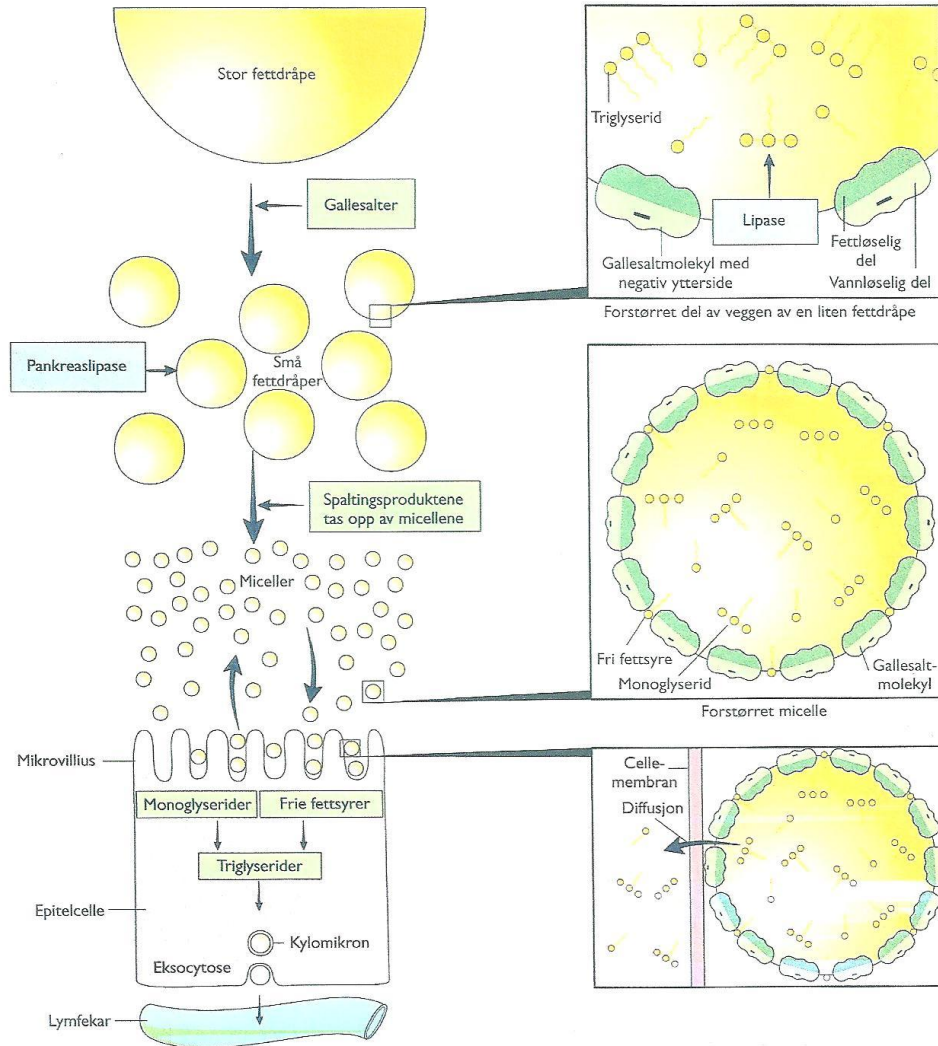


Figur 2.7. Stuktur av gallesalt med hydrofil ( $R^2O$ ) og hydrofob ( $COOR^1$ ) ende (Salter *et al.* 1996).  
 $R^1$  = taurin, glysin eller hydrogen,  $R^2$  = svovelsyre, glukuronsyre eller hydrogen

1,3-spesifikk pankreatisk lipase (colipaseavhengig lipase) blir utskilt i store mengder til tarm og hydrolyserer triglyseridene raskt. Enzymet er posisjonsspesifikt og spalter *sn*-1 og *sn*-3 esterbindinger slik at det dannes frie fettsyrer og 2-monoglyserider. Kun en liten mengde fritt glyserol blir produsert på grunn av manglende aktivitet på *sn*-2 esterbindingene.

I tillegg til gastrisk lipase og 1,3 spesifikk pankreatisk lipase er et tredje enzym involvert i fordøyelse av triacylglyceroler. Dette kalles gallesalt-aktivert lipase som finnes i melk, og er involvert i fordøyelse av melkefett. Et likt enzym produseres også i pankreas, og da kalles det gjerne for pankreatisk karboksylester hydrolase (Nilsson *et al.* 1990). Dette er et ikke-spesifikt enzym som ikke bare spalter av alle 3 fettsyrene i TAG, men også andre fettsyreestere som kolesterylester, retinylestere og voks.

Glyserol og korte fettsyrer diffunderer inn i endotelcellene og videre over i blodbanen. Monoglyserider (2-acylglyserol) og lange fettsyrer er avhengige av miceller for å kunne absorberes. Micellene består i hovedsak av gallesalter som produseres i leveren og skilles ut med gallen. Når micellene kommer i kontakt med fettdråpene i tarmen absorberes monoglyserider og frie fettsyrer. De transporteres til tarmveggen der monoglyserider og frie fettsyrer fraktes inn i epitelcellene ved aktiv transport. Her resyntetiseres de til triglyserider som pakkes sammen med fosfolipider, kolesterol og proteiner i kylomikroner som transporteres fra tarmen med lymfen (Figur 2.7).



Figur 2.7. Nedbryting og absorpsjon av fettstoffer og resyntese av triacylglycerol i tarm (Sand *et al.* 2010).

## 2.7 *In vitro* modellfordøyelse av lipider

*In vitro* modellforsøk brukes for å undersøke *in vivo* fordøyelse. I *in vivo* fordøyelsesstudier må et stort antall mennesker involveres (sykehusansatte, forskere og frivillige). Slike studier er tidkrevende og kostbare og i tillegg begrenset av etiske hensyn og utfordringer ved ekstraksjon av representative prøver fra fordøyelseskanalen. Dyr er forskjellige fra mennesker både når det gjelder tarm og enzymesystem, og resultater fra dyrestudier er ikke alltid sammelignbare med mennesker (Wickham *et al.* 2009). Et enklere og billigere alternativ er å bruke *in vitro* fordøyelsesmodeller som kan gi mulighet til å studere fordøyelse av mat og matkomponenter som

er vanskelig å studere *in vivo*. De kan være raske, rimelige og gjennomføres mange ganger. Fordøyelsesprosessen kan bli studert i ett eller flere trinn, der hvert trinn simulerer mage, tynntarm og/eller tykktarm. Absorpsjonen som skjer i tarm av fordøyde næringsstoffer *in vivo* kan etterliknes ved at fordøyelsestrinnet i tynntarm kobles til dialysemembraner (Mouëcoucou *et al.* 2004; Savoie & Gauthiere 1986) eller Caco-2 celler (en transformert cellelinje fra tykktarm) som er dyrket på semipermeable membraner (Meunier *et al.* 1995).

*In vitro* fordøyelsesmodeller kan være statiske eller dynamiske. I statiske modeller inkuberes mat eller ingredienser i mat med faste trinnvise justeringer. Prøvene blandes ved omrøring eller risting, men det er ingen fjerning av fordøyelsesproduktene underveis i prosessen (Meunier *et al.* 1995). I et statisk system der produktene fra fordøyelsen ikke fjernes, vil det oppstå en likevektsbalanse der hydrolysereaksjonene til slutt vil opphøre. Mengden tilsatt enzym i et slikt system vil ikke kunne påvirke denne balansen. Enzymene vil kunne øke hastigheten av hydrolysen, men ikke mengden av sluttproduktet. I dynamiske modeller brukes computerstyrt simulering av kverning, bearbeidelse og transport av maten, tilsvarende de forskjellige deler av fordøyelsen. Ofte fjernes fordøyelsesprodukter ved dialyse for å simulere absorpsjon fra tynntarmen, og da kan man få tilnærmet full nedbrytning av substratet (Nabil *et al.* 2011). I de fleste fordøyelsesmodeller har det til nå blitt brukt rensede kommersielle enzymer av ikke human opprinnelse, ofte fra gris eller storfe (Söderlind *et al.* 2010). I fordøyelsessaftene hos mennesker finnes flere isoformer av enzymer som kan skille seg ut fra enzymer fra dyr (Jones *et al.* 1993). I tillegg er den menneskelige fordøyelsen påvirket av andre molekyler som gallsalter, fosfolipider og enzymhemmere (Söderlind *et al.* 2010). Bidraget fra slike substanser uteblir dersom rensede enzymer benyttes.

## 2.8 Analysemetoder

### 2.8.1 Kjernemagnetisk resonans (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*)

NMR analysen angir smeltepunkt og mengde fast fett i oljen ved en gitt temperatur. I denne oppgaven er det forholdet mellom fett i fast fase og flytende fase som er analysert. Ved å bestråle prøven med en puls av radiofrekvens (20 MHz) får man et signal fra en flammeionisasjonsdetektor (Flame Ionization Detector; FID) som avtar med tiden. Fettet i fast fase avtar raskere enn fett i flytende fase. Ved å måle størrelsen på signalet ved to tidspunkter

(11 og 70 mikrosekunder etter sendepuls) får man en måleverdi på forholdet mellom fast og flytende fett. Dette forholdet avhenger av prøvens temperatur, derfor må prøven gjennomgå en tempereringsprosess for å få rett krystallstruktur i de ulike termostatbad.

### **2.8.2 Teksturanalyse**

De fleste typer teksturanalyser bygger på det samme prinsipp; et produkt påvirkes av en gitt kraft, enten i form av en probe som har større diameter enn produktet (kompresjonsmåling), eller en probe som har mindre diameter enn produktet (penetrasjonsmåling). Instrumentet måler hvilken kraft som må til for å komprimere/penetrere prøven, og dette avleses i gram eller kilo. Avhengig av hvilken type produkt det måles på kan verdien som leses av kalles for hardhet, fasthet, mykhet eller bruddstyrke.

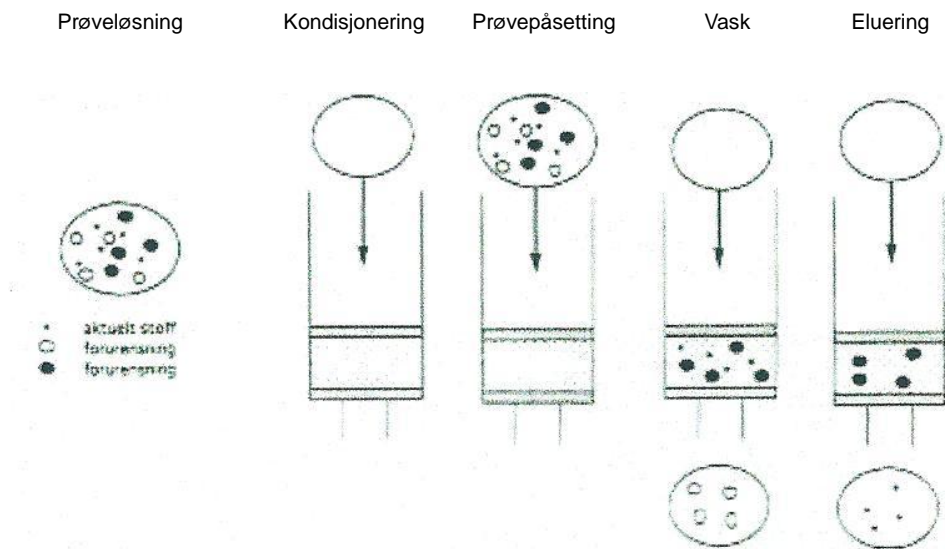
### **2.8.3 Ekstraksjon**

Til ekstraksjon av lipider i matvarer benyttes ofte en væskeekstraksjon. Her benytter man seg av et prinsipp om å bruke ikke blandbare løsemidler som for eksempel vann og kloroform. Vanlige metoder kan være Folchs metode (Folch *et al.* 1957) eller Bligh & Dyers metode (Bligh & Dyer 1959). Siden lipider kan ha en viss grad av polaritet bør de organiske løsemidlene som anvendes også ha en viss grad av polaritet. Når prøven tilsettes vil lipidene foretrekke den organiske fasen, mens de polare komponentene i prøvematerialet havner i den polare fasen (vannfasen). Ved å tilsette et salt (for eksempel NaCl) i blandingen økes polariteten til den polare fasen, og lipidene løses dermed i større grad i den organiske fasen.

### **2.8.4 Separasjon av ulike fettklasser**

Fast fase ekstraksjon (Solid Phase Ekstraktion; SPE) kan benyttes til å separere ulike lipidklasser som triglycider, fosfolipider og frie fettsyrer. Normalfaseekstraksjon er best egnet til separasjon av lipider der kolonnen har en polar stasjonær fase (sorbent) og en upolar mobilfase. Polare interaksjoner oppstår mellom fettklassene, og funksjonelle grupper på sorbenten og graden av retensjon avgjøres av graden av hydrogenbindinger og dipolinteraksjoner. Metoden har følgende trinn; først aktiveres kolonnematerialet ved kondisjonering. Deretter settes prøven på kolonnen hvor fettklassene i prøveløsningen oppnår kontakt med de funksjonelle gruppene i sorbenten. Til slutt elueres fettklassene med et løsemiddel som selektivt bryter interaksjoner mellom analytt og sorbent (figur 2.8). Det er avgjørende at konsentrasjonen av fettklasser ikke er for høy i forhold

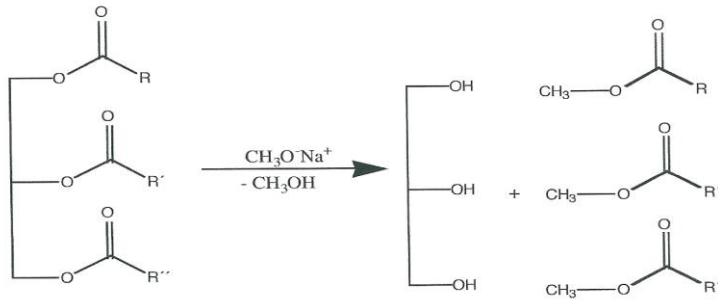
til kolonnens kapasitet. Dersom kolonnen overbelastes kan ikke komponentene fullt ut fanges opp av sorbenten, og krysskontaminering mellom de eluerte fettklassene vil forekomme.



Figur 2.8. Trinn i SPE prosessen (Greibrokk *et al.* 1994).

### 2.8.5 Gasskromatografi og massespektrometri (GC-MS)

I rutineanalyser er gasskromatografi (GC) med flammeionisasjonsdetektor (FID) den mest brukte metoden for å identifisere og kvantifisere fettsyrene i en prøve. For å identifisere fettsyrene sammenlignes retensjonstida til de ulike toppene man får i kromatogrammet med retensjonstidene til kjente fettsyrestandarder. Alternativt kan man bestemme den nøyaktige molekylvekt til de ulike toppene man får i diagrammet med massespektrometri (MS). Dette gir en sikrere identifisering av de ulike fettsyrene enn GC-FID. Ved bruk av GC-MS kan det søkes gjennom et spekterbibliotek for å sammenlikne massespekteret med kjente forbindelser for identifisering. I dette prosjektet ble det valgt å benytte en GC-MS. Før fettsyrene analyseres må de derivatiseres, dvs omdannes til flyktige fettsyremetylestere (Fatty Acid Metylestere; FAME) (Figur 2.9). Dannelsen av FAME skjer i nærvær av for eksempel acetat aldehyd ved å benytte forhøyet temperatur og en katalysator som for eksempel natrium metoksid. I denne oppgaven ble det benyttet heksan, metallisk natrium og boriumtrifluorid ( $\text{BF}_3$ )-metanolløsning.



Figur 2.9. Omestering (metylering) av glyserolbundne fettsyrer (R=Fettsyrer).

### 2.8.6 Internstandarder (IS)

Konsentrasjonen av FAME i prøvene bør tilsvare arealene i IS. Når konsentrasjon og areal av IS er kjent kan FAMES i prøvene kvantifiseres ut i fra dette. Det bør velges internstandarder som ikke finnes i prøvene fra før. Fettsyren 19:0 er egnet som internstandard for medium lange og lange fettsyrer, men er mindre egnet for de korte fettsyrene. Retensjontiden til GC-MS er forskjellig avhengig av hvilken type fettsyre som analyseres, og fettsyrer med forskjellig kjedelengde gir forskjellige areal. I tillegg vil de korte fettsyrene kunne fordampe under prøveopparbeidelsen. For å korrigere for disse forskjellene og kompensere for tapet av de korte fettsyrene bør også IS med kort karboksylkjede tilsettes (for eksempel 9:0).

### 3. Materialer og metoder

#### 3.1 Materialer

##### 3.1.1 Kjemikalier

Tabellen nedenfor gir en oversikt over kjemikalier benyttet i oppgaven.

<b>Kjemikalier</b>	<b>Produktbeskrivelse, renhetsgrad og leverandør</b>
Kloroform	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck, Germany
Metanol	LiChrosolve, Merck, Germany
NaCl	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck, Germany
Heksan	EMSURE® ACS, for analysis, Merck, Germany
Dietyleter	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck, Germany
Eddiksyre	Glacial, 100% anhydrous GR for analysis, Merck, Germany
Borfluorid-metanolløsning	14 %, Sigma Aldrich, Switserland
NaOH	Pro Analyti, Merck, Germany
Metallisk Natrium (i parafin)	Merck, Darmstad Germany
Standard Trinonanoin	Triglyserid C9:0, Larodan AB, Sweden
Standard Nonaic acid	Fri fettsyre C9:0, Larodan AB, Sweden
Standard Trinonadecanoin	Triglyserid C19:0, Larodan AB Sweden
Standard Nonadekansyre,	Fri fettsyre C19:0 Larodan, Sweden
R38 Food Industry FAME mix	Restek, Bellafonte, Pennsylvania, USA
N <sub>2</sub> gass	99,999% Yara, Rjukan, Norway
Helium	99,9999%, Yara, Rjukan, Norway

##### 3.1.2 Humane fordøyelsessafter benyttet i *in vitro* forsøket

To typer fordøyelsessafter ble brukt i dette prosjektet; fysiologisk magesaft og tarmsaft fra mennesker (human gastrisk juice; HGJ og human duodenal juice; HDJ). Saftene var samlet av overlege Morten Jacobsen ved Sykehuset Østfold Fredrikstad (SØF) etter en metode beskrevet av



Holm *et al.* (1988) fra friske, fastende menn og kvinner mellom 20 og 42 år. Lipasekolorimetrisk analyseteknikk ble brukt for å måle lipaseaktiviteten i HDJ. En unit er definert som mengden av enzymløsning som gir en absorbans lik 1,0 ved 595 nm/min etter inkubering med substrat ved 37°C (Ulleberg *et al.* 2011). Målingen ble analysert av avdelingsingeniør Irene Comi ved IKBM, UMB. Lipaseaktivitet er ikke målt i HGJ men aktivitet i magesaft er tidligere detektert av *post doc.* Ellen Ulleberg ved IKBM, UMB. Mengden tilsatt HGJ er basert på målinger av pepsinaktivitet.

Gjennomsnittlig enzymaktivitet i fordøyelsessaftene brukt i denne oppgaven var:

HGJ, pepsinaktivitet; 40,9 U/ml

HDJ, lipaseaktivitet; 959 U/ml

### ***3.1.3 Kommersielle produkter***

Meierismør	Tine DA, Norge
Margarin	*Norge
Lettmargarin	*Norge

\* Etter avtale med leverandør skulle ikke produktnavnet bli spesifisert i oppgaven.

#### *Varedeklarasjon margariner og smør*

Smør er produsert fra 35 % fløte og tilsatt 1,5 % salt (NaCl), melkesyrekultur og vitamin D. Fettinnhold: 82 %.

Margarin inneholder 48 % rapsolje, vegetabilsk fett, vann, skummet melk, salt (NaCl), emulgator (soyalecitin, mono og diglyserider av fettsyrer), kaliumsorbat, melkesyre, vitamin A og D, betakaroten og aroma. Denne margarinen inneholder 70 % fett og blir i den resterende del av oppgaven kalt margarin 70 %.

Lettmargarin inneholder av 28 % rapsolje, vegetabilsk fett, vann, skummet melk, salt (NaCl), pektin, emulgator (soyalecitin, mono og diglyserider av fettsyrer), kaliumsorbat, vitamin

A og D, betakaroten og aroma. Denne margarinen inneholder 40 % fett og blir i resterende del av oppgaven kalt margarin 40 %.

Tabell 3.1. Deklarert næringsinnhold pr. 100g.

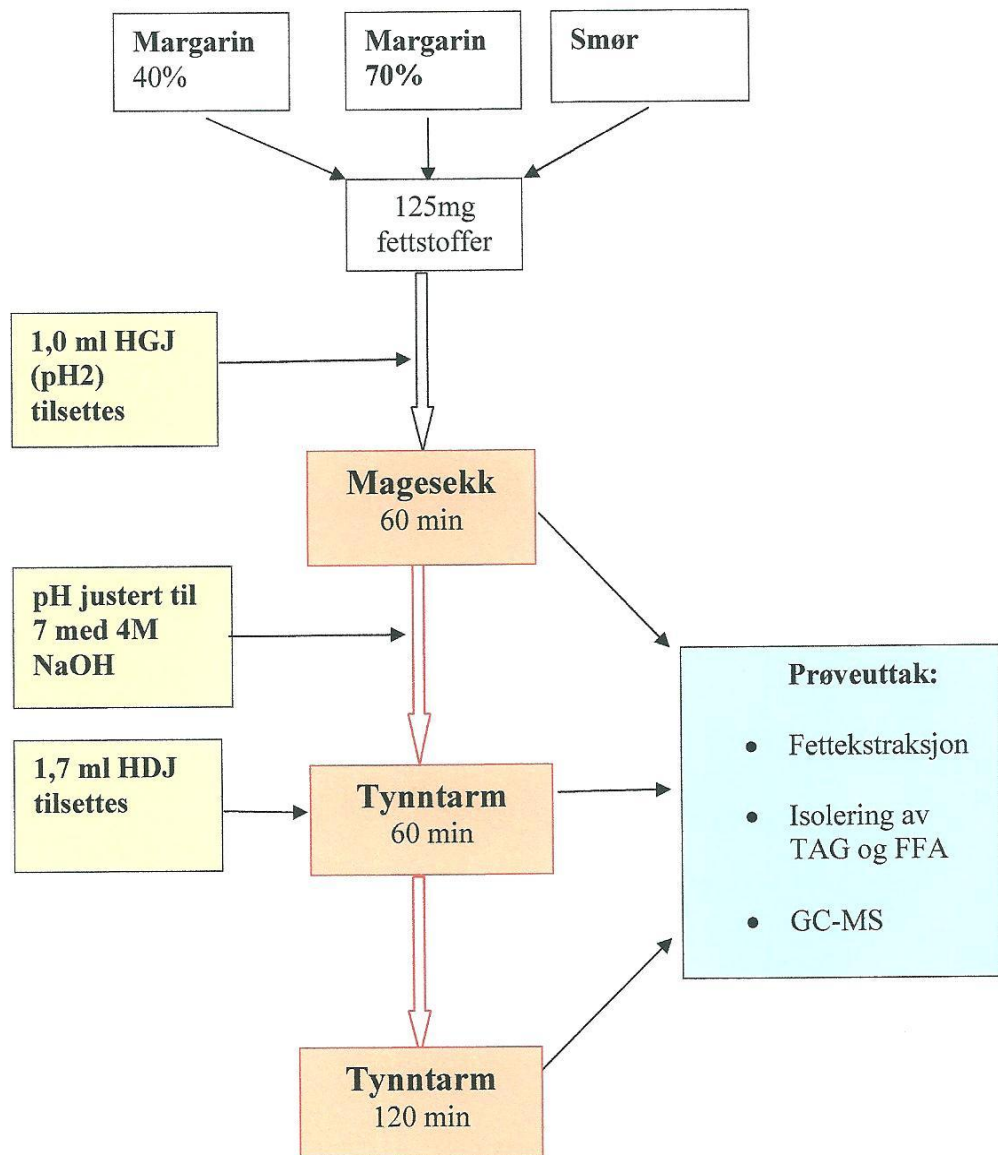
	Smør	Margarin 70 %	Margarin 40 %
Energi		2590kj (630 kcal)	1490kj (360kcal)
Protein	1g	<0,5g	<0,5g
Karbohydrater	1g	<0,5g	0,5g
Fett	82g	70g	40g
hvorav:			
Metttet		17	10g
Enumettet		34g	19g
Flerumettet		14g	8g
hvorav:			
Essensielle fettsyrer		14g	8g
hvorav:			
Alfalinolensyre (omega-3)		4,4g	2,5g
Linolsyre (omega-6)		9,6	5,5g
Vitamin A	1200µg	900µg	900µg
Vitamin D	10µg	10µg	10µ
Vitamin E		8mg	5µ
Kostfiber		0,0g	0,5g
Natrium		0,4g	0,5g

## 3.2 Metoder

### 3.2.1 *In vitro* fordøyelse av margariner og smør

En to trinns *in vitro* modell ble brukt for å simulere fordøyelsen i mage og tarm ved 37°C. Tre separate hydrolyseforsøk ble utført (Figur 3.1). I hvert forsøk ble produktmengde tilsvarende 125 mg lipider tilsatt 40 ml pyrex glassflasker med tett kork. I det første forsøket ble fordøyelsen i magesekken simulert ved at 1,0 ml HGJ ble tilsatt og blandingen inkubert i 60 min (37°C) i en inkubatorrører (Gallenkamp Orbital incubator) ved 150 rpm. Etter at magesaften ble tilsatt ble pH kontrollert med instrumentet PHM 210 Standard pH meter (Meterlab®Radiometer Denmark). Etter inkubasjon i 60 min ble 1 ml prøve pipettert over i et nytt reagensglass. Reaksjonen ble stanset og fett ekstrahert etter en metode basert på Folch *et al.* 1957. I det andre forsøket ble først magesekk hydrolysen utført som beskrevet over. Deretter ble pH justert opp til 7 med 11µl

4M NaOH før HDJ ble tilsatt for å simulere tynntarmsfordøyelsen. Etter 60 min ble reaksjonen stanset med Folchs reagens og fett ekstrahert. Det tredje hydrolyseforsøket er lik forsøk 2, men med hydrolyse i 120 min i duodenalfasen.



Figur 3.1. Flytdiagram over *in vitro* fordøyelsesforsøket utført i to trinn. For hvert kommersielt produkt ble det gjennomført tre hydrolyseforsøk. I det første forsøket ble prøven analysert etter 60 min. I det andre og tredje forsøket ble prøvene hydrolyisert i 60 min med HGJ før pH ble justert og HDJ tilsatt. I forsøk to ble prøven inkubert med HDJ i 60 min. I forsøk tre ble prøven inkubert i 120 min.

Etter at fettene fra fordøyelsesforsøkene var blitt ekstrahert ble TAG og FFA isolert fra det ekstraherte fettene ved hjelp av fase-separasjon (Solid Phase Extraction; SPE) etter en modifisert metode beskrevet av Ruiz *et al.* (2004). Til slutt ble de to fettklassene derivatisert og FAME ble analysert ved GC-MS. Metodene beskrives detaljert senere i Materialer og metoder.

Kontrollprøver uten enzymatisk tilsetning ble analysert for å undersøke fettsyreprofilen i ufordøyde prøver. Det ble også gjort analyse av kontrollprøver kun tilsatt HCl (pH 2) for å undersøke om det sure miljøet i gastrisk fase kunne forårsake hydrolyse. Begge disse forsøkene ble behandlet ved tilsvarende betingelser som beskrevet over.

Plastmatriell kan medføre kontaminering og vil kunne gi falske positive utslag på fettsyrene 16:0 og 18:0 (Russell & Werne 2007). I analysene etter fordøyelsestrinnene ble det derfor brukt glassutstyr når dette var mulig.

### **3.3 Analytiske metoder**

For å analysere fastheten i produktene ble det benyttet to analysemetoder; kjernemagnetisk resonans (nuclear magnetic resonance; NMR) og teksturanalyse.

#### **3.3.1 NMR analyse**

Prøvene ble først smeltet fullstendig ved 80°C. Fettfasen ble så fordelt over i fire rør og plassert i vannbad ved 0°C i en time. Rørene ble deretter plassert i hvert sitt vannbad i 30 min ved henholdsvis 10°C, 20°C, 30°C og 35°C. NMR analysen ble utført i en Minispec Mq 20 (Bruker, Germany).

#### **3.3.2 Teksturanalyse**

Produktene ble oppbevart ved 5°C i en uke før analysen. Målingen ble gjort på tre punkter i hvert beger, ca 2 cm fra kanten og ikke mindre enn 2,5 cm mellom hvert målested. Instrumentet (Stevens LFRA Texture analyser, TA 1000, Germany) var innstilt på en hastighet på 2 mm/sek med en distanse på 10 mm. Det ble benyttet en sylindrisk probe med en diameter på 5 mm.

#### **3.3.3 Beregning av fettprosent ved fordampningsmetoden**

Bestemmelse av nøyaktig fettinnhold i de ulike prøvene ble gjort ved fordampningsmetoden. Et aluminiumsbeger ble veid inn, ca 10 g prøve ble tilsatt og vekten av begeret trukket fra. Beggeret

ble varmet på en varmeplate ved 400°C til alt vannet var fordampet. Vekten av den fordampede prøven ble dividert med vekten av innveid prøve og deretter multiplisert med 100. Mengden protein og karbohydrater i hver prøve ble trukket fra for å finne prosentandel fett i hver prøve. Innhold av protein og karbohydrat kommer fra varedeklarasjonen (Tabell 3.1). For margarinene ble mengden protein og karbohydrat satt til 0,5 g.

### 3.3.4 Internstandarder

For å kvantifisere FAMES i produktene som skulle analyseres ble det brukt fire internstandarder (IS). To TAG IS (9:0 og 19:0) til TAG fraksjonen og to FFA IS (9:0 og 19:0) til FFA fraksjonen. Mengde og konsentrasjon av IS ble bestemt etter å ha analysert flere prøver tilsatt forskjellige konsentrasjoner og volum. Hensikten var å finne den mengden og konsentrasjonen av IS som gav topper som tilsvarte gjennomsnittlig areal av fettsyrene i produktet.

Tillaging av internstandarder ble utført ved å løse 10 mg TAG IS i 1 ml heksan og 0,1 mg FFA IS i 1,0 ml heksan. Tabell 3.2. viser mengden tilsatt IS i de ulike prøvene.

Tabell 3.2. Tilsatt mengde interne standarder i de ulike fordøyelsestrinnene.

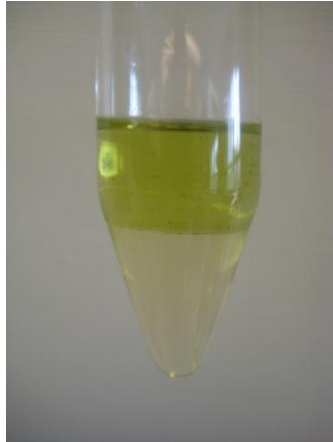
IS	Gastrisk fase	Duodenalfase 60min	Duodenalfase 120 min.
9:0 TAG	300µl	200µl	100µl
19:0 TAG	300µl	200µl	100µl
9:0 FFA	100µl	200µl	300µl
19:0 FFA	100µl	200µl	300µl

Beregninger av fettsyrer fra 4:0 til og med 15:0 ble gjort med IS 9:0. Beregninger av fettsyrer med lengre kjedelengde ble gjort med IS 19:0.

### 3.3.5 Ekstraksjon av lipider

For å kunne analysere lipider i margariner og smør må lipidene først ekstraheres. Dette ble gjort med Folchs metode (Folch *et al.* 1957). Først ble 1 ml (hele prøven i noen av forsøkene) av hver prøve overført til 50 ml glassrør og tilsatt 20 ml metanol-kloroformløsning (2:1). De ble så blandet ved hjelp av en reagensrørmikser i 3 sek. Standardene ble så tilsatt prøvene i henhold til mengden som er oppgitt i tabell 3.2 før prøvene ble inkubert i romtemperatur på en røreplattform med 150 rpm i 15 min. Deretter ble 4 ml NaCl (0,9 %) tilsatt og prøvene kraftig blandet ved hjelp

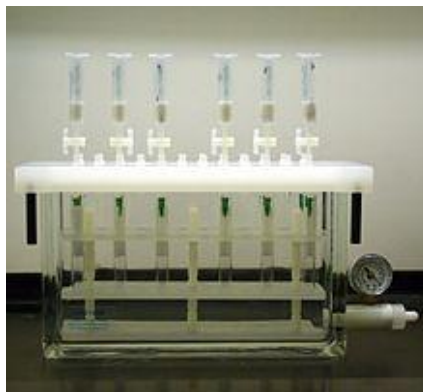
av en reagensrørmikser i 3 sek før de ble sentrifugert i 10 min med 2000 rpm i en Heraeus, Multifuge X3R Centrifuge (Thermo Scientific). Den nedre fasen (Figur 3.2) ble pipetert over i 15 ml glassrør og fordampet i N<sub>2</sub>-gass ved 37°C.



Figur 3.2. Figuren illustrerer hvordan de ulike fasene dannes etter ekstraksjon av lipider i smør med Folchs metode. Den øverste fasen består av vann og metanol og inneholder vannløselige komponenter. I midtfasen ligger denaturerte proteiner. Den nedre fasen består av kloroform og lipider.

### ***3.3.6 Solid fase ekstraksjon av FFAs og TAGs***

Etter de ulike hydrolysetrinnene ble SPE benyttet for å separere lipidklassene TAG og FFA i det ekstraherte fett. SPE kolonnen inneholdt 500 mg kolonnemateriale og var en Cromabond Aminopropyl-modified silica (Machery-Nagel GMBH & Co. KG, Germany). Kolonnen ble plassert i en vacuum manifold (Figur 3.3), og prøvene ble så eluert ved undertrykk med en hastighet på 1 ml pr min.



Figur 3.3. Vakuum manifold med SPE kolonner

Prosedyre:

1. Prøvene som var ekstrahert med Folchs metoden ble inndampet under N<sub>2</sub>, løst i 1ml heksan-kloroform-metanol (95:3:2) og deretter blandet kraftig.
2. Før tilsats av prøvene ble kolonnene ekvilibrert med 7 ml heksan.
3. De ulike prøvene ble satt på kolonnene og TAG ble eluert med 5 ml kloroform.
4. Deretter ble FFA eluert fra kolonnene med dietyleter-eddiksyre (98:2).
5. De to eluerte lipidklassene ble så fordampet i N<sub>2</sub> ved 37°C.

### ***3.3.7 Gass kromatografi og massespektrometri (GC-MS) av FAMES***

Bestemmelse av fettsyresammensetning i TAG og FFA fraksjonene ble bestemt ved hjelp av GC-MS. Før den kromatografiske analysen ble prøvene derivatisert for å danne fettsyremetylestere.

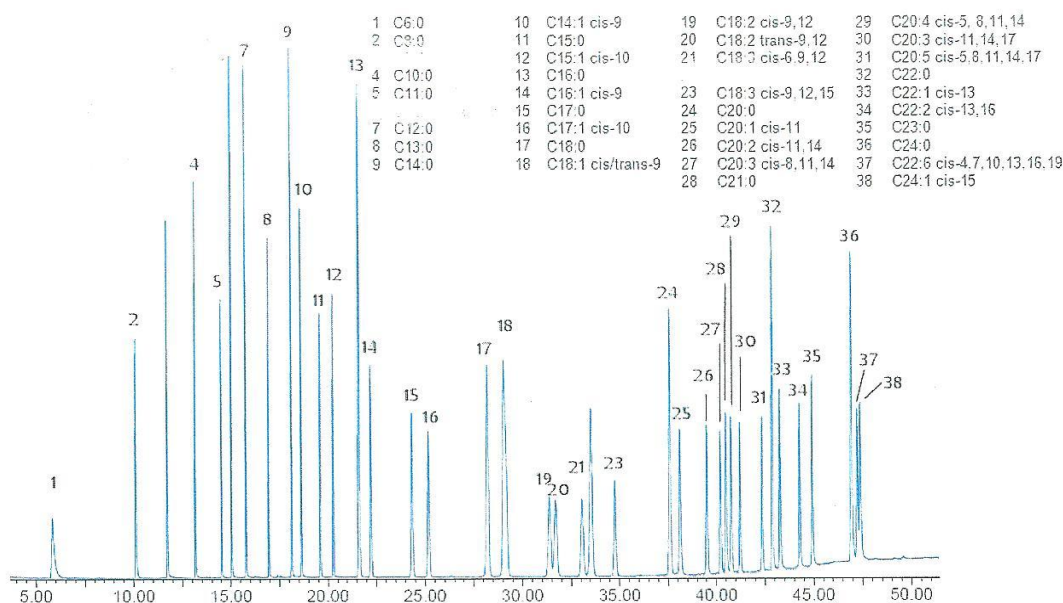
TAG fraksjonen ble omestret ved å løse de tørkede lipidene i 2 ml heksan og 1,5 ml natrium metanolatløsning (33,3 mg metallisk natrium i 1 ml metanol). Glassene ble lagt horisontalt på en røreplattform med 300 rpm i 30 min. Glassene fikk hvile i 10 min før den øvre fasen ble pipettert over i GC-vials.

FFA fraksjonen ble forestret ved å tilsette 1 ml 14 % bortrifluorid-metanolløsning. Prøvene ble satt i 70°C vannbad i 5 minutter og deretter kjølt ned før 2 ml heksan ble tilsatt. Prøvene ble rørt kraftig før den øvre fasen pipettert over i GC-vials. Gasskromatografen som ble brukt var en Agilent 6890 Series gasskromatograf (USA). Lengden på kolonnen (Varian CP. Sil88 50 x 0,25 FAME, Nederland) var på 50 m med en indre diameter på 0,25 mm og 0,25 µm filmtykkelse. Helium ble brukt som bæregass. Temperaturprogrammet startet med 70°C som ble holdt 4 minutter. Så ble temperaturen økt 30°C i minuttet til 155°C som ble holdt i 15 minutter og videre med 2°C i minuttet til 160°C som ble holdt i 15 minutter. Deretter ble temperaturen økt med 3°C i minuttet til 230°C som ble holdt i 2,5 minutter. Til slutt økte temperaturen 50°C i minuttet til 250°C der temperaturen ble holdt i 0,5 minutter og kjøringen ble avsluttet.

Massespektrometeret Autospec ultima, Micromass Ltd. (Manchester England) ble brukt til å identifisere fettsyremetylestere (FAMES). Masseområdet var  $m/z$  40-600 og skanntiden var 0,5 sekunder. Temperatur på ionekilden var på 200°C.

GC-MS instrumentet ble styrt av programvaren MassLynx versjon 4.0. Spekterbiblioteket NIST 08 ble brukt som referansebibliotek for å identifisere FAMES.

For å bidra til sikker identifisering av FAMES ble en innkjøpt standard med 38 komponenter (R38) (Figur 3.4) analysert på GC-MS. FAMES i R38 som også fantes i prøven ble identifisert ved hjelp av retensjonstid og bekreftet i referansebiblioteket. For topper som ikke fantes i R38-miksen ble det gjort biblioteksøk der fettsyrene rangertes etter matchfaktor. Matchfaktoren angir sannsynligheten for at massespekteret det søkes etter er fra en ren forbindelse av det foreslåtte referansespekteret (Thøgersen 2008).



Figur 3.4. Kromatogram og elusjonsrekkefølge for FAMES i R38.

### 3.3.8 Kontrollforsøk

To forsøk ble gjort for å undersøke om SPE kolonnene var blitt overbelastet. Formålet var å se om det forekom TAGs i FFA fraksjonen. I det første forsøket ble FFA fraksjonen derivatisert etter metoden for omestring av TAGs. I forsøk 2 ble FFA fraksjonen på nytt lastet på SPE kolonnen og tilsatt kloroform for å eluere eventuelle TAGs. Analysene ble gjort på GC-MS.



## 4. Resultater

### 4.1 Bestemmelse av fettinnhold i prøvene.

Fettinnholdet i de kommersielle prøvene ble bestemt ved inndamping som beskrevet i Material og metoder. Det nøyaktige fettprosentinnholdet ble beregnet for å kunne finne mengden prøve som måtte tilsettes hydrolysefasen for å oppnå 125 mg fett fra de enkelte prøvene. Resultatene fra beregningene (Tabell 4.1) viste at smør inneholdt 83,2 % fett og margarin 40 og 70 % inneholdt henholdsvis 39,5 og 70,1 % fett.

Tabell 4.1 Fett % i prøvene og mengde prøve tilsatt for å få 125 mg fett. Tabellen viser også pH målt i vannfasen for hvert av produktene

Produkt	% fettinnhold	Prøve med 0,125g fettinnhold	pH
Smør	83,3	0,150g	6,1
Margarin 70 %	70,1	0,317g	5,0
Margarin 40 %	39,5	0,178g	5,0

### 4.2 Fasthet til produktene

Fastheten til produktene ble undersøkt ved ulike temperaturer (10-35°C) ved hjelp av NMR analyse og 5°C ved teksturanalyse. Resultatene av undersøkelse målt ved NMR viste at smør hadde det høyeste innholdet av fast fett ved temperaturområdene 10, 20 og 30°C og et noe lavere innhold ved 35°C enn margarinprøvene. Det to margarinproduktene hadde lik mengde fast fett ved de samme temperaturene. Alle prøvene hadde nær 0 % fast fettinnhold ved 35°C og viste fullstendig nedsmelting ved denne temperaturen (Tabell 4.2).

Tabell 4.2. Andel fast fett (%) i smør og margarin 70-og 40 % analysert med NMR ved fire temperaturområder

	10°C	20°C	30°C	35°C
Smør	48,4	17,7	4,5	0,0
Margarin 70 %	15,7	6,4	2,0	0,4
Margarin 40 %	13,7	6,1	1,8	0,3

Resultatene av teksturanalysene gjort på margarin 70 %, margarin 40 % og smør ved 5°C viste stor variasjon mellom produktene. Smør lå betydelig høyere og hadde større fasthet enn margarinene. Margarin 40 % hadde svært lav verdi (Tabell 4.3).

Tabell 4.3. Teksturanalyse av smør og margarin 70-og 40 % ved 5°C.  
Analyseresultater angitt i gram

	Gram	Spesifikasjon
Smør	1015	X
Margarin 70 %	151	(150-350)
Margarin 40 %	61	(40-100)

### 4.3 Fettsyresammensetningen i TAG fraksjonen av ufordøyde produkter

Resultatene av GC-MS analysene av TAG i smør og margarin 70 og 40 % viste at det i begge margarinproduktene var et betydelig høyere innhold av 18:1n-9 enn av de øvrige fettsyrene (Tabell 4.4). Innholdet av oljesyre, 18:1n-9 *cis*, var 47,7 og 49,5 % i henholdsvis margarin 70- og 40 %. Tilsvarende fettsyre i smør utgjorde 21,8 % av de totale fettsyrene. Innholdet av linolsyre, 18:2n-6 *cis*, var også reativt høyt i margarinene og utgjorde henholdsvis 13,9 og 9,8 % i margarin 70 og 40 %. I smør var det kun 1,2 % 18:2n-6 *cis*. Innholdet av 18:3n-3 *cis* var også forholdsvis høyt i margarinene med en andel på 5,0 - 5,2 %. I smør utgjorde denne fettsyren 0,5 %.

Palmitinsyre, 16:0, var den av fettsyrene det var mest av i smør med hele 35,0 %. I margarinprøvene utgjorde denne ca 11 %. Fettsyren myristinsyre, 14:0, utgjorde 11,4 % i smør, mens den i margarinprøvene kun utgjorde 3,9 % (margarin 70 %) og 4,7 % (margarin 40 %). Det var en stor andel 18:0 i smør med 11,0 % mens det i margarinene var ca 2,7- 2,6 % av denne fettsyren. Av de kortkjedede fettsyrene 4:0; 6:0; 8:0 og 10:0 ble det i smør påvist henholdsvis 1,6, 1,5, 1,2 og 2,7 %, til sammen ca 7 % av de totale fettsyrene. I praksis var det bare 8:0 og 10:0 av de kortkjedede fettsyrene som ble funnet i margarinprøvene. Til sammen utgjorde de ca 1,2-1,4 % av alle fettsyrene i begge margarinene.

Smør inneholdt 67,4 % mettede fettsyrer mens margarinene 70 og 40 % inneholdt mindre av disse fettsyrene med henholdsvis 26,1 og 28,2 % av mettede fettsyrer. Margarinene 70 og 40 %

inneholdt mer av både enumettede og flerumettede fettsyrer med henholdsvis 48,8 og 50,6 % enumettede fettsyrer og 18,9 og 15,0 % flerumettede fettsyrer. Smør inneholdt 23,6 % enumettede fettsyrer og 1,7 % flerumettede fettsyrer.

Tabell 4.4. Gjennomsnittlig % fettsyresammensetning av TAG i ufordøyde prøver

<b>FAME</b>	<b>Margarin 70 %</b>	<b>Margarin 40 %</b>	<b>Smør</b>
<b>Mettede</b>			
4:0			1,63
6:0	0,04		1,53
7:0			0,02
8:0	0,58	0,64	1,20
10:0	0,64	0,74	2,70
11:0			0,07
12:0	6,82	8,28	0,05
13:0			0,11
14:0	3,91	4,69	11,42
15:0			1,23
16:0	11,10	10,90	35,03
17:0	0,04	0,04	1,25
18:0	2,72	2,60	11,01
20:0			0,16
22:0	0,21	0,25	
24:0	0,08	0,09	
<b>Σ SAT</b>	<b>26,14</b>	<b>28,23</b>	<b>67,41</b>
<b>Enumettede</b>			
10:1 n-6 <i>cis</i>			0,26
14:1 n-5 <i>cis</i>			1,02
16:1 n-7 <i>cis</i>	0,12	0,10	
17:1 n-8 <i>cis</i>	0,03		
18:1 n-9 <i>cis</i>	47,69	49,54	21,76
18:1 n-9 <i>trans</i>			0,55
20:1 n-6 <i>cis</i>	0,80	0,83	
22:1 n-9 <i>cis</i>	0,02		
24:1 n-9 <i>cis</i>	0,08	0,089	
<b>Σ MUFA</b>	<b>48,78</b>	<b>50,56</b>	<b>23,59</b>
<b>Flerumettede</b>			
16:2 n-4 <i>cis</i>	0,02	0,02	
16:3 n-3 <i>cis</i>	0,03		
18:2 n-6 <i>cis</i>	13,85	9,79	1,17
18:3 n-3 <i>cis</i>	5,03	5,23	0,49
<b>Σ PUFA</b>	<b>18,93</b>	<b>15,04</b>	<b>1,66</b>
<b>Σ n-3</b>	<b>5,08</b>	<b>5,23</b>	<b>0,49</b>
<b>Σ n-6</b>	<b>14,64</b>	<b>10,62</b>	<b>1,43</b>

Tabell 4.5 viser fettsyresammensetningen i TAGs i ufordøyd smør og margarin 40 og 70 %, uttrykt som µg/mg.

Tabell 4.5. Gjennomsnittlige fettsyresammensetning av TAG, µg/mg, i ufordøyde prøver

<b>FAME</b>	<b>Margarin 70 % ± STD</b>	<b>Margarin 40 % ± STD</b>	<b>Smør ± STD</b>
4:0			19,92 ± 0,60
6:0	0,31 ± 0,00		17,64 ± 0,10
7:0			0,18 ± 0,01
8:0	5,10 ± 0,02	5,06 ± 0,09	13,89 ± 0,30
10:0	5,60 ± 0,03	5,83 ± 0,21	31,22 ± 0,34
10:1 n-6 <i>cis</i>			3,04 ± 0,07
11:0			0,76 ± 0,07
12:0	59,56 ± 4,03	65,10 ± 1,48	39,26 ± 3,40
13:0			1,25 ± 0,24
14:0	34,13 ± 1,71	36,87 ± 1,14	131,86 ± 3,41
14:1 n-5 <i>cis</i>			11,80 ± 0,42
15:0	0,47 ± 0,01		14,22 ± 11,50
16:0	96,89 ± 1,13	85,69 ± 2,76	404,27 ± 10,29
16:2 n-4 <i>cis</i>	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	
16:3 n-3 <i>cis</i>	0,26 ± 0,02		
17:0			14,37 ± 0,15
17:1 n-8 <i>cis</i>	0,25 ± 0,02		
16:1 n-7 <i>cis</i>	1,08 ± 0,01	0,84 ± 0,05	
17:0	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,04	
18:0	23,73 ± 0,16	20,49 ± 0,79	127,11 ± 124,40
18:1 n-9 <i>cis</i>	416,41 ± 3,50	308,94 ± 9,7	251,12 ± 248,60
18:1 n-9 <i>trans</i>			6,33 ± 6,27
18:2 n-6 <i>cis</i>	120,95 ± 0,98	77,02 ± 34,90	13,52 ± 13,46
20:0	5,50 ± 0,14		1,83 ± 1,79
18:3 n-3 <i>cis</i>	43,91 ± 0,13	41,14 ± 0,98	5,72 ± 2,25
20:1 n-6 <i>cis</i>	7,02 ± 0,06	6,54 ± 0,23	
22:0	1,88 ± 0,05	2,02 ± 0,38	
22:1 n-9 <i>cis</i>	0,20 ± 0,01		
24:0	0,72 ± 0,01	0,75 ± 0,1	
24:1 n-9 <i>cis</i>	0,68 ± 0,01	0,69 ± 0,10	

#### **4.4 Analyse av FAMES av frie fettsyrer (FFA) og triacylglyserol (TAG) i ufordøyde og fordøyde prøver.**

Resultatene fra GC-MS analysene viser det kvalitative og kvantitative innholdet av fettsyrer i de to fettklassene FFA og TAG. Figurene 4.1- 4.6 viser fettsyreprofilen og mengde av TAGs og FFAs i ufordøyde og fordøyde prøver. Figur 4.1 og 4.2 viser henholdsvis TAG og FFA i margarin 70 %. Figur 4.3 og 4. 4 viser henholdsvis TAG og FFA i margarin 40 %. Figur 4.5 og 4.6 viser henholdsvis TAG og FFA i smør.

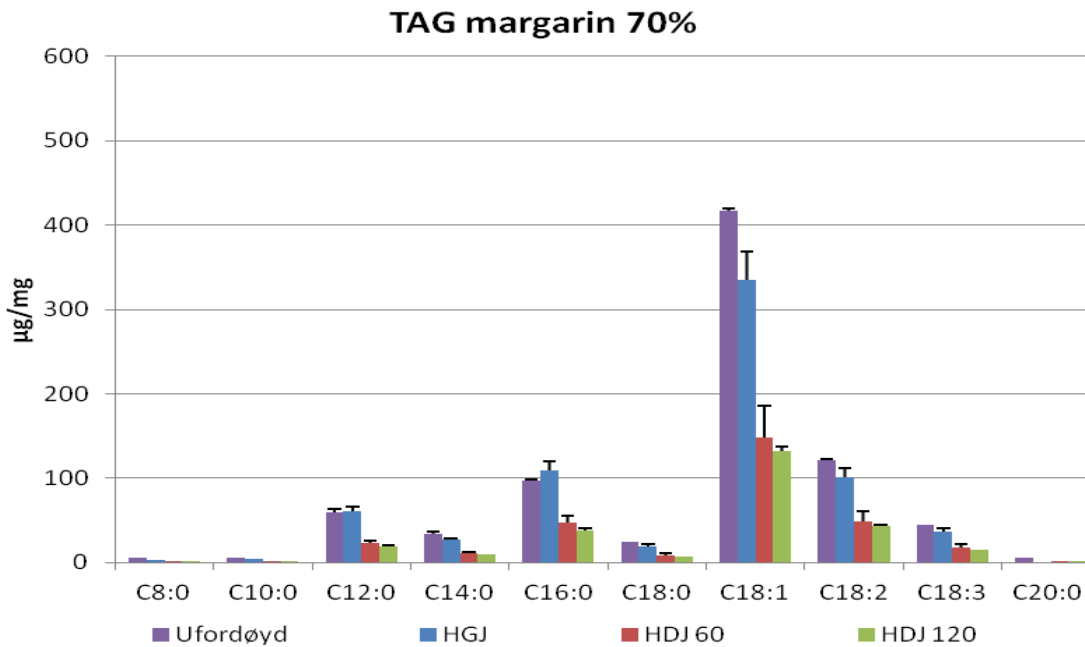
Resultatene fra analysene viste et høyt innhold av TAGs og et lite innhold av FFAs i alle de ufordøyde prøvene. Tilsvarende så man etter magesekkhidrolyse. Noen unntak ble imidlertid registrert. Resultatene i figur 4.1 viser en nedgang i 18:1 innholdet i 70 % margarin i løpet av magesekkhidrolysen. Det er imidlertid ingen økning av denne fettsyren i FFA fraksjonen (Figur 4.2) fra ufordøyd til etter magesekkhidrolyse. Tilsvarende ser man for 16:0 i smør (Figur 4.5). Det er tilsynelatende en kraftig nedgang i 16:0 fra ufordøyd til magesekkhidrolyst smør, men her igjen er det ingen tilsvarende økning av 16:0 i FFA fraksjonen.

Etter duodenalfordøyelse er det imidlertid store forskjeller i mengden fettsyrer i de ulike fettklassene. I TAG fraksjonen i 70 % margarin er det en kraftig nedgang i de fleste fettsyrene fra magesekkhidrolyse til 60 min duodenalfordøyelse (Figur 4.1). Innholdet av de respektive fettsyrene får en betydelig økning i FFA fraksjonen mellom disse trinnene (Figur 4.2). Hidrolyse av margarin 70 % i 120 min gir ikke noen tydelig nedgang i TAG fraksjonen sammenliknet med hidrolyse i 60 min. Det er imidlertid interessant å observere at det skjer en økning av FFA fra 60 min til 120 min tarmhidrolyse for mange av fettsyrene (Figur 4.2).

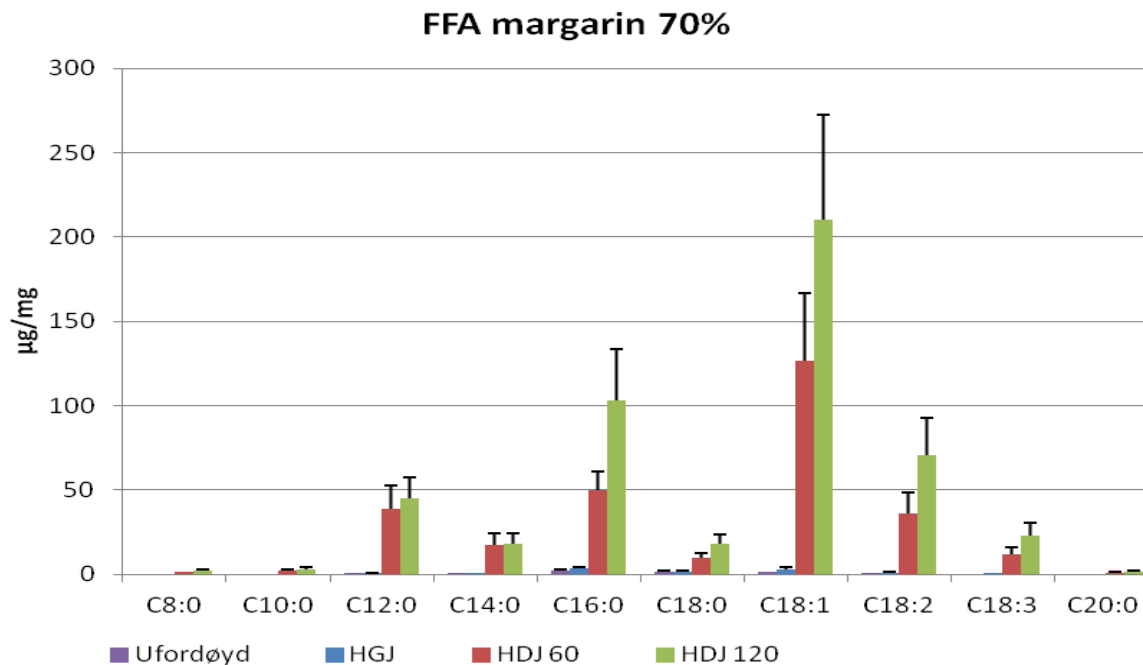
For margarin 40 % er det en tilsynelatende viss økning i TAG fraksjonen fra ufordøyd til magesekkhidrolyse for mange av fettsyrene (Figur 4.3). I FFA fraksjonen ser man ingen økning mellom disse trinnene (Figur 4.4). Etter duodenalfordøyelse i 60 min er det en stor nedgang i TAGs for de fleste av fettsyrene og tilsvarende stor nedgang for enkelte av fettsyrene i tarmhidrolysen fra 60 min til 120 min. Den kraftige nedgangen fra 60 til 120 min tarmhidrolyse gjelder særlig fettsyrene 16:0; 18:1 og 18:2. I FFA fraksjonen er det en betydelig økning av de fleste fettsyrer fra magesekk til duodenalfordøyelse i 60 min. Økningen i fettsyrer fra duodenalfordøyelse 60 til 120 min er imidlertid ikke særlig stor, men korresponder allikevel med nedgangen i TAGs i dette trinnet ved at fettsyrene 16:0; 18:1 og 18:2 skiller seg ut med en større

økning enn de øvrige fettsyrene.

I smørprøvene er det, som i margarinene, en kraftig økning i TAGs mellom magesekkefordøyelse og duodenalfordøyelse i 60 min (Figur 4.5). De korresponderende fettsyrene i FFA fraksjonen viser en tilsvarende økning i dette trinnet (Figur 4.6). Etter duodenalfordøyelse i 120 min er det ingen nedgang i TAGs, mens det for FFAs er en tydelig økning i dette trinnet for alle fettsyrene. Spesielt gjelder dette fettsyrene 16:0; 18:0 og 18:1.

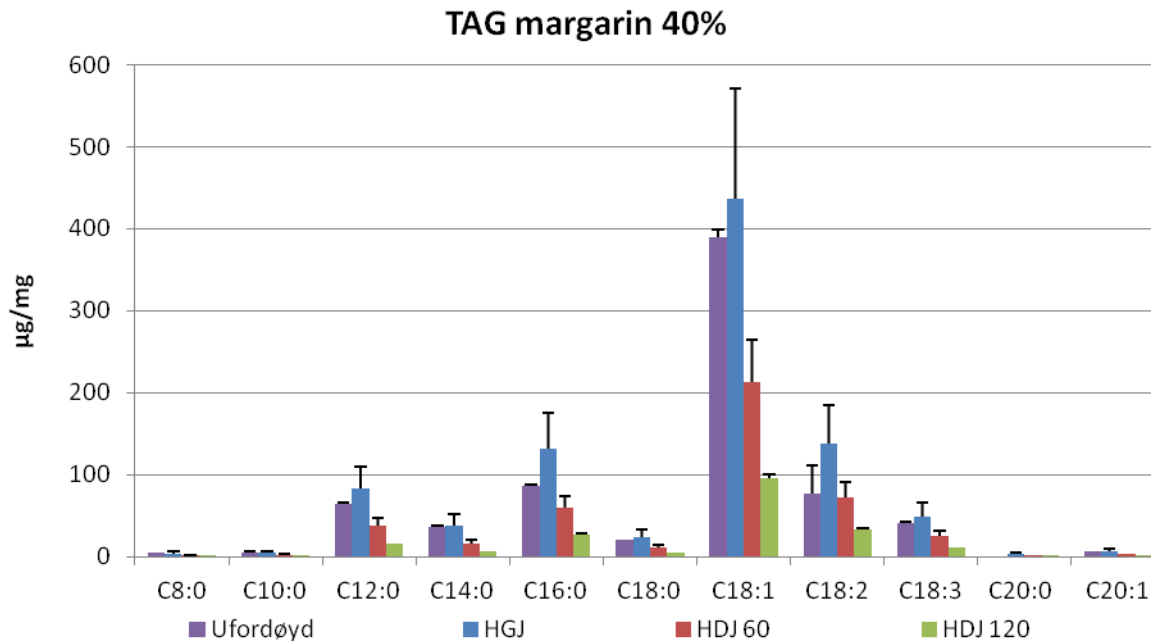


Figur 4.1. Sammensetningen av TAG i margarin 70 % i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.

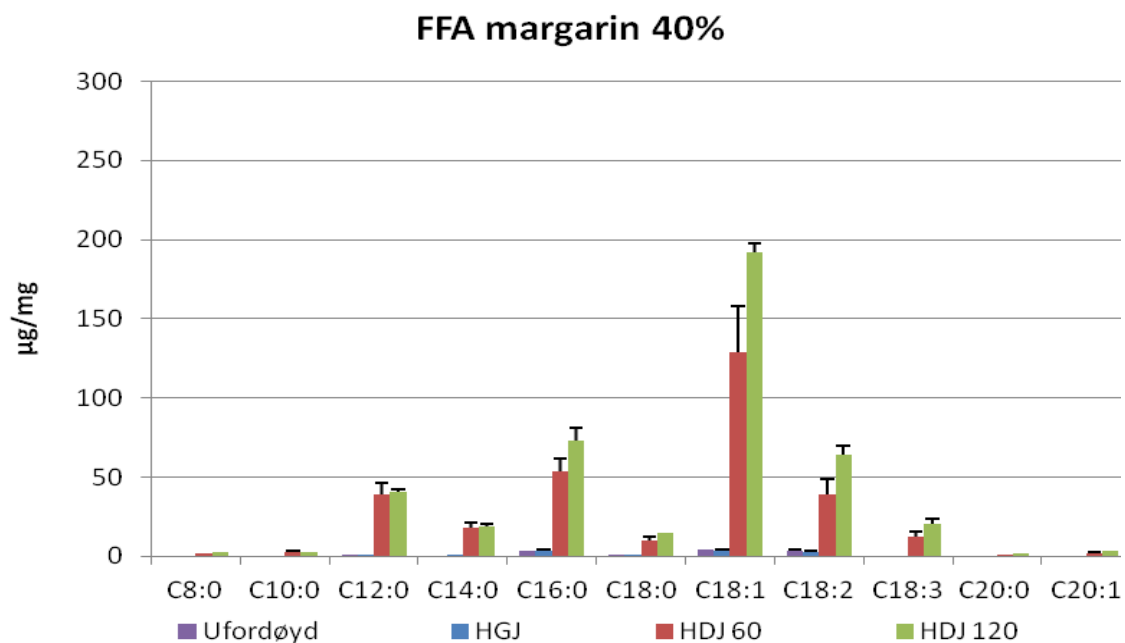


Figur 4.2. Sammensetningen av FFA i margarin 70 % i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.

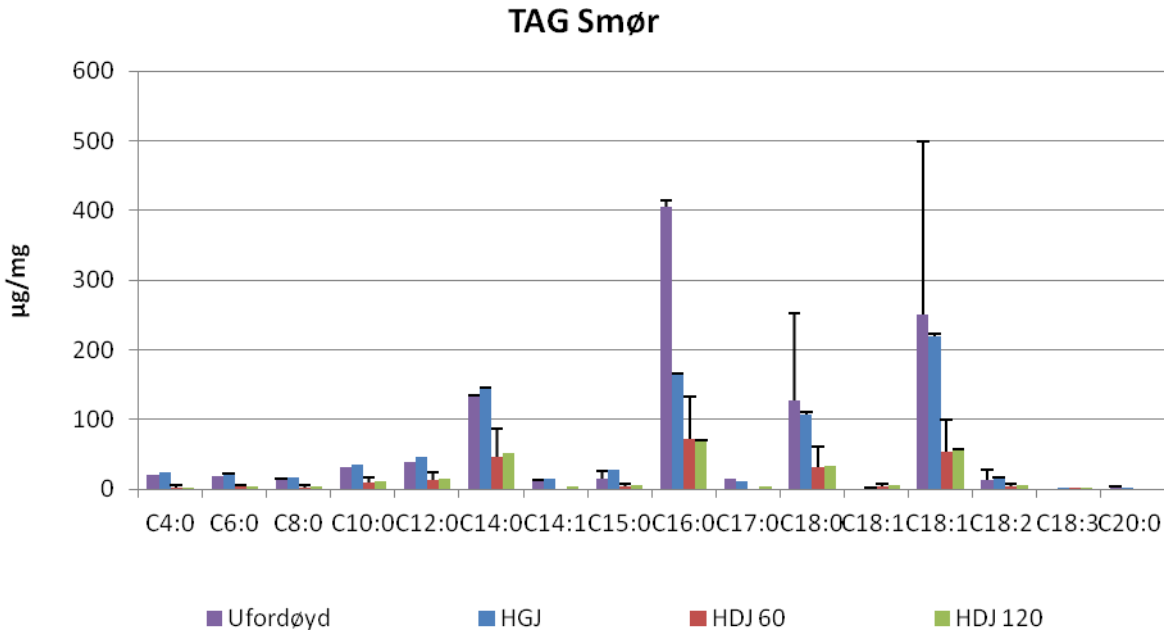




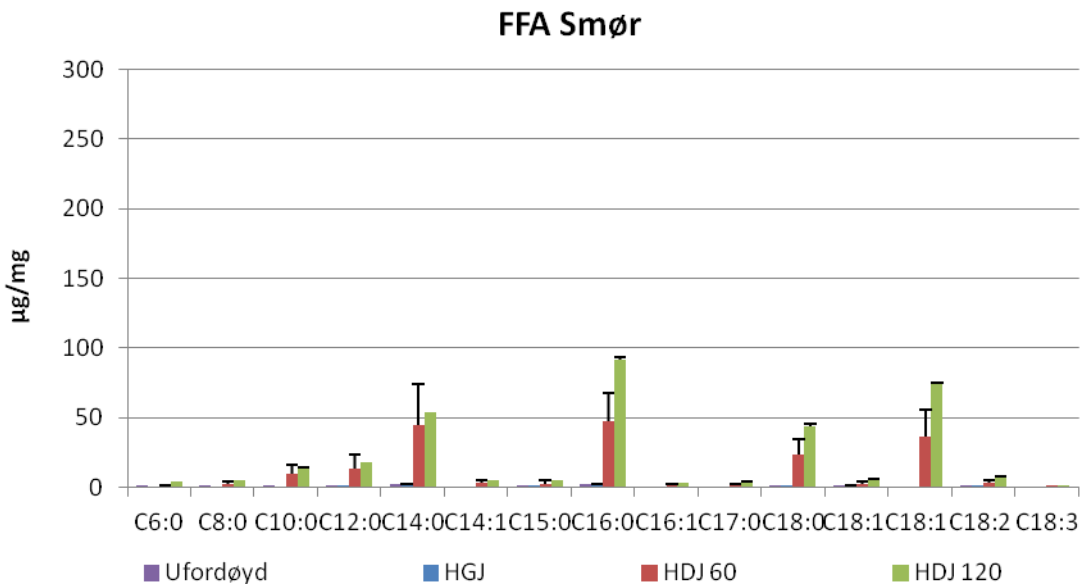
Figur 4.3. Sammensetningen av TAG i margarin 40 % i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.



Figur 4.4. Sammensetningen av FFA i margarin 40 % i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.



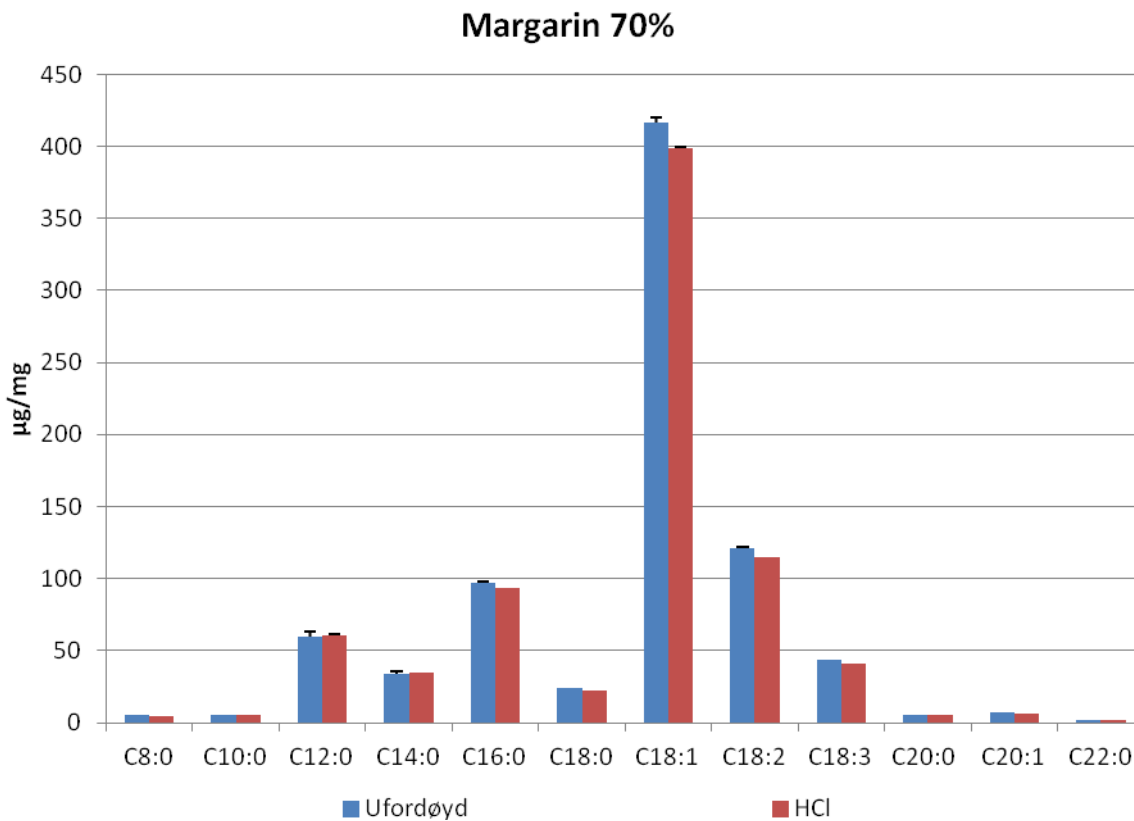
Figur 4.5. Sammensetningen av TAG i smør i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.



Figur 4.6. Sammensetningen av FFA i smør i henholdsvis ufordøyd, fordøyd med HGJ (60 min), fordøyd med HDJ (60 min) og fordøyd med HDJ (120 min). Mengden fettsyrer er oppgitt i µg/mg.

#### 4.5 Kontroll av kjemisk hydrolyse med HCl

Det kvantitative innholdet av fettsyrer i TAG fraksjonen i prøvene behandlet med HCl (pH 2 i 60 min) sammenliknet med kontrollprøven viste ingen markante forskjeller. Ett unntak kan være 18:1n-9 som synes å være litt lavere i prøven behandlet med HCl (Figur 4.7).

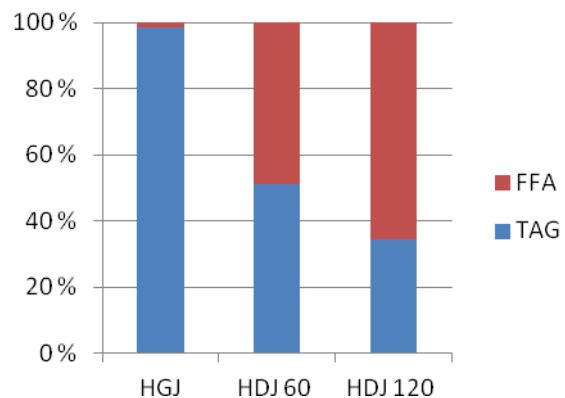


Figur 4.7. Fordeling av fettsyrer i margarin 70 % oppgitt i µg/mg etter henholdsvis kontroll (ufordøyd prøve) og prøve tilsatt HCl (pH 2) (60 min).

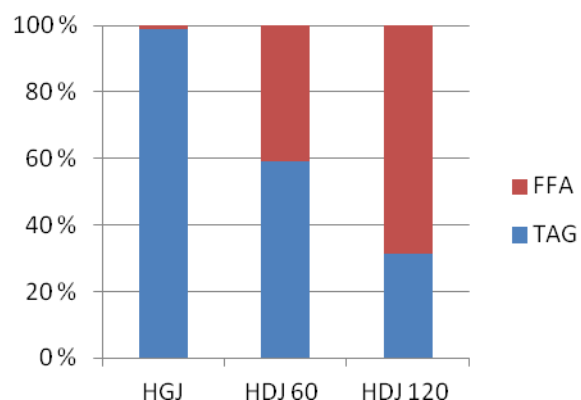
#### **4.6 Relativ mengde av TAG og FFA i produktene etter fordøyelse med HGJ i 60 min og HDJ i 60 og 120 min.**

Alle prøvene viste et svært lavt nivå av FFAs (henholdsvis 1, 2 og 1 %) og et tilsvarende høyt nivå av TAGs etter fordøyelse med HGJ (Figur 4.8; 4.9 og 4.10). Etter fordøyelse med HDJ 60 minutter var det et fall i mengden TAGs og en tilsvarende økning av FFAs (til henholdsvis 49, 41 og 44 %). Økningen av FFAs fra HDJ 60 min til HDJ 120 min var lavere og økte til henholdsvis 66, 59 og 55 %. Margarin 40 % hadde størst økning etter dette trinnet (fra 41, til 59 %).

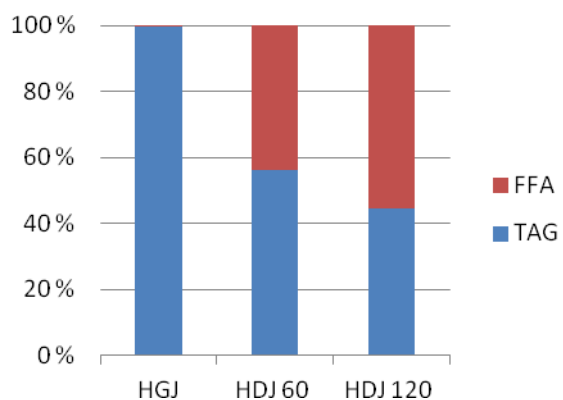
Figur 4.11 viser tilsvarende resultater som beskrevet ovenfor. Svært lite FFA er frigjort i trinnet fra ufordøyd til fordøyd prøve med HGJ. Margarin 70 % og smør hadde størst økning av FFAs under fordøyelse med HDJ i 60 min. Begge disse flatet ut etter HDJ 60 min, mens margarin 40 % fortsatte å øke etter 120 min og var det produktet med størst mengde FFAs ved slutten av fordøyelse etter 2 timer. Smør flatet mest ut i dette trinnet. Figuren viser en korresponderende trend for nedgang i TAGs.



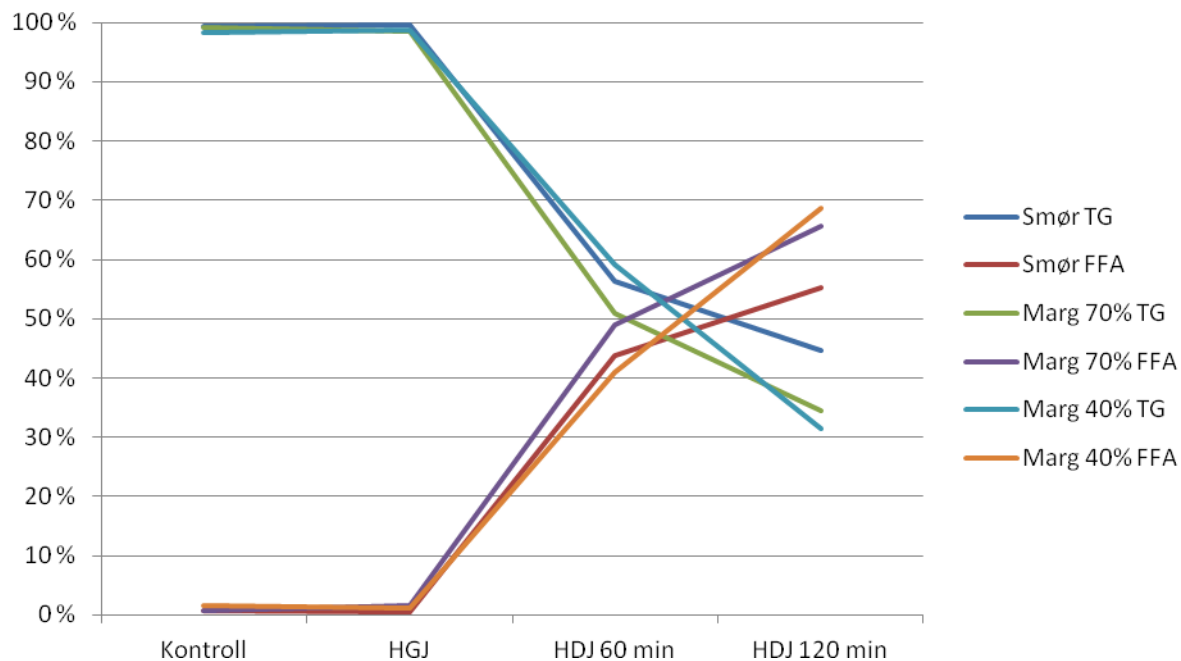
Figur 4.8. Relativ mengde (%) av FFA og TAG i margarin 70 % etter henholdsvis fordøyelse etter HGJ (60 min), fordøyelse etter HDJ (60 min) og fordøyelse etter HDJ (120 min).



Figur 4.9. Relativ mengde (%) av FFA og TAG i margarin 40 % etter henholdsvis fordøyelse etter HGJ (60 min), fordøyelse etter HDJ (60 min) og fordøyelse etter HDJ (120 min).



Figur 4.10. Relativ mengde (%) av FFA og TAG i Smør etter henholdsvis fordøyelse etter HGJ (60 min), fordøyelse etter HDJ (60 min) og fordøyelse etter HDJ (120 min).



Figur 4.11. Hydrolyse av TAG og dannelsen av FFA av totallipid i de ulike prøvene etter fordøyelse med HGJ (60 min), HDJ (60 min) og HDJ (120 min).

## 5. Diskusjon

Innledningsvis ble fettinnholdet i de 3 kommersielle produktene bestemt for å kunne benytte samme mengde fett i alle hydrolyseforsøkene. Fettinnholdet funnet i prøvene stemte godt overens med det som er oppgitt i varedeklarasjonen for de enkelte produktene; 82 % fett i smør og 70 og 40 % i henholdsvis margarin 70 % og margarin 40 % (lettmargarin). Ved utregningen av fettinnholdet ble først vannprosenten beregnet og oppgitt karbohydrat og proteininnhold trukket fra. I margarinene var disse deklart å være mindre enn 0,5 %. I utregningene ble imidlertid 0,5 % trukket fra. Produktene inneholdt også 1,2 -1,5 % NaCl. Dette ble det ikke tatt hensyn til, slik at det beregnede fettinnholdet kan være litt for høyt. Margarin 40 % inneholder også 0,5 % kostfiber som heller ikke ble fratrukket. Det kan derfor være at fettinnholdet er beregnet å være litt for høyt, men forskjellene er allikevel så små at det neppe vil ha noen betydning for hydrolyseforsøkene.

Margarin 70 og 40 % hadde mindre fasthet ved lave temperaturer (10-30°C) enn smør. Dette skyldes et høyere innhold av umettede fettsyrer i de førstnevnte produktene. Smeltepunktet til fett avgjøres først og fremst av lengden på fettsyremolekylene og av graden av umettethet. Den gasskromatografiske analysen av prøvene viste at alle produktene inneholdt mye av de mellomlange fettsyrene (C12 – C18). I margarinene er de fleste av disse fettsyrene umettet, og den lave fastheten avgjøres antagelig av fettsyrene 18:1n-9, 18:2n-6 og 18:3n-3 i disse produktene. Smør inneholdt mest mettede fettsyrer som bidrar til fastheten i produktet. Siden både smøret og margarinene i dette forsøket var flytende ved 35°C kan det antas at alle produktene har tilsvarende fasthet i magesekken der temperaturen er 37°C. Dermed kan man anta at den ulike grad av fasthet ved lavere temperaturer ikke betyr noe for fordøyelsen. Teksturanalysene viste at margarin 70 % hadde større fasthet enn margarin 40 %. Denne variasjonen kan skyldes at fettinnholdet er høyere og vanninnholdet lavere i margarin 70 %. I et framtidig arbeid kunne det vært interessant å undersøke de reologiske egenskapene til fordøyde produkter. For eksempel kunne man analysert forskjeller i viskositet ved 37°C etter de ulike fordøyelsestrinnene.

For å undersøke fettsyresammensetningen i produktene ble TAGs analysert i de ufordøyde prøvene. Fettet i ufordøyd smør og margarin 40 og 70 % inneholder ca 98 % TAGs (Fox *et al.* 1998) og følgelig bør fettsyresammensetningen i TAGs være ganske representativ for fettsyresammensetningen i de kommersielle produktene som helhet. Analysene viste et høyt

innhold av 18:1n-9 i begge margarinprøvene. I varedeklarasjonen er innholdet av raps oppgitt til 48 % i margarin 70 % og 28 % i margarin 40 %. Det er kjent at rapsolje inneholder cirka 60 % av fettsyren 18:1n-9. Det må tas høyde for variasjoner i fettsyresammensetningen i rapsoljer som er produsert i forskjellige land og som er produsert under ulike betingelser (Gunstone 1996). Men de mengdene 18:1n-9 som er funnet i produktene stemmer rimelig godt overens med mengden rapsolje i margarinproduktene. Det samme gjelder innholdet av 18:2n-6 og 18:3n-3. I margarinene er forholdet mellom disse fettsyrene cirka 2 til 2,5, tilsvarende det man finner i rapsolje med lavt innhold av erukasyre (22:1n-9), den rapsoljevarianten som man i dag bruker til mat (Gunstone 1996, Pedersen *et al.* 2010). De absolutte mengdene av 18:2n-6 og 18:3n-3 i margarinene stemmer overens med at cirka 2/3 av fettene er rapsolje. For at margarinproduktene ikke skal være flytende ved romtemperatur må produktene også inneholde fett med høyt smeltepunkt. I varedeklarasjonen til margarinene er det øvrige fettinnholdet oppgitt som udefinert vegetabilsk fett. I margarin 70 % utgjør mengden vegetabilsk fett 22 % og i margarin 40 % utgjør den 12 %. Mengde fettsyre 16:0 ble funnet å være forholdsvis høyt (ca 11 %) i begge prøvene. Palmeolje inneholder ca 42 % 16:0, og det kan antas at mesteparten av 16:0 kommer fra dette fettene. Det er også registrert funn av fettsyren 12:0 som kun finnes i store mengder i kokosfett og palmefrøolje (Gunstone 1996). Ut i fra disse observasjonene kan det antas at det vegetabilske fettene i margarinprøvene er en blanding av palme- og kokosfett, eventuelt palmefrøolje (fett). I smør var fettsyresammensetningen som forventet. Smør inneholdt mer av de mettede fettsyrene med palmitinsyre (16:0) som den dominerende fettsyren. Smørprøvene inneholdt også en god del av de korte fettsyrene smørsyre (4:0) og kapronsyre (6:0), og det høye innholdet av disse stammer fra den mikrobielle fordøyelsen i vomma hos drøvtyggere. I smør ble det påvist 0,55 % transfettsyre som også stammer fra den mikrobielle fordøyelsen i vomma.

I fordøyelsesforsøkene viste resultatene fra gastrisk fase svært lite hydrolyse av fett. Nedbrytning av lipider før tarm er et omdiskutert tema, og det kan virke som om dette emnet ikke er fullstendig klarlagt. Ulik litteratur oppgir forskjellige teorier. Saladin *et al.* (2007) rapporterer at gastrisk lipase kun skilles ut i magen hos spedbarn (og hos syke mennesker med nedsatt galleproduksjon) og at all gastrisk hydrolyse skjer ved hjelp av lingual lipase som er tilført magesekken gjennom spyttet. Brody (1994) på den andre siden rapporterer at lingual lipase ikke finnes hos mennesker og at all lipolyse i magen skjer ved hjelp av gastrisk lipase. Hydrolyse av TAGs i magen blir av flere påstått å være lav, men oppgis å ligge på alt fra 5 - 40 % (Armand



2007). Den viktigste rollen til gastrisk lipase er antakelig at den starter hydrolysen av fett, noe som igjen øker hydrolysen katalysert av lipaser skilt ut fra pankreas; gallsalt aktivert lipase (pankreatisk karboksylester lipase) og pankreatisk colipase-avhengig lipase (1,3-spesifikk pankreatisk lipase) (Bernbäck *et al.* 1989; Bernbäck *et al.* 1990).

Resultatene fra analysene etter gastrisk hydrolyse indikerte at frigjøringen av FFA var 1, 2 og 1 % for henholdsvis margarin 70 %, margarin 40 % og smør. Dette er lavere enn forventet (Armand 2007). For noen av fettsyrene i TAG fraksjonene i smør og margarinprøvene etter magehydrolyse er det en tilsynelatende økning mens for andre er det en nedgang. Dette gav seg ulikt utslag i de tre prøvene. I smørprøven økte TAG for de korte fettsyrene, til og med C14, mens i margarin 40 % var det en svak økning for alle fettsyrene. I margarin 70 % var det kun C16 som økte mens resten hadde nedgang som forventet. Det er usikkert om dette betyr at det er en reell nedgang i TAG mengde eller om det er innenfor måleusikkerheten. De tilsynelatende forskjellene kan muligvis forklares med at det under prøveoppbeidelsen var vanskelig å oppnå homogene løsninger. Særlig gjaldt dette trinnene før tilsetning av HDJ som inneholder emulgerende gallsalter. På grunn av høye standardavvik ble det utført et gjentak av de ufordøyde kontrollprøvene der prøvene ble ekstrahert direkte i prøveglasset med Folchs metode. Magehydrolyse bør sannsynligvis repeteres på samme måte og i tillegg utføres under ulike høyere pH verdier. I forsøkene ble den gastriske hydrolysen gjennomført ved pH 2 og i ettertid kan man stille spørsmål om denne surhetsgraden er for lav. Forskjellige kilder oppgir ulike verdier av pH optimum for lipasene. I Carrier *et al.* (1993) oppgis det at den gastriske lipasen er stabil mellom pH 3 og 7 og har optimal aktivitet mellom pH 4 og 5. Bernbäck (1989) bruker pH 6 for å studere nedbrytning av TAG fra melk med gastrisk lipase, mens Armand *et al.* (1999) benyttet pH 5,40 ved gastrisk fase i deres studier av hydrolyse av emulsjoner i humant magetarmsystem. Magesaften som ble brukt i dette prosjektet er hentet fra fastende personer, og pH i magesaften ble målt til ca 2. Ved inntak av et måltid vil matens bufferkapasitet antakelig være stor, slik at reell pH under gastrisk fase sannsynligvis er høyere. Som et videre arbeid hadde det vært interessant å undersøke dannelsen av frie fettsyrer i gastrisk fordøyelse ved forskjellig pH. Lipaseaktiviteten i magesaften ble ikke analysert, men aktivitet av lipase i HGJ er tidligere påvist (Ellen Ulleberg, personlig meddelelse). Dette betyr at gastrisk lipase er stabil ved pH 2, men aktiviteten ved denne pH er antakelig svært lav, noe som vi finner ved måling av mengden frie fettsyrer etter magesekhydrolyse.

For å undersøke om hydrolysen i magetrinnet kunne være forårsaket av det sure miljøet i magen ble margarin 70 % tilsatt kun HCl (pH 2). Frigjøringen av fettsyrer fra TAG var liten. Siden denne forandringen også var liten ved den gastriske hydrolysen er det vanskelig å trekke noen konklusjoner om bidraget kom fra gastrisk lipase eller fra syrehydrolyse.

Etter fordøyelse med HDJ i 60 min ble innholdet av TAGs målt ved å bestemme mengdene av de ulike fettsyrene redusert til omtrent det halve i alle 3 produktene. FFA fraksjonen viste tilsvarende økning i dette trinnet. Det relative innholdet av FFAs i dette trinnet var størst i margarin 70 % med 49 % mot 41 og 44 % i henholdsvis margarin 40 % og smør. Innholdet av TAGs etter fordøyelse med HDJ fra 60 til 120 min ble ikke like mye redusert som etter HDJ hydrolyse i 60 min. Lavest var nedgangen i smørprøven. Denne trenden var noenlunde lik for alle fettsyrene. En mulig årsak til at hydrolysen avtar etter 60 min kan være at fordøyelsesmodellen som ble brukt i dette prosjektet er et lukket system der ingen av fordøyelsesproduktene (FFA og MAGs og eventuelt glycerol) blir fjernet. Dette fører til at det oppstår en likevekt mellom substratene (TAGs) og fordøyelsesproduktene, og nedbrytningen fullføres ikke, såkalt produktinhibering. Det ville vært interessant å undersøke i et videre arbeid hvordan fjerning av hydrolyseproduktene ville påvirke hydrolysen. Man kunne for eksempel prøve å felle ut FFA med NaOH eller KOH, og på denne måten øke nedbrytningen av TAG. Alternativt kunne man forsøke dialyse for å separere FFA fra TAGs. I utgangspunktet kan man tro at forskjellen i molekylvekt mellom TAG og FFA er så liten at det kan være vanskelig å finne en dialysemembran som kan separere disse. TAGs foreligger imidlertid i høymolekylære miceller, og frigjorte fettsyrer vil antakelig derfor kunne separeres. Dannelsen av frie fettsyrer under hydrolysen vil redusere pH noe, og dersom FFA ikke fjernes kan det kanskje føre til redusert lipaseaktivitet, dvs redusert hydrolyse fra 60 min til 120 min.

I FFA fraksjonen var det derimot en ganske stor økning i mengden av fettsyrer fra 60 min HDJ til 120 min hydrolyse med HDJ uten at man så tilsvarende nedgang i TAGs. Eksempler er 16:0, 18:1n-9, 18:2n-6 og 18:3n-3 i margarin 70 % og for 16:0 og 18:0n-9 i smør. En nærliggende forklaring til denne tilsynelatende motsetningen ville være at økningen i fettsyrene i FFA fraksjonen fra 60 til 120 min kommer fra de polare DAG og MAG fettklassene og ikke fra TAG. Men i vårt elueringsystem skal DAG og MAG klassene bli eluert i den nøytrale lipidfraksjonen, og derfor kan ikke dette være årsaken. Alternativt kan noen FFAs komme fra andre forsåpbare forbindelser som for eksempel fosfolipider. Dette kan kanskje undersøkes ved å analysere

fettklassesammensetning ved hjelp av tynnskjikt-kromatografi (TLC) eller HPLC. Det vil også være mulig å eluere DAG og MAG i egne fraksjoner i et SPE system.

Analysene av FFA fraksjonene tydet på at det er C16 og C18 fettsyrer som økte mest, mens C12 og C14 hadde mindre økning fra 60 til 120 min duodenalhydrolyse. En kan bare spekulere i årsakene til eventuell ulik hastighet på frigjøringen av ulike fettsyrer i TAGs. En nærliggende tanke er å relatere til posisjonering av de ulike fettsyrene i triacylglycerolmolekylene. Det er kjent fra litteraturen at ikke alle fettsyrer i rapsolje er likt fordelt i de 3 posisjonene (Weber *et al.* 2003). I rapsolje er 16:0 hovedsakelig i *sn*-1 og *sn*-3 posisjon, mens fettsyra som det finnes mest av, 18:1n-9, finnes nesten like mye i *sn*-2 som i *sn*-1 og *sn*-3. De flerumettede fettsyrene 18:2n-6 og 18:3n-3 er det betydelig mer av i *sn*-2 enn i *sn*-1 og *sn*-3. Fordøyelsen i tynntarmen vil være avhengig av spesifisiteten til enzymene. Pankreatisk colipase-avhengig lipase (1,3-spesifikk pankreatisk lipase) i duodenalsafta hydrolyserer som navnet sier bare fettsyrer i *sn*-1 og *sn*-3. Fettsyra i *sn*-2 posisjon vil i hovedsak bli absorbert som 2-monoacylglycerol av tarmcellene. Det er mulig at gastrisk lipase kan fortsette å virke når enzymet kommer over i tarmen, og resultatet kan bli hydrolyse av fettsyra i MAG. Enzymet benevnt pankreatisk karboksylester lipase vil kanskje også bidra til at noe av MAG blir hydrolysert, men alt dette gjenstår å bli undersøkt.

Basert på forsøkene som er gjort i dette prosjektet kan man si lite om forskjellene mellom de ulike produktene. Flere av resultatene viste stor analyseusikkerhet. I framtidige forsøk bør mengden tilsatt lipid til SPE-kolonnen være lavere enn 70 mg som ble brukt i dette prosjektet. Leverandøren av kolonnene anbefaler at det settes på 1-2 % av mengden kolonnemateriale. Kolonnene som ble brukt til dette prosjektet hadde 500 mg kolonnemateriale og dermed en kapasitet på 5-10 mg lipider.

Resultatene i denne oppgaven har imidlertid vist at bruk av humane fordøyelsesenzymmer i et *in vitro* modellsystem kan gi mer detaljert informasjon om hvordan fordøyelsen av fett i mat skjer. Det er klart at det gjenstår mye med hensyn på optimalisering av betingelsene, bearbeiding av prøvene og ekstraksjon av lipidene i modellsystemet. Det første man kanskje kunne ta fatt i er å undersøke fordøyelsen i magesekken mer detaljert og jobbet videre for å optimalisere prøveopparbeidelsen. Deretter kunne det vært interessant å fokusere på for eksempel frigjøringen av fettsyrene 18:2n-6 og 18:3n-3. I et slikt forsøk ville det kanskje vært en fordel å kjøre den samme hydrolysen flere ganger i ett og samme produkt.

## 6. Referanser

- Abrams C. K., Hamosh M., Lee T. C., Ansher A. F., Collen M. J., Benjamin S. B., Hamosh P. (1988). Gastric lipase – Localization in the human stomach. *Gastroenterology*, **95**, 1460-1464
- Ackman R. G. (1988) Some possible effects on lipid biochemistry of differences in the distribution on glycerol of long-chain n-3 fatty acids in the fats of marine Fish and marine mammals. *Atherosclerosis*, **70**, 171-173
- Armand M. (2007) Lipases and lipolysis in the human digestive tract: Where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **10**, 156-164
- Armand M., Pasquier B., André M., Borel P., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Portugal H., Jaussan V., Lairon D. (1999) Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 1096-1106
- Bernbäck S., Bläckberg L., Hernell O. (1989) Fatty acids generated by gastric lipase promote human milk triacylglycerol digestion by pancreatic colipase-dependent lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1001**, 286-293
- Bernbäck S., Bläckberg L., Hernell O. (1990) The Complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *Journal of Clinical Investigation*, **85**, 1221-1226
- Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917
- Borel P., Armand M., Senft M., Andre M., Lafont H., Lariron D. (1991) Gastric lipase – Evidence of an adaptive response to dietary fat in the rabbit. *Gastroenterology*, **100**, 1582-1589
- Brody T. (1994) Nutritional Biochemistry. Academic Press Inc. pp.73-84
- Calder P.C. (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twist in an old tale. *Biochemie*, **91**, 791-795
- Carriere F., Laugier R., Barrowman J.A., Douchet I., Priymenko N., Verger R. (1993) Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **28**, 443-454
- Ebringer L., Ferencik M., Krajcovic J. (2008) Beneficial health effects of milk and fermented dairy products - Review. *Folia Microbiology*, **53**, 378-394
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509
- Fox, P. F., McSweeney, P.L.H. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional, London
- Frankel, E.N. (2005) Lipid oxidation. 2<sup>utg.</sup>, The Oily Press, Dundee

Greibrokk, T., Lundanes E., Rasmussen K.E. (1994) Kromatografi, separasjon og deteksjon. 3 utgave Universitetsforlaget, side 109-152, 275-278.

Gunstone F.D. (1996) Fatty Acid and Lipid Chemistry. Blackie Academic & Professional, London, pp. 66-69

Hauge J.G., Aakvag R.K., Christensen T.B. (2001) Biokjemi. 4. utg. Universitetsforlaget

Hedelin M., Chang E.T., Wiklund F., Bellocco R., Klingt Å., Adolfsson J., Shahedi K., Xu J., Adami H-O., Grönberg H., Augustsson Bälter K. (2007) Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism. *International Journal of Cancer*, **120**, 398-405

Hibbeln J.R., Nieminen L.R.G., Blasbalg T.L., Riggs J.A., Lands W.E.M. (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: Estimations considering worldwide diversity. *American Journal of Clinical Nutrition*, **83**, 1483S-1493S

Holm H., Hansen L.E., Krogdahl A., Florholmen, J. (1988) High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently - *in vivo* comparison with bovine serum Albumin. *Journal of Nutrition*, **118**, 521-525

Hur S.J., Lim B.O., Decker E.A., McClements D.J. (2011) *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125**, 1-12

Jones A.T., Balan K.K., Jenkins S.A., Sutton R., Critchley M., Roberts, N.B. (1993) Assay of gastricsin and individual pepsins in human gastric juice. *Journal of Clinical Pathology*, **46**, 254-8.

Lipidmaps. (2012) LIPID Metabolites And Pathways Strategy. (Internett) [http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM\\_classification\\_w.php?category=1](http://www.lipidmaps.org/data/classification/LM_classification_w.php?category=1) Hentet: 07.05.12

Lowe M. E. (2002) The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, **43**, 2007-2016

Lunn J., Theobald H.E. (2006) The health effects of dietary unsaturated fatty acids *Nutrition Bulletin*, **31**, 178-224

Martin B., Fedele V., Ferlay A., Grolier P., Rock, E., Gruffat D., Chilliard, Y. (2004) Effects of grass-based diets on the content of micronutrient and fatty acids in bovine and caprine dairy products. *Grassland Science in Europe*, **9**, 876-886

McClements, D.J., Decker E.A. (2000) Lipid oxidation in oil-in water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food Systems. *Journal of Food Science*, **65**, 1270-1282

McClements D.J., Decker E.A., Park Y., Weiss J. (2008) Designing food Structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components. *Food Biophysics*, **3**, 219-228

McClements D.J., Decker E.A. (2008) Lipids, I Fennema`s Food Chemistry, 4. utg. (Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R., redaktører), CRC Press Taylor & Francis Group. Kap. 4, side 155-216

- McClements D.J., Li Y. (2010) Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, **1**, 32-59.
- Meunier V., Bourrie M., Berger Y., Fabre G. (1995) The human intestinal epithelial-cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, **11**, 187-94.
- Mouécoucou J., Villaume C., Sanches C., Méjean L. (2004)  $\beta$ -Lactoglobulin/polysaccharide interactions during *in vitro* gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1670**, 105-112
- Mu H., Høy C-E. (2004) The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, **43**, 105-133
- Nabil S., Gauthier S.F., Drouin R., Poubelle P.E., Pouliot Y. (2011) In vitro digestion of proteins and growth factors in a bovine whey protein extract as determined using a computer-controlled dynamic gastrointestinal system (TIM-1). *Food Digestion*, **2**, 13-22
- Nasjonalt råd for ernæring (2011) Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer. Metodologi og vitenskaplig kunnskapsgrunnlag. *Helsedirektoratet* <http://helsedirektoratet.no/publikasjoner/kostrad-for-a-fremme-folkehelsen-og-forebygge-kroniske-sykdommer/Sider/default.aspx> Hentet: 18.09.12
- Nilsson J., Bläckberg L., Carlsson P., Enerbäck S., Hernell O., Bjursell G. (1990) cDNA cloning of human-milk bile-salt-stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, **192**, 543-550
- Olsen R.L. (2007) Lipidkjemi med vekt på fisk. Kompendium, 3.utg., Universitetet i Tromsø
- Pedersen, J.I., Hjartåker A., Andersen S.A. (2010) Grunnleggende Ernæring. 1. utg. Gyldendal Akademiske
- Psota T.L., Gebauer S.K., Kris-Etherton P. (2006) Dietary omega-3 fatty acids intake and cardiovascular risk. *The American Journal of Cardiology*, **98**, 3i-18i
- Ruiz J., Antequera T., Andres A.I., Petron M.J., Muriel E. (2004) Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*. **520**, 201-205
- Russell J.M., Werne J.P. (2007) The use of solid phase extraction columns in fatty acid purification. *Organic Geochemistry*, **38**, 48-51
- Saladin K.S. (2007) Anatomy and Physiology, 4<sup>th</sup> edit. *The unity of form and function*. McGraw-Hill Companies, New York, pp. 973-1004
- Salter J., Chaplin M., Dickerson J., Davies J. (1996) Bile acids and health: Is fibre the answer? *Nutrition & Food Science*, **96**, 29-33
- Sand O., Sjaastad Ø.V., Haug E. (2010) Menneskets fysiologi. 1.utg. 6.oppl. *Gyldendal Norsk forlag*.
- Savoie L., Gauthier S.F. (1986) Dialysis Cell for the *in vitro* measurement of protein digestibility. *Journal of Food Science*, **51**, 494-498.

Söderlind E., Karlsson E., Carlsson A., Kong R., Lenz A., Lindborg S., Sheng J.J. (2010) Simulating fasted human intestinal fluids: Understanding the roles of lecithin and bile acids. *Molecular Pharmaceutics*, **7**, 1498-1507.

Thøgersen A. K. (2008) Method development for qualitative and quantitative analysis of fatty acid methyl esters with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Universitetet for miljø og biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Ås

Ulleberg E.K., Comi I., Holm H., Herud E.B., Jacobsen M., Vegarud G. E. ( 2011) Human gastrointestinal juices intended for use in *in vitro* digestion models. *Food Digestion*, **2**, 52-61

Weber N., Klein E., Mukherjee K.D., (2003) Stereospecific incorporation of palmitoyl, oleoyl and linoleoyl moieties into adipose tissue triacylglycerols of rats results in constant *sn*-1:*sn*-2:*sn*-3 in rats fed rapeseed, olive, conventional or high oleic sunflower oils, but not in those fed coriander oil. *Journal of Nutrition*, **133**, 435-441

Weaver B.J., Piche L.A., Ackman R.G., Holub B.J. (1989) The effect of positional Placement of EPA in Ingested Triglyceride on EPA Accumulation in human Platelet and Plasma Phospholipids, in Health Effects of Fish and Fish Oils. (Chandra R.K., ed) pp. 581-590. *ARTS Biomedical Publishers & Distributors, St. Johns, Newfoundland.*

Wickham M., Faulks R., Mills C. (2009) *In vitro* digestion methods for assembling the effect of food structure on allergen *breakdown*. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 952-958.

Willett W.C. (2012) Dietary fats and coronary heart diseases. *Journal of Internal Medicine*, **272**, 13-24

Willett W.C., Stampfer M.J., Manson J.E., Colditz G.A., Speizer F.E., Rosner B.A., Sampson L.A., Hennekens C.H.(1993) Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, **341**, 581-35