

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble gjennomført våren 2012 ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap.

Hovedveileder for oppgaven var Gerd Vegarud, og tilleggsveiledere var Siv Skeie og Tove Devold. Jeg vil takke dem alle for god hjelp under planleggingen og gjennomføringen av oppgaven.

Jeg vil også rette en stor takk til Ragnhild Inglingstad og Kari Olsen for gode råd og uvurderlig hjelp i forbindelse med fettanalyser og resultatbehandling. En takk rettes også til Irene Comi for å ha skaffet til veie mage- og tarmsaft til fordøyelsesforsøkene, og til May Aalberg for alltid å være behjelpelig og i godt humør. Ellers er det mange på laben som fortjener en takk for å ha bistått med små og store spørsmål underveis. Ingen nevnt, ingen glemt!

Til slutt vil jeg takke familie og venner som har kommet med støttende og oppmuntrende ord gjennom arbeidet med denne oppgaven, og ikke minst Rafal som har vært med å gjøre lange dager på lesesalen mye triveligere.

Ås, 15. juni 2012

Stine Kolberg

Sammendrag

I denne oppgaven ble 6 ulike oster; Norvegia original, Norvegia lettere, Norvegia økologisk, Norvegia vellagret, Norvegia ekstra vellagret og Snøfrisk hvitost, fordøyd ved hjelp av human mage- og tarmsaft i et *in vitro* fordøyelsessystem. Det ble tatt ut prøver ved ulike trinn i fordøyelsen, som videre ble analysert med hensyn på frie fettsyrer ved hjelp av GC-FID. Hensikten var å se nærmere på fettnedbrytning og dannelse av frie fettsyrer underveis i fordøyelsen.

Det ble gjennomført 2 fordøyelsesforsøk for hver ost, og det ble analysert for frie fettsyrer i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med human magesaft (HGJ) i 60 min., ost fordøyd med human tarmsaft (HDJ) i 60 min. og ost fordøyd med human tarmsaft (HDJ) i 120 min. ved 37 °C. Før det ble analysert for frie fettsyrer i ostene, ble det utarbeidet en modifisert metode for ekstraksjon av fett i ost.

Resultatene fra fettanalysene viste at mesteparten av de frie fettsyrene som ble detektert forekom i ost som var fordøyd med HDJ, noe som tyder på at fettfordøyelsen hovedsakelig foregår i tynntarmen. I alle ostene var det C_{16:0}, C_{18:1}, C_{18:0} og C_{14:0} som var til stede i størst mengde etter fordøyelse med HDJ. Det var også forskjeller i forholdet mellom C_{18:2} ω-6 og C_{18:3} ω-3 i ostene. Det laveste forholdet ble observert i Norvegia ekstra vellagret (5,9:1), tett etterfulgt av Snøfrisk hvitost (6,1:1). Norvegia original hadde det høyeste forholdet mellom disse fettsyrene, på henholdsvis 8,9:1.

Etter fettanalyse i GC-FID viste det seg at det var store variasjoner mellom mengden fettsyrer som var detektert i de 2 fordøyelsesforsøkene som ble gjennomført for hver ost. Dette resulterte i store standardavvik, og det var dermed vanskelig å sammenligne innholdet av enkelte fettsyrer mellom de ulike ostene. Det antas at disse variasjonene skyldes at det ble tilsatt ulike mengder lipase ved fordøyelse av ostene. Ved tilsetning av mage- og tarmsaft ble det tatt hensyn til proteaseaktivitet, og ikke lipaseaktivitet, noe som forårsaket store variasjoner i lipaseaktiviteten, da det ble brukt mage- og tarmsaft fra flere batcher. Avgjørelsen om å benytte proteaseaktivitet i HDJ ble tatt før forsøkene startet, da de samme ostene skulle brukes til proteinanalyser i en annen oppgave.

På grunn av disse variasjonene er videre forsøk, basert på lik tilsetning av lipase i fordøyelsesforsøkene, nødvendig før man kan konkludere med eksakt mengde av de enkelte fettsyrene som er dannet, og forskjeller mellom de ulike ostene.

Abstract

In this study, 6 different cheeses; Norvegia original, Norvegia lettere, Norvegia økologisk, Norvegia vellagret, Norvegia ekstra vellagret and Snøfrisk hvitost, was digested in an in vitro digestive model, by human gastric juice (HGJ) and human duodenal juice (HDJ). Samples were taken out at various stages during the digestion and further analyzed for free fatty acids by GC-FID. The aim was to look at fat degradation and formation of free fatty acids during digestion.

The digestion was carried out twice for each cheese, and free fatty acids were analyzed in undigested cheese, cheese digested with HGJ for 60 minutes, cheese digested with HDJ for 60 minutes and cheese digested with HDJ for 120 minutes, respectively. A temperature of 37 °C was maintained during the entire digestion. Before analyzing for free fatty acids, a modified method for extraction of fat in cheese was prepared.

The results from the fat analysis showed that most of the free fatty acids were detected in cheese digested with HDJ, suggesting that fat digestion mainly takes place in the small intestine. In all cheeses, C16:0, C18:1, C18:0 and C14:0 occurred in greatest amount after digestion with HDJ. Differences in the ratio between C18:2 ω-6 and C18:3 ω-3 was also found in the different cheeses. The lowest ratio was detected in Norvegia ekstra vellagret (5,9:1), closely followed by Snøfrisk hvitost (6,1:1). The highest ratio was found in Norvegia original at 8,9:1, respectively.

After fat analysis in GC-FID, the results showed large variations between the amounts of fatty acids detected in the 2 digestions carried out for each cheese. This resulted in large standard deviations, and made it difficult to compare the amounts of individual fatty acids between the different cheeses. It is assumed that these variations may be due to the differences in lipase activity in the HGJ and HDJ added during the digestion. The protease activity was taken into account when adding HGJ and HDJ, this causing large variation in the lipase activity, as different batches of HGJ and HDJ was used. The decision to consider the protease activity when adding HGJ and HDJ was taken before the experiments started, since the cheeses digested in this study also was used for protein analyses in a different study.

The various results made it difficult to compare the amount of free fatty acids between the different cheeses. Further experiments should therefore be performed, preferably with the same amount of lipase added to all the digestions, to see if this can provide more similar results.

Innholdsfortegnelse

Ost.....	1
Historie.....	1
Definisjon.....	1
Klassifisering.....	2
Ost som næringskilde.....	2
Fettsyrer i melk.....	3
Melkefett og helseeffekter.....	5
Fordøyelsessystemet.....	8
Munnhulen.....	8
Magesekken.....	9
Gastrisk sekresjon.....	10
Tynntarmen.....	10
Duodenal sekresjon.....	12
Tykktarmen.....	13
Fettfordøyelse.....	14
Fettsyrenes struktur.....	14
Nedbrytning og absorpsjon.....	14
Transport.....	17
Mål med oppgaven.....	17
Materialer og metoder.....	18
<i>In vitro</i> fordøyelse.....	19
Mage- og tarmsaft.....	19
Kjemikalier og utstyr.....	21
Fordøyelse av ostene.....	21
Fettanalyser.....	24
Kjemikalier og utstyr.....	24
Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost.....	26
Osteprøver.....	27
Standardløsninger.....	28

Resultater	29
Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost	29
Analyse av frie fettsyrer i fordøyd og ufordøyd ost	30
Diskusjon	38
Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost	38
Analyse av frie fettsyrer i fordøyd og ufordøyd ost	38
Forslag til videre arbeid	42
Konklusjon	43
Referanseliste	44

Ost

Historie

Ost har lenge vært et betydningsfullt næringsmiddel i det humane kostholdet. Ostens opprinnelse kan spores tilbake til den såkalte jordbruksrevolusjonen i Midtøsten for omtrent 8000 år siden. På denne tiden ble flere dyr domestisert og tatt i bruk som matkilder. Geit og sau var blant de første dyrene som ble brukt til dette formålet, da de var små og enkle å gjete, og i tillegg kunne bidra med kjøtt, melk, hud og ull. Storfe var vanskeligere å domestisere, og ble derfor først og fremst brukt som arbeidsdyr, men etter hvert også tatt i bruk som matkilder. Det ble tidlig oppdaget at melk var en rik næringskilde, og melk og melkeprodukter ble dermed viktige komponenter i det humane kostholdet.

Observasjoner av melkas evne til å koagulere, og dermed muligheten til å produsere ost, antas å være tilfeldig. På grunn av det varme klimaet i Midtøsten, ble melka utsatt for bakterievekst og syreproduksjon under oppbevaring. Dette førte til en pH-reduksjon, og dermed koagulering av kaseinene. Løpefellingssprinsippet ble også oppdaget på et tidlig tidspunkt. På grunn av mangel på oppbevaringsmuligheter, ble hud og rester fra slaktede dyr ofte brukt til oppbevaring av melk. Ved å bruke magesekken til dette formålet, sørget naturlige enzymer (løpe) derfra for en koagulering av melka under lagringen. I dag er osteproduksjonen svært modernisert, men prinsippet bak løpefelling er fortsatt aktuelt, og omtrent 75 % av all ost produseres på denne måten (Fox et al. 2000).

Forbruket av hvit ost i Norge har økt jevnlig de siste 30 årene. Siden 1979 er det registrert en økning på omtrent 50 % (Helsedirektoratet 2011), og i 2011 ble det konsumert i gjennomsnitt 17,5 kg ost pr innbygger (Opplysningskontoret for meieriprodukter 2012).

Definisjon

Ost defineres i følge FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) og WHO (World Health Organization) som «et modnet eller umodnet mykt, halv-fast, fast eller ekstra fast produkt, som kan «coates», der myseprotein/kasein ratioen ikke overstiger den i melk.» Dette kan oppnås ved hel eller delvis koagulering av ulike råmaterialer som: melk, skummet melk, delvis skummet melk, fløte, mysefløte eller kjernemelk. Koaguleringen kan skje ved hjelp av løpe eller andre koaguleringsagenter, før myse tappes av. Prinsippet bak osteproduksjon er en oppkonsentrering av melkeprotein, som gir et produkt med høyere proteininnhold enn råmaterialet brukt til produksjonen. FAO og WHO sier også at dette kan oppnås ved prosesseringsteknikker som involverer koagulering av melk og/eller materialer ervervet fra

melk som gir et sluttprodukt med lignende fysiske, kjemiske og organoleptiske egenskaper som råmaterialene nevnt ovenfor. (FAO & WHO 1978)

Klassifisering

Oster kan klassifiseres med hensyn på hardhet og fettinnhold. Hardhet beregnes med utgangspunkt i ostenes vanninnhold, der andelen vann i osten regnes om til andel vann i fettfri ost. Omregningen foretas fordi det er bedre sammenheng mellom denne verdien og ostens fasthet, noe som kan forklares med at fett i osten ikke binder vann. Vannet må dermed bindes av andre komponenter i tørrstoffet, da særlig kasein. Dette medfører at i to oster med likt vanninnhold, men ulikt fettinnhold, vil osten med mest fett være mykest. Dette skyldes at det er mindre fettfritt tørrstoff til stede som kan binde vannet i denne osten. Fettinnholdet i osten oppgis som prosent fett i tørrstoff. (Nielsen & Ullum 2004; Tetra Pak 2003) Tabell 1 viser en oversikt over den ulike klassifiseringen av ost.

Tabell 1: Klassifisering av ost (Nielsen & Ullum 2004; Tetra Pak 2003).

Vann i fettfri ost (%)	Betegnelsen	Fett i tørrstoff (%)	Betegnelsen
< 51	Ekstra hard	> 60	Ekstra fet
49 - 56	Hard	45 - 60	Fet
54 - 63	Halvfast	25 - 45	Halvfet
61 - 69	Halvmyk	10 - 25	Mager
> 67	Myk	< 10	Ekstra mager

Ost som næringskilde

Ost er et næringsrikt produkt som inneholder flere essensielle næringsstoffer, deriblant proteiner, bioaktive peptider, aminosyrer, fett, fettsyrer, vitaminer og mineraler (Walther et al. 2008). Sammensetningen av næringsstoffer i osten varierer, og kan påvirkes av flere faktorer. Først og fremst avhenger det av hva slags melk det er brukt til produksjonen. Ulike arter, raser, laktasjonstidspunkt og fettinnhold vil gi ulik sammensetning i osten. I tillegg vil også modningsprosessen ha en innvirkning på det ferdige produktet (Ash & Wilbey 2010).

Når det gjelder fettsyresammensetningen i ost, gjenspeiler den i stor grad fettsyresammensetningen i melka, da det skjer liten endring i fett under osteproduksjonen (Martin et al. 2004; Walther et al. 2008). Fettmengden i melk fra ulike arter varierer i stor grad, men felles er at omtrent 98 % av melkefettet består av triglyserider, mens de resterende

komponentene utgjør diglyserider, monoglyserider, frie fettsyrer, fosfolipider, steroler og små mengder fettløselige vitaminer (Fox et al. 2000).

Fettsyrer i melk

Melkefett kjennetegnes ved at det er rikt på mettet fett, og ved at det har et høyt antall korte og mellomlange fettsyrer. Fett i melk fra drøvtyggere inneholder et stort antall fettsyrer, og i kumelk er det funnet mer enn 400 ulike varianter. Flesteparten av disse forekommer i svært små mengder, og av dette antallet er det kun omtrent 15 fettsyrer som finnes i mengder større enn 1 % (MacGibbon & Taylor 2006). En oversikt over de vanligst forekommende fettsyrene i kumelk og geitemelk kan ses i tabell 2.

Fettsyrene i melka stammer i hovedsak fra to kilder; *de novo* syntese i melkekjertlene, og fra plasmalipider som opprinnelig stammer fra fôret. Fettsyrene fra de to ulike kildene skiller seg fra hverandre i struktur. Korte og mellomlange fettsyrer (C_{4:0} til C_{14:0}, samt noe C_{16:0}) syntetiseres i *de novo* syntesen, mens de lange fettsyrene (hovedsakelig C₁₈, og noe C_{16:0}) stammer fra plasmalipidene. *De novo* syntesen sørger for omtrentlig 45 % av den totale mengden fettsyrer i melka, mens plasmalipidene bidrar med resten (Ash & Wilbey 2010; MacGibbon & Taylor 2006). *De novo* syntesen utnytter i hovedsak acetat og β-hydroksybutyrat, som stammer fra den mikrobielle fermenteringen i vomma hos drøvtyggere. B-hydroksybutyrat brytes ned til smørsyre, noe som forklarer den betydelige mengden C_{4:0} som er spesifikk for drøvtyggermelk (MacGibbon & Taylor 2006).

De korte og mellom-lange fettsyrene har enkelte egenskaper som skiller dem fra de lange fettsyrene. De kan blant annet absorberes umetylert direkte inn i blodbanen, og videre til leveren der de metaboliseres, og dermed bidrar til en rask energitilførsel i kroppen. Korte og mellom-lange fettsyrer sørger også for et lavere smeltepunkt i melkefettet, noe som er en medvirkende årsak til at fett er flytende ved kroppstemperatur (MacGibbon & Taylor 2006). De resterende, lange fettsyrene tilføres via fôret, eller frigis fra fettvev, og modifiseres i vomma ved hjelp av fermentering. Under fermenteringen produseres det en rekke hydrolyseprodukter, blant annet konjugert linolsyre (Ash & Wilbey 2010).

Fettsyresammensetning i kumelk vs. geitemelk

Sammensetningen av de ulike komponentene i melka varierer for geitemelk og kumelk, og dette kan påvirke fordøyelsen av den. Geitemelka inneholder blant annet mindre fettglobuler, noe som gjør den enklere å fordøye (Park et al. 2007).

Kumelk og geitemelk inneholder i stor grad de samme fettsyrene, men innholdet av dem er noe forskjellig. Geitemelk inneholder mer av fettsyrene C8:o og C10:o, mens kumelk er rikere på C4:o og C16:o. (Chilliard et al. 2003) En oversikt over ulikheter i fettsyresammensetningen i ku- og geitemelk kan ses i tabell 2.

Tabell 2: Fettsyresammensetning i triglyserider i ku- og geitemelk (% w/w) (MacGibbon & Taylor 2006). Tabellen viser en oversikt over forskjeller i mengde av de ulike fettsyrene i henholdsvis kumelk og geitemelk.

Fettsyre	Navn	Kumelk	Geitemelk
4:0	Smørsyre	3,9	3,1
6:0	Kaprønsyre	2,5	2,2
8:0	Kaprylsyre	1,5	2,4
10:0	Kaprinsyre	3,2	6,3
12:0	Laurinsyre	3,6	2,9
14:0	Myristinsyre	11,1	7,7
14:1	Myristolsyre	0,8	-
15:0	-	1,2	-
16:0	Palmitinsyre	27,9	22,0
16:1	Palmitolsyre	1,5	1,9
18:0	Stearinsyre	12,2	10,6
18:1	Oljesyre	21,1	23,7
18:2	Linolsyre	1,4	2,7
18:3	Linolensyre	1,0	1,0

Fettsyresammensetningen hos ku og geit er ikke konstant, og vil kunne variere med årstider, beitesesong og ulike fôringsregimer. Ved å endre på fôrsammensetningen til dyrene, er det mulig å påvirke fettsyrefordelingen i melka slik at den får et gunstigere fettsyreinnhold. Blant annet inneholder melk fra dyr som går på beite om sommeren ofte mer C18:1 og mindre C16:o (Chilliard & Ferlay 2004; Devle et al. 2012).

Melkefett og helseeffekter

Melkefett har i lengre tid vært forbundet med negative helseeffekter. Dette skyldes i hovedsak det høye innholdet av mettet fett, som har vært antatt å bidra til blant annet hjerte- og karsykdommer, vektøkning og overvekt. Melk inneholder i gjennomsnitt 33 g fett pr. liter, og mer enn halvparten av fettsyrene er mettede. Det har blitt gjort studier på flere individuelle fettsyrer, og disse har vist at ikke alle fettsyrene i melka nødvendigvis har negative helseeffekter (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Steijns 2008).

Smørsyre (C_{4:0}) har vist seg å kunne påvirke genfunksjon, og den har også blitt ansett som en mulig antikarsinogen komponent (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007). Én av årsakene til dette, skyldes at fettsyren kan påvirke kreftcellenes celledifferensiering, og dermed øke deres mulighet for apoptose (programmert celledød). På grunn av dårlig celledifferensiering har ikke kreftceller i utgangspunktet mulighet til å gjennomgå apoptose, noe som fører til videre formering og ukontrollert vekst (German 1999).

Kaprønsyre (C_{8:0}) og kaprylsyre (C_{10:0}) antas å ha antivirale egenskaper (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Thormar et al. 1994). Undersøkelser har vist at disse fettsyrene kan ødelegge virus ved at de påvirker kappen som omringer dem. Dette fører til lekkasje av arvestoffet, og ved høye konsentrasjoner kan hele kappen, og dermed viruspartikkelen, gå i oppløsning (Thormar et al. 1994). En annen fettsyre som også antas å ha antivirale egenskaper er laurinsyre (C_{12:0}) (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007). Studier har også vist at denne fettsyren har antibakterielle egenskaper, og fungerer særlig hemmende mot gram positive bakterier (Kabara et al. 1972; Sun et al. 2002).

Risiko for hjerte- og karsykdommer har tidligere blitt satt i sammenheng med fettsyrenes effekt på det totale blodkolesterolet (Mensink et al. 2003). På grunn av dette har melkefettets høye innhold av laurinsyre (C_{12:0}), myristinsyre (C_{14:0}) og palmitinsyre (C_{16:0}) blitt sett på som negativt. Disse fettsyrene har vist seg å føre til en økning i det totale blodkolesterolet, men det er viktig å skille mellom de ulike typene kolesterol i denne sammenheng. Et høyt nivå av LDL og et lavt nivå av HDL er forbundet med en høy risiko for hjerte- og karsykdommer, mens et lavt nivå av LDL og høyt nivå av HDL blir ansett som positivt i denne sammenheng (Whitney & Rolfes 2008). En økning av HDL (High Density Lipoprotein) i blodet har gunstig påvirkning på helsen, da det sørger for transport av kolesterol tilbake til leveren. HDL kan også fungere som en antioksidant, og forhindrer oksidasjon av LDL (Low Density Lipoprotein) i blodet (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007). Studier har vist at laurinsyre (C_{12:0}) først og fremst øker mengden av HDL i blodet, og dermed minker forholdet mellom totalt kolesterol

og HDL, mens myristinsyre (C_{14:0}) og palmitinsyre (C_{16:0}) har mindre effekt på dette forholdet (Mensink et al. 2003). Stearinsyre (C_{18:0}) har vist seg å ikke ha noen effekt på det totale kolesterolet, og anses dermed ikke som aterogen (Ebringer et al. 2008; Grundy 1994; Haug et al. 2007).

Mellom-lange fettsyrer (C_{6:0} til C_{12:0}) har også vist seg å ha en gunstig effekt i forbindelse med metabolsk syndrom, ved at de forbedrer insulinsensitivitet (Pfeuffer & Schrezenmeir 2007).

Oljesyre (C_{18:1}) er den eneste enumettede fettsyren som forekommer i høye konsentrasjoner i melk. Fettsyren anses å ha positive helseeffekter, da enumettede fettsyrer minker både det totale kolesterolinnholdet, LDL og triglyseridmengden i blodet. Det har også vist seg at erstatning av mettet fett med enumettet fett, reduserer risikoen for hjerte- og karsykdommer (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Mensink et al. 2003). Enumettede fettsyrer er mindre reaktive enn flerumettede fettsyrer, og dermed mindre utsatt for oksidasjon. Da melkefett inneholder mye oljesyre (C_{18:1}) i forhold til flerumettede fettsyrer, kan dette bidra til å beskytte lipider i f. eks. LDL mot oksidative stressfaktorer, da det har vist seg at en høy ratio mellom oljesyre og flerumettede fettsyrer har denne effekten (Haug et al. 2007).

Melk inneholder kun små mengder flerumettede fettsyrer, og de mest forekommende er linolsyre (C_{18:2} ω-6) og linolensyre (C_{18:3} ω-3). Disse fettsyrene er essensielle, og har flere ulike funksjoner i metabolismen (Molkentin 1999). Linolsyre kan konverteres til arakidonsyre (C_{20:4} ω-6), og linolensyre kan omdannes til eikosapentaensyre (EPA) (C_{20:5} ω-3) og dokosaheksaensyre (DHA) (C_{22:6} ω-3). Disse kan videre omdannes til eikosanoider, som har ulike biologiske funksjoner (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Whitney & Rolfes 2008). Eikosanoider avledet fra linolsyre, via arakidonsyre, kan øke risikoen for hjerte- og karsykdommer ved at de forbedrer blodplatenes evne til å aggregere. Dette er derimot ikke tilfellet for eikosanoider avledet fra linolensyre. EPA kan delvis blokkere omdanningen av ω-6 fettsyrer til eikosanoider, og dermed bidra til redusert risiko for hjerte- og karsykdommer (Haug et al. 2007).

Linolsyre har også vist seg å kunne bidra til en senkning av LDL i blodet. Noen studier har også vist at fettsyren kan gi en svak nedgang i HDL- nivået, men sett i ett blir linolsyre ansett for å ha en antiaterogen effekt. Flerumettede fettsyrer kan imidlertid også ha en negativ innvirkning med tanke på aterogenisitet. Flerumettede fettsyrer er mer utsatt for oksidasjon enn mettede fettsyrer, og på grunn av dette kan de føre til dannelse av cytotoxiske komponenter i LDL. Disse komponentene kan være en medvirkende årsak til aterosklerotiske forandringer i

blodkar. Oksidasjonsproduktene kan også være potensielt mutagene, og føre til utvikling av ondartede svulster (Molkentin 2000).

Det er ikke ønskelig med et for høyt forhold mellom linolsyre (C18:2 ω -6) og linolensyre (C18:3 ω -3) i kosten. I vestlige land har dette forholdet vist seg å være så høyt som 15-30:1, noe som fører til en mangel på linolensyre (C18:3 ω -3) (Lock & Bauman 2004; Simopoulos 2008). Et forhold mellom disse fettsyrene på 4:1 eller lavere anses som ideelt (Lock & Bauman 2004). Et høyt forhold mellom disse fettsyrene kan føre til utvikling av flere sykdommer, blant annet hjerte- og karsykdommer, kreft, inflammatoriske og autoimmune sykdommer. Flere studier har vist at et lavere forhold mellom disse fettsyrene i kosten kan ha positiv innvirkning på helsen (Simopoulos 2008).

Fordøyelsessystemet

Fordøyelsessystemet er et organsystem som strekker seg gjennom kroppen fra munnhulen til anus, og består av selve fordøyelsestrakten, og tilhørende organer som spyttkjertler, lever, galleblæren og bukspyttkjertelen.

Hovedoppgaven til fordøyelsessystemet er å prosessere mat, absorbere næringsstoffer fra den, og å kvitte seg med restene som kroppen ikke kan benytte seg av. Selve fordøyelsen deles i to deler; mekanisk og kjemisk fordøyelse. Den mekaniske delen er den fysiske nedbrytningen som maten gjennomgår ved tygging, og ved kontraksjoner i magesekken og tynntarmen. Den mekaniske fordøyelsen sørger for at maten får større overflate, som gjør den enklere å bryte ned for fordøyelsesenzymer.

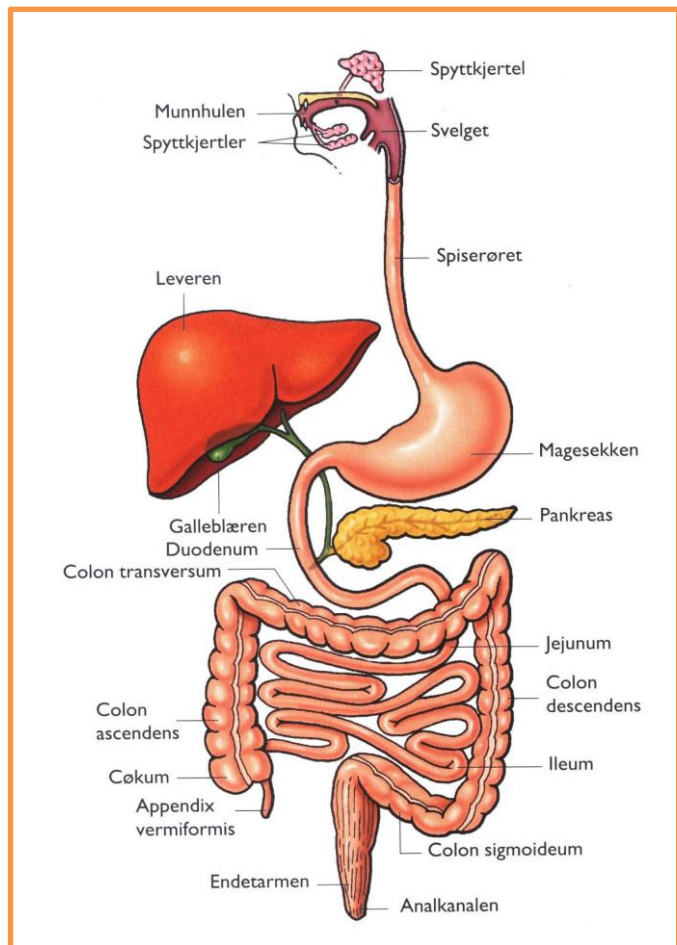
Fordøyelsesenzymerenes oppgave er å bryte ned større partikler til mindre bestanddeler, slik at disse kan tas opp i kroppen. Det er slike hydrolysereaksjoner som utgjør den kjemiske fordøyelsen (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Fordøyelsessystemet med tilhørende organer kan ses i figur 1.

Munnhulen

Munnhulen er det første steget i fordøyelsen, og den er sentral i forbindelse med inntak av mat og mekanisk bearbeiding av den. Tyggingen øker overflatearealet på maten, og stimulerer også spyttutskillelse. Spyttet har en pH på 6,8 – 7,0, og består hovedsakelig av vann, men inneholder også mineraler og proteiner som er viktige i forbindelse med fordøyelsen.

Lingual lipase skilles ut fra spyttkjertler i tungen (Mu & Høy 2004). Enzymet er ikke aktivt så lenge det befinner seg i munnhulen, men aktiveres først når det kommer i kontakt med det



Figur 1: Fordøyelsessystemet (Jacobsen 2010). Figuren viser selve fordøyelsessystemet og tilhørende organer som spiller en rolle i forbindelse med fordøyelsen.

sure miljøet i magesekken. Fettnedbrytning kan dermed ikke skje i munnhulen, men begynner først når maten har kommet ned i magesekken (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Magesekken

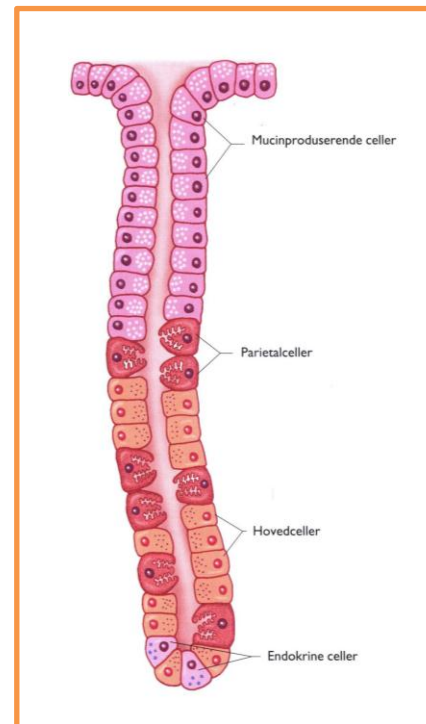
Magesekken fungerer som et lagringsorgan for maten som inntas. En tom magesekk har et volum på ca. 50 ml, men den har en unik evne til å utvide seg, og kan holde på mengder opp mot 4 l. Magesekken bryter ned maten mekanisk ved hjelp av kontraksjoner, samtidig som den blander den med magesaft som gjør den mer flytende. Det foregår også noe enzymatisk nedbrytning her, men mesteparten av fordøyelsen skjer i tynntarmen. Magesekken består av 4 deler; cardia, fundus, corpus og antrum. Fundus er sentral i forbindelse med utskillelse av magesaft som inneholder syrer og fordøyelsesenzymmer, mens antrum er viktig i forbindelse med den mekaniske bearbeidingen av maten (McClements & Li 2010). Pylorus, som befinner seg i enden av magesekken, er omsluttet av en ring av glatt muskulatur, et sfinkter, som er med på å regulere mengde og intervall av mageinnhold som slippes videre ut til tynntarmen.

Innsiden av magesekken består av kjertler som foreligger i groper i overflaten. Disse er omsluttet av et epitelcellelag bestående av flere celletyper:

- Mucinproduserende celler
- Regenerative stamceller
- Parietalceller
- Hovedceller
- Enteroendokrine celler

De mucin-produserende cellene skiller ut mucus som beskytter veggen i magesekken mot syreskader og mekanisk behandling. Regenerative stamceller er lokalisert i halsen på kjertlene. De deler seg raskt, og sørger for en kontinuerlig tilførsel av nye celler etter hvert som gamle celler dør. Parietalcellene skiller ut blant annet HCl.

Hovedcellene sekreterer gastrisk lipase og pepsinogen, mens de enteroendokrine cellene skiller ut hormoner og parakrine budbringere som regulerer fordøyelsen (Saladin 2010; Sand et al. 2006). Figur 2 viser en kjertel i magesekken som består av ulike celletyper.



Figur 2: Kjertel i magesekken bestående av ulike celletyper, endokrine celler, hovedceller, parietalceller og mucinproduserende celler (Jacobsen 2010).

Gastrisk sekresjon

Kjertlene i magesekken kan produsere 2 – 3 liter magesaft i løpet av en dag, og denne består hovedsakelig av vann, HCl og pepsin (Saladin 2010).

Magesaften inneholder en høy konsentrasjon av HCl som har en pH ned mot 0,9, men på grunn av at HCl fra parietalcellene blandes med sekreter fra andre celler, vil ikke pH-nivået i magesekken bli så lavt. I tillegg innehar en del matvarer en bufferkapasitet som er med på å binde en del av H⁺ fra HCl (Sand et al. 2006). I fastende tilstand vil pH i magesekken ligge et sted mellom 1 og 3, men etter et måltid vil den kunne endres betraktelig. Vanligvis vil matinntak føre til en merkbar pH-økning, før den gradvis synker igjen til ca. 2 i løpet av en times tid. Hvor fort og hvor mye pH synker vil avhenge av den opprinnelige pH i maten, dens komposisjon og bufferkapasitet (McClements & Li 2010).

HCl i magesaften har flere viktige funksjoner. Den spalter blant annet proenzymet pepsinogen til pepsin, og gir et surt miljø som er nødvendig for at pepsin skal kunne fungere. Aktivering av lingual lipase skjer også i magesekken, ved hjelp av HCl. Syren degraderer muskel- og bindevev, samt plantecellevegger i maten, slik at store matpartikler lettere brytes ned til mindre partikler. I tillegg er HCl sentral ved bekjempelse mot bakterier som inntas sammen med maten. (Saladin 2010; Sand et al. 2006)

Pepsin er en viktig bestanddel i magesaften. Enzymet degraderer proteiner ved at det spalter peptidbindinger i proteinkjedene. Pepsin dannes ved at pepsinogen, som skilles ut fra hovedcellene, spaltes når det kommer i kontakt med HCl i magesekken. Pepsinogen er i utgangspunktet inaktivt, men ved å spalte av noen av aminosyrene i proenzymet, vil det aktive enzymet pepsin frigis (Saladin 2010). Hovedcellene sekreterer også gastrisk lipase som, sammen med lingual lipase fra spyttkjertlene, fordøyer opptil 30 % av fett i den inntatte maten (Golding & Wooster 2010; Wilde & Chu 2011).

Tynntarmen

Tynntarmen er et oppkveilet organ som fyller mesteparten av bukhulen, og omtrent all kjemisk fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer foregår her. Tynntarmen utgjør den lengste delen av fordøyelsessystemet, og består av 3 deler; duodenum, jejunum og ileum. Duodenum utgjør de første 26 cm av tynntarmen (McClements & Li 2010), og tilførsel av bukspytt og galle foregår her. Bukspyttet inneholder enzymer som er viktige for den videre kjemiske fordøyelsen, og gallen er sentral i forbindelse med fettnekbrytning. HCl fra magesekken nøytraliseres når den transporteres videre til duodenum. I tillegg inaktiveres pepsin på grunn av den forhøyede pH-verdien. Jejunum er ca. 2,5 m lang, og befinner seg bak duodenum (McClements & Li 2010).

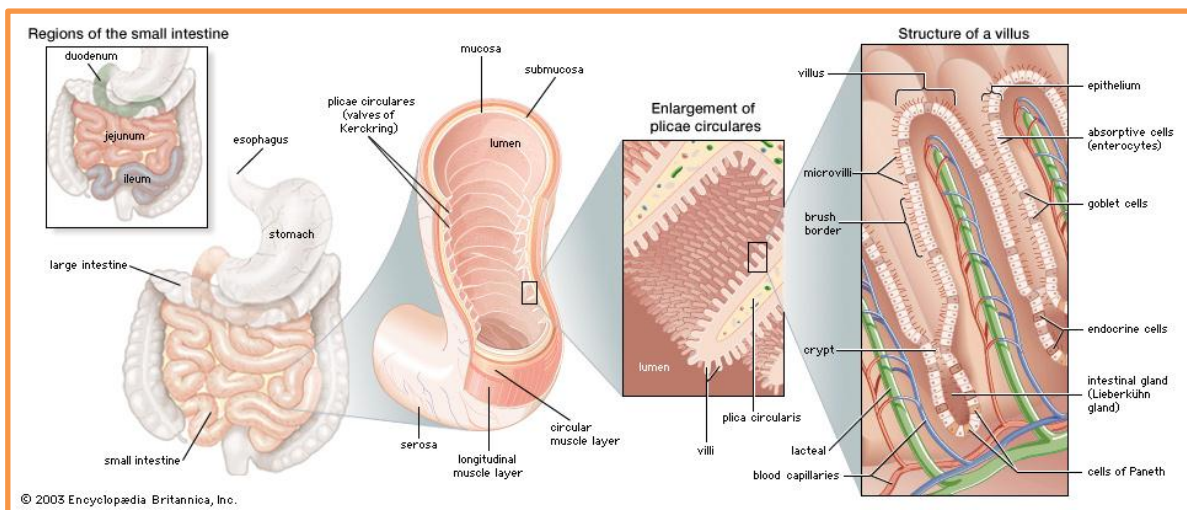
Denne delen av tynntarmen kjennetegnes ved at den har en sterk rød farge, som skyldes en rik blodtilførsel. Mesteparten av fordøyelsen og absorpsjon av næringsstoffer foregår her. Ileum utgjør den siste delen av tynntarmen, og er omtrent 3,5 m lang (McClements & Li 2010). Den skiller seg fra jejunum bl. a. ved at den er lysere i fargen, og ved at den har karakteristiske lymfeknuter, kalt Peyerske plakk, plassert i tarmveggen.

Innsiden av tynntarmen består av flere folder og innbuktninger. Disse gir tarmen en stor indre overflate, noe som er viktig for effektiv fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer. Det skiller mellom 3 typer folder; sirkulære folder, villi og mikrovilli. De sirkulære foldene opptrer fra duodenum til og med første halvdel av ileum, og gir tarmen en spirallignende innside.

Tarminnholdet forflyttes langs denne spiralen, noe som fører til at transporten gjennom tarmen går saktere, og sørger for bedre kontakt med tarmslimhinnen. De sirkulære foldene finnes i mindre grad i ileum, og er fraværende i siste halvdel, men dette utgjør ikke så mye for absorpsjonen av næringsstoffer, da mesteparten av denne er fullført før dette punktet.

Tarmslimhinnen er dekt av små tarmtotter, kalt villi. Disse er omsluttet av enterocytter og mucus-sekreserende begerceller. Overflaten på de absorptive cellene er dekt med en rekke mikrovilli, som inneholder enzymer som er sentrale i den siste delen av fordøyelsen. Enzymene slippes ikke ut i tarmlumen, og det er derfor viktig at tarminnholdet kommer i kontakt med disse. På innsiden av tarmtottene finnes det kapillærer og små lymfeganger som tar opp næringsstoffer og fett som absorberes fra tarmen, og transporterer disse videre ut i kroppen. Et utsnitt av tynntarmen med tarmtotter og villi kan ses i figur 3.

Mellom tarmtottene finnes det intestinale kjertler, kalt Lieberkühnske krypter, som ligner kjertlene i magesekken. Kjertlene består av enterocytter, begerceller, stamceller og panethceller. Panethcellene ligger samlet i bunnen av hver kjertel, og skiller ut lysozym, fosfolipase og proteiner som forhindrer bakteriell infeksjon i tarmslimhinnen. I duodenum finnes det også duodenale kjertler, kalt Brunner-kjertler, som skiller ut mucus. Mucuset er rikt på bikarbonat, og er nødvendig for å nøytralisere HCl fra magesekken (Saladin 2010).



Figur 3: Utsnitt av tynntarmen med tarmtotter og mikrovilli (Encyclopædia Britannica Online 2003).

Duodenal sekresjon

De intestinale kjertlene skiller ut 1 – 2 l sekret i løpet av en dag, og sekretet har en pH-verdi mellom 7,4 – 7,8. Det består hovedsakelig av vann, ioner og mucus, der de viktigste ionene er Na^+ og HCO_3^- . Sekretet inneholder svært lite enzymer. Mesteparten av enzymene i tynntarmen finnes i mikrovilli på tarmtottene, og i bukspytt som skilles ut fra pankreas (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Pankreas (bukspyttkjertelen)

Pankreas er både en endokrin og eksokrin kjertel, og 99 % av pankreas består av eksokrint vev. Det er denne delen som produserer bukspytt, som inneholder viktige fordøyelsesenzymer. Det skilles ut 1,2 – 1,5 l i løpet av en dag. Pankreas er bygd opp av grupper med små blærer, kalt acini. Disse ligner drueklaser, og er dekt med et epitelcellelag. Sekreter som skilles ut herfra, transporteres gjennom små ganger, som etter hvert ender i en stor pankreasgang. Denne gangen møter også gallegangen, og bukspytt og galle tilføres duodenum samtidig gjennom et sfinkter. Det finnes også en mindre avløper fra pankreasgangen, som gjør at bukspytt kan slippes ut i tarmen selv om det ikke slippes ut galle.

Sekretet som skilles ut fra pankreas er en basisk blanding av vann, enzymer, proenzymer, natriumbikarbonat og andre elektrolytter. Acini produserer trypsinogen, chymotrypsinogen og prokarboksypeptidase. Disse er proenzymer som aktiveres når de slippes ut i tarmen. Trypsinogen spaltes til trypsin ved hjelp av enterokinase som sekreseres fra tarmveggen. Siden trypsin er autokatalytisk, kan det videre danne mer trypsin ved å spalte trypsinogen på egen hånd. Enzymet spaltes også de andre proenzymene til henholdsvis chymotrypsin og

karboksypeptidase, i tillegg til å spalte proteiner i tarminnholdet. Acini produserer også pankreatisk amylase, pankreatisk lipase, ribonuklease og deoksyribonuklease. Disse spalter henholdsvis stivelse, fett, RNA og DNA, og aktiveres når de kommer i kontakt med galle eller ioner i tarmlumen. Natriumbikarbonat i sekretet er viktig for å nøytralisere HCl tilført fra magesekken, og for å gi en optimal pH for de pankreatiske enzymene (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Galle

Galle produseres i leveren, og transporteres derfra via kanaler som tilslutt munnene ut i duodenum, sammen med pankreasgangen. Det skilles ut 0,5 – 1 l galle fra leveren i løpet av en dag. Galleblæren fungerer som et lagringsorgan, og galle oppbevares og oppkonsentreres der dersom den ikke skilles ut i tarmen med en gang. Gallen består av mineraler, kolesterol, triglyserider, fosfolipider, gallepigmenter og gallesyrer. Gallesyrene produseres fra kolesterol, og bindes til enkelte aminosyrer før de transporteres fra leveren. De foreligger derfor som salter, og disse er, sammen med fosfolipider, nødvendig for fordøyelsen av fett. De resterende komponentene i gallen er avfallsstoffer som skilles ut via feces. Gallesaltene absorberes i liten grad gjennom tarmveggen, og kan dermed ta del i fettnedbrytningen gjennom hele tyntarmen, før de absorberes i siste del av ileum ved hjelp av en Na⁺-avhengig aktiv transport. Etter absorpsjon transporteres gallesaltene tilbake til leveren, hvor de på nytt skilles ut i galle. En liten del av gallesaltene vil ikke absorberes, og går dermed ut via feces. Nye gallesalter må da produseres ved hjelp av kolesterol i leveren (Saladin 2010; Sand et al. 2006).

Tykkertarmen

Tykkertarmen er omtrent 1,5 m lang, og kan deles inn i 4 deler; cecum, colon, rectum og analkanalen. Colon deles videre inn i 4 deler; ascending, transvers, descending og sigmoid. Alle komponenter som ikke absorberes tidligere i fordøyelsessystemet transporteres til tykkertarmen fra ileum (McClements & Li 2010). Tykkertarmens oppgave er blant annet å absorbere vann og ioner, og å kvitte seg med ufordøyd materiale via feces. Å redusere ufordøyd materiale til feces tar mellom 12 og 24 timer, og overskuddet som tarmen kvitter seg med består av bakterier, ufordøyd fiber, fett, en mindre andel protein, utskilte epitelceller, salter, mucus og andre fordøyelsessekreter. Fettet som skilles ut stammer stort sett fra nedbrutte epitelceller og bakterier (Saladin 2010).

Fettdordøyelse

Fett som inntas gjennom kosten består hovedsakelig av triglyserider, og under normale omstendigheter klarer fordøyelsessystemet å fordøye omtrent 95 % av disse. Triglyseridene består av 3 fettsyrer som er bundet til et glyserolmolekyl, og under fordøyelsen spaltes fettsyrene av, slik at det dannes monoglyserider, diglyserider, glyserol og frie fettsyrer.

Fettsyrener varierer i lengde og antall dobbeltbindinger, og i et humant kosthold kan man finne fettsyrer med 2 – 24 karbonatomer, og med opptil 6 dobbeltbindinger (Mu & Høy 2004).

Fettsyrener er en viktig kilde til energi, og brukes blant annet av muskelvev i kroppen.

Overskuddet lagres i fettvev (Mukherjee 2003).

Fettsyrenes struktur

Fettsyrer består av en hydrofob karbonkjede med en hydroksylgruppe i den ene enden, og en metylgruppe i den andre. De kan forekomme som mettet, enumettet eller flerumettet, avhengig av antall dobbeltbindinger i kjeden. Dobbeltbindinger vil i de fleste tilfeller foreligge i cis-konfigurasjon, som gir fettsyrene en «knekk» i kjeden. Dersom en fettsyre har to eller flere dobbeltbindinger, vil disse forekomme for hvert tredje karbonatom. Fettsyrene nummereres etter antall karbonatomer i kjeden etterfulgt av antall dobbeltbindinger, og hvor i kjeden disse befinner seg, eksempelvis C_{18:2} (9,12). Karbonatomene telles fra karboksylden. Det siste karbonatomet i kjeden, som befinner seg i metylenden, kalles ω (omega). For fettsyrer som omtales som ω-3 og ω-6, betyr det at den nærmeste dobbeltbindingen befinner seg ved det tredje eller sjette karbonatomet telt fra metylenden. De fleste fettsyrer kan syntetiseres i kroppen, med unntak av linolsyre (C_{18:2} ω-6) og linolensyre (C_{18:3} ω-3). Disse må tilføres gjennom kosten, og omtales som essensielle (Champe et al. 2008).

Nedbrytning og absorpsjon

Fettdordøyelsen er noe mer omfattende enn fordøyelsen av karbohydrater og proteiner (Saladin 2010). Dette skyldes at fett ikke er vannløselig, og dermed foreligger som fettdråper i det vandige miljøet i fordøyelsessystemet (Wilde & Chu 2011). Lipasen som sørger for nedbrytning av fett er vannløselig, og derfor kan bare fett nedbrytning skje i grensesnittet mellom vann og fett (Sand et al. 2006).

En begynnende nedbrytning av fett starter i magesekken, der kontraksjonene er med på å fordele fettpartiklene i mindre fettdråper. Dette gjør det mulig for lingual lipase og gastrisk lipase å starte den kjemiske nedbrytningen av triglyseridene (Whitney & Rolfes 2008). Lingual og gastrisk lipase spalter kun av én fettsyre i triglyseridene, hovedsakelig i sn₃-posisjon, noe som resulterer i dannelse av diglyserider og frie fettsyrer (Kontkanen et al. 2011; Mu & Høy

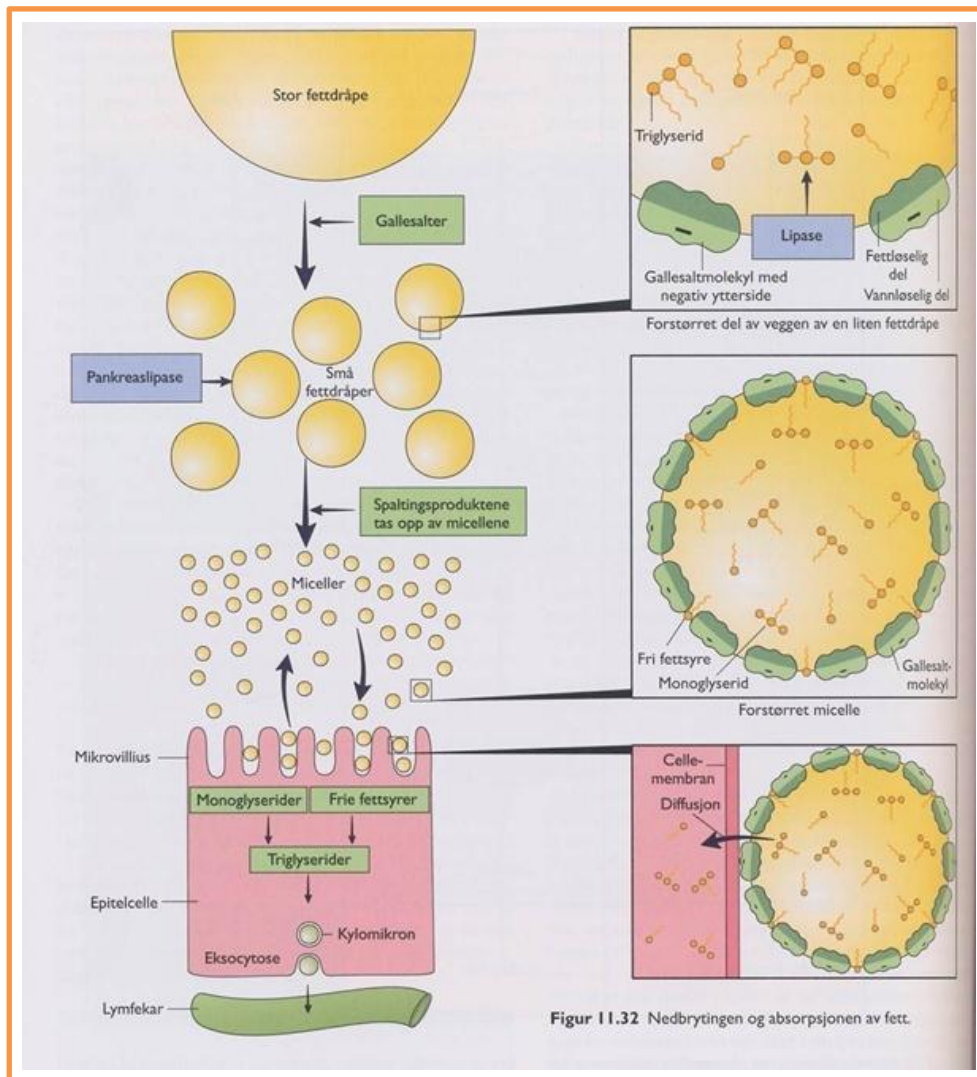
2004). Ved fordøyelse av blant annet melkefett er det hovedsakelig triglyserider som inneholder korte og mellom-lange fettsyrer i sn₃-posisjon som spaltes av gastrisk lipase. Disse fettsyrene er vannløselige i det sure miljøet i magesekken, og absorberes gjennom veggen i magesekken, og videre til portalvenen (Bracco 1994; Kontkanen et al. 2011). Diglyseridene har ikke denne egenskapen, og kan dermed ikke absorberes (Wilde & Chu 2011). Lingual og gastrisk lipase spiller en særskilt rolle i fettfordøyelsen hos nyfødte og hos personer med utilstrekkelig bukspyttproduksjon (Champe et al. 2008).

Mellom 4 og 40 % av fettsyrene i triglyseridene spaltes av i magesekken. Mengden avhenger av størrelsen på fettdråpene, og det spaltes av flere fettsyrer i små fettdråper enn i større, dette på grunn av overflatearealet. Små fettdråper har større overflateareal, som gir enzymene større mulighet til å utøve sin funksjon. Fettsyrene som frigis i magesekken kan ha en funksjon for den videre fordøyelsen i tynntarmen, ved at de blant annet stimulerer hormonutskillelse som fører til sekresjon av galle og bukspytt i duodenum (McClements & Li 2010).

Mesteparten av fettfordøyelsen foregår i tynntarmen, der pankreatisk lipase og galle er viktige bidragsyttere (Saladin 2010). Utskillelsen av disse reguleres av hormonet cholecystokinin (CCK), som skiller ut når fett transporteres til duodenum (Mu & Høy 2004; Whitney & Rolfes 2008). Det er særlig to komponenter i gallen som har en viktig funksjon i forbindelse med fettfordøyelsen, fosfolipidet lecithin og gallesaltene. Disse har hydrofobe regioner som festes til overflaten på fettdråpene, og hydrofile regioner som vender ut mot det vandige miljøet i tarmen. Ved hjelp av segmenteringsbevegelser i tarmen brytes fettdråpene opp i mindre dråper, og lecithin og gallesaltene hindrer dem i å koagulere igjen. Dette gir et stadig større overflateareal på fettdråpene, og dermed større mulighet for kjemisk nedbrytning ved hjelp av pankreatisk lipase (Saladin 2010).

Pankreatisk lipase festes til fettdråpene ved hjelp av en co-lipase, og spalter deretter triglyseridene i sn₁- og sn₃-posisjon. Det produseres dermed monoglyserider og frie fettsyrer. I noen tilfeller spaltes alle fettsyrene av, slik at det også frigis glyserol i tynntarmen (Golding & Wooster 2010). Glyserol, korte fettsyrer og mellom-lange fettsyrer kan enkelt diffundere inn i intestinalcellene, og videre over i blodbanen der de transporteres ved hjelp av albumin. Større molekyler, som monoglyserider og lange fettsyrer, er avhengig av miceller for å kunne absorberes fra tarmen (Champe et al. 2008; Whitney & Rolfes 2008). Slike miceller produseres i leveren, skiller ut i gallen, og består hovedsakelig av gallesalter. De hydrofobe delene av gallesaltene er vendt inn i micellen, mens de hydrofile peker utover. Dette forhindrer at micellene koagulerer. Når micellen kommer i kontakt med fettdråper i tarmen, absorberes

avspaltede monoglyserider og frie fettsyrer inn i micellene. Deretter transporteres de til tarmveggen, hvor micellene fester seg mellom mikrovilli på tarmtottene. Når de kommer i kontakt med epitelcellene, diffunderer noen av monoglyseridene og de frie fettsyrene inn i cellene, mens micellene blir værende i tarmlumen. De kan da absorbere nye nedbrytningsprodukter når de på nytt kommer i kontakt med fettdråper (Sand et al. 2006). Figur 4 illustrerer fett nedbrytning og absorpsjon i tynntarmen.



Figur 4: Nedbrytning og absorpsjon av fett i tynntarmen (Jacobsen 2010). Figuren viser hvordan fettdråper gradvis brytes ned i tarmen og absorberes i tarmveggen ved hjelp av miceller.

Inne i intestinalcellene transporteres monoglyseridene og de frie fettsyrene til glatt endoplasmatisk retikulum, hvor de resyntetiseres til triglyserider. Triglyseridene pakkes sammen med fosfolipider, kolesterol og proteiner i golgiapparatet, og danner kylomikroner.

Kylomikronene transporteres videre via lymfesystemet, før de etter hvert overføres til blodbanen (Saladin 2010).

Transport

Etterhvert som kylomikronene transporteres rundt i blodbanen, vil triglyseridene spaltes av og absorberes av celler som har behov for dem. Dette fører til at kylomikronene minker i størrelse, før det til slutt bare er kylomikronrester igjen. Disse transporteres til leveren og brytes ned. Leveren produserer samtidig lipider som, sammen med rester fra kylomikronene, pakkes med proteiner til partikler kalt VLDL (Very Low Density Lipoprotein). VLDL transporteres rundt i blodbanen, og avleverer triglyserider til celler som har behov for dem. Etersom triglyseridene spaltes av, vil tettheten til lipoproteinene øke, og VLDL omdannes til LDL (Low Density Lipoprotein), som inneholder få triglyserider, men derimot mye kolesterol. LDL sirkulerer rundt i kroppen og avleverer triglyserider, kolesterol og fosfolipider til celler, som bruker komponentene til blant annet oppbygging av membraner, eller lagrer dem for senere bruk.

Celler rundt om i kroppen kan også frigi lipidkomponenter i blodbanen. For å transportere disse, produseres HDL (High Density Lipoprotein), som har i oppgave å transportere glyserol, fettsyrer, kolesterol og fosfolipider tilbake til leveren der de enten resirkuleres eller skilles ut via galle. På grunn av at HDL fjerner kolesterol og andre lipidkomponenter som skilles ut i blodbanen, blir det ansett som gunstig for helsen, mens LDL, som avleverer slike komponenter til celler i kroppen, er forbundet med uønskede helseeffekter (Whitney & Rolfes 2008).

Mål med oppgaven

Denne oppgaven gikk ut på å fordøye 6 ulike oster, hvor én var ystet på geitemelk og de resterende på kumelk, i et *in vitro* fordøyelsessystem. Dette skulle gjennomføres ved hjelp av human mage- og tarmsaft. Det skulle videre undersøkes hvordan fettnebdrytningen i ostene foregikk ved å analysere for frie fettsyrer ved ulike trinn i fordøyelsen. Det skulle også undersøkes om ostene inneholdt frie fettsyrer av helsemessig betydning. Før det kunne undersøkes hvordan frigjøringen av frie fettsyrer foregikk, skulle det utarbeides en modifisert metode for optimal ekstraksjon av fett i fordøyd og ufordøyd ost.

Materialer og metoder

Det ble benyttet seks ulike oster i denne oppgaven. Alle ostene var produsert av TINE Meierier, og ble handlet inn på Coop Mega Ås. Én av ostene, Snøfrisk hvitost, var ystet på geitemelk, mens de resterende var ystet på kumelk. Ostene som ble benyttet kan ses i figur 5.

De seks ostene var henholdsvis:

- Norvegia original (lagringstid ca. 3 måneder)
- Norvegia lettere
- Norvegia økologisk
- Norvegia vellagret med skorpe (lagret i minimum 9 måneder)
- Norvegia ekstra vellagret med skorpe (lagret i minimum 15 måneder)
- Snøfrisk hvitost



Figur 5: Ostene som ble brukt til fordøyelsesforsøket (TINE SA 2012a; TINE SA 2012b; TINE SA 2012c; TINE SA 2012d; TINE SA 2012e; TINE SA 2012f)

Tabell 3 viser energiinnhold, samt mengde protein, karbohydrater og fett i de ulike ostene.

Tabell 3: Næringsinnhold pr. 100 g ost i de ulike ostene (TINE SA 2012a; TINE SA 2012b; TINE SA 2012c; TINE SA 2012d; TINE SA 2012e; TINE SA 2012f)

	Norvegia original	Norvegia lettere	Norvegia økologisk	Norvegia vellagret	Norvegia ekstra vellagret	Snøfrisk hvitost
Energi	1458 kJ (351 kcal)	1136 kJ (272 kcal)	1458 kJ (351 kcal)	1495 kJ (360 kcal)	1495 kJ (360 kcal)	1518 kJ (366 kcal)
Protein	27 g	32 g	27 g	27 g	27 g	24 g
Karbohydrater	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g	0 g
Fett	27 g	16 g	27 g	28 g	28 g	30 g

In vitro fordøyelse

Det ble gjennomført et fordøyelsesforsøk for å se nærmere på nedbrytning av fett i ostene. For at forsøket best mulig skulle ligne en human fordøyelse, ble det tilsatt human mage- og tarmsaft, og en temperatur på 37 °C ble opprettholdt under hele prosessen. Det ble tatt utgangspunkt i et tidligere fordøyelsesforsøk av (Qureshi et al. 2012, ikke publisert), men metoden ble noe modifisert til dette forsøket. Det ble gjennomført 2 fordøyelsesforsøk per ost.

Mage- og tarmsaft

Den humane mage- og tarmsaften var aspirert fra frivillige donorer ved et tidligere tidspunkt, og oppbevart ved -80 °C frem til bruk. Mengden mage- og tarmsaft som ble tilsatt under forsøket ble bestemt med utgangspunkt i proteaseaktiviteten i sekretene. Dette ble gjort fordi prøveuttak fra fordøyelsesforsøket også skulle brukes til proteinanalyser ved en annen anledning. Utrekningene ble utført av Ellen Ulleberg og Irene Comi ved IKBM. På grunn av behov for store mengder mage- og tarmsaft ble det brukt sekreter fra ulike batcher. Hver batch bestod av sammenslåtte individuelle aspirater. Enzymaktiviteten i de ulike batchene var forskjellig, og det ble derfor tilsatt ulike mengder av mage- og tarmsaft under fordøyelsesforsøkene. Tabell 4 viser protease- og lipaseaktiviteten i de ulike batchene.

Lipaseaktiviteten er kun oppgitt i tarmsaft, da den ikke var analysert i magesaft. En oversikt over tilsatt mengde mage- og tarmsaft kan ses i tabell 5. Som en konsekvens av at det ble tatt utgangspunkt i proteaseaktiviteten ved tilsetning av mage- og tarmsaft, ble det tilsatt ulike mengder lipase i de ulike fordøyelsesforsøkene. Lipaseaktiviteten er oppgitt i tabell 5 som antall units tilsatt. En unit i forbindelse med enzymaktivitet er definert som «mengden av

enzymløsning som gir en absorbanse lik 1,0 ved 280 nm etter inkubering med substrat ved 37 °C i 10 min.» (Inglingstad et al. 2010). Når det gjelder protease ble det tilsatt 378 U i form av magesaft og 334 U i tarmsaft. Mage- og tarmsaft er videre i teksten omtalt som HGJ (Human Gastric Juice) og HDJ (Human Duodenal Juice).

Tabell 4: Protease- og lipaseaktivitet i HGJ og HDJ oppgitt i U/ml i de ulike batchene. Lipaseaktivitet ble bare målt i HDJ, og er derfor ikke oppgitt i HGJ.

Batch	Proteaseaktivitet		Lipaseaktivitet
	HGJ	HDJ	HDJ
4	22,0 U/ml	16,7 U/ml	971 U/ml
3	40,9 U/ml	12,6 U/ml	1180 U/ml
2	10,4 U/ml	14,5 U/ml	373 U/ml

Tabell 5: Oversikt over tilsatt mengde HGJ og HDJ i de ulike fordøyelsesforsøkene gjort for hver ost. Den aktuelle mengden lipase som er tilsatt er oppgitt i HDJ. Lipaseaktivitet var ikke målt i HGJ, og er derfor ikke oppgitt her.

Ost	For-søk	HGJ		HDJ		
		Batch	Tilsatt mengde	Batch	Tilsatt mengde	Lipase Tilsatt units
Norvegia original	1	4	17,2 ml	4	20,0 ml	19420
	2	4	17,2 ml	3	26,5 ml	31270
Norvegia lettere	1	3	9,25 ml	3	26,5 ml	31270
	2	2	36,4 ml	2	23,0 ml	8579
Norvegia økologisk	1	3	9,25 ml	3	26,5 ml	31270
	2	2	36,4 ml	2	23,0 ml	8579
Norvegia vellagret	1	4	17,2 ml	4	20,0 ml	19420
	2	4	17,2 ml	3	26,5 ml	31270
Norvegia ekstra vellagret	1	2	36,4 ml	2	23,0 ml	8579
	2	2	36,4 ml	2	23,0 ml	8579
Snøfrisk hvitost	1	4	17,2 ml	4	20,0 ml/17,0 ml *	19420/16507 *
	2	2	36,4 ml	2	23,0 ml	8579

* Grunnet for lite HDJ ble det bare tilsatt 17,0 ml i den fjerde posen (HDJ 120) i dette forsøket.

Kjemikalier og utstyr

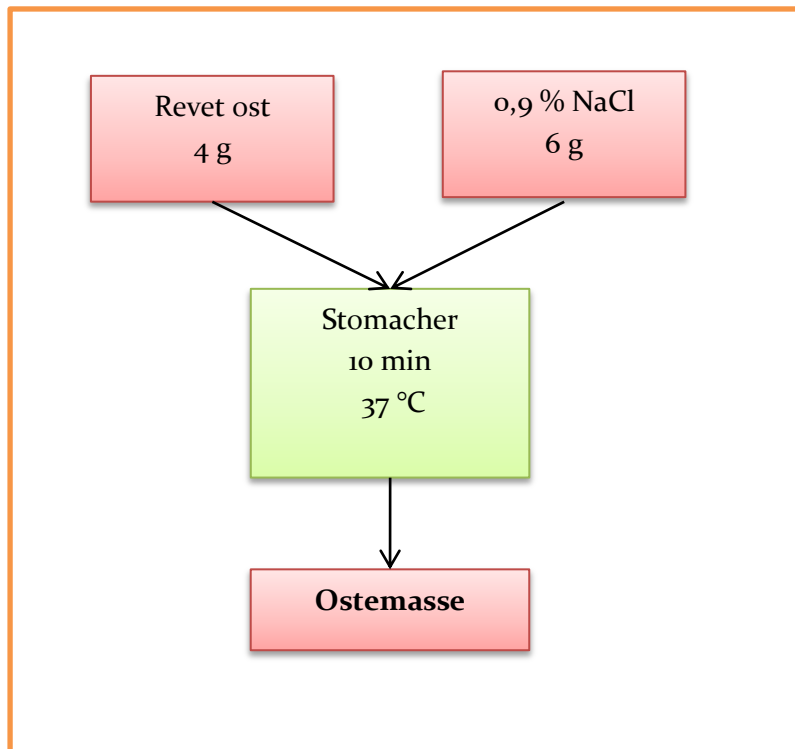
Følgende kjemikalier og utstyr ble brukt under fordøyelsesforsøket.

Stomacher	Colworth Stomacher 400. A. J. Seward
Stomacherposer	Classic 400 Standard bags. Seward Limited
pH-meter	PHM 210 Standard pH meter. Meterlab [®] Radiometer Copenhagen
Ultra-turrax	Yellowline DI18 basic. IKA [®] -Werke GMBD & co KG
NaCl	EMSURE [®] ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
HCl	pro analysi, Merck KGaA
NaOH	pro analysi, Merck KGaA

Fordøyelse av ostene

Ostene ble først revet opp ved hjelp av et rivjern. Deretter ble 4 g ost veid opp direkte i en stomacherpose, og tilsatt 0,9 % NaCl (fysiologisk saltvann) til den totale vekten utgjorde 10 g. For hvert fordøyelsesforsøk ble det veid opp ost og 0,9 % NaCl i 4 stomacherposer, slik at det var mulig å ta ut én pose for hvert uttak i fordøyelsesprosessen. Dette ble gjort fordi osteløsningen ikke ble homogen etter behandling i stomacheren, og det var derfor vanskelig å pipettere ut en representativ prøve underveis i fordøyelsesprosessen.

Stomacherposene med innhold ble videre plassert i en stomacher ved 37 °C. For å opprettholde denne temperaturen under hele prosessen, ble stomacheren plassert i et inkubatorskap. Stomacheren hadde bare én hastighet, og det var ikke mulig å regulere denne. Prøvene fikk stå i 10 minutter, før de ble tatt ut og plassert i et vannbad ved 37 °C. Figur 6 viser behandlingen av ostene før selve fordøyelsen.



Figur 6: Flytskjema over forbehandling av ostene før fordøyelsen.

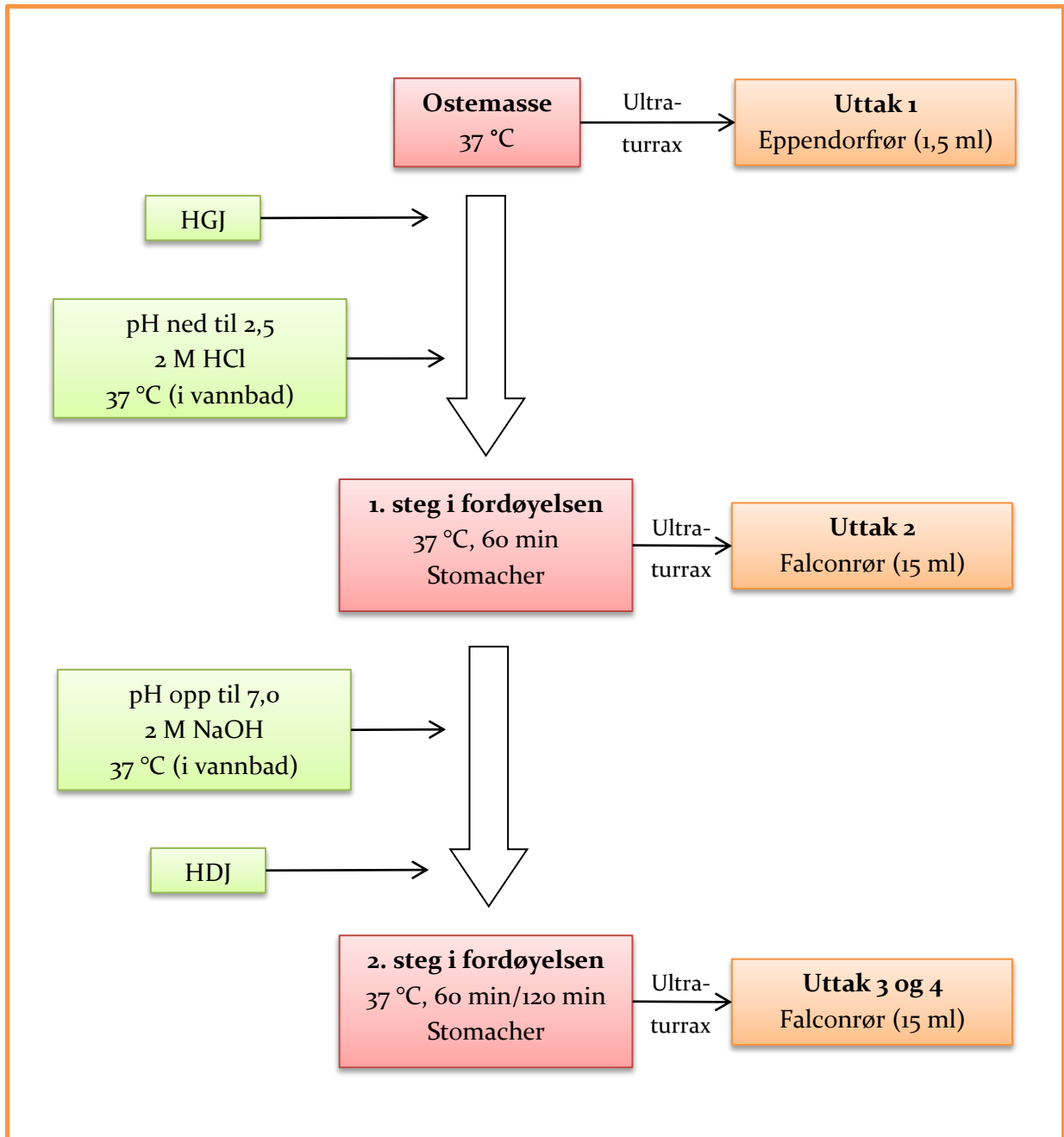
Den første posen ble tatt ut etter dette trinnet. Prøvematerialet ble overført til et begerglass, og homogenisert ved hjelp av en ultra-turrax. Videre ble innholdet fordelt i 1,5 ml eppendorfrør, og fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

De resterende 3 stomacherposene ble satt i vannbad og tilsatt HGJ, før pH ble justert sakte ned til ca. 2,5 ved hjelp av 2 M HCl. Mengden HGJ tilsatt varierte for de ulike prøvene, da det ble brukt HGJ fra ulike batcher. For oversikt over tilsatt mengde, se tabell 5 s. 20. Etter pH-justeringen ble posene satt tilbake i stomacheren, før de ble tatt ut igjen 60 minutter etter at HGJ var tilsatt.

Den andre posen ble tatt ut etter dette trinnet. Prøvematerialet ble overført til et begerglass og homogenisert på samme måte som det første uttaket. Prøven ble fordelt i 15 ml falconrør, og fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

De to siste posene ble plassert i vannbad, og pH ble deretter justert opp til ca. 7 ved hjelp av 2 M NaOH. Etter pH-justeringen ble det tilsatt HDJ til posene. Mengden HDJ tilsatt varierte også her mellom de ulike prøvene, på grunn av ulike batcher. Mengden som ble tilsatt til de ulike prøvene kan ses i tabell 5 s. 20. Etter tilsetning av HDJ ble posene plassert tilbake i

stomacheren. Den tredje posen ble tatt ut etter 60 minutter, og den fjerde posen ble tatt ut etter 120 minutter. Prøvematerialet i disse posene ble på lik linje som de tidligere uttakene, homogenisert, fordelt i 15 ml falconrør og fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Figur 7 viser en oversikt over fordøyelsesprosessen.



Figur 7: Flytskjema over fordøyelse av ostene. Uttak 1 tilsvarer ufordøyd ost, uttak 2 er ost fordøyd med HGJ, uttak 3 er ost fordøyd med HDJ i 60 min., og uttak 4 er ost fordøyd med HDJ i 120 min..

Fettanalyser

De ufordøyde og fordøyde osteprøvene fra fordøyelsesforsøket ble analysert med hensyn på frie fettsyrer. Til fettekstraksjonen ble Folchs metode (Folch et al. 1956) brukt med noen få modifikasjoner. Videre ble de ulike lipidfraksjonene separert ved hjelp av fast fase ekstraksjon (SPE - solid phase extraction) etter en protokoll basert på (Ruiz et al. 2004), før de ble metylert og analysert ved hjelp av GC-FID. For å unngå kontaminasjon av prøvene på best mulig måte, ble det i hovedsak brukt glassutstyr under prøveopparbeidelsen. Tidligere analyser har vist at bruk av plastutstyr er ugunstig, da plasten inneholder forurensning i form av frie fettsyrer (hovedsakelig C16 og C18) (Russell & Werne 2007). Under prøveopparbeidelsen ble det kun brukt plast i ett tilfelle, i forbindelse med tillaging av standardløsninger. For å lage en mest mulig nøyaktig løsning av intern standard ble det brukt automatpipette med plastspiss, da det ikke var glassutstyr tilgjengelig med samme nøyaktighetsgrad.

Kjemikalier og utstyr

Følgende kjemikalier og utstyr ble brukt til fettekstraksjonen, fast fase ekstraksjonen, og analyse ved GC-FID:

Fettekstraksjon – Folchs metode

Kloroform	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
Metanol	LiChrosolve, Merck KGaA
NaCl	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
Standard – frie fettsyrer	C19, nonadekansyre, Larodan AB
Standard – triglyserider	C19, trinonadekanoin, Larodan AB
Sentrifuge	Heraeus Multifuge X3R Centrifuge. Thermo Scientific

Fast fase ekstraksjon – SPE

Heksan	EMSURE® ACS for analysis, Merck KGaA
Kloroform	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
Metanol	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
Dietyleter	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA
Eddiksyre	Glacial, 100 % anhydrous GR for analysis, Merck KGaA
Bortrifluorid-metanolløsning	Aldrich
Glasskolonner	Chromabond. Aminopropyl-modified silica, 3 ml/500 mg, Macherey-Nagel GMBH & co. KG

Analyse av frie fettsyrer – GC-FID

Instrumenter:

GC	Carlo Erba, series 8000, Instrument Teknikk, Italia
Autoinjektor	AS2000, Thermo Finnigan, Milan Italia
Hydrogengenerator FID-160	VWR, Sveits
Interface	NCI 900, Perkin Elmer, Connecticut USA
LC-terminal	TotalChrom, Perkin Elmer, Connecticut USA

Kjemikalier:

Standardløsning	ME 61 miks, Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Intern standardløsning	C19:0, Larodan
N-heksan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

Kromatografiske betingelser:

GC-kolonne	CP-Sil 88, Varian, Agilent Technologies, Matriks, Oslo, Norge
Kolonnelengde	50 m
Indre diameter	0,25 mm
Filmtykkelse	0,20 µm
Bæregass	Helium ultra plus 6.0, Aga
Bæregassflow	75 kPa
Toppsplit	1,0 ml/min
Bunnsplit	20 ml/min
Detektor	Flammeionisasjonsdetektor
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	300 °C
Hydrogengenerator	1,5 bar

GC-temperaturprogram*:

Steg 1	3 min. ved 60 °C
Steg 2	1 min. ved 140 °C
Steg 3	1 min. ved 160 °C
Steg 4	15 min. ved 210 °C

* Temperaturstigningen mellom steg 1 og 2, og steg 2 og 3 er 10°C/minutt, mellom steg 3 og 4 er stigningen 3°C/minutt.

Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost

Før osteprøvene ble analysert ble det gjennomført forforsøk for å undersøke hvordan metoden fungerte, og hvilken mengde prøvemateriale det skulle brukes. De fordøyde osteprøvene som skulle analyseres var svært fortynnet, og det var derfor ønskelig å undersøke hvor store mengder av prøvematerialet det var mulig å bruke til analysene, da det ble stilt spørsmål om det var nok fett til stede i prøvene til at det kunne detekteres i GC-FID.

I det første forforsøket ble det brukt en prøve av Norvegia original fordøyd med HGJ. Av denne prøven ble det tatt ut 5 ulike mengder til fettekstraksjonen, som ble overført til glassrør. Mengdene det ble forsøkt å bruke var henholdsvis 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml og 7 ml. Til hver av disse ble det tilsatt 20 ml kloroform:metanol (2:1). På grunn av begrensninger i utstyr, og for å unngå å bruke store mengder løsemiddel, kunne det ikke brukes mer enn 20 ml av denne løsningen. Etter tilsetning av løsemiddel til prøvematerialet ble rørene ristet kort ved hjelp av en vortex. Da det viste seg at de 3 største mengdene ikke egnet seg til denne metoden, på grunn av en tydelig faseseparasjon ved tilsetning av løsemiddel, ble videre bearbeiding av prøvene kun gjennomført for rørene som inneholdt 1 ml og 2 ml prøvemateriale.

På grunn av at dette bare var et forforsøk, ble det ikke tilsatt intern standard i dette tilfellet. Rørene ble videre inkubert på et ristebrett ved 150 rpm i 15 min. 4 ml 0,9 % NaCl ble så tilsatt, før rørene igjen ble ristet på en vortex. Deretter ble de plassert i en sentrifuge, og sentrifugert i 10 min. i romtemperatur ved 2000 rpm. Etter sentrifugering ble den nedre fasen i rørene pipettert ut ved hjelp av en glasspasteurpipette, og overført til metyleringsrør, før inndampning med N₂.

Etter inndampingen ble det ekstraherte fett løst i en blanding av heksan:kloroform:metanol (95:3:2). Det ble tilsatt 1 ml av denne løsningen, og rørene ble deretter plassert på et ristebrett ved 100 rpm, mens SPE-kolonnene ble aktivert. Kolonnene ble plassert under vakuum, og aktivert med 7 ml heksan. Deretter ble ca. 250 µl av prøvematerialet fra de to rørene plassert på kolonnene. 5 ml kloroform ble så tilsatt for å vaske ut triglyseridene. Videre ble det tilsatt 5 ml dietyler:HAc (98:2) for eluering av frie fettsyrer. Denne fraksjonen ble samlet opp i metyleringsrør, og videre dampet inn med N₂. Figur 8 viser en glasskolonne og «vacuum manifold» brukt til fast fase ekstraksjonen.

De frie fettsyrene ble deretter metylert ved hjelp av BF₃-MeOH. 1 ml av denne løsningen ble tilsatt til hvert rør, før de ble inkubert i et vannbad ved 70 °C i 5 min.. Videre ble det tilsatt 1 ml heksan til rørene, og ca. 250 µl av den øvre fasen ble pipettert ut og overført til GC-vials med

inserts. Prøvene ble deretter analysert i GC-FID. For kromatografiske betingelser henvises det til «Analyse av frie fettsyrer – GC-FID» s. 25.

Det ble videre gjennomført et forforsøk med en prøve av Norvegia lettere fordøyd med HDJ i 60 min.. Dette var en av prøvene som var mest fortynnet, som i tillegg inneholdt minst fett i utgangspunktet. Det ble brukt 1 ml og 2 ml av denne prøven, og prøveopparbeidelsen ble gjort på samme måte som for Norvegia original fordøyd med HGJ. Det ble også gjennomført en kontrollveiing med Norvegia lettere fordøyd med HDJ i 60 min.. Dette ble gjort for begge rørene, som inneholdt henholdsvis 1 ml og 2 ml prøvemateriale. Kontrollveiingen ble utført ved å pipettere ut hele den nedre fasen etter sentrifugering, og deretter veie denne etter inndamping med N₂. Dette ble gjort for å sammenligne utbyttet av ekstrahert fett fra 1 ml prøve kontra 2 ml prøve.

Det ble gjennomført et siste forforsøk, der det ble forsøkt å løse det ekstraherte fett i mindre mengde heksan:kloroform:metanol (95:3:2) før plassering på SPE-kolonnene, for å se om dette kunne gi bedre kromatogrammer etter analyse i GC-FID. Fettmengden i de ulike prøvene ble regnet ut teoretisk, og med bakgrunn i disse tallene ble det besluttet å prøve to ulike mengder av denne løsningen. Det ble brukt 250 µl heksan:kloroform:metanol (95:3:2) for å løse fett i en prøve med Norvegia lettere fordøyd med HDJ, og 500 µl for å løse fett i en tilsvarende prøve med høyere fettinnhold.

Osteprøver

Før fett kunne ekstraheres, ble alle prøvene fra det første uttaket (de ufordøyde prøvene) fortynnet med 0,9 % NaCl. Dette ble gjort fordi ostemassen var svært viskøs og vanskelig å jobbe med. Alle prøvene fra dette uttaket ble fortynnet 1:10, med unntak av Norvegia lettere som ble fortynnet 1:5. Dette på grunn av det lave fettinnholdet i denne osten, i forhold til de andre ostene. Prøvene fra de resterende uttakene ble benyttet uten videre bearbeiding, men ble ristet opp ved hjelp av en vortex før bruk.



Figur 8: SPE-kolonne og "vacuum manifold". Det øverste bildet viser en glasskolonne som ble brukt i oppgaven. Disse ble plassert på et "vacuum manifold" som vises nederst i figuren. (Gemini BV Laboratory 2012; Macherey-Nagel 2012)

Etter forforsøkene ble det besluttet å bruke 1 ml av prøvematerialet til fetttekstraksjonen, og den videre bearbeidingen av prøvene ble gjennomført på samme måte som nevnt over. Det ble i tillegg tilsatt intern standard til prøvene i forbindelse med fetttekstraksjonen. For frie fettsyrer ble det brukt C₁₉ (nonadekansyre) løst i kloroform med en konsentrasjon på 1 mg/ml. 200 µl av denne ble tilsatt til hver prøve. Selv om det bare skulle analyseres for frie fettsyrer i denne oppgaven, ble det også tilsatt intern standard for triglyserider (C₁₉, trinonadekanoin). Det ble tilsatt 250 µl av denne, med en konsentrasjon på 10 mg/ml. Ved separering av lipidfraksjonene, ble også triglyseridfraksjonen samlet opp, og oppbevart for senere analyser.

Alle prøvene ble løst i 500 µl heksan:kloroform:metanol (95:3:2) før SPE, med unntak av Norvegia lettere fordøyd med HDJ som ble løst i 250 µl av denne løsningen. Som en kontroll på analysen ble det også opparbeidet kontrollprøver uten prøvemateriale underveis. Disse ble analysert på lik linje som de øvrige prøvene. Under opparbeidingen ble én av prøvene ødelagt, og det mangler derfor analyseresultater fra en prøve med Norvegia original fordøyd med HDJ i 60 min. Etter prøveopparbeidingen ble samtlige prøver oppbevart ved -20 °C frem til analyse i GC-FID.

Standardløsninger

I tillegg til osteprøvene ble det også opparbeidet standarder, slik at det kunne lages standardkurver for de ulike fettsyrene det ble analysert for. De ulike fettsyrene gir noe ulik respons ved GC-FID analyse, og det ble derfor utarbeidet responsfaktorer for de ulike fettsyrene. Dette ble gjort ved å bruke 3 ulike konsentrasjoner av en standardmiks (ME61), som ble tilsatt metylester av C₁₉. C₁₉ måtte tilsettes da den var brukt som intern standard i osteprøvene, og ikke fantes i standardmiksen i utgangspunktet.

Standardmiksen bestod av 14 ulike fettsyrer, og var blandet ut i forholdet 1:10 (100 µg standardmiks løst i 900 µl heksan). Ut i fra denne løsningen ble det pipettert ut 3 ulike volum på henholdsvis 2,5 µl, 5,0 µl og 7,5 µl. Videre ble det tilsatt heksan til det totale volumet utgjorde 200 µl i hver prøve. Det ble deretter laget en løsning med metylester av C₁₉ løst i heksan, med en konsentrasjon på 2 mg/ml. 200 µl av denne løsningen ble tilsatt til de 3 prøvene, før de ble analysert i GC-FID. Responsfaktorene for de enkelte fettsyrene ble brukt for å korrigere hvor mye av fettsyrene som var ekstrahert i forhold til den tilsatte intern standarden ved omregning av arealene i kromatogrammene til mg fettsyre pr. g ost.

Resultater

Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost

Før de ufordøyde og fordøyde osteprøvene kunne analyseres for frie fettsyrer, ble det gjennomført noen forforsøk for å prøve ut den valgte fett ekstraksjonsmetoden. Det første forforsøket gikk ut på å finne en optimal mengde av osteprøvene som kunne brukes til ekstraksjonen. Da enkelte av prøvene var svært fortynnet, ble det stilt spørsmål om det var nok fett til stede til at det kunne detekteres i GC-FID. Det var derfor ønskelig å kunne bruke størst mulig mengde av de fordøyde og ufordøyde osteprøvene til ekstraksjonen. Ekstraksjon fra ost fordøyd med både HGJ og HDJ i 60 min. ble utprøvd.

Det ble forsøkt å bruke 5 ulike mengder av Norvegia original fordøyd med HGJ, på henholdsvis 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml og 7 ml. De 3 høyeste mengdene på 3 ml, 5 ml og 7 ml ble ekskludert. Dette på grunn av at det oppstod en tydelig faseparasjon allerede ved tilsetning av kloroform:metanol (2:1), noe som ikke var ønskelig på dette tidspunktet. En liten antydning til faseparasjon kunne også ses i prøven som inneholdt 2 ml, men denne ble allikevel bearbeidet videre for å se hva som ble detektert i GC-FID.

Resultatene viste at bruk av både 1 ml og 2 ml av Norvegia original fordøyd med HGJ ga utslag ved analyse med GC-FID, men toppene i kromatogrammene viste seg å være mindre enn foretrukket i prøven som inneholdt 1 ml, og dermed vanskelig å integrere. Prøven som inneholdt 2 ml av prøvematerialet ga finere topper som var lettere å integrere.

Det ble videre gjort et forforsøk med Norvegia lettere fordøyd med HDJ i 60 min., der det ble forsøkt å bruke henholdsvis 1 ml og 2 ml prøvemateriale. Dette var en av prøvene som var mest fortynnet, og som i tillegg inneholdt minst fett i utgangspunktet. Det var derfor ønskelig å se om det var nok fett til stede i denne prøven til at det ble detektert i GC-FID. Begge prøvemengdene på 1 ml og 2 ml ga utslag i kromatogrammene etter analysen, men ved sammenligning av kromatogrammene for disse to prøvene, viste det seg at én av fettsyrene (C_{4:0}) som var detektert i prøven som inneholdt 2 ml av prøvematerialet, ikke ble detektert i prøven som inneholdt 1 ml.

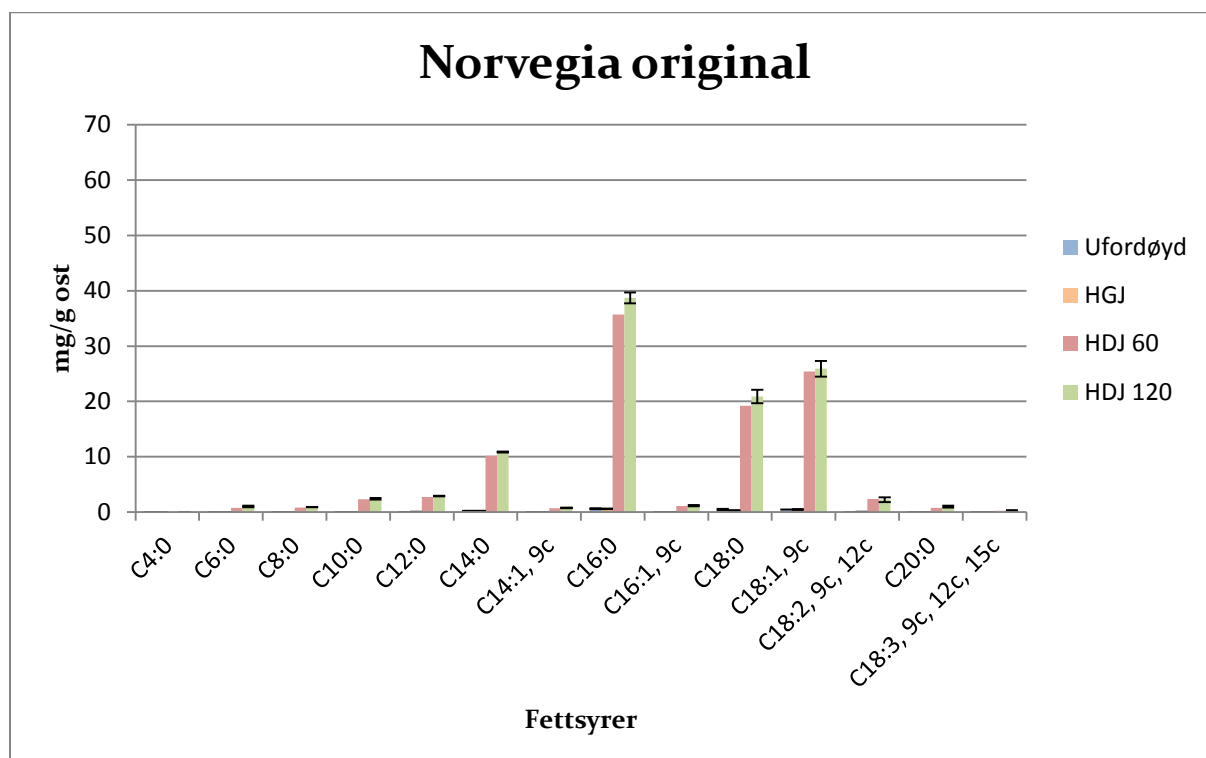
Det ble også gjort en kontrollveiling av Norvegia lettere fordøyd med HDJ i 60 min. for å sammenligne utbyttet av ekstrahert fett fra 1 ml prøve kontra 2 ml prøve. Etter fett ekstraksjonen, og påfølgende tørking med N₂, viste det seg at det var ekstrahert omtrent like mye fett fra de to prøvene som inneholdt 1 ml og 2 ml prøvemateriale.

Det ble tilslutt gjennomført et forforsøk for å undersøke om det var mulig å bruke en mindre mengde av heksan:kloroform:metanol (95:3:2) til å løse det ekstraherte fett for separering av lipidfraksjonene ved SPE. I de to tidligere forforsøkene ble det brukt 1 ml av denne løsningen, men det var ønskelig å undersøke om det var mulig å bruke mindre mengder, på henholdsvis 500 µl og 250 µl, for å se om dette ga bedre kromatogrammer etter analyse i GC-FID. Dette viste seg å gi gode resultater, med større topper som var enklere å integrere.

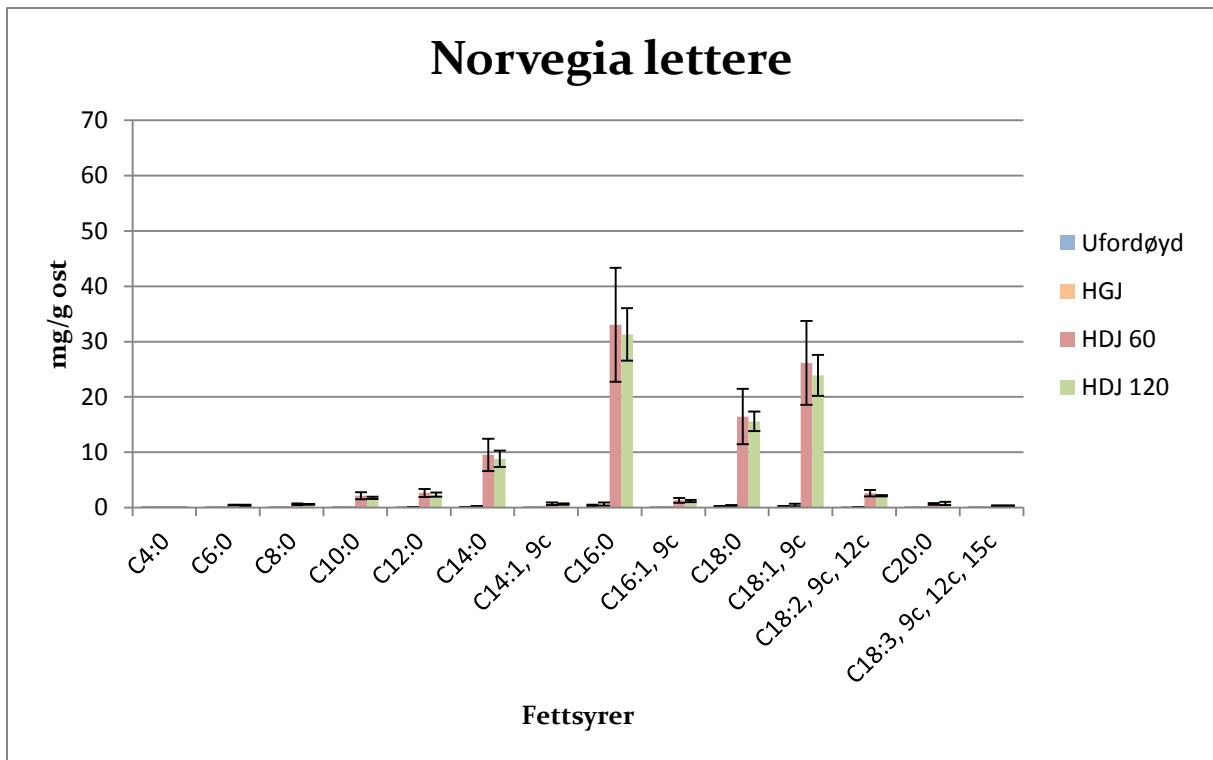
Ut i fra resultatene fra forforsøkene ble det besluttet å bruke 1 ml av de fordøyde og ufordøyde osteprovne til fett ekstraksjonen, og 500 µl heksan:kloroform:metanol (95:3:2) til å løse det ekstraherte fett for separering av lipidfraksjonene ved SPE. For Norvegia lettere fordøyd med HDJ ble det besluttet å bruke 250 µl av denne løsningen til dette formålet, da denne osten inneholdt mindre fett enn de resterende ostene i utgangspunktet.

Analyse av frie fettsyrer i fordøyd og ufordøyd ost

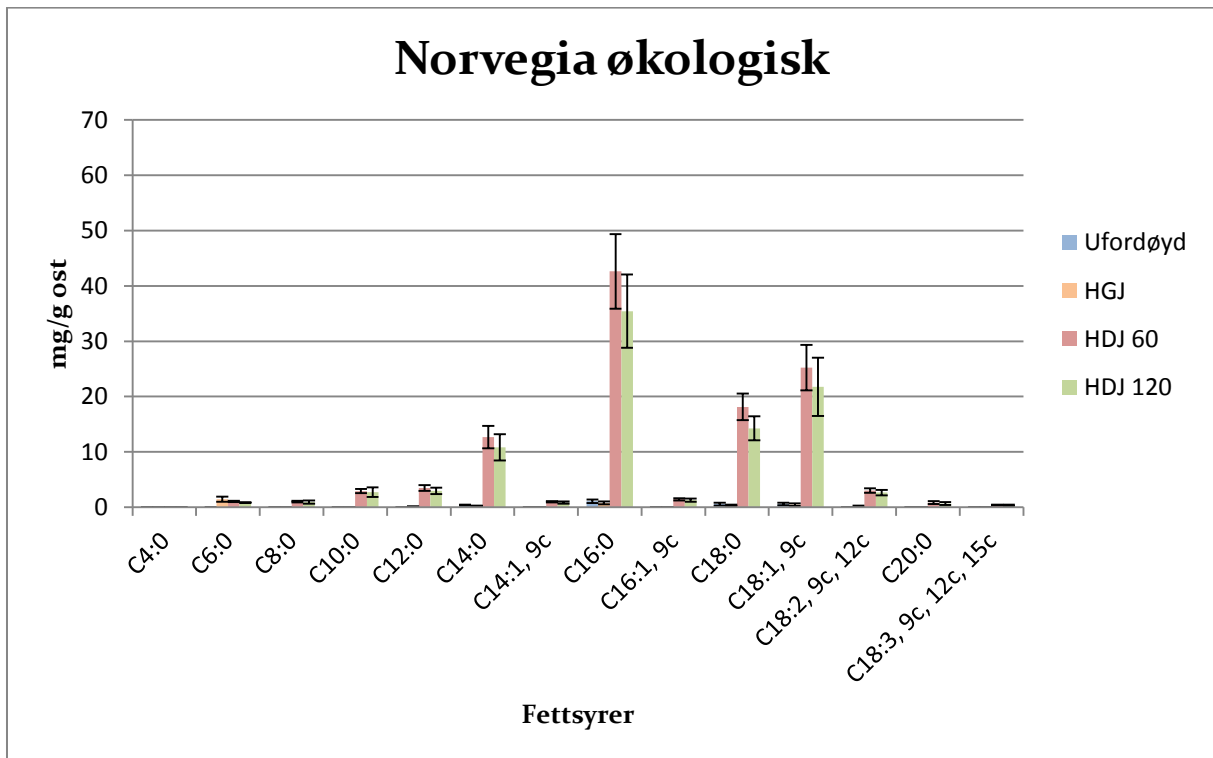
De fordøyde og ufordøyde osteprovne ble analysert med hensyn på frie fettsyrer. De følgende figurene (figur 9 – figur 14) viser de ulike frie fettsyrene som ble detektert i ostene ved analyse med GC-FID.



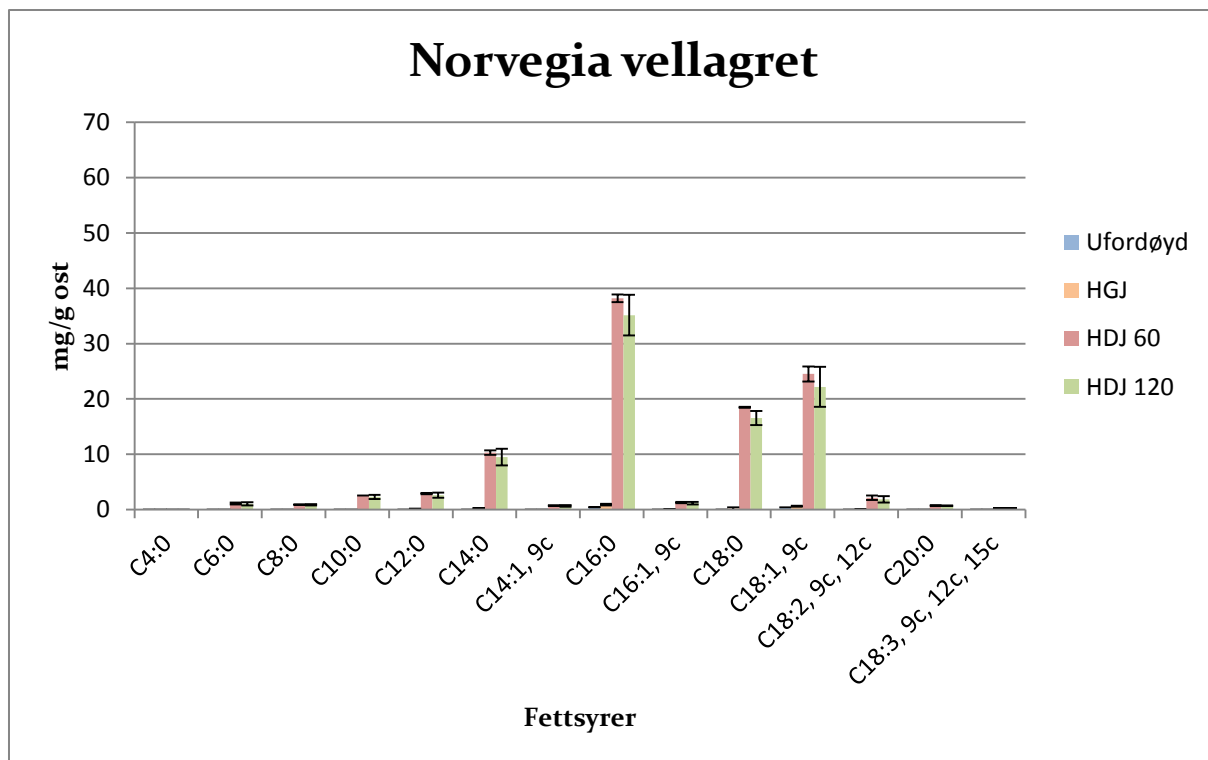
Figur 9: Fettsyrefordelingen hos Norvegia original i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost. Det mangler en prøve av Norvegia original fordøyd med HDJ i 60 min., og denne serien presenteres derfor uten standardavvik.



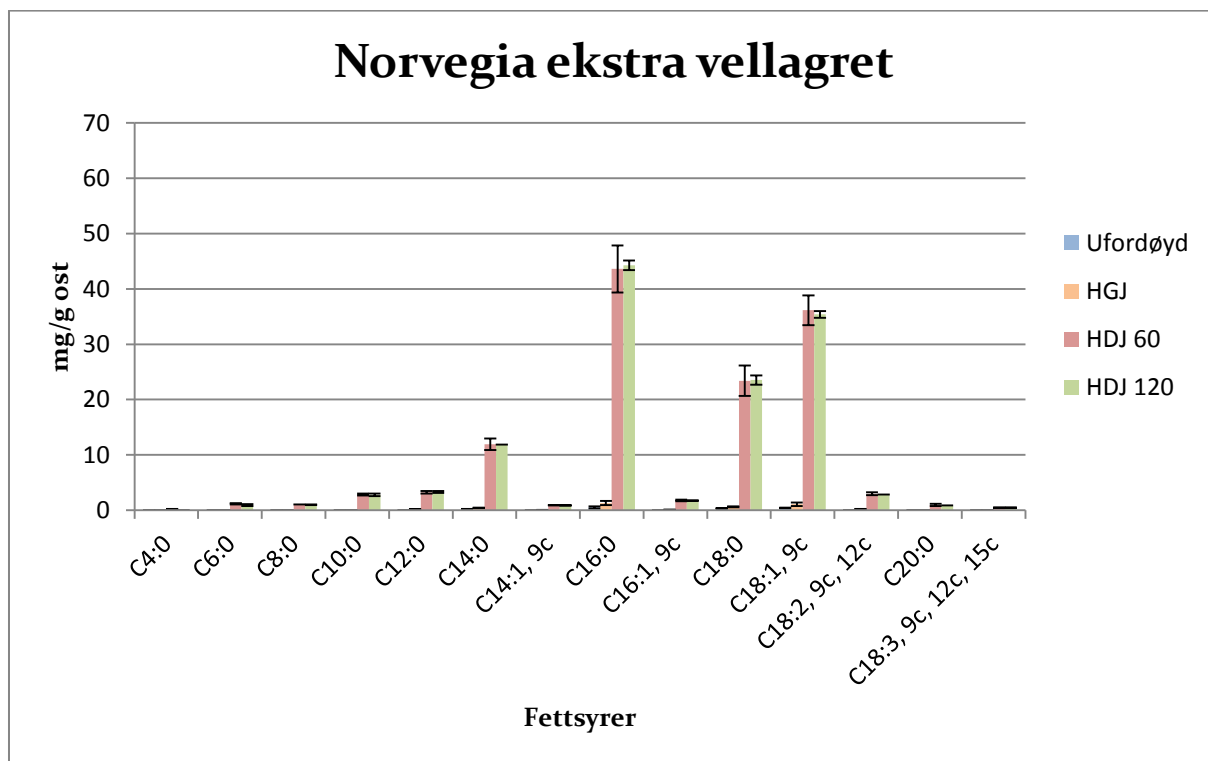
Figur 10: Fettsyrefordelingen hos Norvegia lettere i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost.



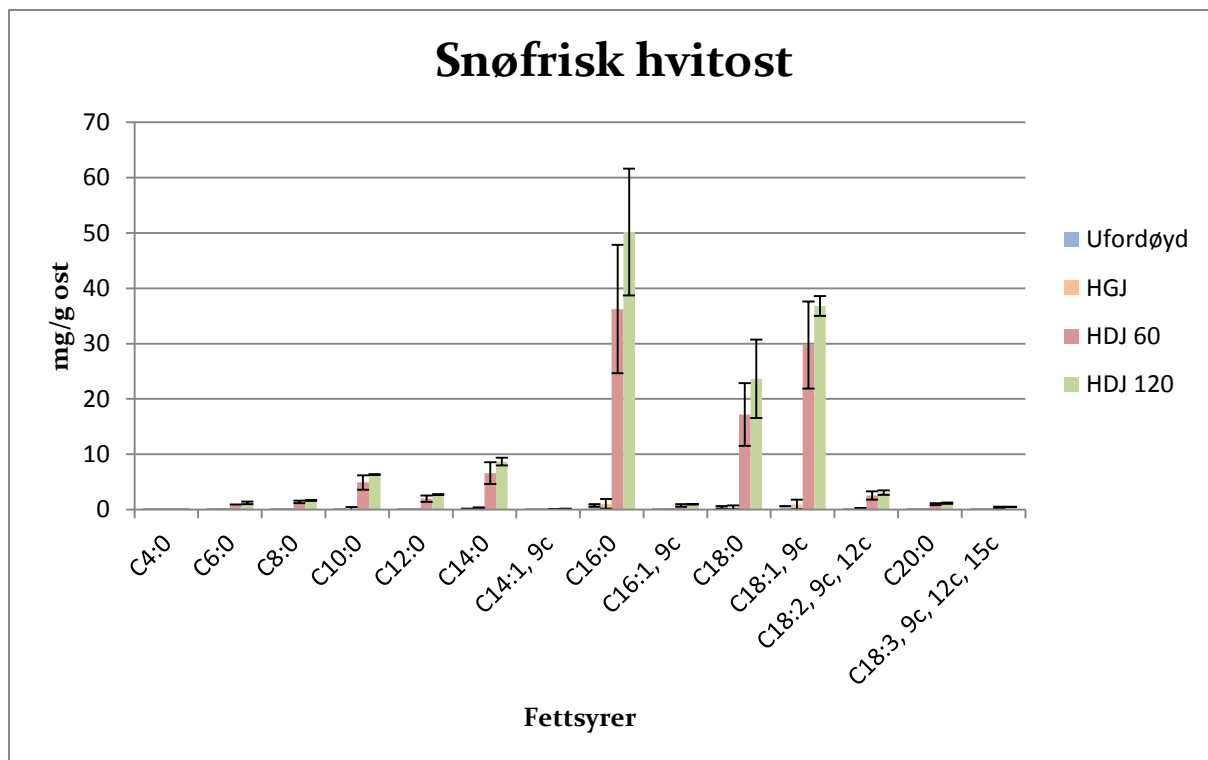
Figur 11: Fettsyrefordelingen hos Norvegia økologisk i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost.



Figur 12: Fettsyrefordelingen hos Norvegia vellagret i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost.



Figur 13: Fettsyrefordelingen hos Norvegia ekstra vellagret i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost.

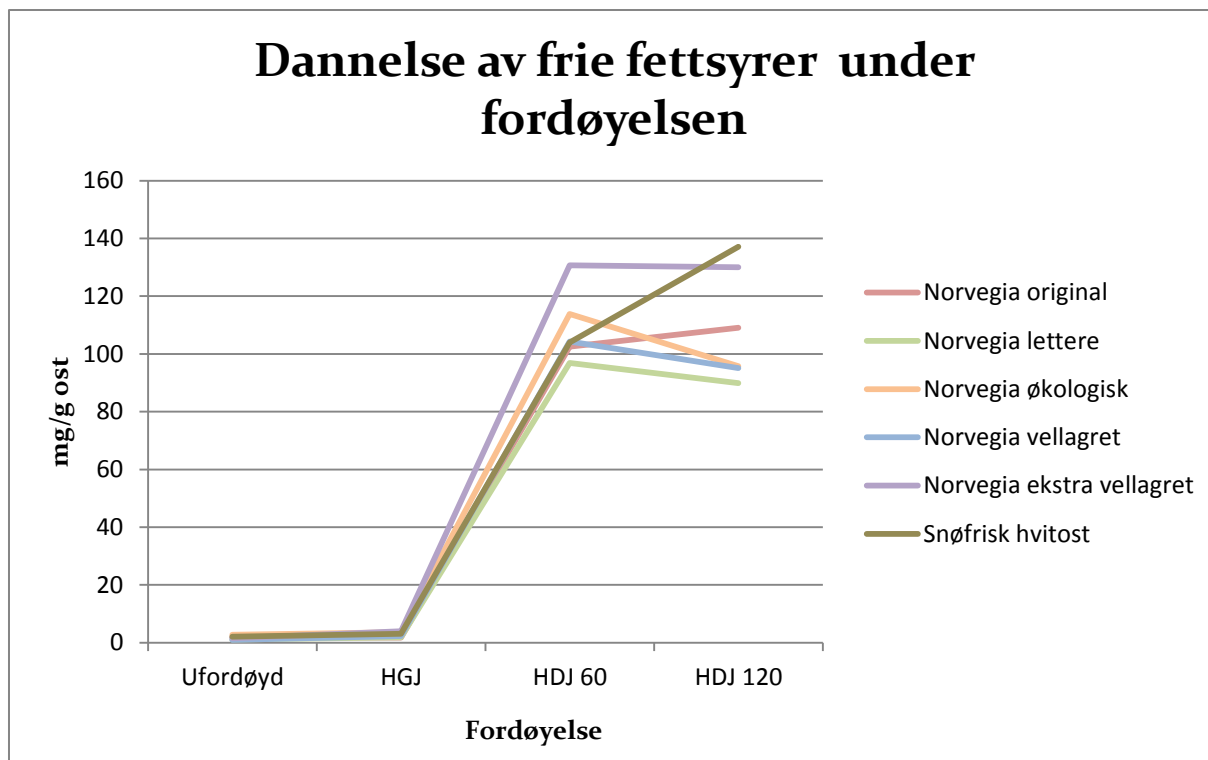


Figur 14: Fettsyrefordelingen hos Snøfrisk hvitost i henholdsvis ufordøyd ost, ost fordøyd med HGJ, ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min.. De ulike fettsyrene er oppgitt i mg pr. gram ost.

Figur 9 – figur 14 viser at de mest fremtredende fettsyrene i alle ostene er henholdsvis C16:0, C18:1, C18:0 og C14:0, i synkende rekkefølge. Det kommer også tydelig frem at mesteparten av de frie fettsyrene foreligger i ost som er fordøyd med HDJ. Det er liten forskjell mellom mengden frie fettsyrene som er detektert i ost fordøyd med HDJ i 60 min. og ost fordøyd med HDJ i 120 min. for de ulike typene Norvegia. Snøfrisk hvitost skiller seg litt ut fra ostene ystet på kumelk, da det kan se ut til at det er detektert mer av enkelte frie fettsyrene (C16:0 og C18:0) etter fordøyelse med HDJ i 120 min. i denne osten.

Det er detektert svært lite av de kortkjedede fettsyrene i ostene. C4:0 er kun detektert i små mengder hos Norvegia ekstra vellagret fordøyd med HDJ i 60 min., og er ikke funnet i de resterende ostene. C6:0 og C8:0 forekommer også i små mengder. I alle ostene er det detektert et høyere innhold av C18:2 ω-6 enn C18:3 ω-3.

Ved sammenligning av figur 9 – figur 14 kan det se ut til at det er detektert størst mengde av de mest forekommende frie fettsyrene (C16:0, C18:1, C18:0 og C14:0) i Norvegia ekstra vellagret. Hos Snøfrisk hvitost er det detektert noe større mengde av C8:0 og C10:0 enn i de resterende ostene ystet på kumelk.



Figur 15: Oversikt over dannelse av frie fettsyrer i de ulike ostene under fordøyelse med HGJ og HDJ i 60 min. og 120 min.. Standardavvik for de ulike ostene er ikke presentert i figuren, men oppgis her:

Norvegia original – ufordøyd (1,8±0,2), HGJ (1,7±0,3), HDJ 60 (102,5 (kun én prøve)), HDJ 120 (109,1±5,0)

Norvegia lettere – ufordøyd (1,0±0,3), HGJ (1,9±0,9), HDJ 60 (96,9±28,8), HDJ 120 (89,9±13,3)

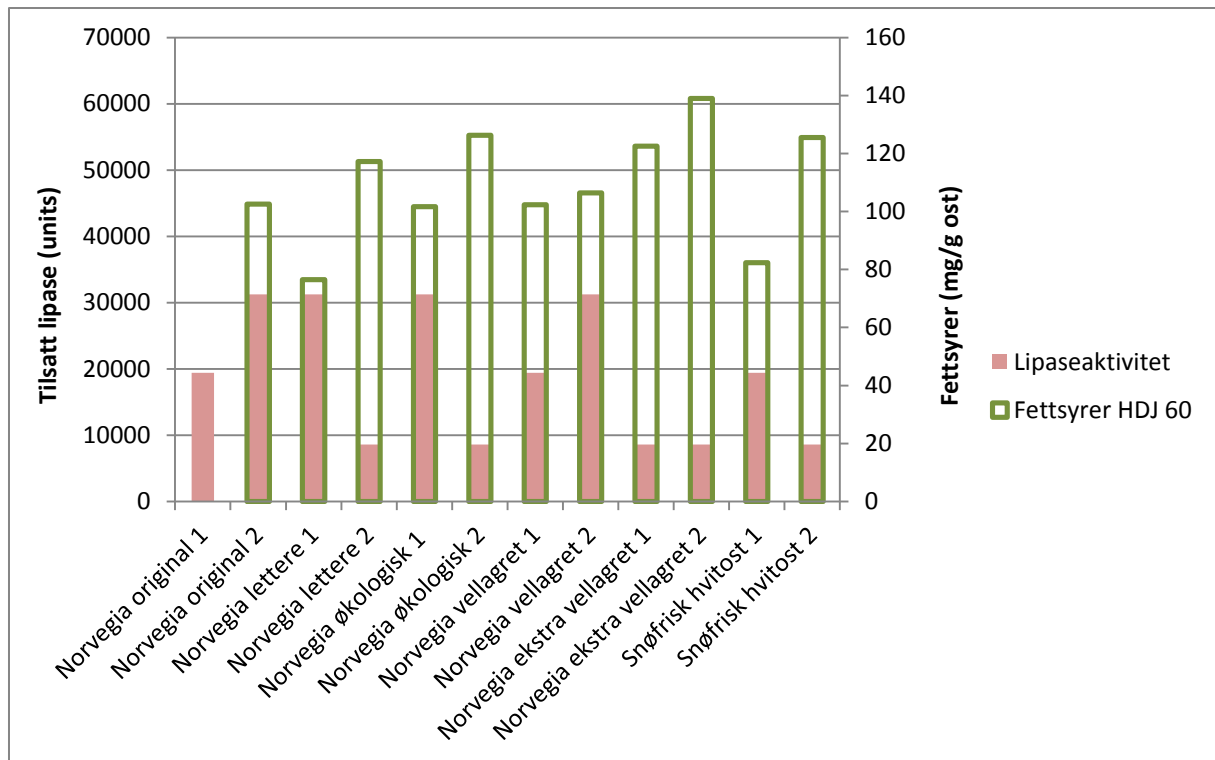
Norvegia økologisk – ufordøyd (2,7±0,9), HGJ (3,6±1,4), HDJ 60 (113,9±17,5), HDJ 120 (95,7±19,5)

Norvegia vellagret – ufordøyd (0,9±0,04), HGJ (2,3±0,6), HDJ 60 (104,3±3,5), HDJ 120 (95,1±12,3)

Norvegia ekstra vellagret – ufordøyd (1,5±0,4), HGJ (4,0±1,0), HDJ 60 (130,0±12,0), HDJ 120 (130,0±3,1)

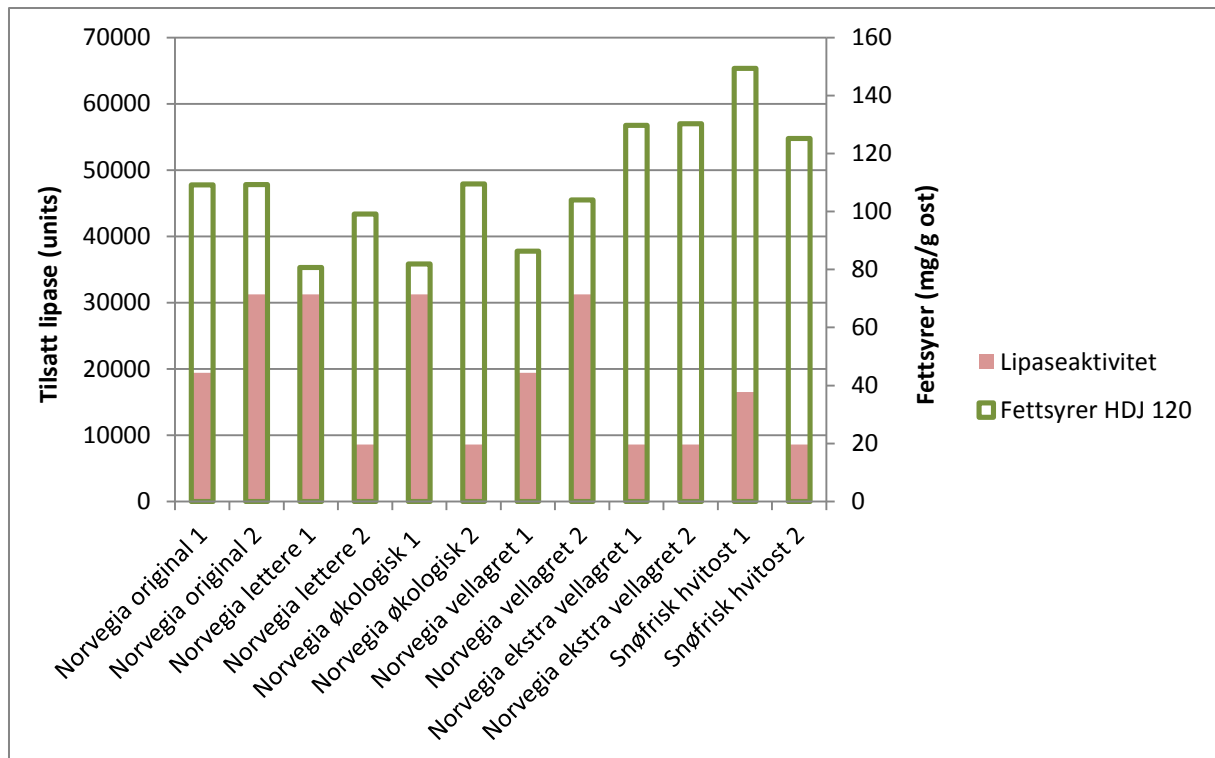
Snøfrisk hvitost – ufordøyd (2,0±0,5), HGJ (3,1±2,6), HDJ 60 (104,0±30,5), HDJ 120 (137,1±22,0)

Figur 15 illustrerer tydelig at mesteparten av de frie fettsyrene som er til stede er detektert i ost som er fordøyd med HDJ. Det har skjedd en betydelig økning i innhold av frie fettsyrer i ostep prøver som er fordøyd med HDJ i forhold til ostep prøver fordøyd med HGJ. Når det gjelder forskjeller mellom fordøyelse etter 60 min. og 120 min. med HDJ, kan det se ut som det har skjedd en økning i innhold av frie fettsyrer for to av ostene, Norvegia original og Snøfrisk hvitost. For de resterende ostene kan det se ut til at det er detektert et noe lavere innhold av frie fettsyrer etter fordøyelse med HDJ i 120 min. enn fordøyelse med HDJ i 60 min. Ved å se nærmere på standardavvikene for de ulike ostene, kan det antas at forskjellen mellom fordøyelse med HDJ i 60 min. og fordøyelse med HDJ i 120 min. ikke nødvendigvis er betydelig.



Figur 16: Oversikt over lipaseaktiviteten i HDJ som er tilsatt i de ulike fordøyelsesforsøkene, og innholdet av frie fettsyrer som er detektert i de ulike ostene som er fordøyd med HDJ i 60 min.. Røde søyler illustrerer lipaseaktiviteten som er oppgitt i antall units lipase tilsatt. Grønne søyler illustrerer det totale innholdet av frie fettsyrer som er detektert i ostene i de ulike fordøyelsesforsøkene. Det er ikke oppgitt mengde frie fettsyrer for Norvegia original 1, da denne prøven ble ødelagt under prøveopparbeidelsen.

Figur 16 viser at det er liten sammenheng mellom lipaseaktiviteten i HDJ som er tilsatt, og mengden frie fettsyrer som er detektert i de ulike ostene som er fordøyd med HDJ i 60 min.. Det er store variasjoner mellom disse parameterne, både mellom de to fordøyelsesforsøkene som er gjort for hver ost, og mellom de ulike ostene.



Figur 17: Oversikt over lipaseaktiviteten i HDJ som er tilsatt i de ulike fordøyelsesforsøkene, og innholdet av frie fettsyrer som er detektert i de ulike ostene som er fordøyd med HDJ i 120 min.. Røde søyler illustrerer lipaseaktiviteten som er oppgitt i antall units lipase tilsatt. Grønne søyler illustrerer det totale innholdet av frie fettsyrer som er detektert i ostene i de ulike fordøyelsesforsøkene.

Figur 17 viser at det er liten sammenheng mellom lipaseaktiviteten i HDJ som er tilsatt, og mengden frie fettsyrer som er detektert i de ulike ostene som er fordøyd med HDJ i 120 min.. Det er store variasjoner mellom disse parameterne, både mellom de to fordøyelsesforsøkene som er gjort for hver ost, og mellom de ulike ostene. Ett unntak her er Norvegia ekstra vellagret. I denne osten kan det se ut som at det er samsvar mellom lipaseaktivitet og den totale mengden frie fettsyrer som er detektert.

Tabell 6: Mengde C18:2 ω -6 og C18:3 ω -3 i ostene, og forholdet mellom disse fettsyrene.

	C18:2 ω -6	C18:3 ω -3	Forhold
Norvegia original	2,323	0,260	8,9:1
Norvegia lettere	2,402	0,324	7,4:1
Norvegia økologisk	2,851	0,396	7,2:1
Norvegia vellagret	2,017	0,296	6,8:1
Norvegia ekstra vellagret	2,923	0,492	5,9:1
Snøfrisk hvitost	2,832	0,461	6,1:1

Tabell 6 viser forholdet mellom C18:2 ω -6 og C18:3 ω -3 i de ulike ostene. Det er tatt utgangspunkt i mengden av disse fettsyrene som er detektert i ostene etter fordøyelse med HDJ i 60 min. og HDJ i 120 min., og beregnet gjennomsnitt ut av disse. Det høyeste forholdet mellom C18:2 ω -6 og C18:3 ω -3 finner man i Norvegia original, mens det laveste forholdet forekommer i Norvegia ekstra vellagret, tett etterfulgt at Snøfrisk hvitost.

Diskusjon

Utprøving av metode til ekstraksjon av fett i ost

Ved utprøving av fett ekstraksjonsmetoden ble det, med bakgrunn i kontrollveilingen, besluttet at det skulle brukes 1 ml av de fordøyde og ufordøyde osteprøvene til ekstraksjonen. Teoretisk skulle det ha blitt ekstrahert dobbelt så mye fett fra prøven som inneholdt 2 ml av Norvegia lettere fordøyd med HDJ i 60 min., i forhold til prøven som inneholdt 1 ml. Da dette ikke var tilfellet, ble det vurdert om dette skyldtes at ikke alt fett ble ekstrahert i prøven som inneholdt 2 ml. Dersom ikke alt fett ble ekstrahert, ble det også stilt spørsmål om man kunne risikere og ikke få med alle fettsyrene som var tilstede i prøven. For å unngå denne usikkerheten, ble det altså besluttet å bruke 1 ml.

For å unngå problematikken med små toppler i kromatogrammene ved bruk av 1 ml prøvemateriale, ble det vurdert om bruk av mindre mengde av heksan:kloroform:metanol (95:3:2) kunne gi en oppkonsentrering av fettsyrene som var tilstede, og dermed gjøre disse enklere å detektere i GC-FID. De to mengdene det ble besluttet å prøve ble valgt på bakgrunn av teoretisk fettmengde i prøvene. Utrekningen viste at det ikke var store forskjeller mellom teoretisk fettmengde i de ulike osteprøvene når det ble tatt hensyn til deres fortynningsgrad. Unntaket var Norvegia lettere fordøyd med HDJ, som skilte seg ut fra de resterende prøvene med et lavere teoretisk innhold av fett. Dette var årsaken til at det ble besluttet å bruke 250 µl av heksan:kloroform:metanol (98:3:2) til å løse det ekstraherte fett i disse prøvene, mens det for de resterende prøvene ble besluttet å bruke 500 µl.

Analyse av frie fettsyrer i fordøyd og ufordøyd ost

Med bakgrunn i resultatene er det tydelig at ostene inneholder mest av C_{16:0}, C_{18:1}, C_{18:0} og C_{14:0}. Disse fettsyrene har ulike egenskaper som gjør dem aktuelle ut i fra et helseperspektiv. C_{16:0}, som forekommer i størst mengde i ostene, har en negativ innvirkning på helsen. Denne fettsyren er ansett som ugunstig, da den bidrar til økt innhold av totalt kolesterol i blodet. Denne egenskapen finner man også hos C_{14:0}, og disse fettsyrene kan dermed bidra til utvikling av hjerte- og karsykdommer (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007).

Ostene inneholder også et forholdsvis høyt nivå av C_{18:1} og C_{18:0}, i forhold til de resterende fettsyrene som er detektert. C_{18:1} anses som en gunstig fettsyre, da den har motsatt effekt på blodkolesterole i kroppen enn de ovennevnte fettsyrene. Fettsyren kan bidra til senkning av det totale kolesterole, LDL-nivået og triglyseridmengden i blodet (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Mensink et al. 2003). C_{18:0} har ingen innvirkning på kolesterolnivået i blodet, og

ostenes innhold av denne fettsyren anses dermed ikke som negativt i denne sammenheng (Ebringer et al. 2008; Grundy 1994; Haug et al. 2007). Det er vanskelig å anslå noe konkret angående forskjeller i mengde mellom de ulike fettsyrene i de ulike ostene, og det er derfor heller ikke mulig å trekke frem én eller flere oster som mer eller mindre gunstige sett ut i fra et helseperspektiv.

Ser man på innholdet av C18:1 og C18:0 opp i mot innholdet av C16:0 og C14:0, kan man muligens tenke seg at de positive og negative helseeffektene til disse fettsyrene til en viss grad kan veies opp i mot hverandre. Dette kan i så fall tyde på at fettene i osten ikke nødvendigvis er så uheldig som man kanskje skulle tro, da melkefett har blitt ansett som negativt i lengre tid (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Steijns 2008).

Melk fra drøvtyggere kjennetegnes vanligvis ved at den inneholder betydelige mengder C4:0 (MacGibbon & Taylor 2006). I ostene som er analysert i denne oppgaven er det detektert svært lite av denne fettsyren, både før og etter fordøyelse med HGJ og HDJ. Da korte fettsyrer er kjent for å være flyktige (Pan et al. 1995) vurderes det her om dette kan være årsaken til at denne fettsyren ikke er detektert i større mengder. Det er mulig at denne fettsyren har forsvunnet underveis i prøveopparbeidelsen (f.eks. under tørking med N₂).

Når det gjelder forholdet mellom C18:2 ω-6 og C18:3 ω-3 er det store variasjoner i dette mellom de ulike ostene. Det er anbefalt at forholdet mellom disse fettsyrene i kosten bør være 6:1 (Whitney & Rolfes 2008), og et forhold på 4:1 anses som ideelt i noen studier (Lock & Bauman 2004). I et gjennomsnittlig vestlig kosthold er inntaket av C18:2 ω-6 mye større enn inntaket av C18:3 ω-3, noe som gir et høyere forhold mellom disse fettsyrene enn det som er anbefalt (Lock & Bauman 2004; Simopoulos 2008). Det lave forholdet mellom disse fettsyrene hos Snøfrisk hvitost og Norvegia ekstra vellagret, på henholdsvis 6,1:1 og 5,9:1, kan være gunstig i denne sammenheng, da det ikke nødvendigvis bidrar til videre økning i forholdet mellom disse fettsyrene i kosten.

Ved sammenligning av fettsyrefordelingen hos de ulike ostene, kan det se ut som Norvegia ekstra vellagret inneholder størst mengde av de mest fremtredende frie fettsyrene, C16:0, C18:1, C18:0 og C14:0, av ostene som er ystet på kumelk. På grunn av at resultatene er presentert med forholdsvis store standardavvik, gjøres slike antydninger med forsiktighet. Det kan også se ut som Snøfrisk hvitost inneholder mer av C8:0 og C10:0 enn de resterende ostene. Dette stemmer i så fall overens med litteratur som sier at geitemelk inneholder større mengder av disse fettsyrene enn kumelk (Chilliard et al. 2003). Disse fettsyrene har vist seg å ha antivirale

egenskaper (Ebringer et al. 2008; Haug et al. 2007; Thormar et al. 1994), og inntak av Snøfrisk hvitost kan dermed være positivt i denne sammenheng.

Resultatene viser at det er svært lite frie fettsyrer til stede i de ufordøyde prøvene, og i prøvene som er fordøyd med HGJ. De små mengdene i de ufordøyde prøvene kan forklares med at melkefett hovedsakelig består av triglyserider (ca. 98 %) (Fox et al. 2000), og at det dermed er lite frie fettsyrer til stede i ufordøyd ost. Det er også svært lite fettfordøyelse som foregår i magesekken, da det kun er små mengder lipase til stede her. Fettfordøyelse i magesekken skjer ved hjelp av lingual lipase og gastrisk lipase, men disse enzymene kan kun spalte av én fettsyre i triglyseridene (Kontkanen et al. 2011), og det er bare 4 – 40 % av fettsyrene i triglyseridene som kan spaltes av her (McClements & Li 2010). På grunn av dette er derfor naturlig at det ikke er detektert store mengder frie fettsyrer i ost fordøyd med HGJ.

Resultatene gir tydelig uttrykk for at fettfordøyelsen hovedsakelig foregår i tynntarmen, da mesteparten av de frie fettsyrene som er detektert i analysene befinner seg i ost som er fordøyd med HDJ. Dette stemmer overens med litteratur som sier at fettfordøyelsen hovedsakelig foregår her, ved hjelp av pankreatisk lipase og gallesalter. Gallesaltenes evne til å hindre aggregering av fettkulene i tarmen, sørger for større overflateareal, og gir lipasen større mulighet til å spalte av fettsyrene (Saladin 2010). I fordøyelsesforsøkene gjennomført for Norvegia lettere, Norvegia økologisk, Norvegia vellagret og Norvegia ekstra vellagret kan det se ut som om det er detektert en større mengde frie fettsyrer totalt i prøver som er fordøyd med HDJ i 60 min. enn i 120 min.. I fordøyelsesforsøkene gjennomført for Norvegia original og Snøfrisk hvitost, er det detektert mest frie fettsyrer i prøver fordøyd med HDJ i 120 min.. Resultatene presenteres derimot med forholdsvis store standardavvik, og ved å ta hensyn til disse, kan det se ut til at det er små forskjeller i mengde mellom de totale frie fettsyrene som er detektert. Dette kan tyde på at mye av fettnedbrytningen allerede har skjedd i løpet av én time i tynntarmen.

Under fordøyelsesforsøkene ble det tilsatt ulike mengder lipase til de ulike forsøkene. Mengden HGJ og HDJ som ble tilsatt ble beregnet ut i fra proteaseaktiviteten i sekretene, og da det ble brukt sekreter fra flere ulike batcher, resulterte dette i at det ikke ble tilsatt like mange units lipase til alle fordøyelsesforsøkene. Dette betyr at det er tilsatt mellom 8579 U og 31270 U lipase i de ulike fordøyelsesforsøkene. De ulike batchene med HGJ og HDJ som ble brukt i oppgaven består av flere individuelle aspirater. Det er store individuelle variasjoner i enzymaktivitet og innhold av gallesalter hos mennesker (Ulleberg et al. 2011), og dette vil være

med å påvirke den totale enzymaktiviteten i batchene. Innholdet av gallesalter i disse batchene vil også spille en rolle for fettnebdrytningen.

Med unntak av én ost, Norvegia ekstra vellagret, ble det ikke tilsatt lik mengde lipase til de to fordøyelsesforsøkene som ble gjennomført for hver ost. Figur 16 s. 35 og figur 17 s. 36, som illustrerer forholdet mellom lipaseaktivitet og mengden frie fettsyrer som er detektert i ostene, viser at det er liten sammenheng mellom disse. Det kan se ut som at lipaseaktiviteten har liten betydning for hydrolysen av fett, da økt mengde lipase ikke ga en tilsvarende økning i mengde frie fettsyrer. Dersom man skal si noe om sammenhengen mellom disse to parameterne, kan det se ut som at det er en viss grad av negativ korrelasjon mellom dem. I enkelte fordøyelsesforsøk har en høyere mengde lipase gitt en lavere deteksjon av frie fettsyrer, men dette er ikke tilfellet for alle forsøkene, og man kan dermed ikke si noe konkret angående dette.

Ved å sammenligne forholdet mellom lipaseaktivitet og mengden frie fettsyrer som er detektert i de ulike ostene, ser man at det er kun for Norvegia ekstra vellagret fordøyd med HDJ i 120 min at det er noenlunde samsvar mellom disse parameterne. Det er kun i denne osten det er tilsatt lik mengde lipase for de to fordøyelsesforsøkene som er gjort. Ved å sammenligne fettsyrefordelingen i de ulike ostene, er det også tydelig at Norvegia ekstra vellagret skiller seg fra de andre med tanke på ulikheter i mengde av de frie fettsyrene som er detektert. Denne osten har mindre standardavvik for de ulike frie fettsyrene enn de resterende ostene. På grunn av dette vurderes det om den store variasjonen av lipase som er tilsatt kan være en medvirkende årsak til variasjonene som er observert mellom de to fordøyelsesforsøkene som er gjort for hver ost.

Ved opparbeidelsen av osteprovne ble det også opparbeidet kontrollprøver. Analyse av disse viste at det var en liten grad av forurensning av C16:o og C18:o i prøvene. Det må derfor tas i betraktning at resultatene fra de ulike ostene kan være påvirket av dette når det gjelder disse fettsyrene. Det antas at denne forurensningen kan komme fra plastutstyr brukt ved prøveoppbeidelsen, da tidligere analyser har vist at plast kan bidra med forurensning i form av disse fettsyrene (Russell & Werne 2007). Da denne forurensningen antas å forekomme for alle ostene, vil ikke dette påvirke forholdet mellom disse fettsyrene i de ulike ostene.

Når det gjelder ekstraksjon av fett i de fordøyde og ufordøyde ostene, tas det i betraktning at ikke alt fett blir ekstrahert ved bruk av en slik metode. Da det er tilsatt intern standard i osteprovne, antas det at denne kan korrigere for fettmengden som ikke blir ekstrahert. I slike tilfeller må man anta at en viss mengde av alle fettsyrene som er representert i den aktuelle

prøven blir ekstrahert, men det foreligger muligens en sjanse for at noen fettsyrer ikke blir ekstrahert i det hele tatt, og dermed heller ikke blir ansett for å være til stede i prøven.

Det tas også med i vurderingen at noen fettsyrer kan ha gått tapt i forbindelse med tørking av prøvene. Det ses som en mulighet at flyktige fettsyrer kan ha fordampet i denne prosessen, dersom tørkingen har foregått med for høy hastighet.

De ufordøyde prøvene ble fortynnet før fettekstraksjonen. Ostemassen var viskøs og vanskelig å jobbe med, noe som resulterte i at det var vanskelig å få en helt homogen løsning ved fortynning. Dette anses som en mulig feilkilde, og kan muligens ha gitt utslag på resultatene fra de ufordøyde osteprøvene.

Forslag til videre arbeid

Da resultatene fra disse fordøyelsesforsøkene viste seg å være svært variable med tanke på innhold av de ulike fettsyrene, bør det gjøres gjentak av forsøkene for å se om det gir bedre resultater. På grunn av tidsbegrensninger var dette ikke mulig i arbeidet med denne oppgaven, og det nevnes derfor mulige forslag til videre arbeid. Ved fordøyelse av ostene bør det først og fremst tilsettes lik mengde lipase til alle fordøyelsesforsøkene, eller om dette ikke er mulig, i alle fall lik mengde lipase (fra samme batch) til de to forsøkene som gjøres for hver ost. Forhåpentligvis vil dette gi mindre variasjoner i innhold av frie fettsyrer i ostene etter analyse i GC-FID. Det kan også være hensiktsmessig og gjennomføre flere fordøyelsesforsøk for hver ost, slik at man får et bedre sammenligningsgrunnlag.

Ved fortynning av ufordøyde osteprøver bør det gjøres noen endringer for å sørge for at løsningen blir mer homogen. I denne oppgaven ble det forsøkt brukt vortex og ultra-turrax til dette formålet, noe som ikke var helt optimalt. Det foreslås eventuelt å forsøke dette i kombinasjon med svak oppvarming av prøvene (f. eks. 37 °C).

Når det gjelder fettekstraksjonen og separering av lipidfraksjonene, bør det gjøres flere undersøkelser for å avdekke hvor i prosessen mulige feil kan ha oppstått. Det kan også være hensiktsmessig å forsøke andre ekstraksjonsmetoder for å se om det gir bedre resultater.

Konklusjon

Resultater fra fettanalysene viser at det ble detektert mest frie fettsyrer i ost som var fordøyd med duodenale enzymer og gallesalter som finnes i HDJ. Dette tyder på at fettfordøyelsen hovedsakelig foregår i tynntarmen. Fettsyrene som ble detektert i størst mengde i samtlige oster var C16:o, C18:1, C18:o og C14:o i synkende rekkefølge.

På grunn av de varierende resultatene fra fettanalysene, er det ikke mulig å si noe konkret angående mengde av de ulike frie fettsyrene i ostene, og dermed gi noen god sammenligning mellom ostene. Det må derfor gjøres flere gjentak av fordøyelsesforsøkene, fortrinnsvis med lik mengde lipase i alle forsøkene, for å se om dette kan påvirke fettsyrefordelingen og gi mer like resultater.

Referanseliste

- Ash, A. & Wilbey, A. (2010). The nutritional significance of cheese in the UK diet. *International Journal of Dairy Technology*, 63 (3): 305-319.
- Bracco, U. (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60 (6): 1002S-1009S.
- Champe, P. C., Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2008). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 520 s.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. & Lamberet, G. (2003). A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86 (5): 1751-1770.
- Chilliard, Y. & Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44 (5): 467-492.
- Devle, H., Vetti, I., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G. & Ekeberg, D. (2012). A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Ebringer, L., Ferencik, M. & Krajcovic, J. (2008). Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products - Review. *Folia Microbiologica*, 53 (5): 378 - 394.
- Encyclopædia Britannica Online. (2003). *Small intestine: regions and structure*. Tilgjengelig fra: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/68637/Structures-of-the-small-intestine-The-inner-wall-of-the> (lest 07.05.12).
- FAO & WHO. (1978). *General Standard for Cheese*. Tilgjengelig fra: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/> (lest 26.04.12).
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. USA: Aspen Publishers, Inc. Tilgjengelig fra: http://books.google.de/books?id=-oRp5VCVTQOC&printsec=frontcover&hl=de&source=gbs_ge_summary_r&cad=o#v=onepage&q&f=false.
- Gemini BV Laboratory. (2012). *Waters SPE manifold*. Tilgjengelig fra: http://www.geminibv.nl/labware/watersvacuumkamer-en-labware?set_language=en (lest 12.06.12).
- German, J. B. (1999). Butyric acid: a role in cancer prevention. *BNF Nutrition Bulletin*, 24: 203 - 209.
- Golding, M. & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15 (1-2): 90-101.
- Grundy, S. M. (1994). Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60 (6): 986S - 990S.
- Haug, A., Hostmark, A. T. & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - a review. *Lipids Health Dis*, 6: 25.
- Helsedirektoratet. (2011). *Utviklingen i norsk kosthold 2011*. Tilgjengelig fra: <http://helsedirektoratet.no/publikasjoner/utviklingen-i-norsk-kosthold-2011-kortversjon/Publikasjoner/utviklingen-norsk-kosthold-2011-kort.pdf> (lest 26.05.12).
- Inglingstad, R. A., Devold, T. G., Eriksen, E. K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K. H., Rukke, E. O. & Vegarud, G. E. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science & Technology*, 90 (5): 549-563.
- Jacobsen, M. B. (2010). *Fordøyelsessystemets anatomi og fysiologi - forelesningsnotater*. UMB.

- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. & Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2 (1): 23 - 28.
- Kontkanen, H., Rokka, S., Kempainen, A., Miettinen, H., Hellström, J., Kruus, K., Marnila, P., Alatossava, T. & Korhonen, H. (2011). Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. *International Dairy Journal*, 21 (1): 3-13.
- Lock, A. L. & Bauman, D. E. (2004). Modifying Milk Fat Composition of Dairy Cows to Enhance Fatty Acids Beneficial to Human Health. *Lipids*, 39 (12): 1197 - 1206.
- MacGibbon, A. K. H. & Taylor, M. W. (2006). *Advanced Dairy Chemistry, Lipids*. 3 utg., b. 2. USA: Springer Science + Business Media, Inc. Tilgjengelig fra: <http://www.scribd.com/doc/27875480/Advanced-Dairy-Chemistry-Volume-II-0387263640> (lest 03.05.12).
- Macherey-Nagel. (2012). *Webshop*. Tilgjengelig fra: http://www.google.no/imgres?q=glass+columns+spe+3+ml/500+mg&hl=no&gbv=2&biw=1366&bih=665&tbm=isch&tbnid=JZJ-XYUfox58zM:&imgrefurl=http://webshop.mn-net.com/epages/us.sf/en_US/%3FObjectPath%3D/Shops/mnus/Products/730013G&docid=8jP_bnAAldRdiM&itg=1&imgurl=http://webshop.mn-net.com/WebRoot/MachereyNagel/Shops/mnus/47FB/68C3/E222/8D25/5BFF/CoA8/oBoB/615A/730_6mlGlas_m.gif&w=200&h=150&ei=a_nWT_zSG8bm4QTW7_CxAw&zoom=1&iact=rc&dur=319&sig=101684731562641555672&page=1&tbnh=120&tbnw=160&start=0&ndsp=20&ved=it:429,r:o,s:o,i:68&tx=80&ty=26 (lest 12.06.12).
- Martin, B., Fedele, V., Ferlay, A., Grolier, P., Rock, E., Gruffat, D. & Chilliard, Y. (2004). Effects of grass-based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products. *Grassland Science in Europe*, 9: 876-886.
- McClements, D. J. & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 1 (1): 32-59.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M. & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (5): 1146 - 1155.
- Molkentin, J. (1999). Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk. *Food / Nahrung*, 43 (3): 185-189.
- Molkentin, J. (2000). Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition*, 84 (1): 47 - 53.
- Mu, H. & Høy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43 (2): 105-133.
- Mukherjee, M. (2003). Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22 (5-6): 369-376.
- Nielsen, E. W. & Ullum, J. A. (2004). *Mejerilære 2*. 5 utg. Odense: Erhvervsskolernes Forlag. 320 s.
- Opplysningskontoret for meieriprodukter. (2012). *Meierifakta*. Tilgjengelig fra: <http://www.melk.no/meierifakta/> (lest 26.05.12).
- Pan, L., Adams, M. & Pawliszyn, J. (1995). Determination of Fatty Acids Using Solid-Phase Microextraction. *Analytical chemistry*, 67 (23): 4396 - 4403.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M. & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68 (1-2): 88-113.
- Pfeuffer, M. & Schrezenmeir, J. (2007). Milk and the metabolic syndrome. *Obesity Reviews*, 8 (2): 109-118.
- Qureshi, T. M., Vegarud, G., Abrahamsen, R. K. & Skeie, S. (2012, ikke publisert). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the Norwegian autochthonous cheese Gamalost after in vitro human gastrointestinal digestion.

- Ruiz, J., Antequera, T., Andres, A. I., Petron, M. J. & Muriel, E. (2004). Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*, 520 (1-2): 201-205.
- Russell, J. M. & Werne, J. P. (2007). The use of solid phase extraction columns in fatty acid purification. *Organic Geochemistry*, 38 (1): 48-51.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy and physiology: The Unity of Form and Function*. 5 utg. New York: McGraw-Hill. 1152 s.
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E. & Bjålie, J. G. (2006). *Menneskekroppen - fysiologi og anatomi*. 2 utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS. 544 s.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233 (6): 674-88.
- Steijns, J. M. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *International Dairy Journal*, 18 (5): 425-435.
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J. & Roberton, A. M. (2002). The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*, 140 (2): 185-198.
- Tetra Pak. (2003). *Dairy processing handbook*. 2 utg. Sverige: Tetra Pak Processing Systems AB. 452 s.
- Thormar, H., Isaacs, C. E., Soo Kim, K. & Brown, H. R. (1994). Inactivation of Visna Virus and Other Enveloped Viruses by Free Fatty Acids and Monoglycerides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 724 (1): 465-471.
- TINE SA. (2012a). *Norvegia*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia> (lest 12.03.12).
- TINE SA. (2012b). *Norvegia ekstra vellagret m/skorpe*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-ekstra-vellagret-m-skorpe> (lest 12.03.12).
- TINE SA. (2012c). *Norvegia lettere*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-lettere> (lest 12.03.12).
- TINE SA. (2012d). *Norvegia vellagret m/skorpe*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-vellagret-m-skorpe> (lest 12.03.12).
- TINE SA. (2012e). *Norvegia økologisk*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/norvegia-%C3%B8kologisk> (lest 12.03.12).
- TINE SA. (2012f). *Snøfrisk hvitost*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/produkter/ost/gulost/sn%C3%B8frisk-hvitost> (lest 12.03.12).
- 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 (1): 52-61.
- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R. & Wehrmüller, K. (2008). Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, 88 (4-5): 389-405.
- Whitney, E. & Rolfes, S. R. (2008). *Understanding Nutrition*. 11 utg. USA: Thomson Wadsworth. 720 s.
- Wilde, P. J. & Chu, B. S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv Colloid Interface Sci*, 165 (1): 14-22.

Vedlegg

1. Fortynninger for alle ostene
2. Teoretisk fettmengde i ostene etter fortynning
3. Rådata fettanalyser