



Forord

Denne oppgaven er en del av et toårig masterstudie i matvitenskap ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet ble påbegynt i august 2014 og avsluttet i mai 2015. Masteroppgaven ble gjort i samarbeid med Nofima AS avd. Ås, hvor alt praktisk laboratoriearbeid ble utført.

Jeg vil først og fremst takke mine to veiledere på Nofima, seniorforskerne Grethe Iren Borge og Bente Kirkhus for mye god veiledning og hjelp gjennom hele året. Jeg er veldig takknemlig for deres engasjement og tiden dere har satt av til min oppgave.

En spesiell takk rettes til laboratorieingeniør Silje Johansen for opplæring og hjelp med laboratoriearbeid. Takk til laboratorieleder Hanne Zobel og senioringeniørene Frank Lundby og Elin-Merete W. Nicolaisen for god hjelp og godt selskap på laboratoriet.

Takk til professor Gerd Vegarud som stilte opp som hovedveileder på NMBU.

Til slutt vil jeg gi en stor takk til alle medstudenter og nye venner på Nofima for et lærerikt og minneverdig år.

Ås, mai 2015

Karoline Kjølbø Rød

Sammendrag

Tomater er den grønnsaken som det ble solgt mest av i Norge i 2013, og utgjør en viktig del av det norske kostholdet. Helseeffekten av tomater er vist i en rekke studier, og skyldes at den populære grønnsaken er en god kilde til fiber, protein og mikronæringsstoffer. Det er også vist at ulike typer prosessering kan gi økte helsegevinster ved å endre tilgjengeligheten av næringsstoffer og plantestoffer i tomatene.

I denne masteroppgaven har det blitt undersøkt tilgjengelighet av karotenoider i høytrykkshomogeniserte (HPH) tomatemulsjoner med 10 % vegetabilsk olje, laget av tre ulike sorter fersk eller fryst tomat. *In vitro* fordøyelse av ren rapsolje ble sammenlignet med *in vitro* fordøyelse av tomatemulsjoner, for å finne ut om tomatemulsjonene påvirket fettfordøyelsen, og om den eventuelle påvirkningen varierte avhengig av råvare og HPH trykk. Til sammenligning ble det i tillegg gjort en fordøyelse av grønnkålemulsjoner. Emulsjonskvalitet ble målt for å finne hvordan HPH, de ulike tomatsortene og bruken av fersk eller fryst råvare påvirket viskositet og partikkelstørrelse, og om dette videre hadde en sammenheng med karotenoidtilgjengelighet og fettfordøyelse.

Resultatene viste at økt homogeniseringstrykk ga reduksjon i emulsjonens partikkelstørrelse og økt viskositet i grønnsaksemulsjonene. Emulsjoner laget av ulike sorter tomat viste variasjon i viskositet, pektininnhold, og tilgjengelighet av karotenoider. Bruken av ferske eller fryste tomater som råvare utgjør liten effekt på emulsjonene, men ga noe endring i emulsjonenes viskositet. Det ble vist at tomater og grønnkål hadde lipasehemmende egenskaper, men i varierende grad avhengig av sort og prosessering.

Abstract

In 2013, tomatoes were the most purchased vegetable in Norway and constitute an important part of the Norwegian diet. Health effects of tomatoes are shown in numerous studies, mostly due to the fact that the popular vegetable is a good source of fiber, protein and micronutrients. It is also shown that different kinds of processing can enhance the health benefits of tomatoes, by altering the bioaccessibility of nutrients and phytochemicals.

In this study, the bioaccessibility of carotenoids in high pressure homogenized (HPH) tomato emulsions with 10% vegetable oil made from three different sorts of fresh or frozen tomatoes have been examined. *In vitro* digestion of pure rapeseed oil was compared with *in vitro* digestion of the rapeseed oil in tomato emulsions, in order to find whether the tomatoes affected the fat digestion and in that case, whether the usage of different HPH pressures and types of tomatoes made an influence. In comparison, kale emulsions were also digested. Emulsion quality was measured to find how the HPH, the different types of tomatoes and the usage of fresh or frozen tomatoes affected viscosity and particle size, and if this was further connected to accessibility of carotenoids and fat digestion.

Results revealed that increased homogenization pressure gave a reduction in the emulsion particle size and an increase in viscosity. Emulsions made from different varieties of tomatoes displayed variation in viscosity, fiber concentration and availability of carotenoids. The use of fresh or frozen tomatoes as raw material posed little effect on the emulsions, but exhibited some effect on the viscosity of the emulsions. It was shown that tomatoes and kale worked as lipase inhibitors, but to varying degrees depending on the type of tomato and the processing.

Innhold

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
1. Introduksjon	5
1.1. Tomaten og dens innholdsstoffer	6
1.2. Prosessering av tomat	9
1.3. Fettfordøyelse	12
1.4. Analysemetodikk	15
2. Formål med masteroppgaven	19
3. Materialer og metoder	20
3.1. Forsøksplan.....	20
3.2. Opparbeidelse av tomatemulsjoner.....	22
3.3. Analyse av totalt pektininnhold	24
3.4. Kvalitative analyser (viskositet og partikkelstørrelse).....	24
3.5. <i>In vitro</i> fettfordøyelse.....	24
3.6. Analyse av karotenoider.....	27
3.7. Statistikk	29
4. Resultater	30
4.1. Totalt pektininnhold i høytrykkshomogeniserte tomatemulsjoner – forsøk 1	30
4.2. Viskositet i grønnsaksemulsjoner.....	32
4.3. Partikkelstørrelse i grønnsaksemulsjoner	35
4.4. <i>In vitro</i> fordøyelse av grønnsaksemulsjoner og effekter på lipaseaktivitet	41
4.5. Innhold av lykopen og β -karoten i tomatemulsjoner og emulsjonens fettfase.....	46
4.6. Korrelasjon mellom ulike responsvariabler.....	53
5. Diskusjon	57
5.1. <i>In vitro</i> fettfordøyelse.....	57
5.2. Karotenoider.....	59
5.3. Analysemetodikk	61
6. Konklusjon.....	64
7. Referanser	65

1. Introduksjon

Dagens forståelse av god ernæring bygger på viktigheten av et balansert og sunt kosthold, med høyt inntak av grønnsaker, fiber og umettede fettsyrer. Store deler av verdens befolkning lider av feilernæring som resultat av underskudd på vitaminer og essensielle fettsyrer (Panagiotou and Fisher, 2013). For at næringsstoffer skal ha effekt i kroppen må de gjøres tilgjengelige for opptak i tarmen. På engelsk brukes det to ulike begrep for biotilgjengelighet, mens det i Norge ikke alltid gjøres forskjell på de to. I denne oppgaven vil evnen til opptak av et gitt stoff over tarmepitelet refereres til som biotilgjengelighet, og være ekvivalent med begrepet *bioavailability* på engelsk. Tilgjengelighet tilsvarer uttrykket *bioaccessibility* på engelsk og viser til mengden karotenoider som frigis fra grønnsaksmatriks og er tilgjengelig for opptak i tarmen (Colle et al., 2010). I de siste årene har det blitt satt mer fokus på tilgjengelighet, og hvordan prosessering av matvarer og komposisjon av måltider påvirker opptaket av næringsstoffer fra matens matriks. Ulike matkomponenter virker inn på hverandre, og kan bidra til forsterket eller hemmende grad av næringsopptak over tarmepitelet (Aarak et al., 2013b). Blant annet er det vist at mengden fiber i et måltid kan virke inn på fordøyelse og opptak av makro- og mikronæringsstoffer, samt gi lengre oppholdstid for mat i fordøyelsessystemet (Riedl et al., 1999, Lemmens et al., 2009, Hoffmann et al., 1999). Høyt inntak av grønnsaker er assosiert med helsebringende effekter, men de underliggende mekanismene er fortsatt ikke helt klarlagt. Grønnsaker er generelt rike på fiber, vann og vitaminer. Dette gir en lav energitetthet og mye næring i form av mikronæringsstoffer, mens fiber bidrar til å fremme metthetsfølelse. Det er også vist at grønnsaker inneholder enkelte komponenter som kan virke inn på pankreatisk lipase, og dermed bremse fettfordøyelsen. Norge har et økende inntak av frukt og grønnsaker, der hver innbygger har et gjennomsnittlig konsum på 139,5 kg frukt og grønt per år (Opplysningskontoret for frukt og grønt, 2014). I følge Helsedirektoratets kostråd anbefales et kosthold som er hovedsakelig plantebasert, for å redusere energitettheten i kostholdet og øke inntaket av helsefremmende næringsstoffer som antioksidanter, vitaminer og mineraler. Tomater er den grønnsaken som det ble solgt mest av i 2013, og utgjør en viktig del av det norske kostholdet (Helsedirektoratet, 2011, Opplysningskontoret for frukt og grønt, 2014).

1.1. Tomaten og dens innholdsstoffer

Tomaten ble tidligere ansett som giftig i den vestlige verden, men er i dag en av de viktigste grønnsakene i middelhavsdietten og har høyt konsum over hele verden (Viuda-Martos et al., 2014a). I følge Friedman (2013) ble det i 2013 produsert rundt 159 millioner tonn tomater globalt, hvorav 80 % inntas i form av prosesserte produkter som sauser, juice, konsentrater og pureer. Den positive helseeffekten av tomater er vist i en rekke studier, og skyldes at den populære grønnsaken er en god kilde til fiber, protein og mikronæringsstoffer. Den er spesielt rik på vitamin A og C, karotenoider og kalium (Shi, 2000).

I modningsprosessen forandres tomatene i retning av mørkere farge, søtere smak og mykere konsistens. De rigide celleveggene får en endret sammensetning som resultat av nedgang i mengden uløselige polysakkarider og økt mengde vannløselig pektin og enkle sukkerarter som gjør tomaten søtere (Jeremiah, 1995). Endringen i farge som skjer under modning skyldes at det grønne pigmentet klorofyll brytes ned og byttes ut med rødlige pigmenter som lykopen og β -karoten (Jeremiah, 1995). Akkumuleringen av karotenoider skjer som følge av at kloroplastene omdannes til kromoplaster og i denne prosessen vil membranstrukturer, slik som thylakoider, endres og blir sete for økt syntese av karotenoider (Gross, 1991).

1.1.1. Karotenoider

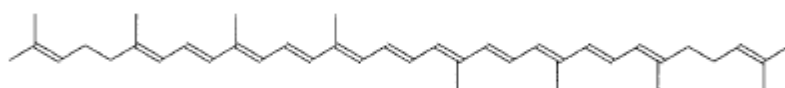
Karotenoider er en klasse naturlige pigmenter i spekteret rødt, oransje og gult, produsert av høyere planter og alger (Viuda-Martos et al., 2014a). Forskning viser at karotenoider er med på å redusere oksidativt stress, ved å nøytralisere ROS fra aerob metabolisme og ved å binde peroksyldradikaler (Shi, 2000, Pirayesh Islamian and Mehrali, 2015). Dette kan utgjøre en stor positiv helseeffekt, da oksidativt stress kan medføre alvorlige sykdommer som kreft og hjerte- og karsykdommer (Viuda-Martos et al., 2014a).

Karotenoider er lipider, og derfor løselig i fett og upolare løsemidler. Med unntak av de mest umettede karotenoidene, opptrer pigmentene i fast form ved romtemperatur. I intakte tomatceller sitter karotenoider på innsiden av membranen hos kromoplaster og kloroplaster, hvor de bidrar i fotosyntesen (Viuda-Martos et al., 2014a, Gross, 1991). Karotenoider absorberer for det meste lys i den blå regionen av lysspekteret (bølgelengde 430-470 nm), men noen av pigmentene er også i stand til å absorbere bølgelengder fra det blågrønne (470-500 nm) og det grønne spekteret (500-530 nm). Lyset som ikke absorberes

reflekteres, og gir farge til karotenoidene. Pigmenter som absorberer i blå bølgelengde forekommer gule, mens de som absorberer lys med større bølgelengde er mer oransje og røde (Gross, 1991).

Fordi karotenoider er bygget opp av et system av konjugerte dobbeltbindinger, kan de gjennomgå *cis-trans* isomerisering. Naturlig forekommer karotenoider i *all-trans* form som er den mest stabile isomeren, men det er også observert naturlige forekomster av *cis*-karotenoider i ubehandlet grønnsaksvev. Systemet av konjugerte dobbeltbindinger fører også til at pigmentene lett ødelegges av oksidativ degradering. Prosessen forsterkes av eksponering for høy temperatur, lys og lavt vanninnhold. De vanligste karotenoidene i tomat er lykopen og β -karoten (Gross, 1991).

Med sin mørkerøde farge er lykopen hovedkilden til fargepigment i tomater, og utgjør hele 80 til 90 % av det totale pigmentinnholdet. Normalt inneholder tomater 3 til 5 g lykopen per 100 g råvare, men disse verdiene varierer noe mellom ulike sorter og tomatenes modningsgrad når de høstes. Lykopen nøytraliserer singlet oksygen dobbelt så effektivt som β -karoten og er den av karotenoidene som har høyest antioksidantkapasitet (Cucu et al., 2012). Lykopen står for 50 % av karotenoidinnholdet i humant plasma, der størst konsentrasjon finnes i lever, vesicula seminalis og prostata (Anese et al., 2013). Da mennesker selv ikke er i stand til å produsere lykopen *de novo*, er plasmanivået av lykopen direkte avhengig av det ernæringsmessige inntaket av lykopenholdige matvarer (Colle et al., 2010). Forskning har vist at lykopen i kostholdet kan virke forebyggende på en rekke kroniske sykdommer som diabetes og osteoporose. Viktigst er likevel antioksidantens innvirkning på kreft og hjerte- og karsykdommer, og da spesielt prostatakreft (Viuda-Martos et al., 2014a). I motsetning til andre karotenoider har ikke lykopen provitamin A-egenskaper (Cucu et al., 2012). Figur 1 viser molekylstrukturen for lykopen.

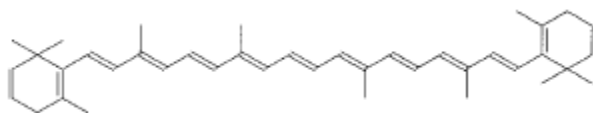


C₄₀H₅₆ Lykopen

Figur 1 - Molekylstruktur for lykopen (Shi, 2000).

Ferske tomater inneholder hovedsakelig den mest stabile isomeren; all-*trans* lykopen (Viuda-Martos et al., 2014a). Som hos andre karotenoider, er denne svært temperatur- og lyssensitiv når den frigis fra sitt opprinnelige miljø og matriks (Anese et al., 2013). Prosessering bidrar til spontan isomerisering og oksidering av all-*trans* lykopen til ulike *cis*-isomerer. *Cis*-isomerene er mer polare (Shi, 2000) og har trolig større løselighet i galle. Dette gjør at de tas lettere opp i miceller enn all-*trans* lykopen, og er mer biotilgjengelig. I tillegg oppnår lykopen sterkere antioksidantegenskaper ved isomerisering (Viuda-Martos et al., 2014b).

Etter lykopen er β -karoten den største kilden til karotenoider i tomat (Gross, 1991), og må på lik linje med lykopen tilføres gjennom kostholdet (Pedersen et al., 2012). En av de viktigste fysiologiske effektene karotenoider har er å fungere som provitamin A hos dyr og mennesker. *trans*-isomeren av β -karoten er det pigmentet med høyest provitamin A aktivitet, og også det som er mest utbredt ettersom de fleste grønnsaker inneholder β -karoten (Gross, 1991). Vitamin A er nødvendig for mange prosesser i kroppen, som vekst og bendannelse, reproduksjon og mørkesyn. β -karoten har også vist seg som en sterk antioksidant, og har trolig en forebyggende effekt på hjerte- og karsykdommer (Pedersen et al., 2012) og lungekreft (Kopsell et al., 2007). Figur 2 viser molekylstrukturen for β -karoten.



$C_{40}H_{56}$ β -karoten

Figur 2 -Molekylstruktur for β -karoten (Shi, 2000).

Analysen av lipofile karotenoider i tomat og tomatemulsjoner består av å ekstrahere ut karotenoidene fra plantematriks og over i en løsning før kvantitativ bestemmelse ved bruk av væskrokromatografi med UV-deteksjon (Bohoyo-Gil et al., 2012).

1.1.2. Pektin

Pektin er en gruppe naturlig forekommende vannløselig biopolymerer, som sammen med cellulose og hemicellulose utgjør hovedsubstansen i tomaters cellevegg (Lemmens et al., 2009, Jeremiah, 1995). Flere pektinkjeder går sammen og danner tredimensjonale strukturer, men disse er i motsetning til andre utilgjengelige karbohydrater ikke av fibrøs karakter (Kay and Truswell, 1977, Sriamornsak, 2003). Pektins evne til geldannelse gjør at det i næringsmiddelindustrien brukes som tilsetningsstoff i en rekke matvarer, som syltetøy og geleer (Willats et al., 2006). Pektin ansees som det mest komplekse polysakkaridet i planters cellevegg (Shpigelman et al., 2015), og er mer kjemisk reaktivt enn andre fibre (Shpigelman et al., 2014). Biopolymeren har en tendens til å endre struktur ved isolering og prosessering (Sriamornsak, 2003), og det er blant annet vist at HPH og pH påvirker oppbygningen av pektinnettverk (Shpigelman et al., 2015).

Pektins positive effekt på kolesterol og lipidinnhold i blodet har lenge vært kjent (Kay and Truswell, 1977), og et høyt innhold av fiber i kostholdet er generelt akseptert som helsefremmende. I tillegg er det vist at pektin kan virke reduserende på blodglukosen og ha forebyggende effekt på utvikling av kreft (Willats et al., 2006). En negativ virkning av pektin er at nettverket trolig fanger karotenoider i nettverket sitt, og har vist hemmende effekt på opptak av lykopen og β -karoten i tarmen (Riedl et al., 1999).

1.2. Prosessering av tomat

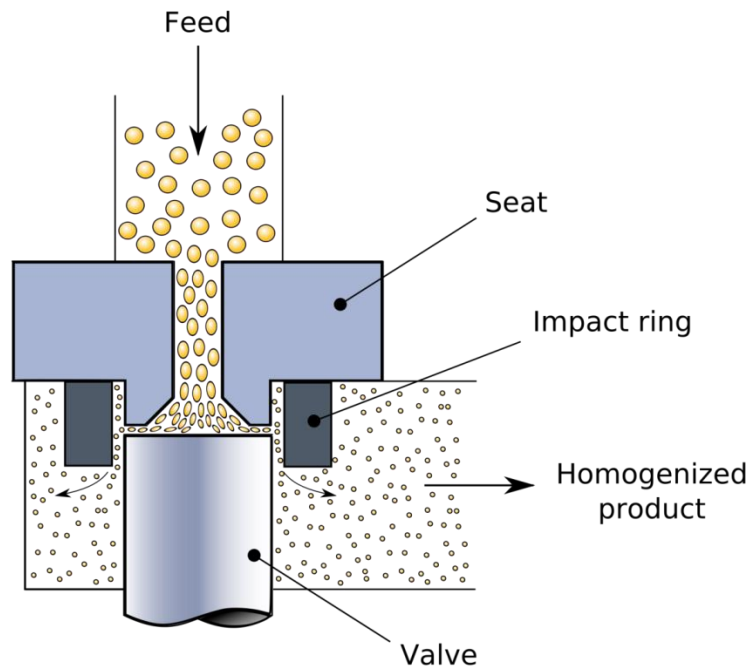
Tomatprodusenter ønsker av økonomiske årsaker å redusere antall innhøstinger, og unngå å transportert av overmodne tomater. Dette medfører at en del av tomatene som distribueres høstes før de er fullt modne og ferdig utvokst. Avbrutt modningsprosess påvirker kvaliteter som smak, konsistens og farge, men også innhold av viktige næringsstoffer (Janick and Paull, 2006). Prosessering og konservering av tomater gir en mulighet for å la tomatene oppnå en høyere modningsgrad før de distribueres, i tillegg til å forlenge holdbarhet. Det er vist i en rekke forsøk at prosessering av tomater øker biotilgjengelighet av utvalgte næringsstoffer i tomatene (Colle et al., 2010).

1.2.1. Temperaturbehandling

Frysing av ferske tomater er en lite utbredt metode da grønnsakens teksturegenskaper ofte gjennomgår store endringer, og gir tomatene en mykere konsistens (VanGarde and Woodburn, 1994). Vann ekspanderer i volum ved frysing, og trykket som skapes når dette skjer kan resultere i stress hos skjøre cellekomponenter og gi vedvarende skader som celleruptur (Mallett, 1993). Det er også tenkt at pektin påvirkes av fryseprosessen (VanGarde and Woodburn, 1994). De store kvalitetsendringene hos ferske tomater, gjør at det vanlig å varmebehandle tomatene før nedfrysning. Varmebehandling er den mest brukte metoden for konservering i matindustrien, og bidrar til pasteurisering og sterilisering av matvarer. Denaturering av aktive enzymer og destruksjon av endosporer er nødvendig for matsikkerhet og for å forlenge oppbevaringstid hos de fleste matvarer (Knockaert et al., 2012). Tekstur, smak og farge forandres ofte under prosesseringen, og gir endring i kvaliteten hos produktene (Knockaert et al., 2012), men også økt tilgjengelighet av helsebringende plantenæringsstoffer (Viuda-Martos et al., 2014a). Under varmebehandlingen denatureres enzymer, og cellevegger brytes ned som resultat av depolymerisering av pektin (Shi, 2000). Denne nedbrytningen gir frigivelse av karotenoider fra tomatmatriks og øker deres tilgjengelighet (Colle et al., 2013). Isomerisering som resultat av høye temperaturer gjør også at mer lykopen går over til den *cis*-isomeren som har høyere biotilgjengelighet (Shi, 2000).

1.2.2. Høytrykkshomogenisering (HPH)

I tillegg til varmebehandling er det vist at mekanisk prosessering bidrar til økt tilgjengelighet av karotenoider (Colle et al., 2013). Prosessering ved bruk av høye trykk har i den senere tid fått mye oppmerksomhet, da trykkbehandling er med på å inaktivere mikroorganismer uten å gi for store endringer i produktets kvalitet (Knockaert et al., 2012). Høytrykkshomogenisering (HPH) er mye brukt i foredling av tomater da sauser, juice og ketchup oppnår økt viskositet og mer uniform tekstur og farge etter trykkbehandling (Colle et al., 2010). Selv om mikroorganismer drepes, inaktiveres ikke alltid enzymer i like høy grad som ved varmebehandling (Shpigelman et al., 2015).



Figur 3 - Skjematisk forklaring av høytrykshomogenisering (HPH) (Pugliesi, 2010).

Figur 3 viser en skjematisk forklaring av HPH. Teknikken blir ofte brukt i produksjon av emulsjoner - en finfordelt blanding mellom to ulike faser, som ikke er løselig med hverandre. Et vanlig eksempel på dette er når lipofile oljer blandes i hydrofile, vandige løsninger. For at faseskille ikke skal dannes må blandingen gjennomgå emulgering, dvs. å dele opp og finfordele dråper av den lipofile fasen i den vandige løsningen (Stang et al., 2001). Homogeniseringen er en mekanisk prosess hvor emulsjonen presses gjennom en smal dyse ved hjelp av en høytrykkspumpe. På denne måten blir fett finfordelt som bittesmå dråper i vannfasen, og emulsjonen gjøres mer stabil (Stang et al., 2001). HPH vil også gi oppløsning av celleklynger og nedbrytning av cellevegger, og på denne måten påvirke tilgjengeligheten av næringsstoffer (Panozzo et al., 2013).

1.3. Fettfordøyelse

Det humane fordøyelsessystemet er bygget opp av munn, spiserør, magesekk, tynntarm, tykktarm og endetarm. I munnen starter mekanisk nedbrytning og delvis kjemisk spalting av stivelse, som et resultat av tygging og α -amylaseutskillelse fra spyttkjertlene. Kjertler i magesekken sørger for produksjon av saltsyre, som skaper magesekkens karakteristiske sure miljø, med en pH på ca. 3. I tillegg til å virke bakteriehemmende, tilrettelegger den lave pH-en for aktivering av det proteinspaltende enzymet pepsin, samt gastrisk lipase. I tolvfingertarmen blandes pH-nøytraliserende natriumbikarbonat, pankreatin og galle med innholdet fra magesekken. Fordøyelse av fett og stivelse fullføres ved hjelp av henholdsvis pankreatisk lipase og pankreatisk amylase, mens proteinnedbrytningen fullføres av trypsin, chymotrypsin og karboksypeptidase. En pH på ca 7 gir optimale forhold for duodenal enzymaktivitet. Alle enzymene som inngår i fordøyelsesprosessen fungerer optimalt ved kroppstemperatur (Saladin, 2012).

Fett er det makronæringsstoffet som har høyest energitetthet, men som gir minst metthetsfølelse. Overvekt er i økende grad et globalt problem, der den konstante tilgangen av raffinerte matvarer med høy energitetthet, kombinert med lite fysisk aktivitet medfører at mange lever med en konstant positiv energibalanse. Overvekt kan bidra til utvikling av livsstilssykdommer som diabetes, hjerte – og karsykdommer og kreft. (Albertsson et al., 2007). For mennesker i I-land hentes i gjennomsnittlig 40 % av det daglige fettforbruket i kroppen fra triacylglycerider (TAG) i kostholdet. Før disse kan tas opp over tarmepitelet må de brytes ned til mono- og diacylglyceroler, glycerol og frie fettsyrer (Nelson et al., 2008). Lipiders hydrofobe natur gjør nedbrytning og absorpsjon av fett mer komplisert enn tilsvarende prosesser for protein og karbohydrater. Absorpsjon av frie fettsyrer over tarmepitelet er avhengig av miceller som produseres i leveren og sendes gjennom gallegangen til duodenum. Miceller bidrar til en enorm økning i lipidmolekylens eksponering for lipaseaktivitet, da de sammen med utvalgte komponenter av gallelecitin og gallesyrer innehar egenskaper som gjør det mulig å emulgere fett i tarmlumens vandige miljø. Hydrofobe regioner i gallegangkomponentene bindes til fettdråpenes overflate. I tillegg innehar de et hydrofilt domene som er løselig i den hydrofile tarmsaften. Dette gjør det mulig for gallesaltene å bryte ned fett til mindre dråper, og på denne måten eksponere større flater til enzymaktivitet og tilrettelegger for økt lipolyse (Saladin, 2012). Pankreatisk

lipases kofaktor – co-lipase sørger for binding av lipasekomplekset til fettsyrene ved å danne en bro mellom gallesalter og lipaseenzymet (Aarak et al., 2013a). Lipasen er selv et relativt hydrofilt enzym, mens co-lipase utgjør den svært hydrofobe delen av enzymkomplekset. Disse egenskaper gjør at lipasen kan opptre i grensesnittet mellom olje og vann, og gjør enzymet i stand til å spalte fett selv i vandig miljø (Albertsson et al., 2007). Micellene med sin hydrofobe kjerne og sitt hydrofile ytre bidrar i tillegg til kontakt mellom lipase og TAG, til transport av fordøyd fett over tarmepitelet. Kolesterol, fettløselige vitaminer og næringsstoffer absorberes sammen med frie fettsyrer og monoglycerider inn i den hydrofobe kjernen og transporteres til enterocyttenes overflate. Lipidene transporteres over epitelets plasmamembran, mens micellene forblir i tarmlumen hvor de fortsetter å transportere lipider. Uten miceller ville absorpsjon av fett vært redusert til 40-50 % av normalt opptak, mens opptaket av kolesterol hadde vært nesten fraværende (Saladin, 2012).

1.3.1. Lipaseinhibitorer

Pankreatisk lipase er det enzymet som er hovedansvarlig for spalting av fett i fordøyelsessystemet, og har et aktivt sete med en hydrofob kjerne som blir gjort tilgjengelig for binding av fettsyrer når enzymet aktiveres (Miled et al., 2000). Hemming av dette enzymet vil kunne medføre reduksjon i fettabsorpsjon (Aarak et al., 2014), og behandling av overvekt ved å kontrollere lipaseaktivitet har lenge vært et aktuelt tema. Bruk av den syntetiske lipaseinhibitoren Orlistat ble allerede godkjent på 90-tallet for klinisk behandling av overvekt. Legemiddelet virker sterkt hemmende på pankreatisk og gastrisk lipase, men langtidseffekten av behandlingen er begrenset (Miled et al., 2000). Den eksakte biokjemiske reaksjonen som skjer ved hemming av lipase er ikke kartlagt (Tiss et al., 2009), men det er vist at bruk av Orlistat fører til økt fettinnhold i avføring som indikerer at mer fett passerer tynntarmen uten å absorberes. Fiber har vist seg å virke hemmende på lipolyse, og i følge Kumar og Chauchan (2010) skyldes hemmingen at fiber bindes kovalent til det aktive setet i pankreatisk lipase, og danner et stabilt kompleks. En annen teori er at fiber bremser micelledannelse ved å binde galle og fett, eller at økt viskositet i tarmlumen bremser binding av lipasekomplekset til fettdråpene (van het Hof et al., 2000, Aarak et al., 2013c). I mange studier er det også funnet at biologiske membraner fra planter, dyr og bakterier kan virke som lipaseinhibitorer ved å binde lipase og co-lipase. Spesielt thylakoidmembraner fra kloroplaster har vist god evne til å bremse fettfordøyelse, og gi økt utskillelse av det

metthetsfremmende hormonet cholecystokinin (CCK) (Albertsson et al., 2007, Emek et al., 2013). CCK skiller ut ved tilstedeværelse av fettsyrer i tynntarmen og bidrar til formidling av metthetsfølelse og bremser hormonell sultreaksjon (Saladin, 2012). En rekke andre naturlige stoffer fra plantevev, plantekstrakter og mikroorganismer, deriblant polyfenoler har vist seg å virke inn på *in vitro* fettfordøyelse (Birari and Bhutani, 2007, McDougall et al., 2009, Sharma et al., 2005, Aarak et al., 2014).

1.3.2. Fordøyelse av karotenoider

På lik linje med fettsyrer er karotenoider avhengig av inkorporering i miceller for opptak over tarmepitelet og inkorporering i lipoproteiner for transport i plasma (Gerster, 1997). Når inntak av karotenoider kombineres med fett resulterer dette trolig i økt opptak av karotenoider, da lipidene stimulerer til galleutskillelse som gir ytterligere emulgering og micelledannelse i tarmlumen. I vestlig diett er behovet for fett generelt tilstrekkelig for opptak, da et måltid må inneholde minimum 5-10 g fett for å stimulere til opptak av karotenoider (Anese et al., 2013). Forskning viser også at fiber i kostholdet har innvirkning på tilgjengelighet og biotilgjengelighet av karotenoider (Viuda-Martos et al., 2014b).

1.3.3. Modellsystem for å studere fordøyelse (*in vitro* fordøyelse)

Bruk av *in vitro* fordøyelsesmodeller gir mulighet for å studere fordøyelse av ulike matvarer og den nedbrytningsevnen fordøyelsesenzymene har for ulike matvarer, samt tilgjengelighet av ulike næringsstoffer og andre innholdsstoffer i mat. På denne måten kan mengden stoff som er tilgjengelig i tarmen bestemmes, men modellen gir ingen mulighet for å bestemme hvor mye som faktisk blir tatt opp over tarmepitelet. Da må man benytte humane intervensjonsstudier. Miljø, inkubasjonstid, enzym-, salt- og kjemikaliekonsentrasjon kontrolleres nøyaktig i *in vitro* systemet som har som mål å simulere en prosess som er mest mulig lik den humane fordøyelsen. Modellen kan tilpasses til å simulere fordøyelse for ulike aldersgrupper og helsetilstander, og det er mulig å fordøye et stort antall prøver og inkludere mange replikater uten for store omkostninger eller tidskonsum. Vanligvis benyttes fordøyelsesenzymmer utvunnet fra dyr (Minekus et al., 2014), men i enkelte tilfeller blir også kroppsvæske (mage- og tarmsaft) fra mennesker benyttet (Ulleberg et al., 2011). De vanligste modellene for *in vitro* fordøyelse inkluderer oral-, ventrikkel- og duodenalfase som lett kan simuleres ved hjelp av vanlig laboratorieutstyr og elektrolyttløsninger. (Minekus et al., 2014).

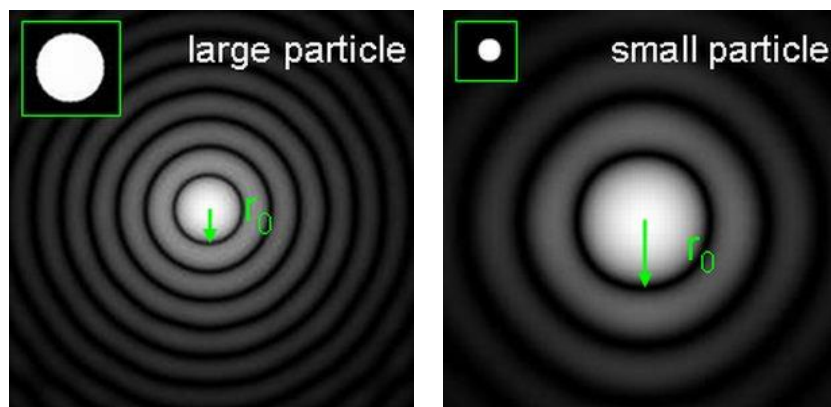
1.4. Analysemetodikk

1.4.1. Viskositetsmåling

Viskositet er et mål på hvor tyktflytende en væske er, og defineres som væskens motstand mot bevegelse. En Rapid Visco Analyzer (RVA) er et viskometer som måler denne motstanden ved hjelp av en roterende plastspade. Viskometeret er koblet til et dataprogram som mottar informasjon fra analysen, og gjør det mulig å regulere temperatur i væsken og antall rotasjoner plastspaden gjør per minutt (rpm) (Doutch et al., 2012, Gamel et al., 2012).

1.4.2. Laserdiffraksjon

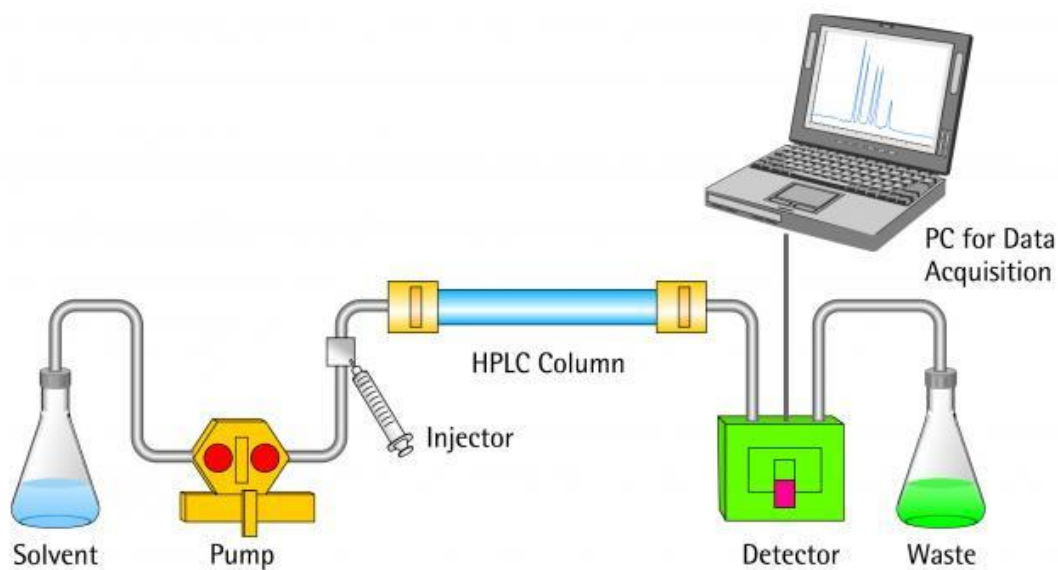
Laserdiffraksjon er en metode som benytter laserlys for å bestemme partikkelstørrelse i en rekke ulike løsninger. Diffraksjonsmønsteret forteller noe om partikkelens størrelse og form, og ved hjelp av en fotodetektor kan denne informasjonen overføres til et dataprogram og hvor det er mulig å regne ut størrelsen av partiklene (Ma et al., 2000). Figur 4 viser hvordan ulik størrelse på partikler gir ulikt diffraksjonsmønster ved laserdiffraksjon.



Figur 4 - Lysbrytning ved laserdiffraksjonering (Sympatec).

1.4.3. Høytrykksvæskekromatografi (HPLC)

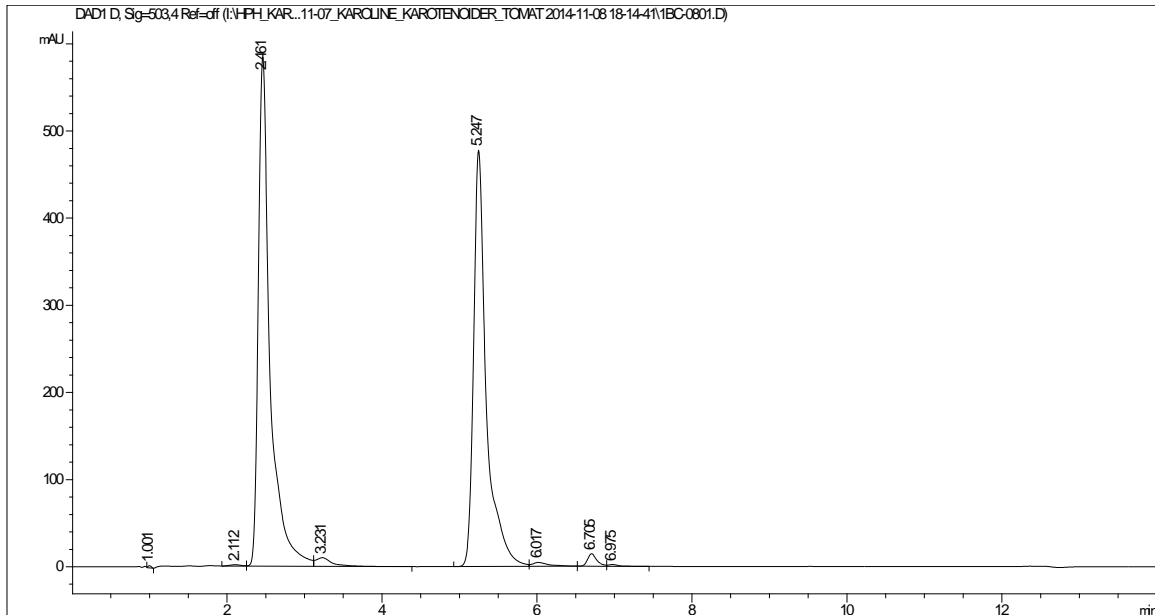
Høytrykksvæskekromatografi (HPLC), eller mer riktig betegnelse, høy-ytelse væskekromatografi er en teknikk innen kjemisk analyse for separasjon og deteksjon av lavmolekylære stoffer i en blanding. Et HPLC- system er vist i figur 5. Dette består av flere moduler satt sammen: et pumpesystem, injektor, HPLC kolonne, en eller flere ulike typer detektorer, og et datasystem for å styre og ta imot signaler fra de ulike modulene.



Figur 5 – Et HPLC-system består av pumpe, injektor, en HPLC-kolonne og en detektor. Det hele er koblet til et dataprogram som styrer og tar i mot informasjon fra analysen (Töppner et al., 2014).

Løsemiddel (mobil fase) pumpes gjennom kolonnen som er tettpakket av små partikler ($\leq 10 \mu\text{m}$), og utgjør stasjonærfasen. Det kreves høyt trykk for å drive mobilfasen over den tettpakkete kolonnen, og i HPLC skapes et mottrykk opp mot 350 bar. Prosessen er derfor avhengig av at pumpe og kolonne tåler dette høye trykket, for opprettholdelse av en stabil eluering (Miller, 2005). Prøvene injiseres i injektoren og føres inn på kolonnen sammen med mobilfasen. Prøvens forbindelser (analytter) interagerer med kolonnens pakkemateriale, og separeres etter hvert som prøven beveger seg nedover kolonnen. De ulike forbindelsene i prøvemateriale elueres ut av kolonnen ved ulik tid, avhengig av stoffets affinitet for stasjonær- og mobilfase, og videre gjennom en detektor som måler absorpsjonen i et bestemt område av spekteret kontinuerlig (Nelson et al., 2008). En moderne UV-Vis detektor kan måle ved flere bølgelengder samtidig og dermed måle ulike forbindelser (Miller, 2005). Signaler sendes fra UV-Vis detektoren til datasystemet, hvor informasjonen fremstilles i form av et kromatogram. Hvert stoff som separeres fra prøvematerialet utgjør en topp i kromatogrammet, og det er arealet av disse toppene som brukes til å regne konsentrasjonen av det gitte stoffet i den injiserte prøven. Figur 6 viser et eksempel på et kromatogram med

resultatene fra væskechromatografi, der y-aksen viser milliabsorbans og x-aksen viser retensjonstiden i minutter.



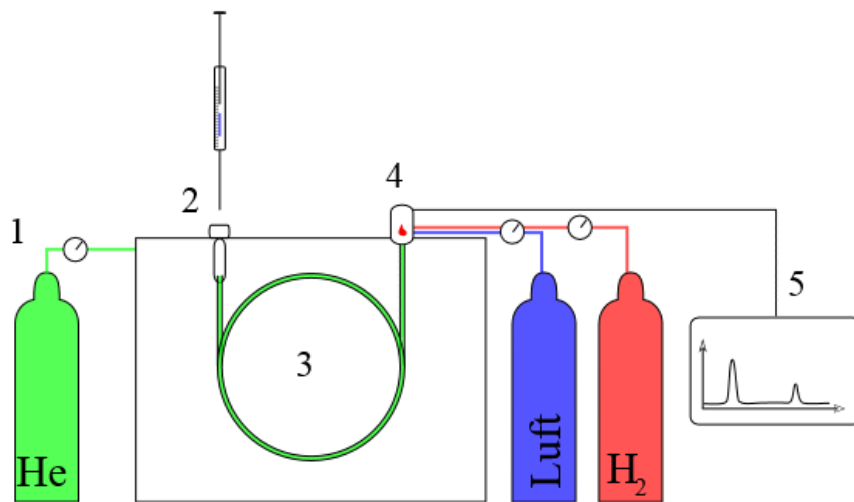
Figur 6 - Eksempel på et kromatogram med resultatene fra væskechromatografi, der y-aksen viser milliabsorbans og x-aksen viser retensjonstiden i minutter (kromatogram fra eget forsøk).

For HPLC er to typer separasjon mulig; isokratisk eluering og gradienteluering. Isokratisk eluering brukes for separasjon av enkle stoffer, der mobilfasen består av ett eluderingsmiddel. Ved gradienteluering kan selv svært kompliserte blandinger av karotenoider separeres ved å kombinere to eller flere løsemidler og pumper, som sørger for kontinuerlig endringer i mobilfasens sammensetning av løsemidler under analyse. Ved å lage en løsemiddelgradient med løsemidler av ulik polaritet, vil komponenter i prøvemateriale med ulik polare egenskaper løses ulikt i de to løsemidlene og dermed elueres i samsvar med sin polaritet (McMaster, 2005).

De siste årene har UHPLC også blitt tatt i bruk for separering av karotenoider. En metode der det brukes smalere kolonner, pakket med mindre partikler ($< 2\mu\text{m}$) som krever et høyere trykk over kolonnen. Trykkene i dette systemet kan komme opp mot 1000 bar, og fører til redusert analysehastighet og løsemiddelforbruk. I tillegg er det vist at metoden gir bedre karotenoidseparasjon enn HPLC (Rivera and Canela-Garayoa, 2012).

1.4.4. Gasskromatografi (GC)

I gasskromatografi (GC) brukes inert gass som mobilfase for å frakte prøvematerialet over kolonnen. De mest vanlige bærer-gassene er nitrogen, helium og hydrogen (Miller, 2005). Noen lipider er naturlig flyktige, men de fleste må forestres før de kan analyseres ved gasskromatografi. I kromatografen varmes de transforestrede fettsyrene til flyktig tilstand, slik at de kan fraktes over kolonnen sammen den inerte bærer-gassen. Ulike fettsyrer i en sammensatt løsning separeres på grunnlag av lipidenes affinitet for stasjonær-fasen. Lipidene med høyest affinitet vil interagere med stasjonær-fasen, mens de minst løselige vil migrere raskest over kolonnen og ha den laveste retensjonstiden. På denne måten kan løselighet og kokepunkt være med på å identifisere de ulike lipidene i en løsning. Den mest brukte detektoren i et GC system som analyserer organiske stoffer er en flammeionisasjonsdetektor (FID). Denne måler konsentrasjonen av partikler i gassfasen (Miller, 2005). Figur 7 viser en skjematisk forklaring av en gasskromatograf, med gassbeholder, injektor, kolonne og detektor.



Figur 7 – En gasskromatograf består av gassbeholder (1), injektor (2), kolonne (3) og detektor (4). Det hele er koblet til et dataprogram (5) som styrer og tar i mot informasjon fra analysen (Manske, 2006).

2. Formål med masteroppgaven

Denne masteroppgaven omfatter forsøk med høytrykkshomogenisering (HPH) av tomatemulsjoner for å se hvorvidt denne typen prosessering påvirker frigivelse av karotenoider fra grønnsaksmatriks til fettfasen i emulsjonene. *In vitro* fordøyelse av ren rapsolje ble sammenlignet med *in vitro* fordøyelse av tomatemulsjoner, for å finne ut om tomatemulsjonene påvirket fettfordøyelsen, og om den eventuelle påvirkningen varierende avhengig av HPH trykk. Emulsjonene ble produsert av ferske og fryste tomater av tre ulike sorter, tilsatt 10 % vegetabilsk olje. Til sammenligning ble det også utført *in vitro* fettfordøyelse og måling av emulsjonskvalitet i grønnkålemulsjoner. Rapsolje tilsatt den syntetiske lipaseinhibitoren Orlistat ble kjørt som en positiv kontroll i forsøket, da det er vist at dette stoffet virker inn og hemmer fettfordøyelse. Emulsjonskvalitet ble målt for å finne hvordan trykket påvirket viskositet og partikkelstørrelse, og om dette videre hadde en sammenheng med karotenoidtilgjengelighet og fettfordøyelse. For å undersøke om fiber fra grønnsakene kunne ha en effekt på fordøyelsen av fett, ble det målt totalt pektininnhold i tomatene. Figur 8 viser et flytskjema med oversikt over de ulike kvalitative og kvantitative analysene som inngår i oppgaven.

3. Materialer og metoder

3.1. Forsøksplan

Tre sorter tomat av typen klase-, plomme- og perletomat ble benyttet som råvare i tillaging emulsjonene. Det ble først laget en grovemulsjon i blender fra hver av sortene, en fra fersk råvare og en fra fryst råvare. Alle grovemulsjonene inneholdt 10 % vann, 10 % rapsolje og 0,1 % natriumbenzoat. Disse grovemulsjonene ble videre eksponert for høytrykkshomogenisering (HPH) ved 200 bar og 1500 bar. Forsøksdesignet for forsøk 1 er vist i tabell 1.

Tabell 1 - Forsøksdesign for forsøk 1

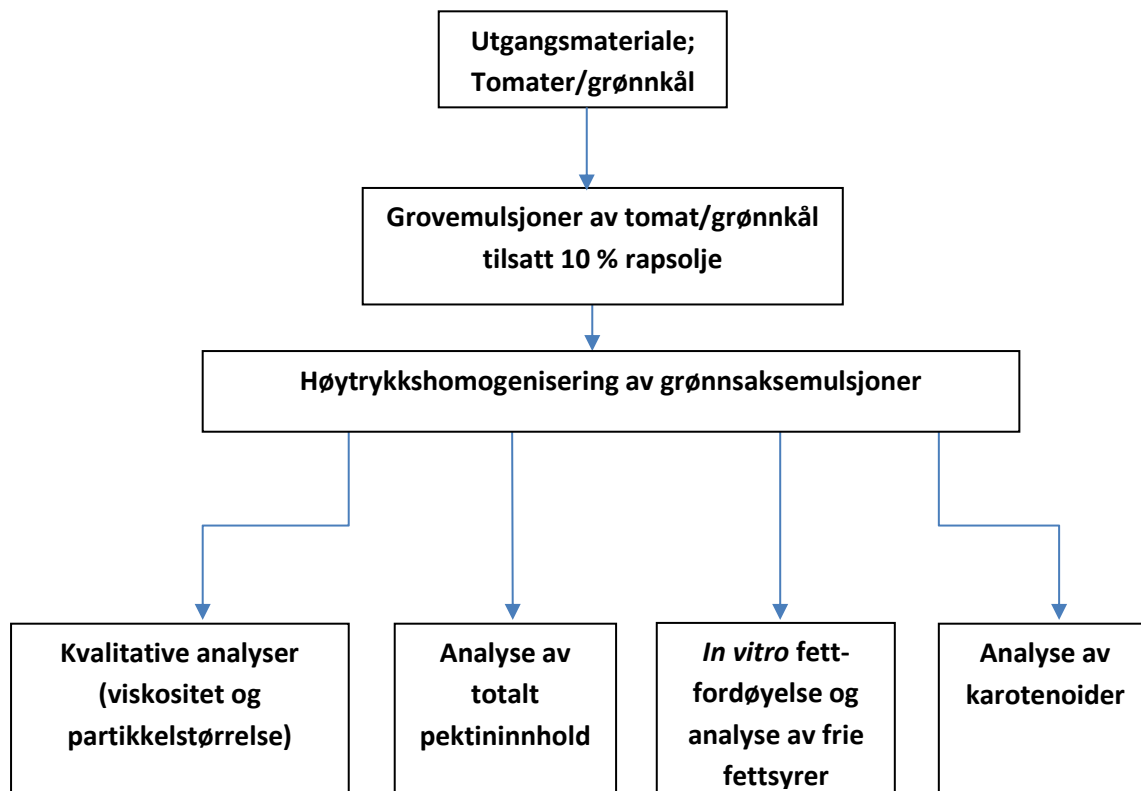
Prøvenr	Tomatsort	Fersk/fryst råvare	HPH trykk (bar)
1	Klase	Fersk	Før HPH
2	Plomme	Fersk	Før HPH
3	Perle	Fersk	Før HPH
4	Klase	Fryst	Før HPH
5	Plomme	Fryst	Før HPH
6	Perle	Fryst	Før HPH
7	Klase	Fersk	200
8	Plomme	Fersk	200
9	Perle	Fersk	200
10	Klase	Fryst	200
11	Plomme	Fryst	200
12	Perle	Fryst	200
13	Klase	Fersk	1500
14	Plomme	Fersk	1500
15	Perle	Fersk	1500
16	Klase	Fryst	1500
17	Plomme	Fryst	1500
18	Perle	Fryst	1500

Klasetomat ble valgt ut for å lage nye emulsjoner til gjentagende forsøk, sammen med grønnkålemulsjoner. Behandling av råvarer og høytrykkshomogenisering ble gjort på samme måte som i forsøk 1. For grønnkålemulsjonene ble det kun laget emulsjoner av fersk råvare. Forsøksdesignet for forsøk 2 er vist i tabell 2.

Tabell 2 - Forsøksdesign for forsøk 2

Prøvenr	Grønnsakssort	Fersk/fryst råvare	HPH trykk (bar)
1	Klasetomat	Fersk	Før HPH
2	Klasetomat	Fersk	200
3	Klasetomat	Fersk	1500
4	Klasetomat	Fryst	Før HPH
5	Klasetomat	Fryst	200
6	Klasetomat	Fryst	1500
7	Grønnskål	Fersk	Før HPH
8	Grønnskål	Fersk	200
9	Grønnskål	Fersk	1500

Ferdige høytrykkshomogeniserte emulsjoner ble analysert for: i) partikkelstørrelse, ii) viskositet og iii) pektininnhold. Videre ble analyse av karotenoidinnhold og *in vitro* fordøyelse utført på alle prøvene for å studere effekter av sort, fersk eller fryst råvare og homogeniseringstrykk (se flytskjema i figur 8).



Figur 8 - Flytskjemaet viser en oversikt over de ulike analysene som ble gjort i masteroppgaven, delt inn i kvalitative og kvantitative analyser.

3.2. Produksjon av tomatemulsjoner

3.2.1. Råvarer

Tomatene som ble benyttet i forsøk 1 var fra Wiig gartneri på Jæren. Tomatene ble brukt til emulsjonsproduksjon ca. en uke etter høsting. Tre sorter tomat ble benyttet i forsøket; klasetomat, plommetomat og perletomat. Basert på farge og konsistens viste tomatene en høy grad av modenhet. Mellom høsting og emulsjonsproduksjon ble tomatene oppbevart i mørkt klimarom ved 15 °C. Nedfrysning av tomater til produksjon av emulsjon fra fryst råvare ble gjort på samme tidspunkt som produksjon av emulsjon fra fersk råvare, slik at modningsgraden ble sammenlignbar.

I forsøk 2 ble det benyttet klasetomater av nederlandsk opprinnelse som ble kjøpt i vanlig dagligvarehandel. Disse tomatene var noe mindre modne enn tomatene i forsøk 1. Grønncål ble på lik linje med klasetomatene kjøpt i vanlig dagligvarehandel, og benyttet rett etter innkjøp.

Til emulsjonen ble det benyttet rapsolje av typen Odelia, kaldpresset stekeolje.

3.2.1.1. *Varmebehandling og homogenisering av tomater*

Tomatene ble vasket, tørket og kuttet i terninger. Terningene ble tilsatt vann (10 % av totalvekt) og kokt i 20 minutter, før tomatblandingen ble kjølt på is til ca. 15 °C og tilsatt tilsvarende mengde vann som fordampet ved koking (figur 9a). Odelia rapsolje (10 % av totalvekt) og natriumbenzoat (0,1 %) ble tilsatt (figur 9b), før det hele ble homogenisert til en grovemulsjon i Wilfa Knus 1200S blender (Wilfa, Norge) i 4 minutter (figur 9c). For å unngå at store partikler, som skallbiter og frø, skulle bli sittende fast i høytrykkshomogenisatoren, ble homogenatene silt v.h.a. spesialtilpasset sile- og puréutstyr i en Kenwood Major kjøkkenmaskin (først grov, deretter fin sil). Det ble også produsert et homogenat av tomatmasse uten tilsatt olje behandlet på tilsvarende måte som grovemulsjonene.



a)

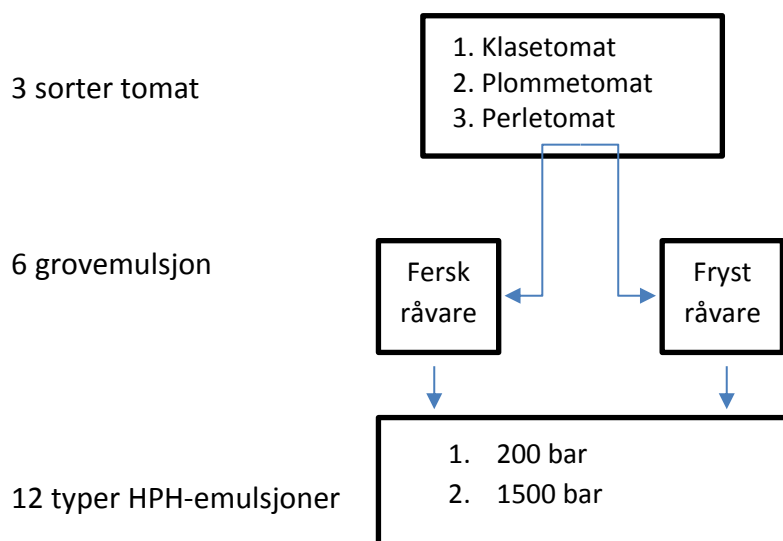
b)

c)

Figur 9 – Emulsjonsproduksjon. a) Tomater ble kokt med 10 % vann i 20 minutter. b) Tomatblandingen ble tilsatt 10 % rapsolje. c) Tomater og olje ble blandet til en grovemulsjon ved hjelp av en blender.

3.2.2. Høytrykkshomogenisering (HPH)

Hver av grovemulsjonene ble eksponert for to ulike trykk; i) middels høyt trykk (200 bar) og ii) høyt trykk (1500 bar). HPH ble gjort ved hjelp av en Panda PLUS 2000 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia). Etter HPH ble tomatemulsjonene oppbevart i 100 ml plastbeger i et mørkt kjølerom (4°C) til de ble analysert. Alle begrene ble pakket inn i aluminiumsfolie for å unngå lyspåvirkning. Figur 10 viser en oversikt over de ulike emulsjonene som ble produsert i forsøk 1.



Figur 10 - Flytskjemaet viser de ulike behandlingene tomatene gjennomgikk for å danne de 18 ulike typene emulsjon. Fryst og fersk råvare av tre ulike sorter tomat ble benyttet for å lage 6 emulsjoner, som videre ble behandlet ved tre ulike trykk.

3.3. Analyse av totalt pektinnhold

Et utvalg av emulsjonene ble sendt til Eurofins for analyse av totalt pektinnhold (ISO metode A7034). Denne analysen ble kun gjort for første produksjon av tomatemulsjoner (forsøk 1), og ikke av prøver fra forsøk 2 (klasetomatemulsjoner og grønnkålemulsjoner). Resultatene fra Eurofins ble oppgitt i milligram per kg emulsjon, uten standardavvik.

3.4. Kvalitative analyser (viskositet og partikkelstørrelse)

3.4.1. Viskositetsmåling

Viskositet hos de ulike emulsjonene ble målt ved hjelp av en Rapid Visco Analyser (RVA- Newport Scientific Pty, Warriewood, Australia). 30 g prøve ble overført til spesialtilpasset beger med tilhørende propell og analysert ved 25 °C og 160 rpm. Tomatemulsjonene i forsøk 1 ble analysert med tre replikater, mens det i forsøk 2 ble gjort to replikater. Resultater fra RVA oppgis i centipoise (cP), som tilsvarer ett millipascalsekund (mPa·s).

3.4.2. Måling av partikkelstørrelse

Ved måling av partikkelstørrelse ble det brukt laserdiffraksjon HELOS/KR-QUIXEL (Sympatec GmbH, Tyskland). 250 ml destillert vann (dH₂O) og 250 µl emulsjon ble tilsatt i apparatets væskebeholder. Etter sonikering i 120 sekunder ble målingene utført i tre omganger med en varighet på 30 sekunder, ved konstant temperatur (30 °C). Varmebehandlet, homogenisert og silt tomatmasse uten tilsatt olje ble analysert for å kunne skille tomatpartiklene fra oljedråper i tomatemulsjonene. Samme analyse ble gjort for nye klasetomatemulsjoner og grønnkålemulsjoner i forsøk 2. Resultatene fra partikkelstørrelsesmålingen ble presentert både i form av en volumtetthetsfordeling og en kumulativ fordeling (www.sympatec.com). I denne oppgaven oppgis partikkelstørrelsen som medianverdien, dvs. at 50 % av partiklene i emulsjonene vil være mindre enn den partikkelstørrelsen vi oppgir, og 50 % vil ha større partikkelstørrelse.

3.5. *In vitro* fettfordøyelse

Grønnsaksemulsjonene ble fordøyd ved hjelp av en statisk *in vitro* fordøyelses modell basert på EU Cost Action 1005 INFOGEST fordøyelsesmetode (Minekus et al., 2014), og nedbrytning av fett til frie fettsyrer (FFA) fettsyrer ble kvantifisert ved bruk av fast-faseekstraksjon og gasskromatografi.

3.5.1. Enzymer og kjemikalier benyttet ved *in vitro* fordøyelse

Enzymene som ble benyttet var alle bestilt fra Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA), der pepsin (P7000) og pankreatin (P1625) var hentet fra hhv. gastrisk mucosa og bukspyttkjertel hos svin, mens α -amylase (A0521) var hentet fra humant saliva (spytt). Gallen (B8381) ble benyttet var isolert fra kveg og får. Alle løsemidler benyttet i analysen var av analysegrad, bestilt fra VWR International (Radnor, PA, USA).

Det ble laget elektrolyttløsninger (se tabell 3) for simulert saliva (SSF) og simulert magesaft (SGF), som ble frosset ned og lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fram til bruk. Elektrolyttløsning ble ikke laget for duodenalfasen, da det ble antatt at pankreatin og galle bidrar med de nødvendige saltene. I stedet ble pankreatin og galle løst i $5,929\text{ mg/ml NaHCO}_3$ iblandet dH_2O . CaCl_2 i løsning ($58,8\text{ g/ml}$) ble oppbevart i egen flaske og tilsatt til SSF ($1,5\text{ mM}$) og SGF ($1,5\text{ mM}$) samtidig med enzymene.

Tabell 3 - Tabellen viser blandingsforhold av saltløsninger i simulert saliva (SSF) og simulert magesaft (SGF) brukt ved *in vitro* fordøyelse. Uttak (ml) ble fylt opp med vann til 500 ml.

	Stamløsning (g/L)	Uttak til SSF (ml)	Uttak til SGF (ml)
KCl	46.8	10.0	28.0
KH_2PO_4	68.0	20.0	0.9
NaHCO_3	84.0	4.0	6.5
NaCl	120.0	1.0	10.0
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30.5	1.0	2.0
pH-justering			
	Mol/L (M)		
NaOH	1	4.0	
HCl	1	1.0	3.0

3.5.2. *In vitro* fordøyelse

Grønnsaksemulsjon (1 g) ble tilsatt SSF (1 ml), iblandet α -amylase (5 U/ml) og CaCl_2 ($1,5\text{ mM}$) og ble inkubert ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 minutter. Tilsvarende ble gastrisk fase simulert ved å tilsette 2 ml SGF iblandet pepsin (1000 U/ml) og CaCl_2 ($0,15\text{ mM}$). pH ble justert til 3.0 ved hjelp av 10 M HCl, før prøverørene ble inkubert i risteinkubator (Innova 40/40R, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ og 215 rpm i 120 min. Simulert duodenalvæske ble produsert ved å løse galle og pankreatin tilsvarende en sluttkonsentrasjon på hhv. 10 mM og $1,2\text{ mg/ml}$ i natriumbikarbonat og vann. 4 ml av den simulerte duodenalvæsken ble tilsatt prøvene og pH ble justert til 7.0 ved hjelp av 10 M NaOH. Etter pH-justering ble prøvene igjen stilt på risteinkubator ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ og 215 rpm i 40 eller 80 minutter. Prøvene ble direkte

overført fra risteinkubator til is, for så å tilsette ChCl_3 :MeOH (2:1, 15 ml) som stoppet lipolysen.

Fordøyelse av emulsjonene i forsøk 1 og 2 ble alle gjort med tre replikater. Parallelt med fordøyelse av klasetomatemulsjoner i forsøk 2, ble det gjort fordøyelse av ferske grønnkålemulsjoner. Som en positiv kontroll ble rapsolje med og en uten tilsatt Orlistat fordøyd parallelt med hvert av forsøkene, der vann erstattet grønnaksinnholdet i emulsjonene.

3.5.3. Kjemikalier og materialer brukt ved analyse av frie fettsyrer

Alle løsemidler benyttet i analysen var av analysegrad, bestilt fra VWR International (Radnor, PA, USA). Trikosansyre, C23:0 (10-2300-13) ble bestilt fra Larodan AB (Malmö, Sverige).

3.5.4. Fettekstraksjon og analyse av frie fettsyrer

Lipider ble ekstrahert fra de fordøyde prøvene ved sentrifugering, og isolasjon av fettfase. Den frie fettsyren trikosansyre, C23:0 (200 μl , 2 mg/ml kloroform) ble tilsatt som internstandard før prøvene ble vendt forsiktig 10 ganger for tilstrekkelig miksing. Rørene ble sentrifugert ved 1500 G i 10 minutter ved hjelp av en Heraeus Multifuge 4 KR (Thermo Electron Corporation, USA) for dannelse av faseskille i prøvene. Fettfasen ble pipettert ut og overført til nye sentrifugeglass. Isolert fettfase ble tilsatt 1 ml dH_2O før prosessen ble gjentatt. Ekstrahert fett ble konsentrert under nitrogen ved 40 °C ved hjelp av en (Techne Sample Concentrator; Techne, Staffordshire, UK) og løst i 3,7 ml kloroform.

Frie fettsyrer (FFA), nøytrale lipider og polare lipider ble fraksjonert ved hjelp av automatisert fastfase ekstraksjon (Gerstel MPS Autosampler; Gerstel GmbH, Sveits). For polare lipider ble det benyttet to elueringsløsninger; metanol:kloroform (6:1) og metanol:kloroform (6:1) med 0,05M natriumacetat. FFA og nøytrale lipider ble eluert med hhv. dietyleter:eddiksyre (99:1) og kloroform:metanol (95:5). Fraksjonen som inneholdt FFA ble avdampet under nitrogen på en varmeblokk ved 40 °C. Prøvene ble løst i 1 ml benzen og tilsatt 3 ml metanolisk HCl og 200 μl 2,2-dimetylpropan før de ble inkubert i vannbad ved 80 °C i 20 minutter. Det ble tilsatt 1 ml isooktan og 1 ml 5 % NaCl, før sentrifugering ved 1000 G i 10 min (). Isooktanlaget ble overført til nye sentrifugerør, og tilsatt 1 ml 2 % NaHCO_3 før sentrifugering og isolering ble gjentatt. Den isolerte isooktanløsningen ble overført til GC-prøverør og tilsatt vannfritt natriumsulfat. Prøvene ble analysert ved hjelp av Agilent 6890

gasskromatograf (GC) med BPX-70 kolonne (60 m x 0,25 mm indre diameter, 0,25 µm film; SGE Analytical Science Private Limited, Australia) pakket med 70% cyanopropyl-polysilfenylen-siloksan, og flammeioniseringsdetektor (FID). Temperaturprogrammet startet ved 70°C i 1 minutt, økte med 30°C/minutt til 170 °C, 1,5°C/minutt til 200°C og 3°C/minutt til 220°C og endelig holdetid på 5 minutter. Resultater ble integrert med Agilent GC ChemStation software (version A.05.02; Agilent Technologies) og gjenkjent ved hjelp av eksterntstandard. Fettfordøyelsen ble målt som mg FFA per gram rapsolje som ble tilsatt emulsjonene. Resultater fra måling av fettfordøyelse oppgis som mengden frie fettsyrer målt i ferdig fordøyde prøver, angitt som milligram per gram rapsolje i emulsjonene.

3.6. Analyse av karotenoider

Karotenoidene lykopen og β-karoten i både hele emulsjonen og i emulsjonens fettfase ble kvantifisert. Tomatemulsjonene ble oppbevart ved -80 °C til analysen ble gjennomført. Ekstraksjonsprosedyrene ble utført i mørkerom, med bruk av rødt lyst som lyskilde for å unngå pigmentdegradering.

3.6.1. Kjemikalier og materialer

Alle løsemidler benyttet i analysen var av HPLC-grad fra VWR International (Radnor, PA, USA). Gjennom hele analysen ble det benyttet Milli-Q rensert vann. *trans*-β-Apo-8-karotenal (10810) ble benyttet som internstandard, mens β-karoten (22040) og lykopen (75051) ble brukt for eksterntstandardkurver. Alle standarder ble bestilt fra Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA)

3.6.2. Ekstraksjon av karotenoider i tomatemulsjoner

Tre replikater (1 g ± 0,05 g) ble tatt ut fra hver av emulsjonene, og tilsatt internstandarden β-Apo-8'-karotenal løst i kloroform (100 µl, 1 mg/ml). Prøvene ble tilsatt 20 ml ekstraksjonsmiddel (n-heksan:aceton:etanol 2:1:1 med 0,05 % BHT), og homogenisert ved hjelp av Ultra-Thurrax (15 000 rot/min) i ett minutt. Under homogenisering ble prøvene oppbevart mørkt og på is, for å unngå degradering av pigmentene. De homogeniserte prøvene ble filtrert over Falden filter (597 ½), og filtratet ble videre overført til en skilletrakt. Filtratet ble tilsatt mettet NaCl-løsning (50 ml) før nederste vannfase ble skilt av. 10 ml metanolisk KOH (10 %) ble tilsatt hvert av rørene, som videre ble ristet på vortexmikser og flushet med N₂-gass for å fjerne oksygen.

Etter 2 timers inkubasjon i mørkt romtemperert miljø, ble prøvene overført til skilletrakt og tilsatt 2 ml heksan. Prøvene ble vasket to ganger med ammoniumacetat (20 ml, 50mM), for å fjerne alkalierester. Den gjenværende organiske fasen ble overført til Pyrex-rør, og avdampet under nitrogengass på en varmeblokk ved 40 °C (Techne Sample Concentrator; Techne, Staffordshire, UK). Inndampede prøver ble reløst i 3 ml THF:MeOH (1:4) med 0,05 % BHT, filtrert (0,2 µm filter) og analysert ved hjelp av UHPLC.

3.6.3. Ekstraksjon av karotenoider i tomatemulsjonens fettfraksjon

Ved analyse av isolert fettfase ble fettsettefraseparert fra emulsjonene etter opptining. For hver emulsjonstype ble to replikater (25 g ± 1 g) veid ut i sentrifugerør. Prøvene ble sentrifugert i en Avanti J-26 XP sentrifuge (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) i 30 minutter (20 000 x g_{max}, 22 °C) for å skille fettfasen fra emulsjonen. Fettfasen ble forsiktig pipettert over i nye rør (50 ml) og tilsatt internstandard *trans*-β-Apo-8'-carotenal løst i kloroform (100 µl, 1 mg/ml), og 10 ml heksan/etanol (3:4) med 0,05 % BHT. Prøvene ble ristet på vortexmikser, før de ble tilsatt metanolisk KOH (10 ml, 20 %) og inkubert i mørkt, romtemperert miljø over natten for alkalisk spalting.

Etter inkubasjon ble prøvene tilsatt 4 ml heksan og vasket fem ganger med dH₂O (20 ml), for å fjerne etanolrester. Løsemiddel ble dampet av under nitrogengass på en varmeblokk ved 40 °C (Techne Sample Concentrator; Techne, Staffordshire, UK). Prøven ble deretter raskt reløst i 3 ml THF:MeOH (1:4) med 0,05 % BHT. Videre ble prøvene filtrert (0,2 µm filter) og analysert ved hjelp av UHPLC.

Det ble gjort to replikater for samme emulsjon, for emulsjoner både fra forsøk 1 og forsøk 2.

3.6.4. UHPLC analyse

Ekstraktene fra tomatemulsjonene ble analysert ved hjelp av UHPLC 1290 (Agilent Technologies, USA) med kolonne Acquity UPLC BEH RP 18 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, og tilhørende forkolonne. Kolonnen hadde en temperatur på 25 °C, mens prøvekommeret var nedkjølt til 5 °C, og holdt mørkt. Det ble benyttet gradienteluering med to mobilfaser A og B, med en elueringshastighet på 0,3 ml/min og injeksjonsvolum på 5 µl. Mobilfase A besto av acetonitril, metanol og 0,1 M Tris HCl, pH 8 (72:8:3) og mobilfase B besto av metanol og etylacetat (68:32). Tabell 4 viser metodens gradientprogram.

Tabell 4 - Gradientprogram benyttet ved UHPLC-analyse av karotenoider

Tid (minutter)	3	8	11	11,5	14
Mobilfase B (%)	0	100	100	0	0

Det ble benyttet eksterne kalibreringskurver med fire konsentrasjoner for β -karoten (2,1-13,3 $\mu\text{g/ml}$), lykopen (3,2-33,3 $\mu\text{g/ml}$) og *trans*- β -apo-8'-carotenal (1-10 $\mu\text{g/ml}$) ved utregninger. Kurver og beregninger er vist i vedlegg.

3.7. Statistikk

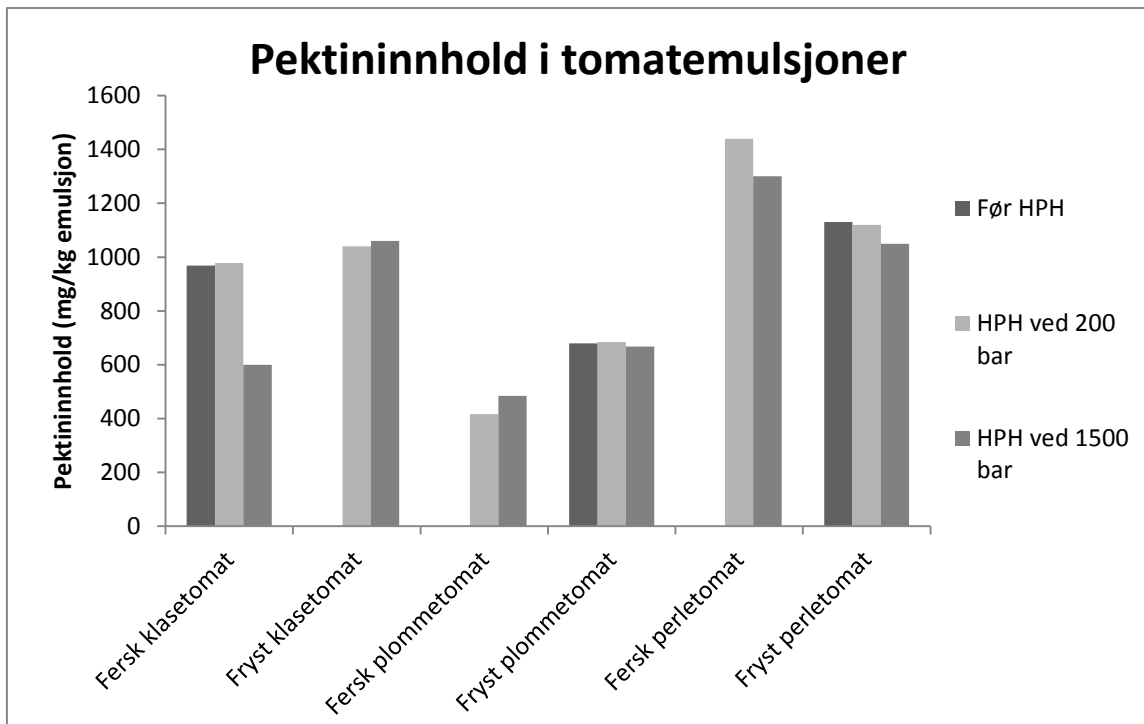
Statistiske analyser ble utført med MiniTab 17 Statistical Software. ANOVA analyse (generell lineær modell) ble utført på forsøksdesign (se tabell 1 og 2 i delkapittel 3.1) der tomatsort, homogeniseringstrykk og bruk av fersk eller fryst råvare ble satt som designvariabler, og resultatene fra de ulike analysene som responsvariabler. Signifikansnivå ble satt til $p < 0,05$. Når det ble funnet signifikant effekt av en variabel med flere enn to nivåer, ble én-veis ANOVA med Tukey-test benyttet. Korrelasjon mellom to variabler ble bestemt ved å beregne Pearson korrelasjon (r).

4. Resultater

Det er i denne masteroppgaven gjennomført to forsøk, forsøk 1 og 2 (se forsøksplaner i tabell 1 og 2, kap. 3.1). Resultatene er delt inn i fem ulike delkapitler, ett for hver av analysene som ble gjort i forsøket.

4.1. Totalt pektininnhold i høytrykkshomogeniserte tomatemulsjoner – forsøk 1

Tomatemulsjonene som ble analysert fra forsøk 1, inneholdt 416-1440 mg pektin pr kg emulsjon. Alle tomatsortene viste signifikante forskjeller ($p = 0,000$) i totalt pektininnhold, der emulsjoner av plommetomat hadde lavest innhold på 416-684 mg/kg, mens emulsjoner av perletomat hadde høyest innhold av pektin med et innhold på 1050-1440 mg/kg. Klasetomat ligger mellom de to med 600-1060 mg/kg, men er nærmest perletomat i pektininnhold. Fryst klasetomatemulsjon, samt emulsjon av fersk plomme- og perletomat uten høytrykksbehandling ble ikke analysert grunnet mangel på prøvemateriale. Det ble ikke funnet signifikante effekter av homogeniseringstrykk og frysing på totalt pektininnhold. Figur 11 viser resultatene fra måling av totalt pektininnhold. Det ble ikke gjort målinger av pektininnhold for emulsjonene i forsøk 2, og dette delkapittel omhandler derfor kun tomatemulsjonene i forsøk 1.



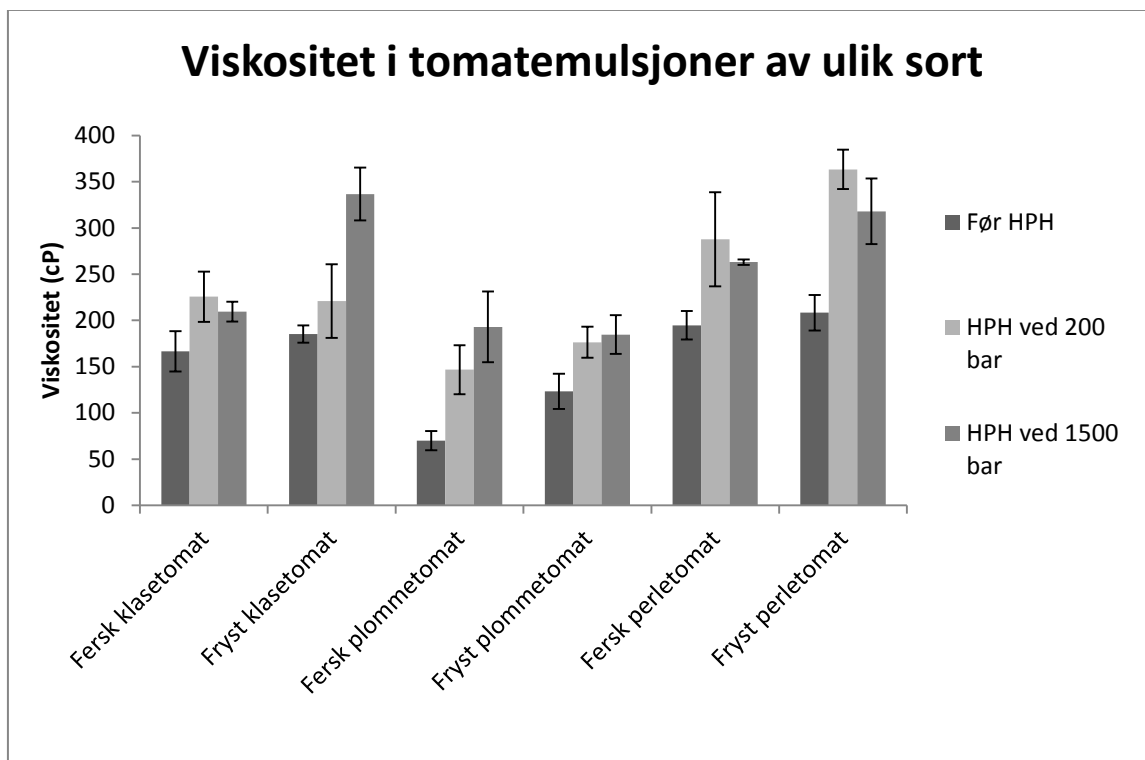
Figur 11 – Totalt pektininhold i høytrykksprosesserte tomatemulsjoner av ulike tomatsorter. Y-aksen viser totalt pektininhold målt i milligram (mg) pektin per kg emulsjon. De ulike HPH-trykkene er markert med forskjellige gråtoner forklart til høyre i figuren.

4.2. Viskositet i grønnsaksemulsjoner

Viskositetsmålinger ble gjort for alle emulsjonene i forsøk 1 og 2.

4.2.1. Viskositet i høytrykkshomogeniserte tomatemulsjoner – forsøk 1

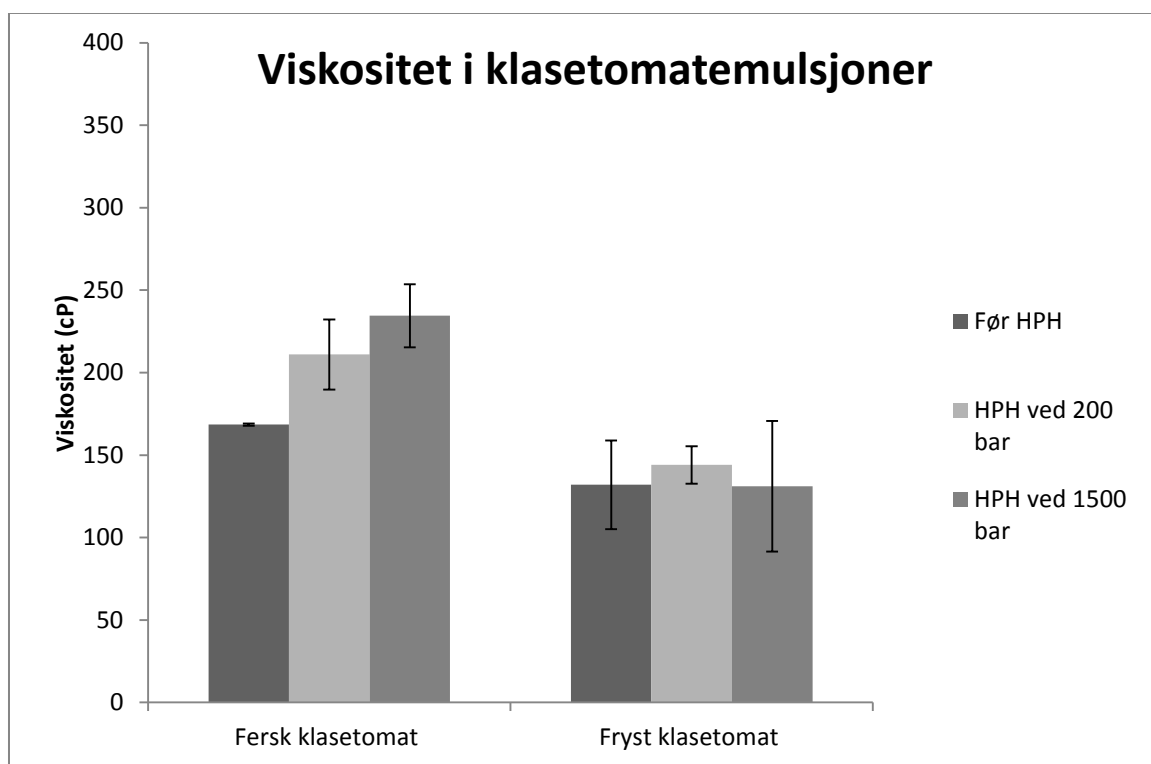
ANOVA-analyse viste at alle de tre kategoriske variablene hadde effekt på viskositet, der tomatsort viste størst effekt ($p = 0,001$), mens effekten av homogeniseringstrykk ($p = 0,002$) og bruk av fersk eller fryst råvare ($p = 0,025$) var noe lavere. Fra figur 12 kommer det fram at perletomat viste høyere viskositet enn plommetomat, med viskositet på 194-363 cP sammenlignet med 70-146 cP for plommetomat. Klasetomat hadde en viskositet på 166-336 cP. Viskositet viste en økning med økende trykk, og at fryst råvare ga noe høyere viskositet enn fersk.



Figur 12 – Viskositetsmåling av tomatemulsjoner basert på ulike sorter (forsøk 1) før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst råvare med 10 % rapsolje. Y-aksen viser viskositet, målt i centipoise (cP). De ulike HPH-trykkene er markert med forskjellige gråtoner forklart til høyre i figuren.

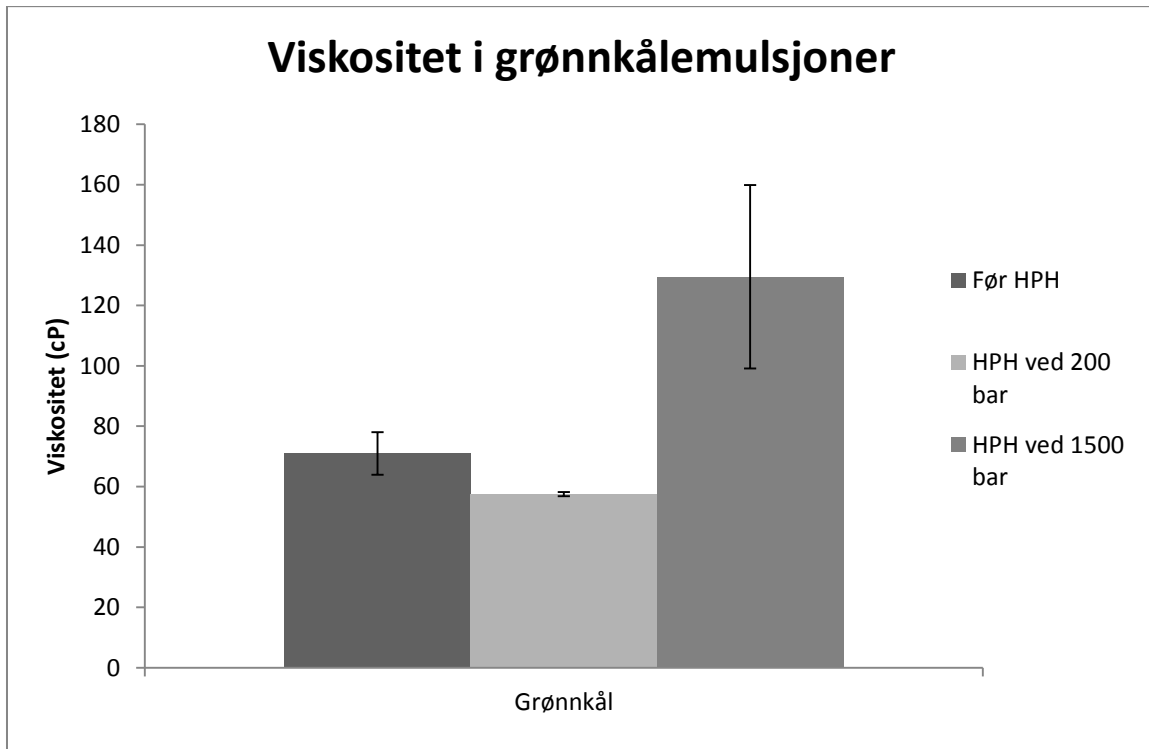
4.2.2. Viskositet i høytrykkshomogeniserte klasetomat- og grønnkålemulsjoner - forsøk 2

Viskositetsmålinger fra forsøk 2 viste at emulsjon laget av ferske klasetomater hadde verdier mellom 168 og 234 cP. Dette er omtrent likt som klasetomatemulsjonene i forsøk 1 som var på mellom 166 og 225 cP. De fryste klasetomater viste noe lavere verdier på 131-144 cP i forsøk 2, enn i forsøk 1 der de varierte mellom 185 og 336 cP. Det kan se ut til at fersk klasetomat gir høyere viskositet enn fryst, men det ble ikke vist signifikant forskjell ved ANOVA-test. Homogeniseringstrykk viste heller ingen signifikant effekt på viskositet. Resultatene fra viskositetsmåling av klasetomatemulsjoner i forsøk 2 er vist i figur 13.



Figur 13 – Viskositetsmåling for klasetomatemulsjoner (forsøk 2) før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser viskositet målt i centipoise (cP). De ulike HPH-trykkene er markert med forskjellige gråtoner forklart til høyre i figuren.

Grønnkålemulsjoner uten trykkbehandling og de trykkbehandlet ved 200 bar viser liten forskjell i viskositet. Emulsjon behandlet ved 1500 bar har høyere viskositet enn de to andre, men gir ikke signifikant effekt ($p = 0,055$). Resultatene fra viskositetsmåling i grønnkål er vist i figur 14.

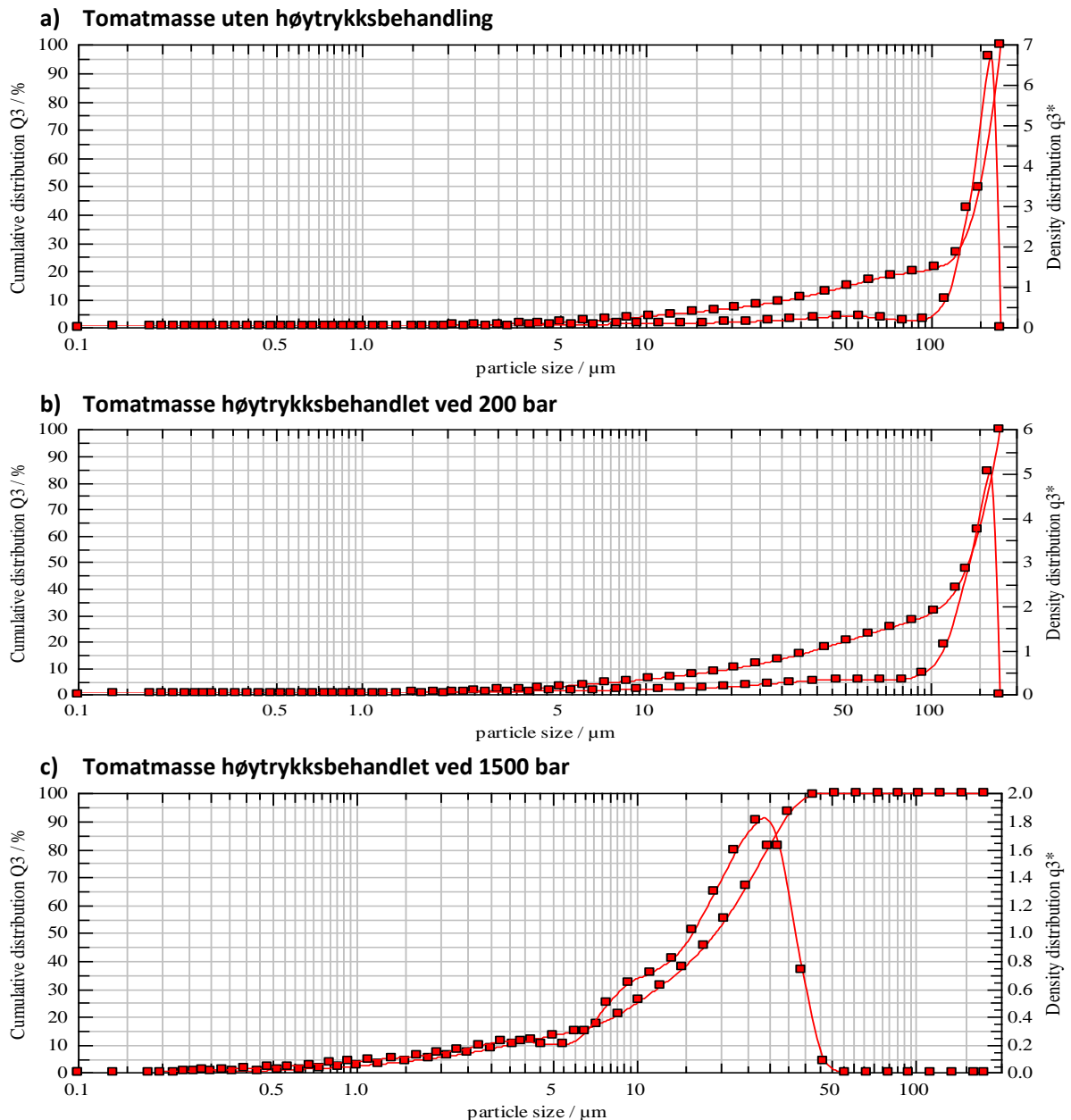


Figur 14 - Viskositetsmåling av grønnkålemulsjoner før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk grønnkål med 10 % rapsolje. Y-aksen viser viskositet målt i centipoise (cP), mens de ulike trykkbehandlingene er markert med forskjellige gråtoner forklart til høyre i figuren.

I forsøk 1 virket alle de kategoriske variablene inn på viskositet, mens ingen av variablene viste signifikant effekt på viskositeten i forsøk 2.

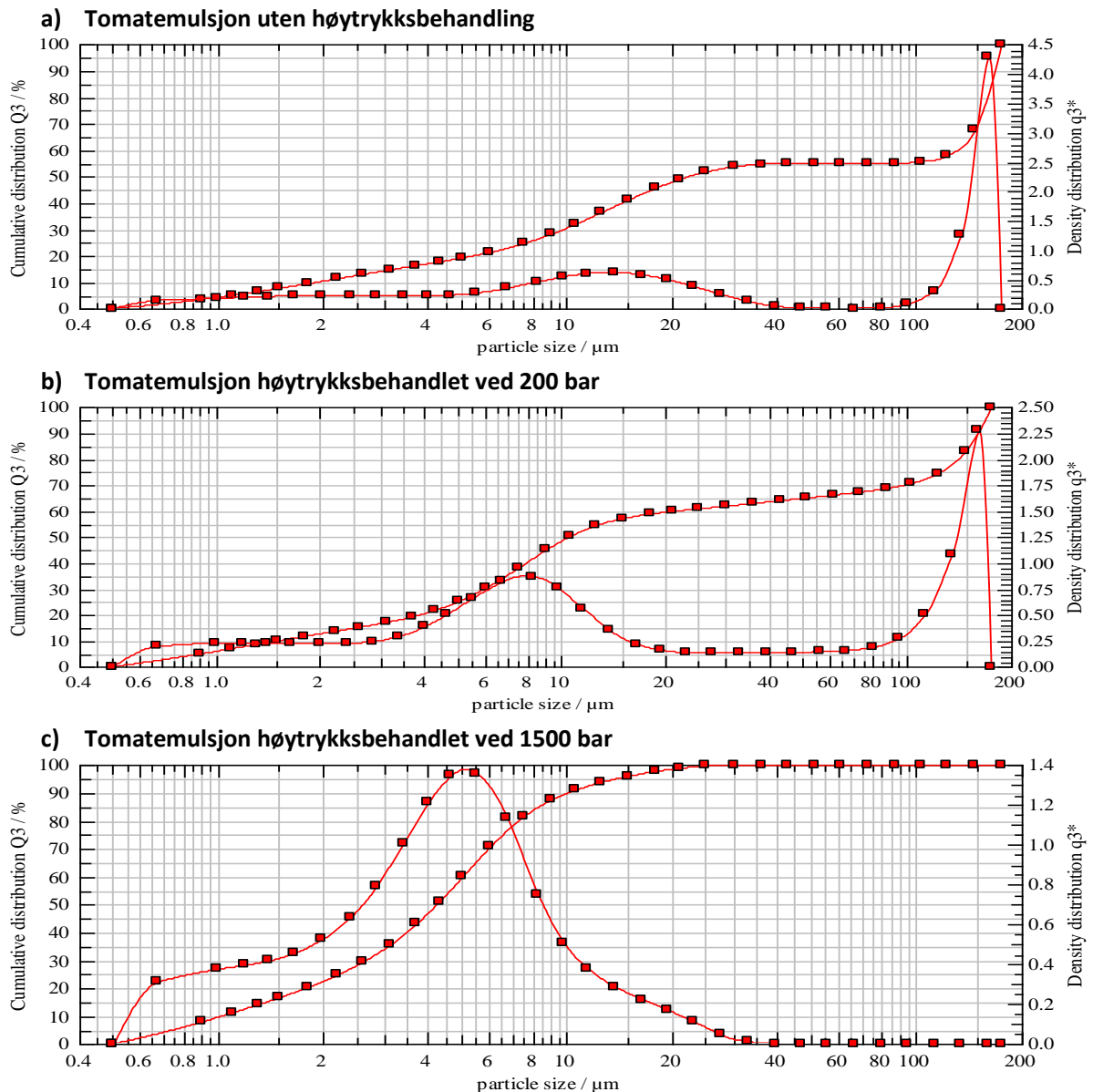
4.3. Partikkelstørrelse i grønnsaksemulsjoner

I tillegg til å måle partikkelstørrelse for alle emulsjonene i forsøk 1 og 2, ble det gjort målinger for tomatmogenat uten tilsatt olje for å kunne skille tomatpartikler fra oljedråper i tomatemulsjonene. Medianverdi for partiklene i tomatmogenat før HPH (figur 15a) og etter HPH ved 200 bar (figur 15b) ble målt til over hundre mikrometer (μm). HPH ved 1500 bar (figur 15c) ga redusert tomatpartikkelstørrelse, med medianverdi på 19,22 μm .



Figur 15 – Partikkelstørrelsesmålinger for tomatmasse uten tilsatt olje, a) uten trykkbehandling og trykkbehandlet ved b) 200 bar og c) 1500 bar. Y-aksen viser hhv. volumtetthetsfordeling og kumulativ fordeling, mens x-aksen viser partikkelstørrelse angitt i mikrometer (μm).

Av plassmessige hensyn er ikke alle diagrammene for partikkelstørrelsesmåling, men medianverdien for partikkelstørrelse i de ulike emulsjonene er presentert i stolpediagram i avsnitt 4.3.1. Verdiene som er vist i stolpediagrammet er gjennomsnittet av tre påfølgende målinger. Standardavvik er ikke tatt med, da disse målingene ikke kan regnes som replikater. Figur 16 viser et eksempel på hvordan diagrammene for partikkelstørrelse i emulsjonene så ut (emulsjon basert på fersk klasetomat).

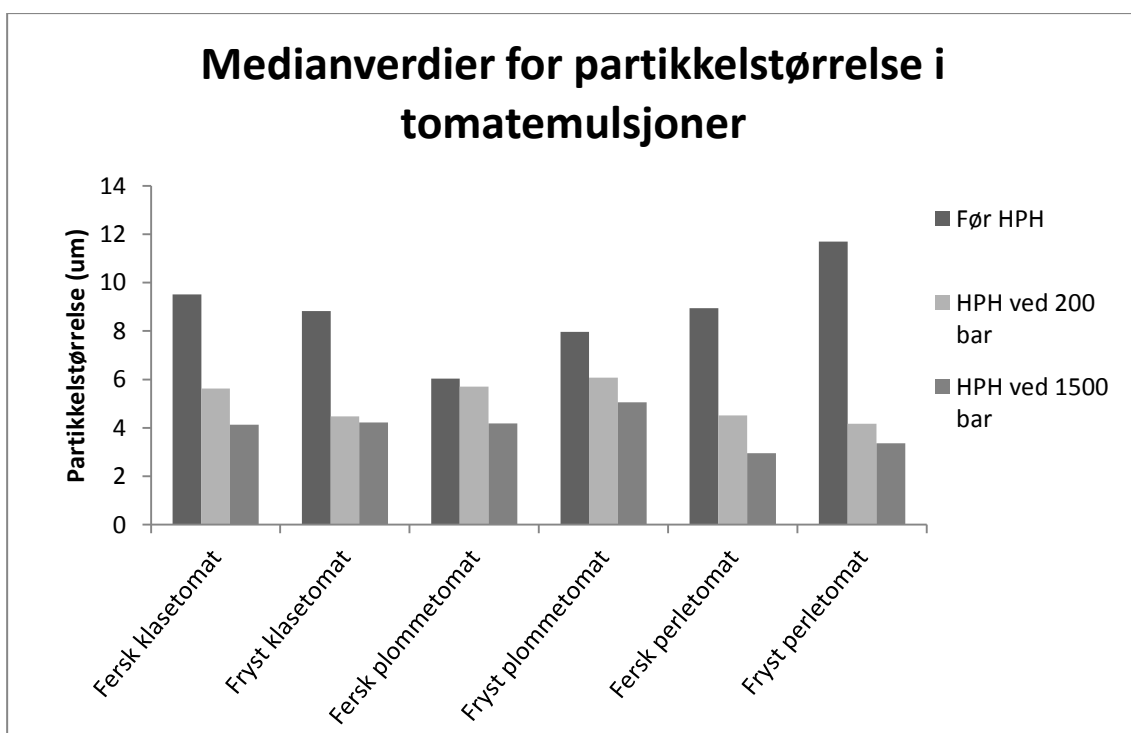


Figur 16 - Partikkelstørrelsesmålinger for klasetomatemulsjoner, a) uten trykkbehandling og trykkbehandlet ved b) 200 bar og c) 1500 bar. Y-aksen viser hhv. volumtetthetsfordeling og kumulativ fordeling, mens x-aksen viser partikkelstørrelse angitt i mikrometer (μm).

Tomathomogenatet i figur 15 og emulsjonen i figur 16 er begge laget av fersk klasetomat. Sistnevnte figur viser den dominerende partikkelstørrelsen i ren tomatmasse ikke overlapper med partikkelstørrelsene i emulsjonen. Mest sannsynlig utgjør derfor ikke tomatpartiklene noen stor andel av målingen.

4.3.1. Partikkelstørrelse i høytrykkshomogeniserte tomatemulsjoner – forsøk 1

Før trykkbehandling viste emulsjonene en partikkelstørrelse som varierte mellom 8,43 μm og 11,75 μm . HPH ved 200 bar ga signifikant reduksjon av partikkelstørrelsen til 4,17-5,63 μm . Ytterligere økning i homogeniseringstrykk til 1500 bar viste videre reduksjon til 2,93-4,02 μm ($p = 0,001$). Det var ingen signifikant forskjell mellom bruk av homogeniseringstrykk ved 200 bar og 1500 bar. Bruk av ulike sorter eller bruk av fersk og fryst råvare ga ingen signifikant effekt på partikkelstørrelsen. Resultater for partikkelstørrelse i forsøk 1 er vist i figur 17.

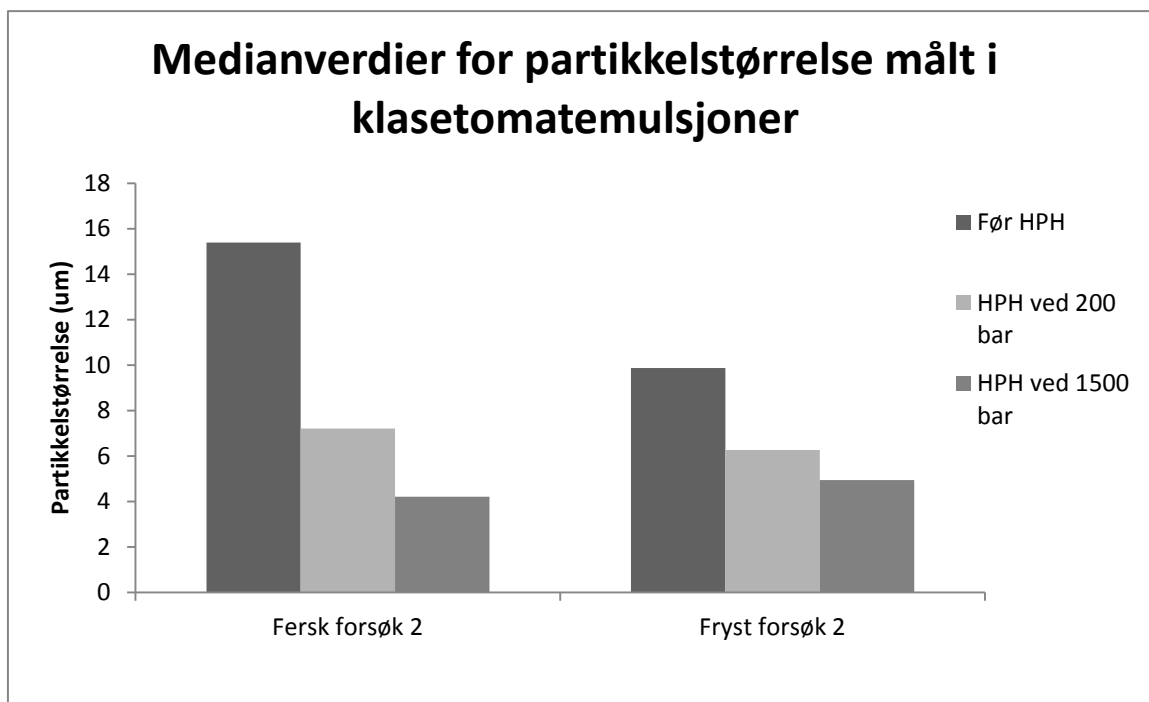


Figur 17 – Medianverdi for partikkelstørrelse i tomatemulsjoner før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klase-, plomme eller perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser partikkelstørrelse målt i mikrometer (μm), mens de ulike trykkbehandlingene er markert med ulike gråtoner forklart til høyre i figuren. Verdiene som er vist i stolpediagrammet er gjennomsnittet av tre påfølgende målinger. Standardavvik er ikke tatt med, da disse målingene ikke kan regnes som replikater.

4.3.2. Partikkelstørrelse i høytrykkshomogeniserte klasetomat- og grønnkålemulsjoner – forsøk 2

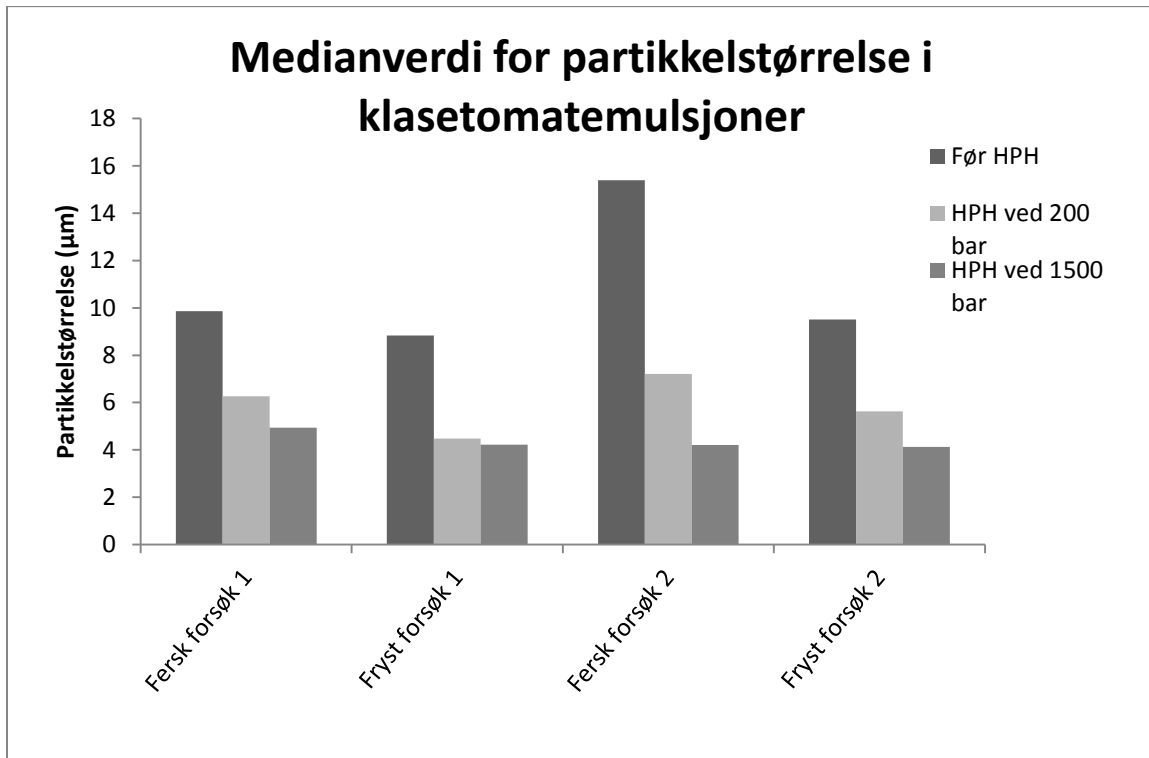
Det var en klar tendens til redusert partikkelstørrelse som resultat av HPH trykk i klasetomatemulsjonene i forsøk 2 (figur 18), men effekten var ikke signifikant ($p < 0,08$).

Homogeniseringstrykk ved 200 bar ga redusert partikkelstørrelse fra 15,4 μm i fersk klasetomat og 9,8 μm i fryst klasetomat, til hhv. 7,2 μm og 6,26 μm . HPH ved 1500 bar ga ytterligere reduksjon i partikkelstørrelse til 4,2 μm i fersk klasetomat og 4,9 μm i fryst klasetomat. Det ble heller ikke funnet signifikant effekt av fersk eller fryst råvare på partikkelstørrelse i klasetomatemulsjonene.



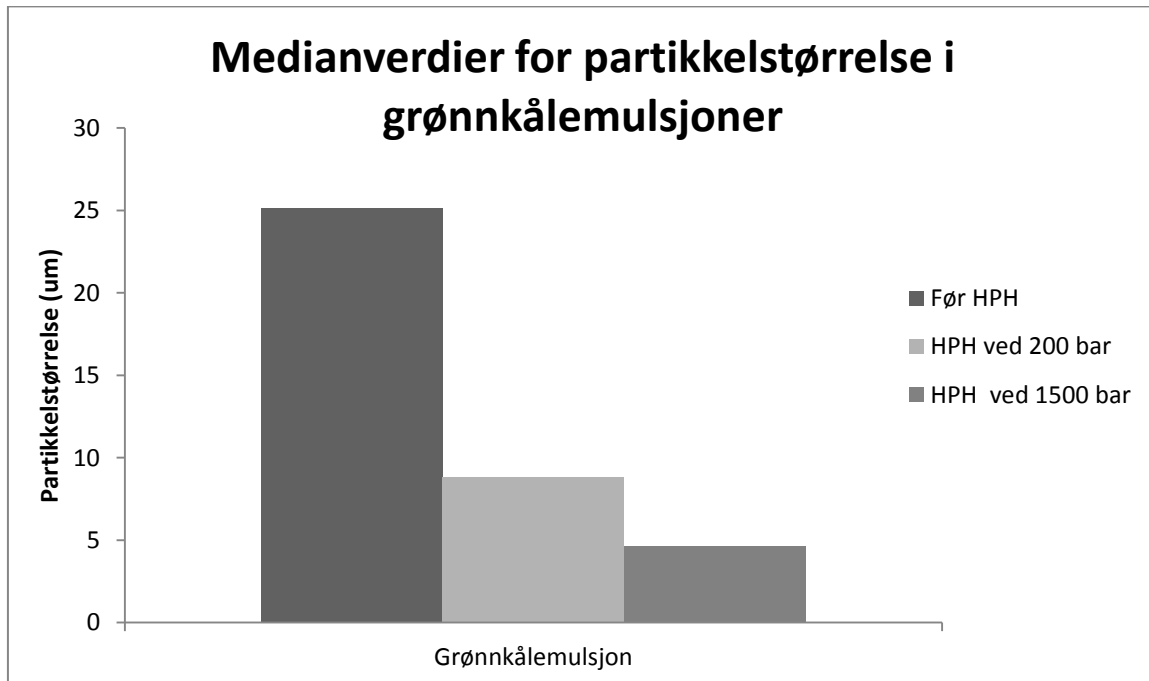
Figur 18 – Medianverdi for partikkelstørrelse i klasetomatemulsjoner før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. De ulike trykkbehandlingene er markert med forskjellige gråtoner, forklart til høyre i figuren. Y-aksen viser partikkelstørrelse målt i mikrometer (μm).

For å sammenligne resultatene fra forsøk 1 og 2 er partikkelstørrelse i klasetomatemulsjoner fra begge forsøk, plottet i samme diagram (figur 19). Resultatene fra de to forsøkene ligger relativt likt med unntak av fersk klasetomatemulsjon før HPH, der forsøk 2 hadde større oljedråper enn de andre emulsjonene som ikke ble høytrykksbehandlet.



Figur 19 – Medianverdi for partikkelstørrelse i klasetomatemulsjoner fra forsøk 1 og 2, før HPH og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser partikkelstørrelse målt i mikrometer (µm), mens de ulike trykkbehandlingene er markert med forskjellige gråtone forklart til høyre i figuren. Verdiene som er vist i stolpediagrammet er gjennomsnittet av tre påfølgende målinger. Standardavvik er ikke tatt med, da disse målingene ikke kan regnes som replikater.

Partikkelstørrelsen i grønnkålemulsjoner var relativt mye større enn for tomatene før HPH, med en median på 25,2 μm . Etter HPH viste partiklene en reduksjon i størrelse ($p = 0,001$), men ga fortsatt noe høyere tall enn for tomatene. Emulsjoner behandlet ved 200 bar hadde partikkelstørrelse på 8,8 μm og 1500 bar 4,7 μm . Resultatene (figur 20) viser i likhet med tomatemulsjoner at økt trykk ved høytrykkshomogenisering virker reduserende på partikkelstørrelsen.



Figur 20 - Medianverdi for partikkelstørrelse i grønnkålemulsjoner før HPH, og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk grønnkål med 10 % rapsolje. Y-aksen viser partikkelstørrelse målt i mikrometer (μm), mens de ulike trykkbehandlingene er markert med forskjellige gråtoner forklart til høyre i figuren. Verdiene som er vist i stolpediagrammet er gjennomsnittet av tre påfølgende målinger. Standardavvik er ikke tatt med, da disse målingene ikke kan regnes som replikater.

For alle emulsjonene ga trykkbehandling reduksjon i partikkelstørrelsen, men denne effekten var ikke alltid signifikant. Ytterligere trykkøkning ga videre reduksjon i partikkelstørrelse for alle emulsjoner. Partikkelstørrelse i grønnkålemulsjonene etter HPH er noe større enn hos tomat, mens størrelsen før HPH viser en medianverdi som er 10 μm høyere enn hos oljedråpene i tomatemulsjon.

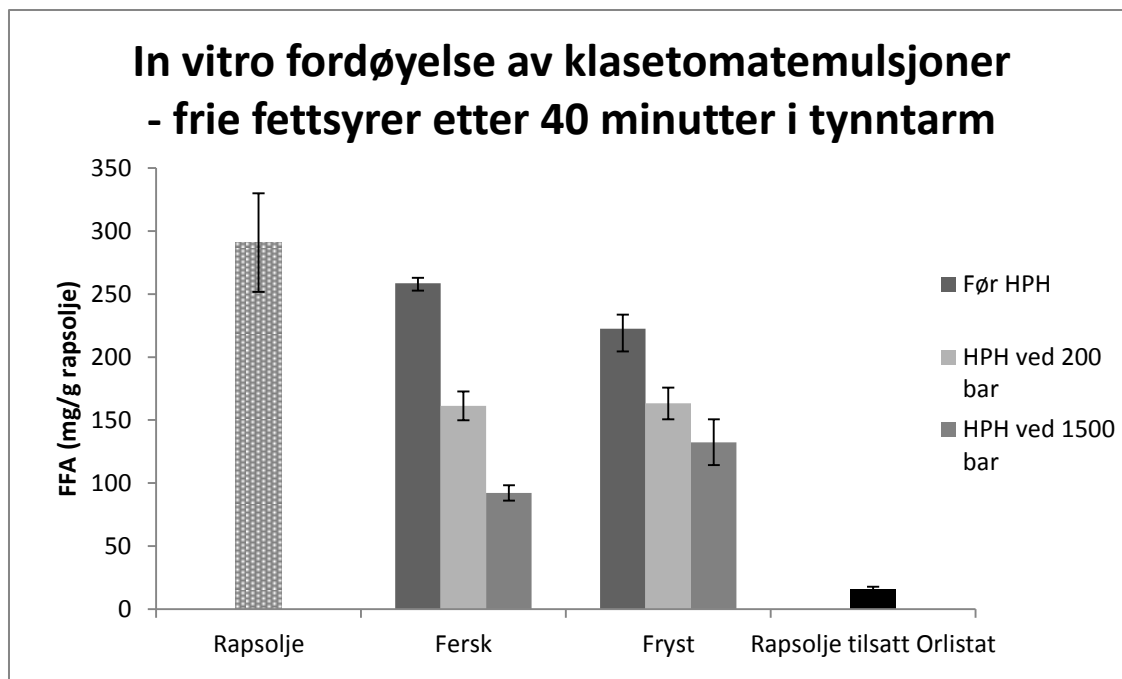
4.4. *In vitro* fordøyelse av grønnsaksemulsjoner og effekter på lipaseaktivitet

In vitro fordøyelse ble gjort for høytrykkshomogeniserte tomatemulsjoner av fersk og fryst klase-, plomme-, og perletomater (forsøk 1), samt grønnkålemulsjon. Da det ikke ble funnet noen forskjell i fettfordøyelse for de ulike tomatsortene, ble klasetomat valgt ut til gjentak av forsøket (forsøk 2). Resultatene er vist i de tre avsnittene under.

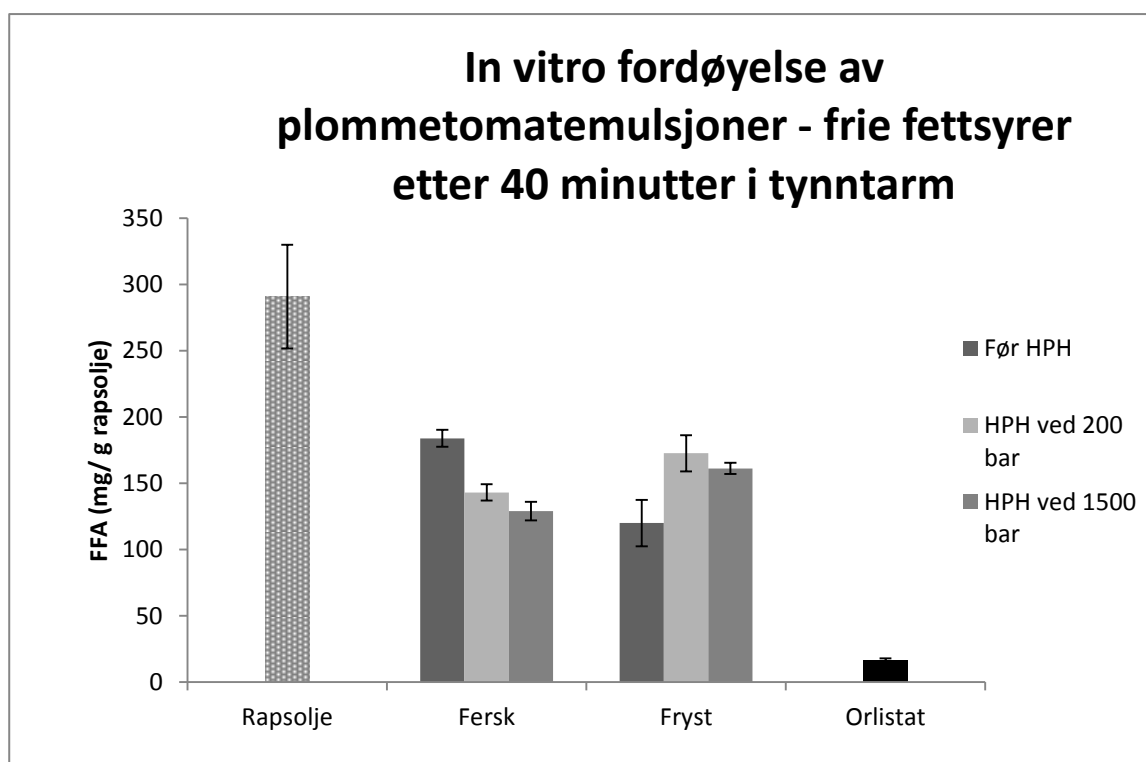
4.4.1. *In vitro* fordøyelse av høytrykkshomogeniserte emulsjoner av ulike sorter tomat – forsøk 1

Alle emulsjonene viste en økning i FFA etter 40 min i tynntarm (duodenalfasen). I tomatemulsjoner før HPH økte FFA til 119-258 mg FFA per gram rapsolje. Etter HPH ved 200 bar økte det til et noe lavere nivå, 142,9-172,5 mg FFA/g olje, men forskjellen var ikke signifikant. Videre økning i homogeniseringstrykk til 1500 bar ga ytterligere reduksjon til 92,2-161,1 mg FFA per gram olje. HPH ved 1500 bar ga signifikant lavere nivå av FFA enn emulsjonene før HPH ($p = 0,02$). Figur 21 viser resultater for emulsjoner produsert av klasetomat, mens figur 22 og 23 viser resultater fra plomme- og perletomatemulsjoner.

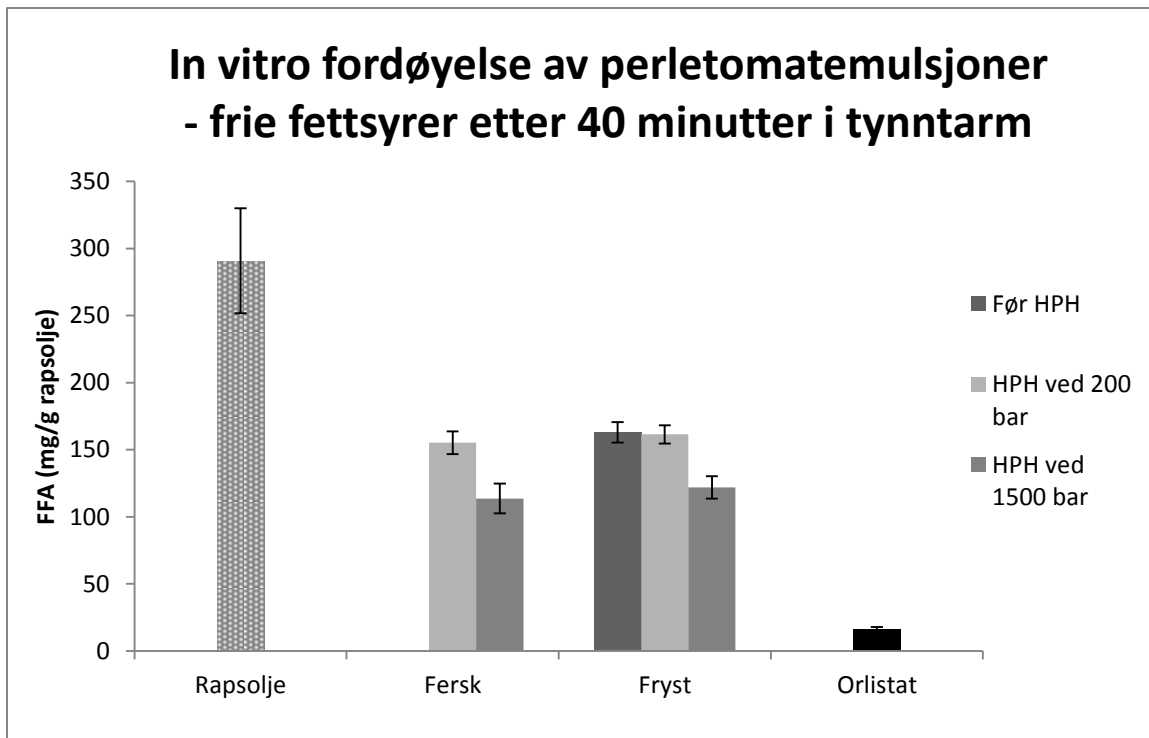
Søylene helt til høyre og helt i venstre i diagrammene viser resultater fra fordøyelse av rapsolje hhv. med og uten Orlistat. Rapsoljen hadde en FFA-konsentrasjon på i underkant av 300 mg/g olje etter 40 minutter. Alle tomatemulsjonene med unntak av fersk klasetomat før HPH, ga signifikant reduksjon i FFA sammenlignet med ren rapsolje ($p < 0,001$). Orlistat viste i midlertid den kraftigste reduksjonen i frigivelse av fettsyrer med kun 15,7 mg FFA per gram olje etter 40 minutter duodenalfase, og ga signifikant reduksjon sammenlignet alle de andre prøvene ($p < 0,001$). Bruken av fersk og fryst råvare eller ulik tomatsort ga ingen signifikant effekt på fettfordøyelsen.



Figur 21 - *In vitro* fettfordøyelse av klasetomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 og 1500 bar, og rapsolje og rapsolje tilsatt Orlistat. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser antall milligram (mg) fettsyrer frigjort (FFA) per gram rapsolje i emulsjonene.



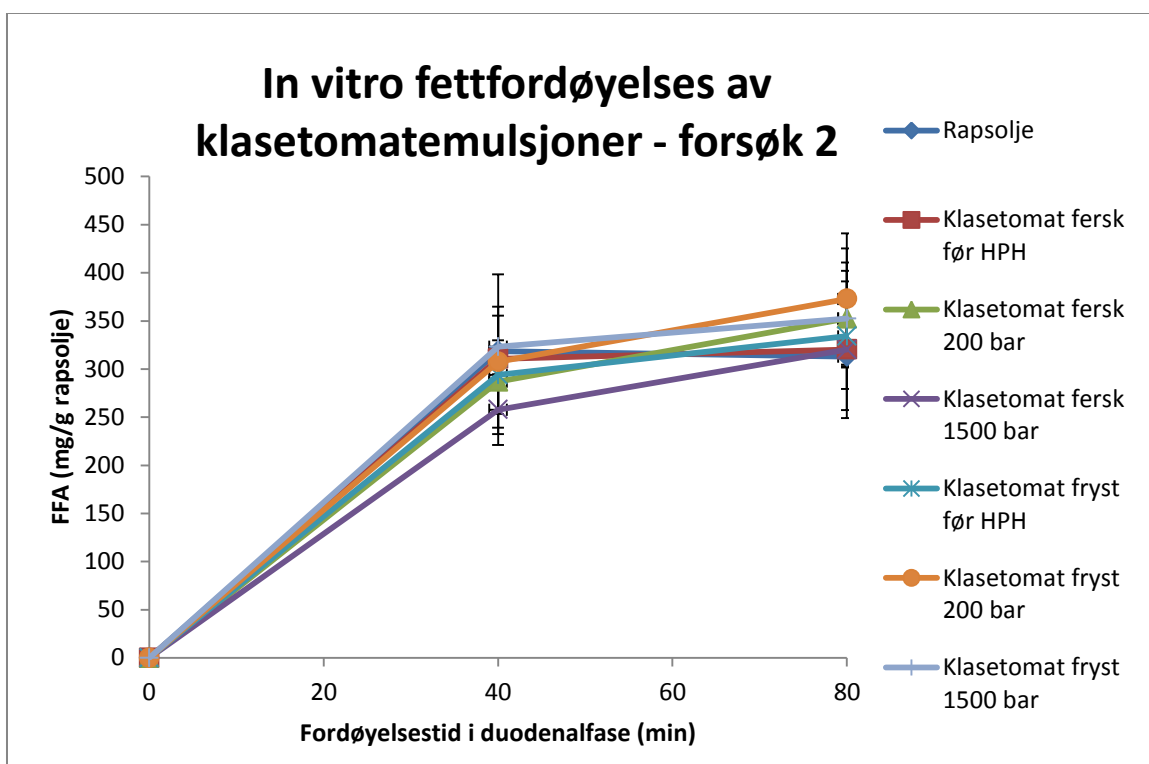
Figur 22 - *In vitro* fettfordøyelse av plommetomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 og 1500 bar, og rapsolje og rapsolje tilsatt Orlistat. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst plommetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser antall milligram (mg) fettsyrer frigjort (FFA) per gram rapsolje i emulsjonene.



Figur 23 - *In vitro* fettfordøyelse av perletomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 og 1500 bar, og rapsolje og rapsolje tilsatt Orlistat. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser antall milligram (mg) fettsyrer frigjort (FFA) per gram rapsolje i emulsjonene.

4.4.2. *In vitro* fordøyelse av høytrykkshomogeniserte klasetomat- og grønnkålemulsjoner - forsøk 2

I forsøk 2 ble det utført et nytt forsøk med *in vitro* fordøyelse av klasetomatemulsjoner, og fordøyelsen ble fulgt i 80 min. I motsetning til forsøk 1, der hemming av fettfordøyelsen ble funnet, ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom de ulike emulsjonene, fra fryst og fersk tomat og ulike HPH trykk, og rapsoljen i dette forsøket (figur 24). Etter 40 minutter duodenalfordøyelse var nivået av FFA i prøvene økt til 257,8-323,2 mg/ g rapsolje og ved 80 minutter duodenalfordøyelse til 320,1-372,8 mg/ g rapsolje, uavhengig om rapsoljen var emulgert inn i tomatemulsjon eller forelå som ren olje.

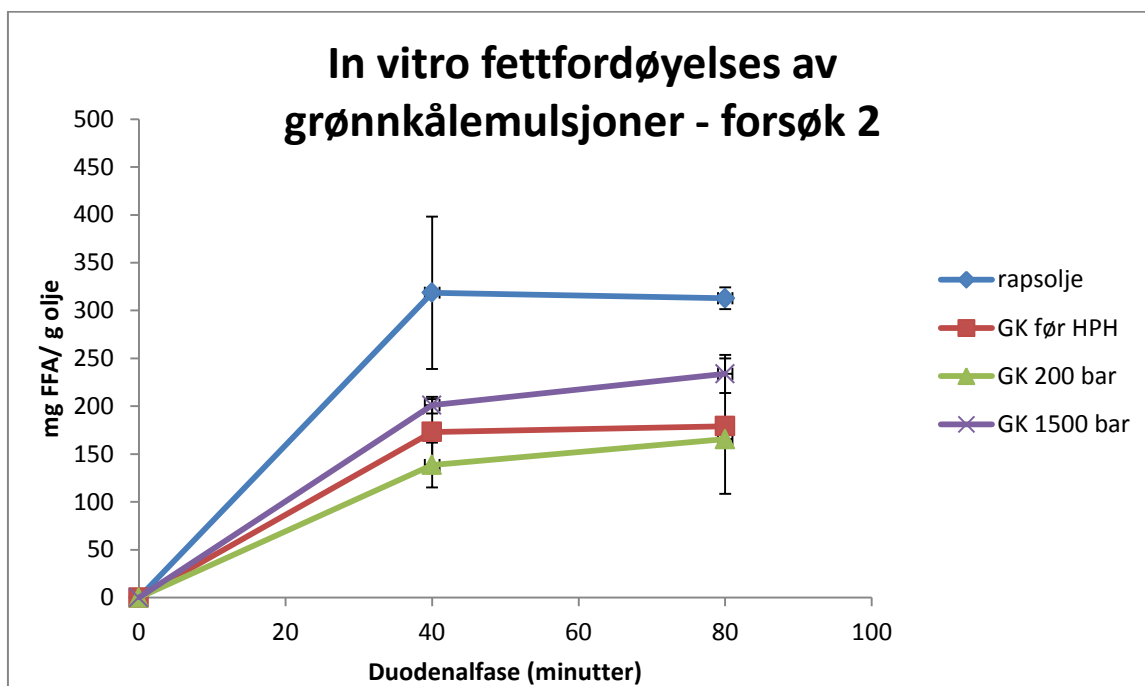


Figur 24 - *In vitro* fettfordøyelse av rapsolje og klasetomatemulsjoner med 10 % rapsolje før og etter HPH ved 200 og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat. Y-aksen viser antall milligram (mg) frie fettsyrer (FFA) frigjort per gram rapsolje i emulsjonene. X-aksen viser fordøyelsestid i duodenalfasen målt i minutter.

Etter 40 minutter duodenalfordøyelse viste grønnkålemulsjon før HPH FFA på 173,1 mg/g olje, mens HPH ved 200 bar ga reduksjon til 138,5 mg FFA/g olje. Denne effekten var ikke signifikant. Økning i trykk til 1500 bar ga økt frigivelse til 201,1 mg FFA/g rapsolje. Emulsjoner HPH ved 200 bar og emulsjoner HPH ved 1500 bar viser stor forskjell, men ikke

nok til å være signifikant ($p = 0,055$). Duodenalfordøyelse etter 80 minutter ingen signifikante forskjeller i FFA som resultat av HPH trykk.

Duodenalfordøyelse av rapsolje i 40 minutter og 80 minutter, ga i begge tilfeller i overkant av 300 mg frigitt FFA/g rapsolje. Etter 40 minutter viste emulsjon behandlet ved 200 bar reduksjon i frigivelse av FFA, men effekten var ikke signifikant ($p = 0,064$). Emulsjoner HPH ved 200 bar ($p = 0,001$) og 1500 bar ($p = 0,025$) viste signifikant reduksjon i frigivelse av FFA etter 80 minutter duodenalfordøyelse. Resultatene fra forsøket er vist i figur 25.



Figur 25 - *In vitro* fettfordøyelse av rapsolje og grønnkålemulsjoner med 10 % rapsolje før og etter HPH ved 200 og 1500 bar.. Y-aksen viser antall milligram (mg) frie fettsyrer (FFA) frigjort per gram rapsolje i emulsjonene. X-aksen viser fordøyelsestid i duodenalfasen målt i minutter.

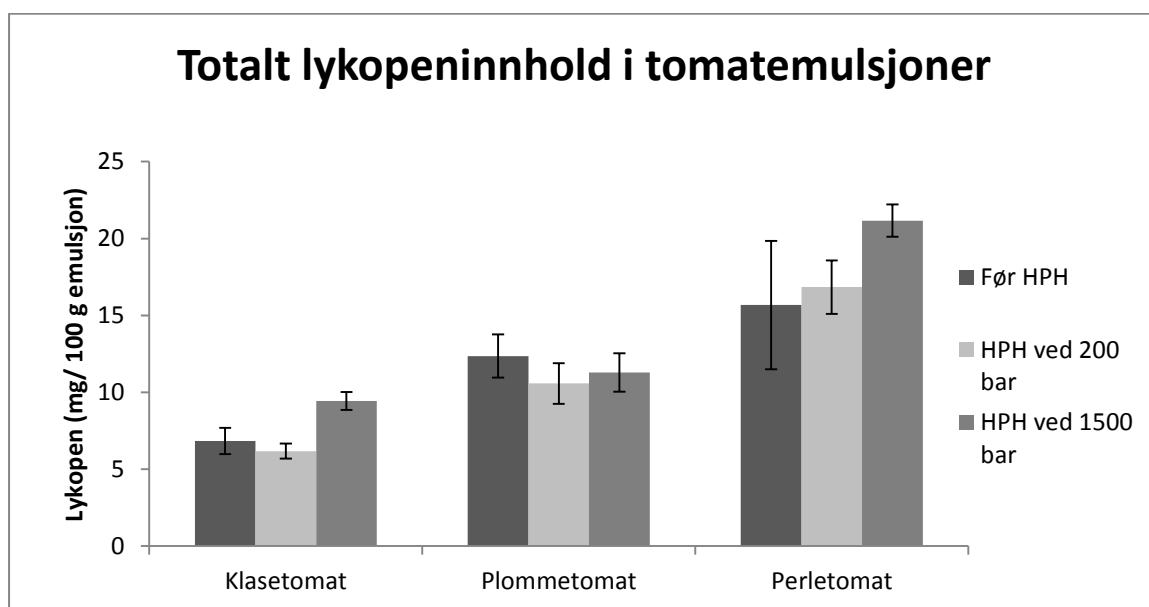
Tomatemulsjoner fra forsøk 1 og grønnkålemulsjoner fra forsøk 2 viste klar hemming i fettfordøyelse, mens emulsjoner av klasetomat i forsøk 2 ikke ga tilsvarende hemming av fettfordøyelse. Dette viser at disse grønnsakene inneholder naturlige lipaseinhibitorer, men at det kan være varierende mengde inhibitorer tilstede i ulike sorter eller ulik modningsgrad.

4.5. Innhold av lykopen og β -karoten i tomatemulsjoner og emulsjonens fettfase

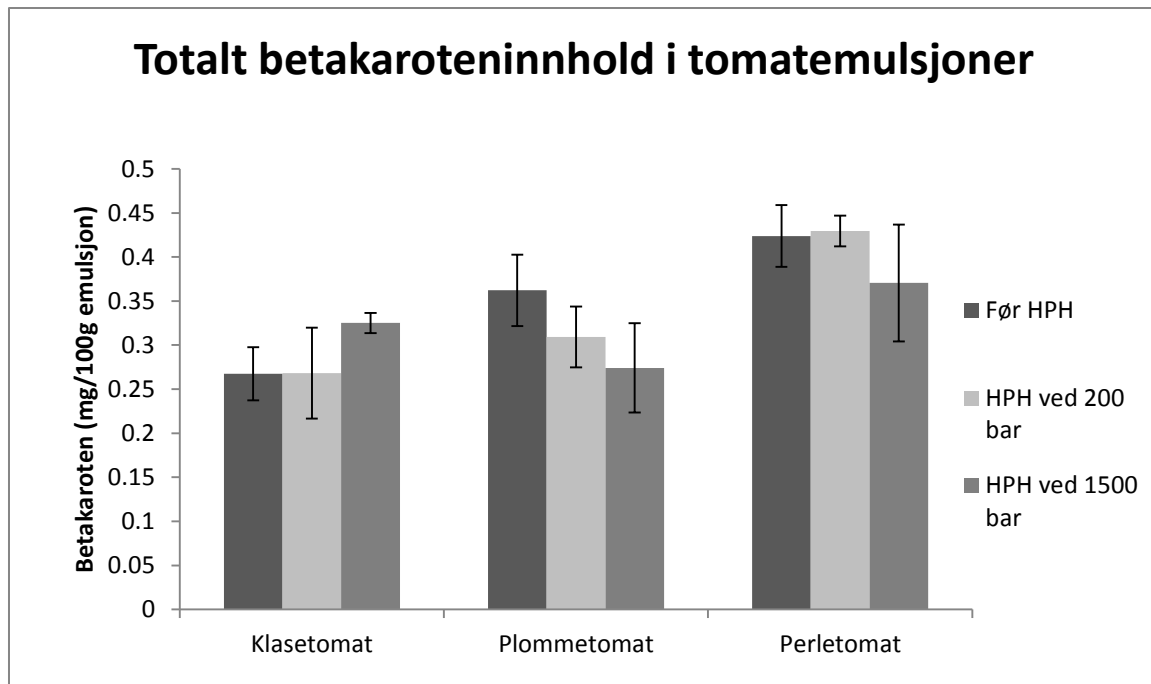
Dette avsnittet viser resultater fra målinger av lykopen og β -karoten i tomatemulsjoner fra forsøk 1, samt mengde av karotenoider i fettfase isolert fra de ulike emulsjonene i forsøk 1 og forsøk 2. Det ble ikke gjort karotenoidmålinger for grønnkålemulsjoner. Ettersom ingen av forsøkene viste signifikant forskjell i karotenoidkonsentrasjon hos emulsjoner laget av ferske eller fryste tomater, ble disse to slått sammen i resultatdelen.

4.5.1. Totalt karotenoidinnhold i tomatemulsjoner – forsøk 1

Mengde karotenoider i de ulike tomatemulsjonene varierte, lykopen varierte mellom 6,2-21,2 mg/100 g emulsjon (figur 26) og β -karoten mellom 0,27-0,43 mg/100 g emulsjon (figur 27). Emulsjoner laget av perletomat viste signifikant høyere innhold av lykopen ($p = 0,005$) og β -karoten ($p = 0,002$), enn emulsjoner laget av klasetomat. Lykopeninnholdet i plommetomat var ikke signifikant forskjellig fra de to andre sortene, mens β -karoteninnholdet var signifikant lavere i plomme enn hos perletomat ($p = 0,002$). Homogeniseringstrykk og bruken av ferske eller fryste tomater hadde ingen signifikant effekt på innholdet av lykopen og β -karoten i tomatemulsjonene.



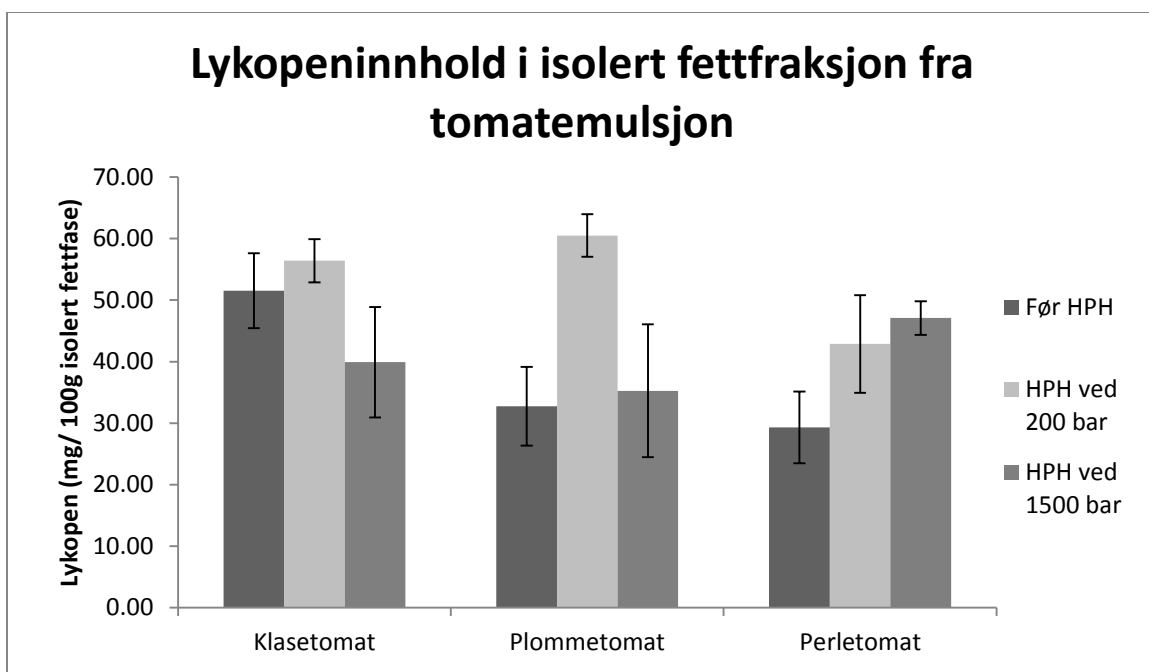
Figur 26 – Totalt lykopeninnhold i tomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klase-, plomme eller perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde lykopen målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.



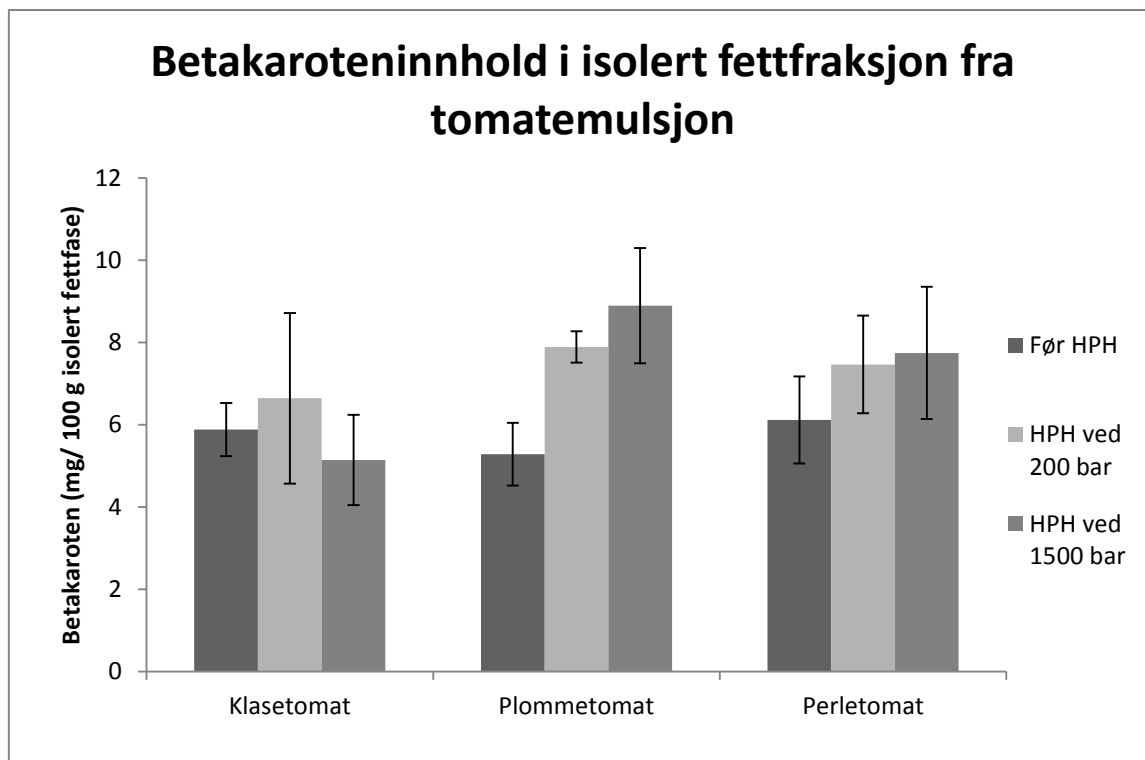
Figur 27 – Totalt β -karoteninnhold i tomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klase-, plomme eller perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde β -karoten målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.

4.5.2. Karotenoidinnhold i isolert fettfraksjon – forsøk 1

Fettfraksjon ble isolert fra emulsjonene og analysert for karotenoidinnhold. Resultatene viste at lykopenkonsentrasjonen varierte mellom 29,3-60,5 mg/ 100 g fett (figur 22) og β -karotenkonsentrasjonen varierte mellom 5,1-8,9 mg/ 100 g fett (figur 23) i de ulike tomatemulsjonene. ANOVA viste ingen effekt av homogeniseringstrykk eller tomatsorter på mengden karotenoider i fettfraksjonen. Det er imidlertid en klar trend at karotenoidkonsentrasjonen i fettfasen (oljedråpene) øker når uhomogenisert emulsjon (før HPH) homogeniseres ved 200 bar.



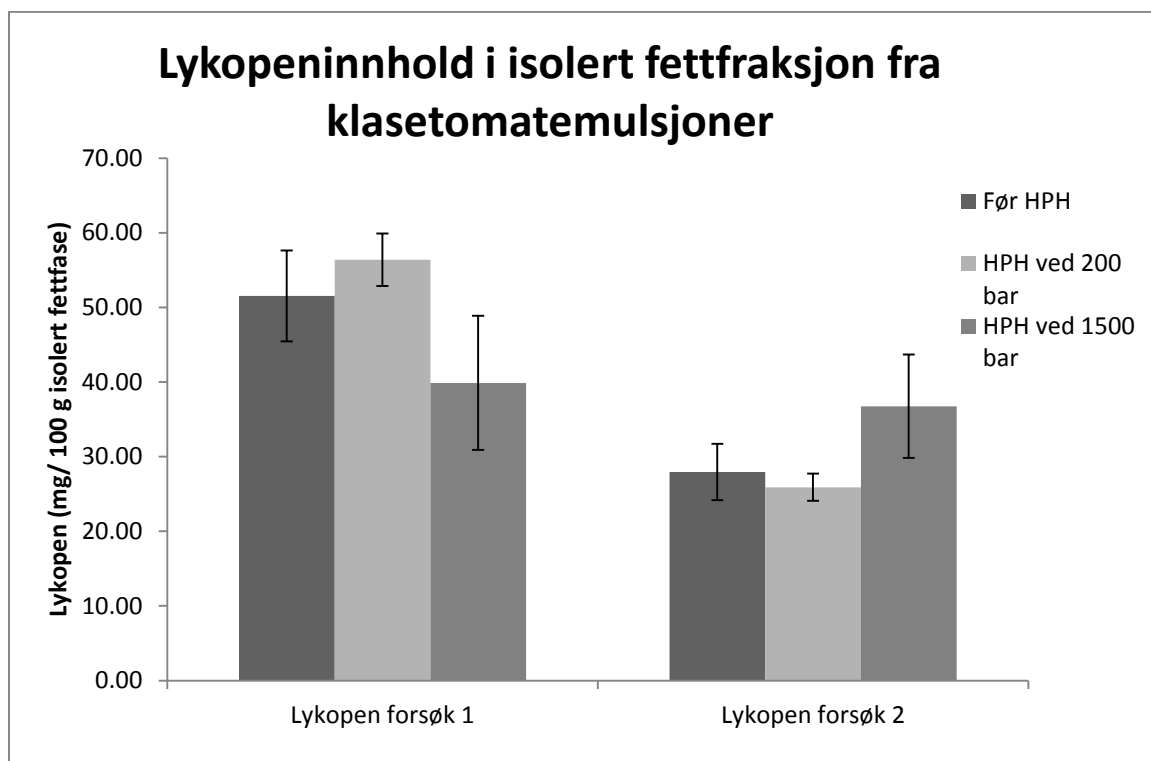
Figur 28 – Lykopeninnhold i fettfraksjonen til tomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klase-, plomme eller perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde lykopen målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.



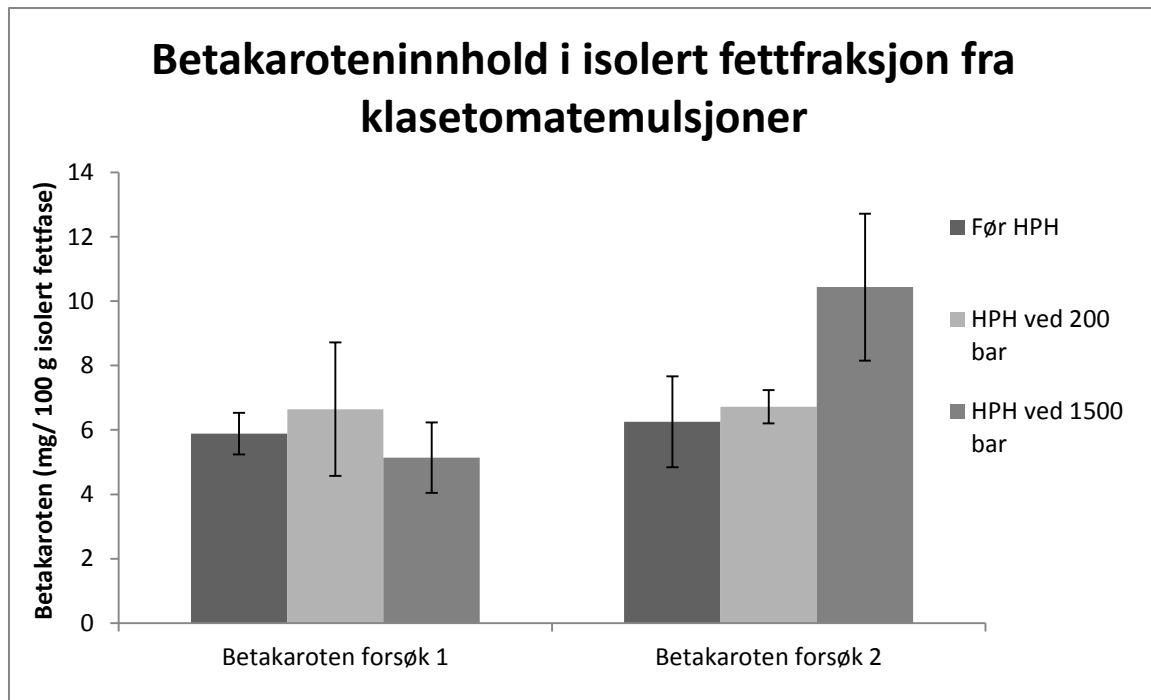
Figur 29 – β -karoteninnhold i fettfraksjonen til tomatemulsjoner før og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klase-, plomme eller perletomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde β -karoten målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.

4.5.3. Karotenoidinnhold i isolert fettfraksjon for klasetomatemulsjoner fra forsøk 2

I dette delkapittelet er resultatene fra forsøk 1 og 2 framstilt i samme diagram (figur 30 og 31). Forsøk 2 viste, i motsetning til forsøk 1, at HPH ga økt innhold av β -karoten i fettfasen. Innholdet av β -karoten var 1.7 ganger høyere i 1500 bar emulsjonen (10.4 mg/100 g fett) enn uten HPH behandling (6.3 mg/100 g fett), og effekten var signifikant ($p = 0,035$). Nivået av lykopen økte 1.3 ganger etter HPH ved 1500 bar, men økningen var ikke signifikant. Det ble heller ikke funnet noen økning i frigjøringen av karotenoider til fettfasen ved bruk av det laveste HPH trykket på 200 bar.



Figur 30 – Lykopeninnhold i fettfraksjonen til klasetomatemulsjoner fra forsøk 1 og 2, før og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde lykopen målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.



Figur 31 – β -karoteninnhold i fettfraksjonen til klasetomatemulsjoner fra forsøk 1 og 2 før HPH og etter HPH ved 200 bar og 1500 bar. Emulsjonene ble produsert av fersk og fryst klasetomat med 10 % rapsolje. Y-aksen viser mengde lykopen målt i milligram per 100 gram tomatemulsjon. De ulike trykkbehandlingene er markert i ulike gråtoner forklart til høyre i figuren.

Økt andel karotenoider i emulsjonens fettfase anses som økt tilgjengelighet, da disse blir gjort mer tilgjengelig for opptak i tarmen. Mengden karotenoider som går over i fettene kalles derfor her tilgjengelig karotenoider.

Ved å beregne andelen karotenoider som frigjøres fra matrisen og løses ut i fettfasen kan man si noe om effekten av emulsjonsproduksjon og HPH på tilgjengeligheten. Formelen under ble brukt for å beregne prosentvis tilgjengelighet, der resultatene er vist i tabell 5.

$$\begin{aligned} & \% \text{ tilgjengelige karotenoider} \\ & = \left(\frac{\text{mg karotenoider gjenfunnet per 100 g isolert fettfase}}{\text{mg karotenoider per 100 g emulsjon} * 10 \% \text{ tilsatt fett}} \right) * 100 \end{aligned}$$

Resultatene er fra forsøk 1. De ulike tomatsortene hadde i utgangspunktet ulikt innhold av både lykopen og β -karoten, men frigjorde relativt like mengder til fettfasen (figur 28 og 29).

Innholdet av β -karoten i emulsjonene var lave, og det ble derfor ikke beregnet prosentvis tilgjengelighet av disse.

Prosentvis tilgjengelighet av lykopen viste ikke sammenheng med homogeniseringstrykk, men det var en tendens til at høytrykkshomogenisering generelt frigjorde mer lykopen fra matriks, og 200 bar frigjorde den høyeste andelen av lykopen over i fettfasen. Klasetomat ga høyest andel frigjort lykopen på 91,4 % ved 200 bar. Perletomat viste relativt mye lavere tilgjengelighet av lykopen enn de to andre sortene (18.6-25.4 %), men også for denne sorten hadde HPH ved 200 bar høyest effekt. Plommetomatemulsjonene frigga på det meste ca. 60 % av lykopenet til fettfasen.

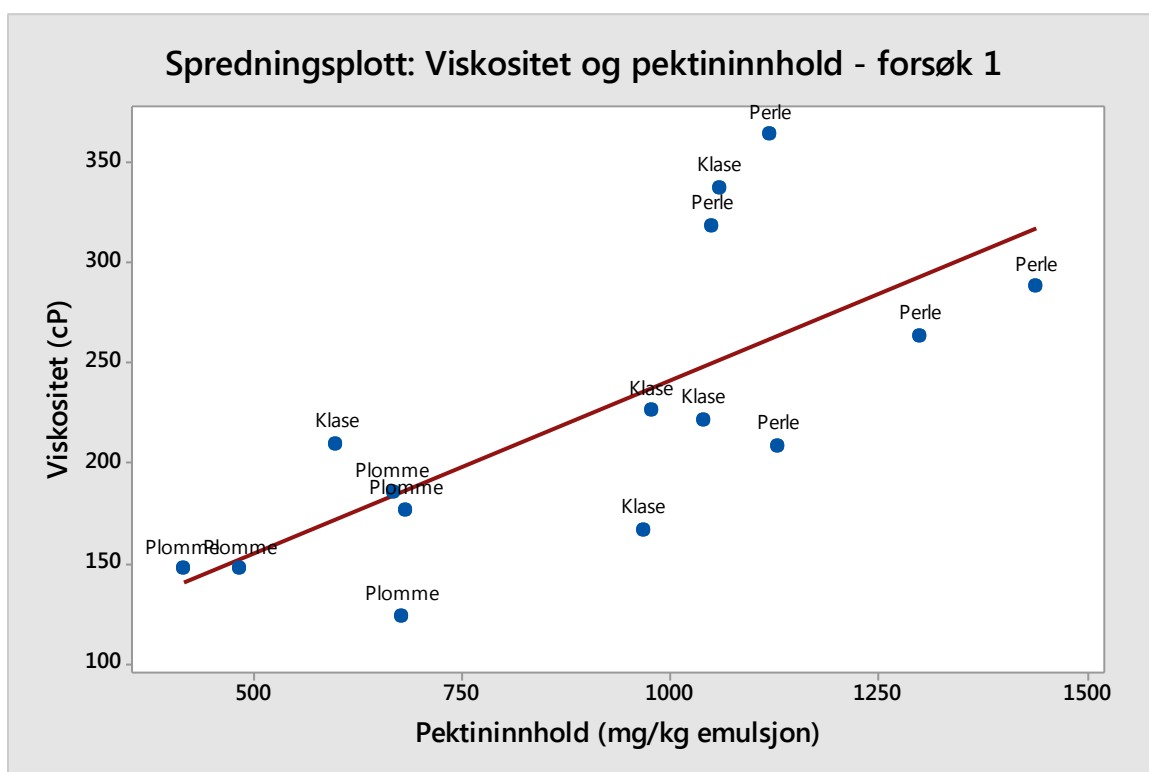
Tabell 5 – Prosentandelen av lykopen fra den totale emulsjonen som ble målt i emulsjonens fettfase.

Prosent lykopen gjenfunnet i isolert fettfase

	Før HPH	200 bar	1500 bar
Klasetomat	75,4	91,4	42,3
Plommetomat	26,5	57,2	31,2
Perletomat	18,7	25,5	22,3

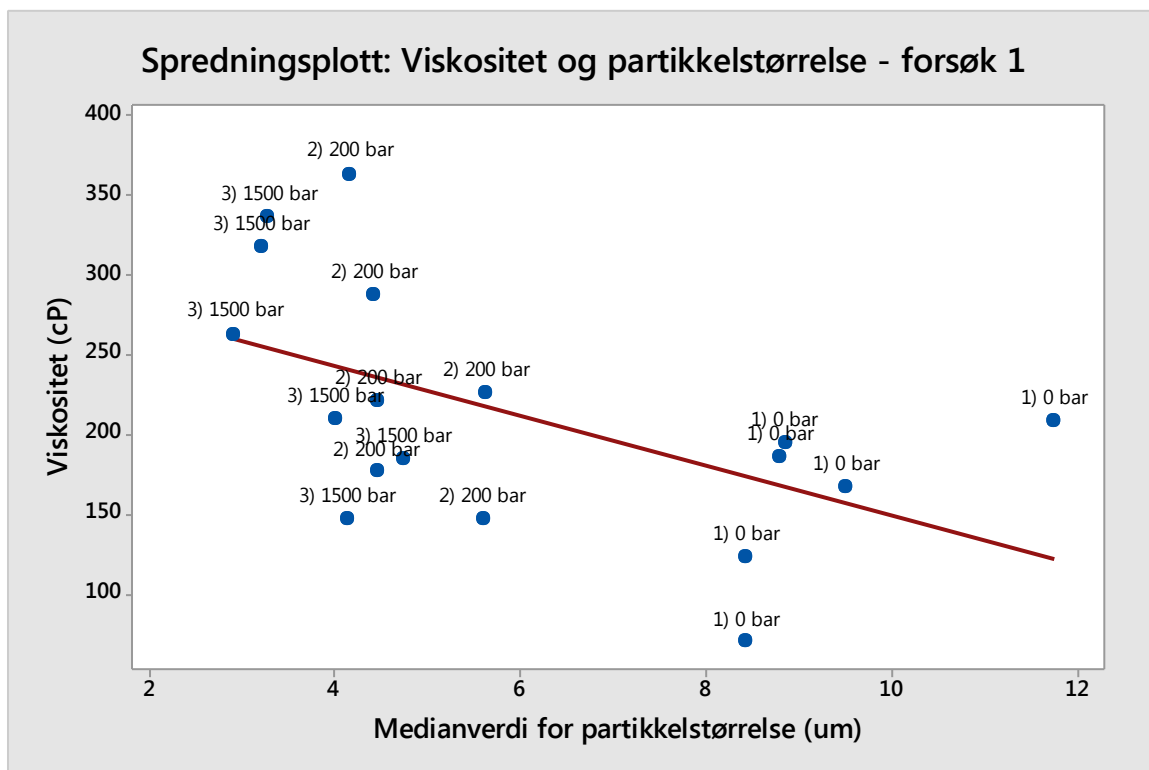
4.6. Korrelasjon mellom ulike responsvariabler

Spearman-test viste signifikant korrelasjon mellom viskositet og tomatenes totale pektininnhold ($r=0,745$, $p=0,001$). Det er i tillegg tydelige grupperinger, der plommetomat hadde lavest pektininnhold og dermed lavest viskositet. Perletomat, med høyest pektininnhold ga også høyest viskositet. Klasetomat ligger mellom de to andre tomat-sortene i både viskositet og pektininnhold. Figur 32 viser spredningsplottet mellom de to variablene.



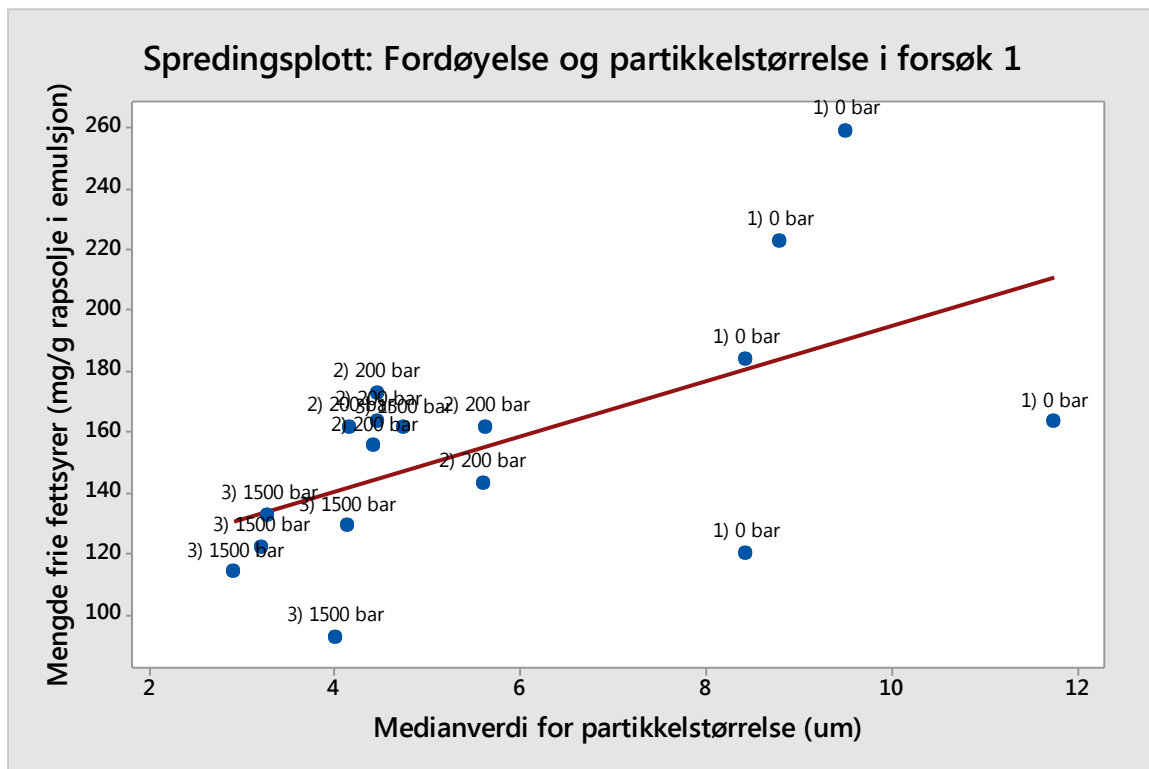
Figur 32 – Korrelasjon mellom viskositet og totalt pektininnhold tomatemulsjoner fra forsøk 1. Viskositet er markert på y-aksen målt i centipoise (cP), mens pektininnhold målt i milligram per kilo emulsjon utgjør x-aksen.

Viskositet og partikkelstørrelse viste en signifikant negativ korrelasjon ($r=-0,543$, $p=0,02$), Dette tilsier at redusert partikkelstørrelse i emulsjonene (små oljedråper) er assosiert med økt viskositet. Også her er det grupperinger, der emulsjoner før HPH viste størst dråpestørrelse og lavest viskositet. Emulsjoner behandlet ved 1500 bar viste lav partikkelstørrelse og høy viskositet, mens homogeniseringstrykk på 200 bar ga en mellomting mellom de to. Figur 33 viser spredningsplottet mellom de to variablene.



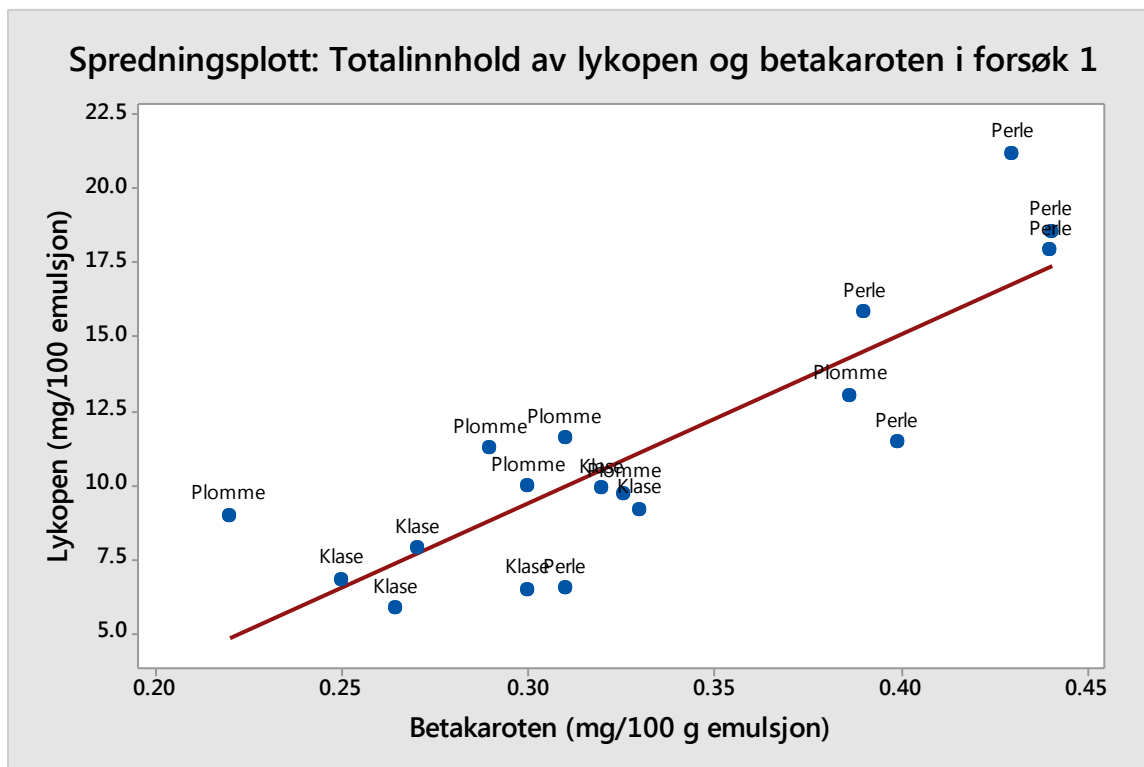
Figur 33 - Korrelasjon mellom viskositet og partikkelstørrelse i tomatemulsjoner fra forsøk 1. Viskositet er markert på y-aksen målt i centipoise (cP), mens medianverdien for partikkelstørrelse målt i mikrometer (µm) utgjør x-aksen.

Mengden frie fettsyrer frigitt ved *in vitro* fordøyelse økte med økende partikkelstørrelse ($r=0,679$, $p =0,004$). Også her virket trykk inn, og figur 34 viser at emulsjonene før HPH hadde høyest partikkelstørrelse og ga mest FFA, mens HPH ga reduksjon i partikkelstørrelse og redusert nivå av FFA.



Figur 34 - Korrelasjon mellom mengde frie fettsyrer frigitt ved *in vitro* fordøyelse og partikkelstørrelse i tomatemulsjoner fra forsøk 1. Frie fettsyrer er markert på y-aksen målt i milligram per gram rapsolje i emulsjonen, mens partikkelstørrelse målt i mikrometer utgjør x-aksen.

Spredningsplottet i figur 35 viser signifikant korrelasjon ($r=0,788$, $p = 0,001$) mellom totalinnholdet av lykopen og totalinnholdet av β -karoten i tomatemulsjoner. De ulike tomat-sortene viser grupperinger der perletomat har det høyeste innholdet av karotenoider, mens klasetomat og plommetomat har lavere og relativt likt innhold.



Figur 35 - Korrelasjon mellom totalinnhold av lykopen og β -karoten i tomatemulsjoner fra forsøk 1. Lykopen er markert på y-aksen, mens β -karotenmålinger utgjør x-aksen. Begge er målt i milligram per 100 g tomatemulsjon.

5. Diskusjon

I denne studien ble det produsert tomat- og grønnkålemulsjoner med høytrykkshomogenisering (HPH). Det ble funnet at økt homogeniseringstrykk ga reduksjon i partikkelstørrelse (oljedråpestørrelse) og økt viskositet i emulsjonene. Emulsjoner laget av ulike sorter tomat viste variasjon i viskositet, pektininnhold, og tilgjengelighet av karotenoider. Bruken av ferske eller frysede tomater som råvare utgjorde liten forskjell, men hadde noe effekt på viskositet i emulsjonene. Resultatene fra måling av karotenoider og fettfordøyelse vil bli diskutert i hvert sitt delkapittel, mens analysemetoder diskuteres i slutten av kapitlet.

HPH, pektininnhold og bruk av fersk eller frysede råvare hadde effekt på emulsjonens kvalitetsegenskaper, som viskositet og partikkelstørrelse. Ulike tomatsorter kan tenkes å benyttes i industriell HPH produksjon, og det var derfor interessant å finne ut hvor stor variasjon det var i pektininnholdet mellom sortene og om innholdet påvirket emulsjonskvaliteten. Det er heller ikke kjent fra litteraturen hvorvidt frysing av råvarer kan påvirke kvalitet av tomatemulsjoner. Frysing kan være en aktuell lagringsmåte for overskuddstomater, og det var ønskelig å se om frysing påvirket kvaliteten i HPH emulsjonene.

Totalt pektininnhold ble funnet å være forskjellig mellom de tre ulike tomatsortene. Det ble derimot ikke funnet forskjeller mellom pektininnhold i frysede og ferske tomater innen hver sort. Det var heller ingen effekt av HPH trykk. Hvorvidt frysing eller HPH trykk påvirket pektinstrukturen er imidlertid ikke kjent.

Resultatene fra forsøk 1 i denne oppgaven viste økt viskositet i tomatemulsjonene ved HPH av frysede råvare. Grunnen til dette er uvisst, men en mulighet kan være vanntap ved opptining av tomatene.

5.1. *In vitro* fettfordøyelse

Tomatemulsjoner fra forsøk 1 og grønnkålemulsjoner fra forsøk 2 viste klar hemming i fettfordøyelse, mens emulsjoner av klasetomat i forsøk 2 ikke ga tilsvarende hemming av fettfordøyelse.

Det antas, som nevnt i introduksjonen at pektinnettverket kan påvirkes av trykk, men ettersom det i denne oppgaven kun har blitt målt totalt pektininnhold for emulsjonene er

det ikke mulig å si noe om biopolymerens struktur ut fra denne pektinanalysen. Likevel kan det tenkes at dannelse av et mer komplekst fibernettsverk vil kunne bidra til tettere binding av oljedråper i nettverket og øke homogeniteten i emulsjonen (Colle et al., 2013). Hvis det antas at pektinnettverket blir tettere ved økende trykk, kan dette kombinert med at HPH ga reduksjon i oljedråpestørrelse, påvirke tilgjengelighet av fett og karotenoider. Som nevnt i introduksjonen vil mindre oljedråper gi større overflateratio, og økt tilgjengelighet for lipaseaktivitet. Forsøkene viser motstridende resultater der nedbrytningen av fett til frie fettsyrer reduseres med reduksjon i dråpestørrelse. En hypotese av Colle et al. (2010) er at et tettere pektinnettverk vil fange små oljedråper og gjøre dem mindre tilgjengelig for gallesalter og fordøyelsesenzymer. Dette kan være en mulig forklaring på hemmingen av frigitt FFA fra HPH tomatemulsjoner i forsøk 1 og grønnkålemulsjoner i forsøk 2, da også tidligere studier viser sammenheng mellom pektininnhold og lipasehemming (Kay and Truswell, 1977, Kumar and Chauhan, 2010). Likevel ble det funnet liten forskjell i hemming mellom de ulike sortene tomat, selv om totalinnholdet av pektin varierte mellom sortene. I midlertid viser relativt ny forskning at thylakoider fra grønne planter kan bremse fettfordøyelsen og gi økt utskillelse av metthetshormonet CCK (Stenblom et al., 2013, Albertsson et al., 2007). Albertsson et al. foreslår at dette kan skyldes enten direkte binding av thylakoidmembraner og deres membranproteiner i lipasens aktive sete, eller blokkering av lipasens tilgang til fettdråpene. Membranlipider og -proteiner har amfipatiske egenskaper, og vil i likhet med lipase og gallesalter opptre i grensesnittene mellom olje og vann. Da klorofyll er det dominerende pigmentet i grønnkål (Kopsell et al., 2007), er det grunn til å tro at konsentrasjonen av thylakoider i denne grønnsaken er høy og at dette kan virke inn på lipaseaktivitet. Hos tomater utvikles kloroplastene til kromoplaster etter hvert som de modnes. Thylakoidmembraner i modne tomater vil derfor forekomme i en annen struktur enn hos de mindre modne tomatene. Grunnen til at tomatene i forsøk 1 viser lipasehemming, mens de i forsøk 2 ikke virker inn på enzymet er uvisst, men tomatene i forsøk 1 var mer modne enn tomatene i forsøk 2, og en tenkelig grunn kan derfor være at thylakoider eller pektin opptre ulikt i de to modningsstadiene, og virker ulikt inn på lipase. Andre innholdsstoffer i tomater og grønnkål kan også virke inn her (Birari and Bhutani, 2007). Tilgjengeligheten av disse stoffene under *in vitro* fordøyelsen kan ha vært forskjellig i de to forsøkene.

Albertson et al. (2007) hevder at i motsetning til lipasehemming ved hjelp av Orlistat, gir ikke thylakoidene økt mengde lipider i avføring. Dette og økt utskillelse av CCK tyder på at thylakoidene kun gir en forsinkelse i fettfordøyelsen. Likevel vil forlenget fettfordøyelse med ufordøyde fettsyrer i nedre del av tynntarmen medføre metthetsfølelse og på denne måten kunne være med på å hindre overdrevet energiinntak. Selv om naturlige lipaseinhibitorer viser lavere inhibering enn Orlistat, gir de syntetiske midlene en rekke bivirkninger (Kumar and Chauhan, 2010), som mest sannsynlig kan unngås ved bruk av naturlig forekommende lipaseinhibitorer. Det kan derfor være ønskelig å bruke naturlige inhibitorer, fremfor bruk av syntetiske midler ved fedmebehandling. I dette forsøket ble det kun utført forsøk med 40 og 80 minutters fordøyelsestid i duodenalfasen. Vanligvis bruker kyme tre timer gjennom tynntarmen (Minekus et al., 2014), og forsøket kunne vært enda mer beskrivende ved å ta med ekstra forsøk med lengre fordøyelsestid. (Aarak et al., 2013a)

5.2. Karotenoider

Spearman-test viste høy korrelasjon mellom viskositet og mengde pektin i forsøk 1, der økende pektininnhold ga økt viskositet. Dette stemmer overens med tidligere studier av Verrijssen et al., der økt viskositet ble observert ved økende konsentrasjon av pektin i olje-i-vann emulsjoner tilsatt β -karoten. I tråd med resultatene fra forsøk 1 viste Verrijssen et al. (2014) også korrelasjon mellom viskositet og partikkelstørrelse. Reduksjon i oljedråpenes størrelse som resultat av HPH medførte en mer finfordelt og homogen emulsjon, som ga økt viskositet. Studiet deres viste også at tilgjengeligheten av β -karoten avtok med økende pektininnhold. Resultatene fra denne masteroppgaven viste at karotenoidinnholdet i emulsjon og fettfase ikke viste signifikant korrelasjon med viskositet eller pektin. Tidligere studier viser at fiber påvirker karotenoidtilgjengeligheten (Riedl et al., 1999, Verrijssen et al., 2014), men dette skyldes trolig at fiber kan hemme fettfordøyelsen og dermed også opptaket av karotenoider da disse følger med fettene inn i micellene. Resultater fra karotenoidkvantifisering i forsøk 1 viste relativt lik mengde av karotenoider i fettfasene fra de ulike emulsjonene, selv om mengden av karotenoider i hele emulsjonen varierte. Dette tilsier at en større prosentandel av karotenoidene fra sortene med lavt totalt lykopen og β -karoteninnhold frigis til fettene enn for de med høyt totalinnhold. Perletomat som viste høyest totalinnhold av lykopen og β -karoten viste lik mengde karotenoider i fettfasene som

de to andre sortene. Dette betyr at en stor andel av karotenoidene i perletomatemulsjonene sitter bundet til matriks selv etter høytrykkshomogenisering.

En tidligere studie har vist at HPH trykk over 479 bar er tilstrekkelig for nedbrytning av cellevegger og dannelse av en jevn fordeling av cellemateriale i tomatmasse (Colle et al., 2010). Dette stemmer overens med resultatene fra partikkelstørrelsesmåling av tomatemulgen uten olje i avsnitt 4.3, der HPH ved 1500 bar ga kraftig reduksjon i partikkelstørrelse. Det er tenkelig at det er denne effekten påvirket resultatene fra karotenoidmålinger i forsøk 2, der emulsjoner behandlet ved 1500 bar hadde høyere konsentrasjon av lykopen og β -karoten i fettfasen, enn emulsjoner behandlet ved de lavere HPH trykkene. Colle et al. (2013) viste lignende resultater i tomatemulsjoner, men her ble HPH av tomatemulsjonene gjort før varmebehandling.

Grunntil at resultatene fra karotenoidmålinger i emulsjonens fettfase blir forskjellig i forsøk 1 og 2 er uvisst, men modningsgraden av tomatene kan virke inn. En mulig hypotese er at de svært modne tomatene i forsøk 1 allerede hadde så mykt vev at karotenoidene ble løst ut under koking og blanding, og at HPH med økende trykk ikke hadde noe effekt på overføring av karotenoider til fettfasen. For de litt mindre modne tomatene i forsøk 2 kan økt konsentrasjon av lykopen og β -karoten i fettfasen etter HPH, skyldes knusing av celler og cellemembraner og løsrivelse av karotenoider til oljedråpene i emulsjonen.

Emulsjonene i forsøk 1 ble oppbevart 2 uker lenger i kjøleskap før nedfrysing og analyse enn tomatemulsjonene i forsøk 2. Dette kan ha ført til at emulsjonene i forsøk 1 ble utsatt for en noe større pigmentdegradering enn forsøk 2. Stabiliteten hos karotenoider endres når de frigis fra matriks, og gjør pigmentene mer utsatt for fototoksidering og degradering. Sammenligning av resultatene fra de to forsøkene viser likevel liten forskjell i mengde karotenoider. Faktisk viser forsøk 1 gjennomgående høyere lykopeninnhold i klasetomatemulgen enn i forsøk 2. Også her kan modningsgrad virke inn. Vi vet dessuten for lite om opprinnelsen til tomatene som ble brukt i forsøk 2 til å kunne si noe om andre faktorer kan ha hatt betydning.

Bruk av fryst eller fersk råvare ga som forventet ingen effekt på karotenoidinnholdet i emulsjonene. Tidligere er det vist at karotenoider degraderes noe ved frysing, men kun i liten grad ved lang lagringstid i fryser (Jeremiah, 1995). I forsøk 1 og 2 ble tomatene kun

frosset ned i et par dager, før de ble brukt til produksjon av emulsjoner. Det forekom derfor ingen signifikant degradering av pigmenter.

5.3. Analysemetodikk

Denne oppgaven har omfattet bruk av flere analysemetoder. Spesielt de kjemiske analysemetodene med mange trinn i prøveopparbeidelsen krever en del erfaring for å minske variasjon og usikkerhet i resultatene. Generelt for alle analysene er at det burde vært gjort flere replikater og flere forsøksjentak for å styrke resultatene. Men i denne oppgaven ble det valgt å fokusere på å lære flere typer analyser fremfor å gjenta produksjonen flere ganger. Resultatene i dette forsøket kan derfor kun si noe om egenskapene hos de tomatene og grønnkålbladene som ble benyttet i emulsjonene, og ikke benyttes til å trekke generelle konklusjoner for råvaren som gruppe. I avsnittene under diskuteres de ulike analysemetodene, og mulige feilkilder i analysene.

5.3.1. Emulsjonskvalitet

Det ble antatt at partiklene som ga utslag på resultater fra partikkelstørrelsesmåling i emulsjonen, var oljedråper. Grønnsakspartikler vil nødvendigvis virke inn på medianverdien, med mindre disse blir identifisert og trukket fra. Måling av partikkelstørrelse i tomatmasse uten tilsatt olje ble ikke gjort for andre sorter enn klasetomat. Det er derfor ikke mulig å si noe om tomatpartiklenes effekt på målingen hos de andre sortene. Likevel antas det at partiklene fra plomme- og perletomat viste tilsvarende mønster som for klasetomat, da det var liten forskjell mellom målingene fra emulsjoner laget av ulike tomatorter. For grønnkål ble bakgrunnen heller ikke trukket fra. Ettersom grønnkålemulsjon uten trykkbehandling viser større medianverdi for partikkelstørrelse enn tomatene, kan det være tenkelig at grønnsakspartiklene har større effekt på resultatene her enn hos tomat. Partikkelstørrelsesmåling i høytrykkshomogeniserte grønnkålemulsjoner viser imidlertid like verdier som de fra tomatemulsjoner. Da det i dette forsøket kun ble brukt tre påfølgende målinger av samme prøve, utgjør dette en statistisk svakhet. For å kunne konkludere med at høytrykksbehandling har en signifikant effekt på partikkelstørrelse burde det vært gjort målinger av tre replikater av hver av emulsjonene. Under produksjonen av HPH emulsjoner ble det observert svingninger i homogeniseringstrykket. Ustabil trykk ved HPH kan gi ujevn partikkelstørrelse i emulsjonene som videre kan påvirke viskositet og resultatene fra *in vitro* fordøyelsesforsøk.

5.3.2. *In vitro* fordøyelsesmodell

Human (in vivo) fordøyelse er et dynamisk og komplekst system, der feedback responser virker inn i alle steg av fordøyelsen. Feedback responsene vil ikke være mulig å simulere *in vitro*, og prosessen vil aldri bli helt lik kroppens egen fordøyelse. På en annen side gir det simulerte fordøyelsessystemet mulighet for en veldig kontrollert prosess, som ikke påvirkes av faktorer som dagsform eller tidligere måltider. En svakhet med den statiske fordøyelsesmodellen er at ferdig fordøyd materiale ikke fjernes under fordøyelsen. Dette medfører en fare for at ferdig fordøyd materiale virker inn på enzymaktiviteten. Det blir derfor brukt en relativt lav substratkonsentrasjon ved *in vitro* fordøyelse. Aarak et al. (2012) rapporterer at det er mulig å tilpasse fordøyelsesmodellen slik at pancreatin og galle fra gris gir omtrent sammenlignbar fettfordøyelse som ved bruk av tarmsaft hentet fra menneske. Det kan derfor antas at resultatene fra fordøyelsen av grønnsaksemulsjoner er sammenlignbar med *in vivo* fordøyelse.

I dette forsøket ble mastiseringsleddet (tygging) utelatt da grønnsaksemulsjonenes relativt flytende konsistens kun gjorde det nødvendig med simulering av den enzymatiske delen av oralfasen. I magefasen ble miljøet tilpasset pepsinets pH-optimum. Gastrisk lipase ble ikke inkludert i forsøket. Grunnen til at pankreatisk lipase var den eneste av de tre lipasene som ble inkludert i fordøyelsesforsøket, er at enzymet står for mesteparten av fettnedbrytningen. Dessuten gikk dette forsøket ut på å finne effekt av eventuelle pankreatisk lipaseinhibitorer i grønnsaker, fremfor å måle total lipaseaktivitet.

At resultatene fra fordøyelse av klasetomatemulsjoner i forsøk 1 og 2 ikke var reproducerbare kan skyldes forskjell i oppdeling av replikater under de to forsøkene. I forsøk 1 ble tre replikater fra hver enkelt prøve fordøyd på samme dag. På grunn av for stort antall prøver måtte analysen deles inn i tre dager. Ferske tomatemulsjoner av ulik sort ble fordøyd én dag, og prøver fra frysede tomatemulsjoner dagen etter. Emulsjoner som ikke var trykkbehandlet ble fordøyd tre måneder etter de to første fordøyelsene, sammen med de positive kontrollprøvene (rapsolje og rapsolje tilsatt Orlistat). For fordøyelse av tomatemulsjoner i forsøk 2 ble prøvene delt opp på en slik måte at ett replikat fra hver prøve ble analysert hver dag i tre påfølgende dager. I forsøk 1 kan derfor resultater fra emulsjoner behandlet ved 200 bar og 1500 bar trygt sammenlignes, da disse ble analysert

samme dag. Det samme gjelder for de ulike sortene. Fersk og fryst råvare ble kjørt hver sin dag, og det er derfor mulig at metodevariasjon mellom analysedagene kan ha påvirket resultatene. Likevel ser det ut til at resultatene fra de to ulike dagene i forsøk 1 viser lignende forskjeller som ferske og fryste tomater fra forsøk 2. Sammenligningen mellom emulsjoner uten trykkbehandling og de med trykkbehandling fra forsøk 1 er derimot noe usikre. Selv om emulsjonene uten trykkbehandling ble produsert samme dag som de trykkbehandlede emulsjonene, kan det i løpet av de tre månedene med lagring ha skjedd kjemiske og fysiske forandringer i emulsjonene. I forsøk 2 ble et replikat av alle prøver fordøyd samme dag, og prøvene kan derfor sammenlignes direkte med hverandre gjennom hele fordøyelsen. Ved å gjøre det på denne måten kan man den annen side introdusere større variasjon mellom replikaten slik at det blir vanskeligere å finne signifikante forskjeller.

5.3.3. Karotenoider

Selv om alle analyser ble gjort i mørkerom er det mulig at noen av prøvene ble utsatt for lys under lagring, eller ved transportering mellom kjølerom og mørkerom. Sannsynligvis er lykopen og β -karoten fordelt likt i emulsjonen, men hvis emulsjonene ble eksponert for ustabil trykk ved HPH er det ikke sikkert at alle delene av emulsjonen er like homogene. Da kun en liten del av emulsjonen ble analysert for å finne karotenoidinnholdet i emulsjonene, kan ustabil trykk ha forårsaket variasjon i målingene. For karotenoidmålinger i fettfasen ble det benyttet såpass mye mer prøvemateriale så det er lite sannsynlig at lite homogene emulsjoner kan ha påvirket resultatene.

Sannsynligheten for menneskelige feil under ekstraksjonen av karotenoidene var stor, og resultatene fra UHPLC-måling viste stor variasjon i internstandardens arealer. Ved tillaging av standardkurver og tilsetning av internstandard ble det brukt svært små volumer. Dette gir muligheter for pipetteringsfeil og variasjon i tilsatt volum mellom prøvene. Det er også tenkelig at internstandard var dårlig oppløst i løsemiddelet. Hvis dette var tilfelle ville det kunne bli tilsatt ulik konsentrasjon av internstandard til ulike prøver. Det ble i flere steg av forsøket gjort overføring av faser. Tap av prøve under disse overføringene kan ha påvirket resultatene fra UHPLC.

6. Konklusjon og videre arbeid

Studien har vist at tomat og grønnkål har lipasehemmende egenskaper, men i varierende grad avhengig av sort og prosessering. I tillegg ble det vist at HPH ved 1500 bar ga økt tilgjengelighet av lykopen og β -karoten hos noen av tomatene. Lipasehemming kan bidra til økt utskillelse av metthetshormonet CCK, og redusert energiinntak. Økt tilgjengelighet av lykopen og β -karoten kan virke helsebringende på grunnlag av karotenoidenes antioksidant- og provitamin A-egenskaper. Hvis det kun fokuseres på helsebringende egenskaper vil valg av emulsjon laget av perletomat eller grønnkål behandlet ved 1500 bar gi høyest viskositet og lipasehemming. Det kan være tenkelig at grønnsaksemulsjonene kan brukes som tilsetning i matvarer for å bidra til økt metthet og tilskudd av næringstoffer og helsesrelaterte plantestoffer. Da er det positivt at bruk av ferske eller frysede tomater hadde liten påvirkning på fettfordøyelse og tilgjengelighet av karotenoider, slik at tomatene kan fryselaagres frem til produksjon.

Ved videre arbeid ville det være interessant å sammenligne *in vitro* fordøyelse av emulsjoner tilsatt ulike lipaseinhibitorer som pektin, thylakoider og polyfenoler. Gjennom et slikt forsøk ville det være mulig å si noe om hvilke av disse komponentene som har størst effekt på lipaseaktivitet. I tillegg bør ytterligere *in vitro* fordøyelse av grønnkål gjennomføres, da det kun ble gjort ett forsøk på grønnkål for å sammenligne med tomatene som hadde hovedfokus i denne oppgaven.

7. Referanser

- AARAK, K. E., KIRKHUS, B., HOLM, H., VOGT, G., JACOBSEN, M. & VEGARUD, G. E. 2013a. Release of EPA and DHA from salmon oil - a comparison of in vitro digestion with human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, 110, 1402-1410.
- AARAK, K. E., KIRKHUS, B., JOHANSEN, S., VEGARUD, G. E. & BORGE, G. I. A. 2014. Effect of broccoli phytochemical extract on release of fatty acids from salmon muscle and salmon oil during in vitro digestion. *Food & Function*, 5, 2331-2337.
- AARAK, K. E., RIGBY, N. M., KIRKHUS, B., SALT, L. J., SAHLSTROM, S., BENGTSSON, G. B., VEGARUD, G. E. & MACKIE, A. R. 2013b. The impact of meal composition on the release of fatty acids from salmon during in vitro gastrointestinal digestion. *Food & Function*, 4, 1819-1826.
- AARAK, K. E., RIGBY, N. M., KIRKHUS, B., SALT, L. J., SAHLSTRØM, S., BENGTSSON, G. B., VEGARUD, G. E. & MACKIE, A. R. 2013c. The impact of meal composition on the release of fatty acids from salmon during in vitro gastrointestinal digestion. *Food & function*, 4, 1819-1826.
- ALBERTSSON, P., KOHNKE, R., EMEK, S., MEI, J., REHFELD, J., AKERLUND, H. & ERLANSON-ALBERTSSON, C. 2007. Chloroplast membranes retard fat digestion and induce satiety: effect of biological membranes on pancreatic lipase/co-lipase. *Biochem. J*, 401, 727-733.
- ANESE, M., MIROLO, G., FABBRIO, A. & LIPPE, G. 2013. Lycopene bioaccessibility and bioavailability from processed foods. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 72, 543-547.
- BIRARI, R. B. & BHUTANI, K. K. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12, 879-889.
- BOHOYO-GIL, D., DOMINGUEZ-VALHONDO, D., GARCIA-PARRA, J. & GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. 2012. UHPLC as a suitable methodology for the analysis of carotenoids in food matrix. *European Food Research and Technology*, 235, 1055-1061.
- COLLE, I., VAN BUGGENHOUT, S., VAN LOEY, A. & HENDRICKX, M. 2010. High pressure homogenization followed by thermal processing of tomato pulp: Influence on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Research International*, 43, 2193-2200.
- COLLE, I. J. P., LEMMENS, L., VAN BUGGENHOUT, S., MET, K., VAN LOEY, A. M. & HENDRICKX, M. E. 2013. Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. *Food Research International*, 51, 32-38.
- CUCU, T., HUVAERE, K., VAN DEN BERGH, M.-A., VINKX, C. & VAN LOCO, J. 2012. A simple and fast HPLC method to determine lycopene in foods. *Food Analytical Methods*, 5, 1221-1228.
- DOUTCH, J., BASON, M., FRANCESCHINI, F., JAMES, K., CLOWES, D. & GILBERT, E. P. 2012. Structural changes during starch pasting using simultaneous Rapid Visco Analysis and small-angle neutron scattering. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1061-1071.
- EMEK, S. C., ÅKERLUND, H. E., ERLANSON-ALBERTSSON, C. & ALBERTSSON, P. Å. 2013. Pancreatic lipase–colipase binds strongly to the thylakoid membrane surface. *Journal of the science of food and agriculture*, 93, 2254-2258.
- FRIEDMAN, M. 2013. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 9534-9550.
- GAMEL, T. H., ABDEL-AAL, E.-S. M., WOOD, P. J., AMES, N. P. & TOSH, S. M. 2012. Application of the rapid visco analyzer (RVA) as an effective rheological tool for measurement of β -glucan viscosity. *Cereal Chemistry*, 89, 52-58.
- GERSTER, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 16, 109-126.
- GROSS, J. 1991. *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*, Van Nostrand Reinhold.
- HELSEDIREKTORATET, N. R. F. E. 2011. *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge sykdommer* *Metodologi og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag* [Online]. Available: <https://helsedirektoratet.no/Lists/Publikasjoner/Attachments/400/Kostrad-for-a-fremme->

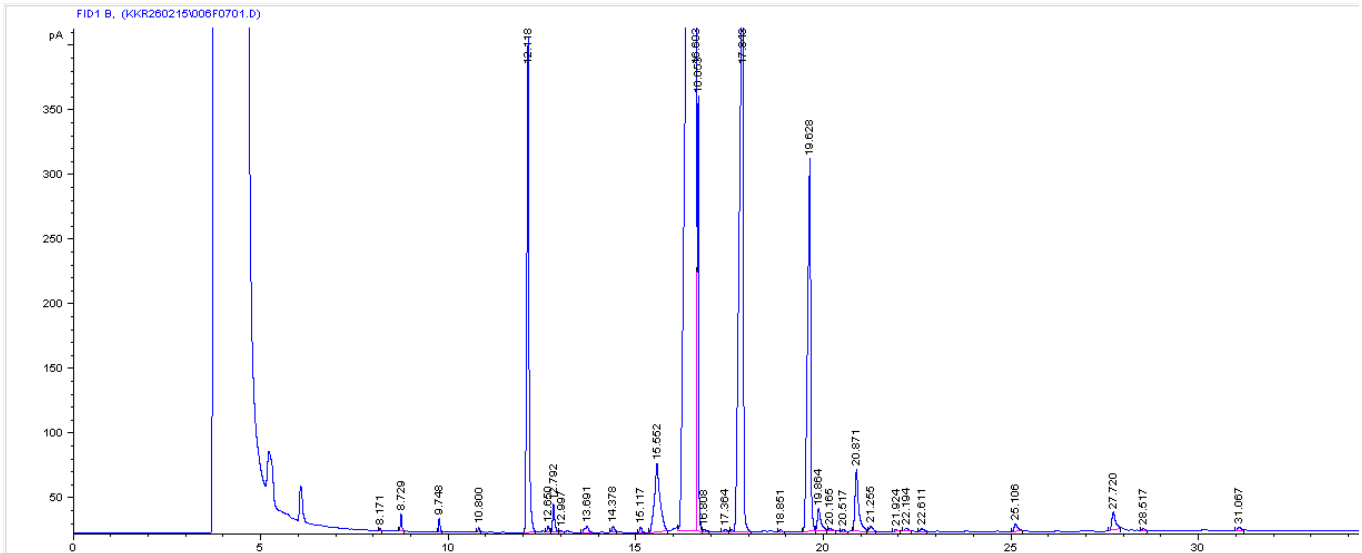
- folkehelsen-og-forebygge-kroniske-sykdommer-metodologi-og-vitenskapelig-kunnskapsgrunnlag-IS-1881.pdf.
- HOFFMANN, J., LINSEISEN, J., RIEDL, J. & WOLFRAM, G. 1999. Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation ex vivo in humans. *European Journal of Nutrition*, 38, 278-285.
- JANICK, J. & PAULL, R. E. 2006. *The Encyclopedia of fruits and nuts*, Cambridge, CAB International.
- JEREMIAH, L. E. 1995. *Freezing effects of food quality*, New York, USA, Marcel Dekker, Inc.
- KAY, R. M. & TRUSWELL, A. S. 1977. Effect of citrus pectin on blood lipids and fecal steroid excretion in man. *The American journal of clinical nutrition*, 30, 171-175.
- KNOCKAERT, G., PULISSERY, S. K., COLLE, I., VAN BUGGENHOUT, S., HENDRICKX, M. & LOEY, A. V. 2012. Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chem*, 135, 1290-7.
- KOPSELL, D. A., KOPSELL, D. E. & CURRAN-CELENTANO, J. 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 900-907.
- KUMAR, A. & CHAUHAN, G. S. 2010. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82, 454-459.
- LEMMENS, L., VAN BUGGENHOUT, S., OEY, I., VAN LOEY, A. & HENDRICKX, M. 2009. Towards a better understanding of the relationship between the β -carotene in vitro bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. *Food Research International*, 42, 1323-1330.
- MA, Z., MERKUS, H. G., DE SMET, J. G. A. E., HEFFELS, C. & SCARLETT, B. 2000. New developments in particle characterization by laser diffraction: size and shape. *Powder Technology*, 111, 66-78.
- MALLETT, C. P. 1993. *Frozen food technology*, Surrey, UK, Blackie Academic & Professional.
- MANSKE, M. 2006. Schematic of a gas chromatography apparatus.
- MCDUGALL, G. J., KULKARNI, N. N. & STEWART, D. 2009. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115, 193-199.
- MCMASTER, M. 2005. *LC/MS: a practical user's guide*, John Wiley & Sons.
- MILED, N., CANAAN, S., DUPUIS, L., ROUSSEL, A., RIVIÈRE, M., CARRIÈRE, F., DE CARO, A., CABBILLAU, C. & VERGER, R. 2000. Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*, 82, 973-986.
- MILLER, J. M. 2005. *Chromatography: concepts and contrasts*, John Wiley & Sons.
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., CARRIÈRE, F., BOUTROU, R., CORREDIG, M., DUPONT, D., DUFOUR, C., EGGER, L., GOLDING, M., KARAKAYA, S., KIRKHUS, B., LE FEUNTEUN, S., LESMES, U., MACIERZANKA, A., MACKIE, A., MARZE, S., MCCLEMENTS, D. J., MENARD, O., RECIO, I., SANTOS, C. N., SINGH, R. P., VEGARUD, G. E., WICKHAM, M. S. J., WEITSCHIES, W. & BRODKORB, A. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.
- NELSON, D. L., LEHNINGER, A. L. & COX, M. M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan.
- OPPLYSNINGSKONTORET FOR FRUKT OG GRØNT, N. 2014. *Totaloversikten 2004-2013* [Online]. Available: <http://www.frukt.no/sitefiles/1/dokumenter/TotaloversiktOFG2013enkelt sider.pdf>.
- PANAGIOTOU, T. & FISHER, R. J. 2013. Producing micron- and nano-size formulations for functional foods applications. *Functional Foods in Health and Disease*, 3, 274-289.
- PANOZZO, A., LEMMENS, L., VAN LOEY, A., MANZOCCO, L., NICOLI, M. C. & HENDRICKX, M. 2013. Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by high pressure homogenisation: A case study on differently coloured tomatoes. *Food Chemistry*, 141, 4094-4100.
- PEDERSEN, J. I., MÜLLER, H., HJARTÅKER, A. & ANDERSSON, S. A. 2012. *Grunnleggende ernæringslære*, Gyldendal akademisk.

- PIRAYESH ISLAMIAN, J. & MEHRALI, H. 2015. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. *Cell journal*, 16, 386-91.
- PUGLIESI, D. 2010. Homogenizing valve.
- RIEDL, J., LINSEISEN, J., HOFFMANN, J. & WOLFRAM, G. 1999. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *Journal of Nutrition*, 129, 2170-2176.
- RIVERA, S. M. & CANELA-GARAYOA, R. 2012. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1-10.
- SALADIN, K. S. 2012. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*, New York, McGraw-Hill.
- SHARMA, N., SHARMA, V. K. & SEO, S.-Y. 2005. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of ethnopharmacology*, 97, 453-456.
- SHI, J. 2000. Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20, 293-334.
- SHPIGELMAN, A., KYOMUGASHO, C., CHRISTIAENS, S., VAN LOEY, A. M. & HENDRICKX, M. E. 2014. Thermal and high pressure high temperature processes result in distinctly different pectin non-enzymatic conversions. *Food Hydrocolloids*, 39, 251-263.
- SHPIGELMAN, A., KYOMUGASHO, C., CHRISTIAENS, S., VAN LOEY, A. M. & HENDRICKX, M. E. 2015. The effect of high pressure homogenization on pectin: Importance of pectin source and pH. *Food Hydrocolloids*, 43, 189-198.
- SRIAMORNSAK, P. 2003. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal*, 3, 206-228.
- STANG, M., SCHUCHMANN, H. & SCHUBERT, H. 2001. Emulsification in High-Pressure Homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, 1, 151-157.
- STENBLUM, E.-L., MONTELIUS, C., ÖSTBRING, K., HÅKANSSON, M., NILSSON, S., REHFELD, J. F. & ERLANSON-ALBERTSSON, C. 2013. Supplementation by thylakoids to a high carbohydrate meal decreases feelings of hunger, elevates CCK levels and prevents postprandial hypoglycaemia in overweight women. *Appetite*, 68, 118-123.
- SYMPATEC, G. *Laser diffraction methods* [Online]. Available: https://www.sympatec.com/EN/Science/Characterisation/11_LaserDiffraction.html.
- TISS, A., LENGSELD, H., CARRIÈRE, F. & VERGER, R. 2009. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, 41-47.
- TÖPPNER, K., HANSEN, D. & HERBIG, E. 2014. *HPLC Analysis; The role of ultrapure water* [Online]. Available: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>.
- ULLEBERG, E., COMI, I., HOLM, H., HERUD, E., JACOBSEN, M. & VEGARUD, G. 2011. Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in In Vitro Digestion Models. *Food Digestion*, 2, 52-61.
- VAN HET HOF, K. H., WEST, C. E., WESTSTRATE, J. A. & HAUTVAST, J. G. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of nutrition*, 130, 503-506.
- VANGARDE, S. J. & WOODBURN, M. 1994. *Food preservation and safety: principles and practice*, Ames, Iowa, Iowa State University Press.
- VERRIJSEN, T. A. J., BALDUYCK, L. G., CHRISTIAENS, S., VAN LOEY, A. M., VAN BUGGENHOUT, S. & HENDRICKX, M. E. 2014. The effect of pectin concentration and degree of methyl-esterification on the in vitro bioaccessibility of β -carotene-enriched emulsions. *Food Research International*, 57, 71-78.
- VIUDA-MARTOS, M., SANCHEZ-ZAPATA, E., SAYAS-BARBERA, E., SENDRA, E., PEREZ-ALVAREZ, J. A. & FERNANDEZ-LOPEZ, J. 2014a. Tomato and Tomato Byproducts. Human Health Benefits of Lycopene and Its Application to Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 1032-1049.
- VIUDA-MARTOS, M., SANCHEZ-ZAPATA, E., SAYAS-BARBERA, E., SENDRA, E., PEREZ-ALVAREZ, J. A. & FERNANDEZ-LOPEZ, J. 2014b. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54, 1032-49.

WILLATS, W. G. T., KNOX, J. P. & MIKKELSEN, J. D. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97-104.

Vedlegg 1 – Eksempel på utregning av FFA konsentrasjon i prøver

Figuren viser et eksempel på et kromatogram fra gasskromatografi.



Konsentrasjonen av frie fettsyrer i prøvene ble regnet ut ved å summere alle arealene av de frie fettsyrene fra kromatogrammet. Summen ble delt på arealet av internstandarden (IS), og multiplisert med mengden tilsatt IS i prøven. For å få milligram FFA, fremfor μg ble det hele delt på 100. Formel og beregningseksempel er vist oppgis under:

$$\frac{\text{mg FFA}}{\text{g rapsolje tilsatt i emulsjon}} = \frac{\text{Sum av alle FFA arealer}}{\text{Areal av IS}} * \frac{\text{mengde tilsatt IS per prøve}}{100 \text{ mg}}$$

Beregningseksempel er gjort for fersk klasetomatemulsjon før HPH, der summen av arealene fra de frie fettsyrene var 19026 pA·s.

$$\frac{\text{mg FFA}}{\text{g rapsolje tilsatt i emulsjon}} = \frac{19026 \text{ pA} \cdot \text{s}}{297 \text{ pA} \cdot \text{s}} * \frac{400 \mu\text{g}}{100 \text{ mg}}$$

$$\frac{\text{mg FFA}}{\text{g rapsolje tilsatt i emulsjon}} = 255,6 \frac{\text{mg FFA}}{\text{gram rapsolje}}$$

Vedlegg 2 – Ekstern- og internstandardkurver for UHPLC

Internstandard og eksternstandarder ble fortynnet og målt på spektrofotometer for å bestemme eksakt konsentrasjon av løsningene. Tabell 1 viser hvilke standarder som ble benyttet og konsentrasjon av de ulike standardenes stamløsninger, samt oversikt over nødvendig fortynning for å bestemme konsentrasjon av løsningene på spektrofotometer.

Tabell 6 - Tabellen viser konsentrasjon av de ulike standardenes stamløsninger, samt oversikt over nødvendig fortynning og fortynningsmiddel for å bestemme konsentrasjon av løsningene ved hjelp av spektrofotometer.

Standard	Konsentrasjon i stamløsning	Løsningsmiddel for stamløsning	Fortynning for spektrofotometermåling	Fortynningsmiddel for spektrofotometermåling
Trans- β -apo-8'-carotenal	1 mg/ml	Kloroform 0,05 % BHT	20x	Petroleumseter
Lykopen	100 μ g/ml	THF:MeOH (1:2) 0,05% BHT	40x	Heksan
β -karoten	40 μ g/ml	THF:MeOH (1:4) 0,05 % BHT	5x	Heksan

Lykopen og β -karoten løst i THF:MeOH (1:4) med 0,05 % BHT ble benyttet for opparbeidelse av internstandardrekke. Fortynningsrekken er vist i tabell 2.

Tabell 7 - Fortynningskurve for tillaging av eksternstandardrekke

		β -karoten (40 μ g/ml)	Lykopen (100 μ g/ml)	THF:MeOH (1:4) 0,05 % BHT	Konsentrasjon β -karoten (μ g/ml)	Konsentrasjon lykopen (μ g/ml)
	Fortynning	μ l	μ l	μ l	μ g/ml	μ g/ml
Nivå 1	2x	50	50	50	13,3	33,3
Nivå 2	10x	50	40	150	8,3	16,66
Nivå 3	15x	50	27	250	6,1	8,25
Nivå 4	20x	25	15	425	2,1	3,22

Tilsvarende fortynningskurve ble laget for internstandard, med utgangspunkt i *trans*- β -apo-8'-carotenal vist i tabell 3.

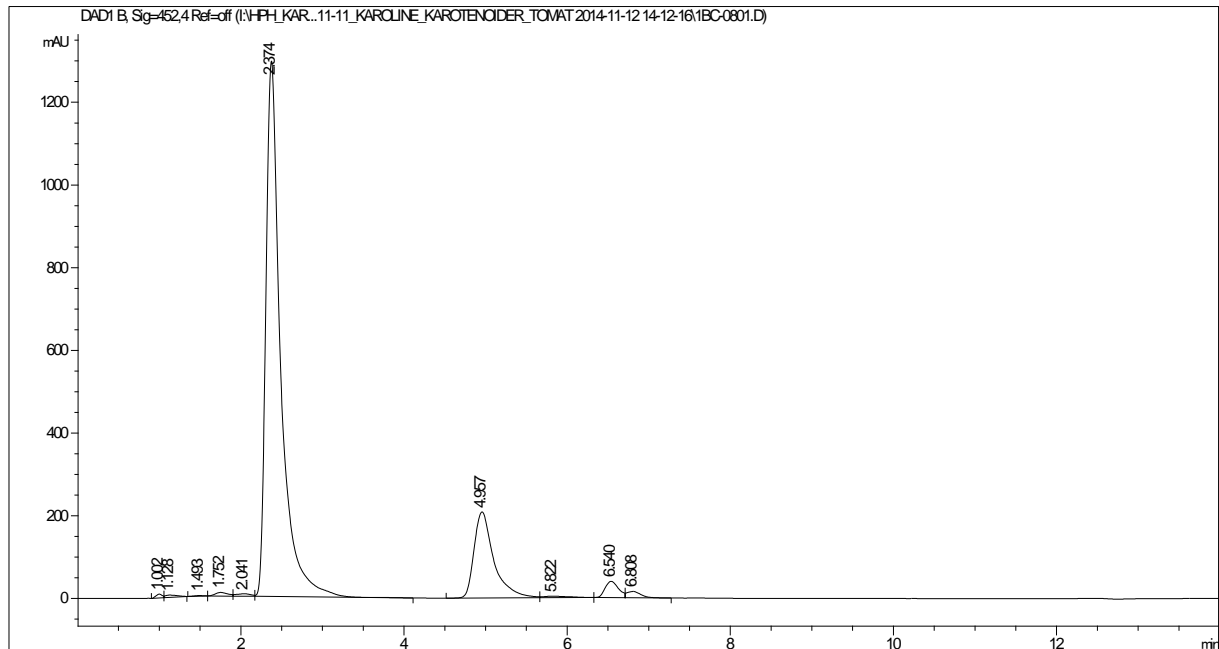
Tabell 8 - Fortynningskurve for internstandardrekke med 1 mg/ml *trans*- β -apo-8'-carotenal stamløsning som utgangspunkt.

	<i>trans</i>-β-apo-8'- carotenal (1 mg/ml)	THF:MeOH 1:4 0,05 % BHT (μl)	Konsentrasjon (μg/ml)
Nivå 1	10 μ l av stamløsning	990	1
Nivå 2	500 μ l av nivå 1	500	2
Nivå 3	320 μ l av nivå 2	480	5
Nivå 4	250 μ l av nivå 3	250	10

Intern- og eksterntandardkurvene ble brukt som utgangspunkt for å lage trendlinjer, som ble benyttet i utregningene av karotenoidkonsentrasjoner i prøvematerialet.

Vedlegg 3 – Eksempel på utregning av karotenoidkonsentrasjon i emulsjoner og fettfase

Figuren viser et eksempel på et kromatogram fra UHPLC.



Arealer fra UHPLC kromatogram ble omregnet til konsentrasjoner i karotenoidekstrakt ved bruk av eksterne kurvene i vedlegg 2. For målingene av karotenoidinnhold i hele emulsjonen ble denne konsentrasjonen videre omgjort til konsentrasjon av karotenoider i emulsjonen ved å dele på antall milliliter karotenoidekstrakt som ble analysert og multiplisere med prøvens utgangsvekt. Eksempel på utregning er vist under:

$$\frac{\mu\text{g karotenoid}}{\text{gram emulsjon}} = \frac{\text{konsentrasjon av karotenoid i UHPLC ekstrakt}}{\text{antall milliliter UHPLC ekstrakt}} * \text{prøvens startvekt}$$

Som eksempel vises utregning for β -karoteninnhold i fersk plommetomat før HPH.

Areal oppgitt fra UHPLC: 448,2 mAu

Trendlinje $y = 932.29x$ ga at konsentrasjonen av betakaroten i UHPLC-ekstraktet var 0,48 $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\frac{\mu\text{g betakaroten}}{\text{gram emulsjon}} = \frac{0,48 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{3,0 \text{ ml}} * 1,003 \text{ g}$$

$$\frac{\mu\text{g betakaroten}}{\text{gram emulsjon}} = 1,43 \frac{\mu\text{g betakaroten}}{\text{gram emulsjon}}$$

$$\frac{\text{mg betakaroten}}{100 \text{ g emulsjon}} = \frac{1,43 * 100}{1000}$$

$$\frac{\text{mg betakaroten}}{100 \text{ g emulsjon}} = 0,143 \frac{\text{mg betakaroten}}{100 \text{ g emulsjon}}$$

For konsentrasjon av karotenoider i fettfasen ble tilsvarende formel brukt, men i stedet for å multipliseres med prøvens startvekt ble det multiplisert med antall gram isolert fettfase. For å gjøre om benevningen til milligram karotenoid per 100 gram emulsjon ble resultatene multiplisert med 100 og delt på 1000.

Antall μg gjenfunnet IS per gram emulsjon etter analyse ble regnet ut på samme måte som eksempelet ovenfor, og delt på mengde IS tilsatt i prøven. Dette ga andelen gjenfunnet IS i hver enkelt prøve. Ved å dele karotenoidkonsentrasjonen i prøven på dette tallet, ble det korrigert tap av prøve under ekstraksjon og analyse.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no