

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven i matvitenskap ble utført ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) på Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB). Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og ble utført i perioden januar til mai 2012 på Nofima AS.

Masteroppgaven har vært en del av et større prosjekt på Nofima om spektroskopiske målemetoder. Det har vært et samarbeid med et selskap (CropTailor) som jobber med forskning og utvikling av nye havresorter med bedret ernæringsmessig kvalitet. CropTailor har bidratt ved å sende ulike havresorter som er med i forsøket.

Jeg ville gjerne takket mine veiledere Nils Kristian Afseth (Nofima) og Elling Olav Rukke (IKBM, UMB) for god hjelp og støtte gjennom hele prosessen. Jeg ville også takket de andre masterstudentene og ansatte på Nofima som med sine blide vesener har gjort dette halvåret til en hyggelig affære. Til sist ville jeg takket venner og familie for støtten og oppmuntringen gjennom de siste to årene på masterstudiet.

Ås, mai 2012

Gunvor Svalstuen Ruud

Sammendrag

Havre (*Avena Sativa*) har mange interessante ernæringsmessige egenskaper og har blant annet det høyeste lipidinnholdet av kornartene. Majoriteten av lipidene er sunne en- og flerumettede fettsyrer som oljesyre, linolsyre og α -linolensyre. Denne oppgaven var et samarbeid med en aktør i havreindustrien som jobber med forskning og utvikling av nye havresorter med bedret ernæringsmessig kvalitet. Fettsyresammensetningen i havre analyseres i hovedsak med gasskromatografi som er en tidkrevende metode. Formålet med denne masteroppgaven var å utvikle en metode for å estimere fettinnhold og fettsyresammensetning i havre basert på infrarød spektroskopi av små mengder prøvemateriale.

I metodeutviklingen ble det undersøkt om målinger av havre med FT-IR spektroskopi var reproducerbart. Det ble laget et forsøksdesign der 168 prøver med havremel ble blandet med ulike oljer og analysert med FT-IR-spektroskopi. FT-IR spektrene ble korrelert mot referanseanalysene relatert til fettinnhold og fettsyresammensetning i en prøvekalibreringen som fungerte bra med gode R^2 verdier. Med informasjon fra forsøksdesignet og prøvekalibreringen ble det laget et nytt design og ny kalibreringsmodell. Det ble laget 63 prøver fra tre havremeltyper blandet med oljer slik at fettinnholdet og fettsyresammensetningen ble variert på samme måte. Kalibreringen med regresjonsanalyse gav gode modeller, men litt lavere R^2 verdier enn prøvekalibreringen. Prøvevolumene ble mindre fordi det var lite prøvemateriale, noe som kan ha vært årsaken til mindre god prøveopparbeidelse og kalibrering.

Kalibreringsmodellen ble test-sett validert med 6 ukjente havremelprøver. Resultatene viste at oppbyggingen av designene fungerer og predikeringen av jodverdiene er god, men kalibreringen har et forbedringspotensiale og må utvikles videre for å kunne estimere fettinnhold og detaljert fettsyresammensetning. Dersom kalibreringen utvikles til å bli mer nøyaktig kan det bli mulig å benytte FT-IR spektroskopi industrielt til screening av havreprøver i nær fremtid da metoden er ikke-destruktiv, krever lite kjemikalier, er enkel i bruk og gir raske reproducerbare resultater.

Abstract

Oat (*Avena Sativa*) has many interesting nutritional qualities and has among others the highest amount of lipids of the cereals. The majority of the lipids are healthy mono- and polyunsaturated fatty acids like oleic acid, linoleic acid and α -linolenic acid. This study was a collaboration with a company in the oat industry who works with research and development of new types of oat with improved nutritional qualities. Fatty acids in oat are usually identified by gas chromatography, which is a time consuming method. The purpose of this thesis was to develop a method to estimate the fat content and fatty acid composition in oat based on infrared spectroscopy with small amounts of sample.

In the method development it was tested if the analysis of oat with FT-IR spectroscopy was reproducible. A test-design was made with 168 samples of oatflour mixed with different oils and analysed with FT-IR spectroscopy. The results showed that the test calibration with the FT-IR spectra correlated with the reference analyses fat content and fatty acid composition functioned very well with good R^2 values. With information from the testing it was made a new design and calibration. It was made 63 samples of oatflour mixed with oils in the same way with variety of fat content and fatty acids as the testing. The calibration functioned well with good R^2 values, but the R^2 values was a bit less good than in the testing. The reason for this could be the small amounts of the 3 different kinds of oatflour available, so the samples therefore had to be in small volume which made it difficult and less accurate.

The calibration model was test set validated by 6 unknown oatflour samples. The results showed that the layout of the designs and the prediction of iodine values worked very well. The calibration model has an improvement potential and has to be developed to be able to predict fat content and detailed fatty acid content. If the calibration model is developed to be more accurate it would be possible to use FT-IR spectroscopy in the oat industry in nearby future since the method is non-destructive, requires little chemicals, is simple to use and gives rapid and reproducible results.

Forkortelser

| | |
|------------------|---|
| A. Sativa | Avenia Sativa |
| ATR | Attenuated Total Reflection |
| Cm^{-1} | Bølgenummer |
| EMSC | Extended multiplicative scatter correction |
| FAME | Fettsyremetylestere |
| FID | Flamme- ioniserings detektor |
| FT-IR | Fourier transform infrared |
| GC | Gasskromatografi |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| PCA | Principal Component Analysis |
| PLSR | Partial Least Squares Regression |
| R^2 | R square |
| RMSEP | Root Mean Square Error of Prediction |

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| 1 Introduksjon | 3 |
| 2 Teori | 5 |
| 2.1 Havre | 5 |
| 2.1.1 Oppbyggingen av havre (<i>A. Sativa</i>) | 6 |
| 2.2 Lipider..... | 8 |
| 2.2.1 Fettsyrer | 8 |
| 2.2.2 Triglyserider..... | 9 |
| 2.2.3 Steroler | 10 |
| 2.2.4 Fosfolipider og glykolipider | 10 |
| 2.2.5 Nomenklatur | 11 |
| 2.3 Lipider i havre (<i>A. Sativa</i>)..... | 13 |
| 2.4 Prosessering av havre..... | 14 |
| 2.4.1 Enzymer og antioksidantaktivitet..... | 14 |
| 2.5 Havre til humant konsum – ernæring | 16 |
| 2.6 Fettsyresammensetning..... | 17 |
| 2.6.1 Gasskromatografi | 17 |
| 2.7 Spektroskopi..... | 19 |
| 2.7.1 Atomenes bevegelse | 19 |
| 2.7.2 Fourier transform infrarød (FT-IR) spektroskopi..... | 21 |
| 2.7.3 FT-IR spekter..... | 22 |
| 2.7.4 Analyse av lipider med FT-IR spektroskopi | 23 |
| 2.8 Dataanalyser..... | 25 |
| 2.8.1 Forbehandling av rådataene | 25 |
| 2.8.1.1 Andre derivering..... | 25 |
| 2.8.1.2 Extended multiplicative scatter correction (EMSC) | 26 |
| 2.8.2 Kalibrering | 26 |
| 2.8.2.1 Principal component analysis (PCA)..... | 26 |
| 2.8.2.2 Partial least square regression (PLSR)..... | 27 |
| 2.8.3 Validering | 27 |
| 3 Materialer og metoder..... | 28 |
| 3.1 Beskrivelse av forsøket..... | 28 |
| 3.1.1 Del 1: Reproduserbarhet av FT-IR metoden | 28 |
| 3.1.2 Del 2: Kalibrering | 29 |
| 3.1.3 Del 3: Validering av kalibreringen | 29 |
| 3.2 Prøveopparbeidelse | 30 |
| 3.3 Fourier transform infrarød (FT-IR) spektroskopi..... | 31 |
| 3.4 Fettsyresammensetning..... | 32 |
| 3.4.1 Ekstrahering av fett | 32 |
| 3.4.2 Metylering | 32 |
| 3.4.3 Gasskromatografisk analyse for fettsyresammensetning..... | 33 |
| 3.5 Fettinnhold | 34 |
| 3.6 Dataanalyse | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.1 Analyse av X- verdiene | 35 |
| 3.6.2 Analyse av Y -verdiene | 35 |
| 3.6.3 Kalibrering og prediksjon | 36 |
| 4 Resultater og diskusjon | 37 |
| 4.1 Del 1: Reproduserbarhet av FT-IR metoden | 37 |
| 4.1.1 Variasjon i prøvesettet | 37 |
| 4.1.2 FT-IR spektrene..... | 39 |
| 4.1.2.1 Reproduserbarhet | 39 |
| 4.1.2.2 Betydning av absorpsjonsbånd | 39 |
| 4.1.3 PCA | 41 |
| 4.1.4 Effektene av forbehandling..... | 42 |
| 4.1.5 Regresjonsanalyse | 43 |
| 4.1.5.1 Fettsyresammensetning angitt som % av totalvekt prøve | 43 |
| 4.1.5.2 Fettsyresammensetning angitt som % av total olje..... | 47 |
| 4.2 Diskusjon del 1 | 51 |
| 4.3 Del 2: Kalibrering | 55 |
| 4.3.1 Variasjon i prøvesettet | 55 |
| 4.3.2 FT-IR spektrene..... | 56 |
| 4.3.3 PCA | 56 |
| 4.3.4 Regresjonsanalyse | 57 |
| 4.4 Diskusjon del 2 | 62 |
| 4.5 Del 3: Validering av kalibreringen | 64 |
| 4.6 Generell diskusjon | 66 |
| 5 Konklusjon | 68 |
| 6 Referanser | 69 |
| 7 Vedlegg | 73 |

1 Introduksjon

Havre er en kornvekst som i et ernæringsmessig perspektiv har en rekke interessante egenskaper. Blant annet er havre det kornslaget med høyest innhold av lipider. Noen arter har opp til 18 % lipidinnhold, hvorav majoriteten er en- og flerumettede fettsyrer (Banas et al. 2007). Olje fra havre er mer stabil mot harskning enn f. eks soyaolje (Kalbasiastari & Hammond 1977). Ulike forskningsmiljøer jobber aktivt for å utvikle nye havretyper med et høyt lipidinnhold og gunstig fettsyresammensetning slik at havre også kan brukes som en oljevekst (Webster & Wood 2011).

Gasskromatografi (GC) er analysemetoden som i hovedsak benyttes for å gi detaljert informasjon om fettsyresammensetning i havre. Det er en analysemetode som krever store ressurser i form av tid og kjemikalier (Li-Chan et al. 2010), og det er derfor begrenset hvor mange prøver det faktisk er mulig å analysere. Aktører i havreindustrien er derfor interessert i en metode for å bestemme fettinnhold og fettsyresammensetning raskere. Ideelt sett skal denne metoden kunne benyttes som et supplement til GC, der en raskt kan scanne gjennom mange prøver, for deretter å velge ut noen få prøver for mer nøyaktige analyser med GC. Blant selskaper som er interessert i denne typen metodikk, er det svenske firmaet CropTailor. Selskapet jobber med forskning og utvikling av nye havresorter med bedret ernæringsmessig kvalitet, og CropTailor forvalter en stor samling ulike havresorter. Hver havresort forefinnes imidlertid i relativt beskjedne mengder. Noen av disse havresortene benyttes i denne masteroppgaven.

Fourier transform infrarød (FT-IR) spektroskopi er en rask og ikke-destruktiv målemetodikk som de senere år ofte har blitt benyttet innen næringsmiddelanalyser. Metoden har også vist stort potensiale for estimering av fettsyresammensetning i ulike næringsmidler (Li-Chan et al. 2010). Metoden bruker det midt- infrarøde området til å identifisere funksjonelle grupper i lipidene. FT-IR spektroskopi kan brukes for å måle oppmalte havreprøver, og dette gir muligheten til å analysere mange prøver med lite prøvemateriale på kort tid (Barth 2007). På den måten kan et stort antall prøver screenes før utvalgte prøver eventuelt undersøkes mer detaljert ved hjelp av GC. Det er forsket lite på FT-IR spektroskopiske

Introduksjon

analyser på lipider i havre, men den beslektede metoden nær-infrarød spektroskopi (NIR) er utprøvd (Krishnan et al. 2000).

Formålet med denne masteroppgaven er å utvikle en metode for å estimere fettinnhold og fettsyresammensetning i havre basert på infrarød spektroskopi av små mengder prøvemateriale. Metoden må være rask, nøyaktig, ikke-destruktiv og kreve lite kjemikalier. Metodeutviklingen består av tre hoveddeler:

- Del 1: Reproduserbarhet av FT-IR metoden

Det skal undersøkes hvor reproduserbart det kan lages havremel/olje blandinger og måle de med FT-IR spektroskopi. Ulike vegetabiliske oljer blandes inn i melet for å sikre stor spredning i både fettinnhold og fettsyresammensetning. Forsøksdesign benyttes for å en jevn variasjon i prøvesettet. Det blir gjennomført regresjonsanalyse for å undersøke hvor godt resultatene fra FT-IR spektroskopien korrelerer med referanseanalysene relatert til fettinnhold, grad av umettethet og de vesentligste fettsyrene.

- Del 2: Etablering av kalibreringsmodellen

Ved hjelp av erfaringer fra del 1 skal den faktiske kalibreringen etableres. Det benyttes her tre ulike oppmalte havresorter (CropTailor) og de samme oljene som i del 1. Det lages et antall havremel/olje blandinger som gir god spredning på samme måte som i del 1. Referansemetodene og de statistiske analysene gjennomføres på bakgrunn fra erfaringer fra del 1.

- Del 3: Validering av kalibreringsmodellen

For å validere kalibreringen analyseres noen utvalgte havreprøver (Crop Tailor) med FT-IR spektroskopi. Referanseanalyser gjennomføres for å undersøke om kalibreringen gir nøyaktige estimater.

2 Teori

2.1 Havre

Havre tilhører en planteslekt i gressfamilien (*Gramineae*) med ca. 70 ulike arter. Havre dukket opprinnelig opp som et ugress blant bygg og hvete. Havre ble først dyrket i midtøsten, den iberiske halvøy og nordvest-Afrika. Den genetiske artsvariasjonen har utviklet seg globalt. Det eksisterer således både diploide, tetraploide og heksaploide arter med ulikt antall kromosomsett og egenskaper (Webster & Wood 2011). Havrearten *Avenia Sativa* er den vanligste med mer enn 75 % av total dyrket havre på verdensbasis. Andre arter som dyrkes er blant annet *Avenia byzantina* og *Avenia strigosa* (Webster 1986).

Havredyrkingen (*A. Sativa*) kom til Norge fra midtøsten for ca. 2500 år siden. Det ble i 2007 dyrket over 260 000 tonn havre i Norge. Over 90 % av havren gikk til dyrefôr. Havren har gode vekstvilkår i Norge. Den trives i et kjølig og fuktig klima (Nordbø 2012). Sammensetningen i havre vises med gjennomsnittlige verdier i tabell 2.1.

Tabell 2.1: Gjennomsnittlig sammensetning i havre basert på informasjon om mat og helse fra offentlige myndigheter (Matportalen 2012).

| | Gjennomsnitt % |
|------------------|----------------|
| Protein | 11 |
| Fett | 6 |
| Karbohydrater | 61,7 |
| Kostfiber | 8,5 |
| β- glukcan | 4,2 |
| Sukker | 1,3 |
| Aske (mineraler) | 1,9 |

2.1.1 Oppbyggingen av havre (*A. Sativa*)

Cerealier innen gressfamilien produserer tørre frukter, som inneholder et frø. Disse en-frø fruktene eller *caryopsis* går under navnet korn (Hoseney 1986). Havre består av små akser, som henger sammen i greiner og danner en risle, se figur 2.1. I aksene ligger kornene omsluttet av beskyttende inneragner. Kornene har et skall, men inneragnene er et ekstra skall utenpå som må fjernes før prosessering. Inneragnene inneholder cellulose, hemicellulose, lignin og fenoliske komponenter. Det finnes arter av havre, naken havre, som er utviklet uten inneragner (Webster &Wood 2011).

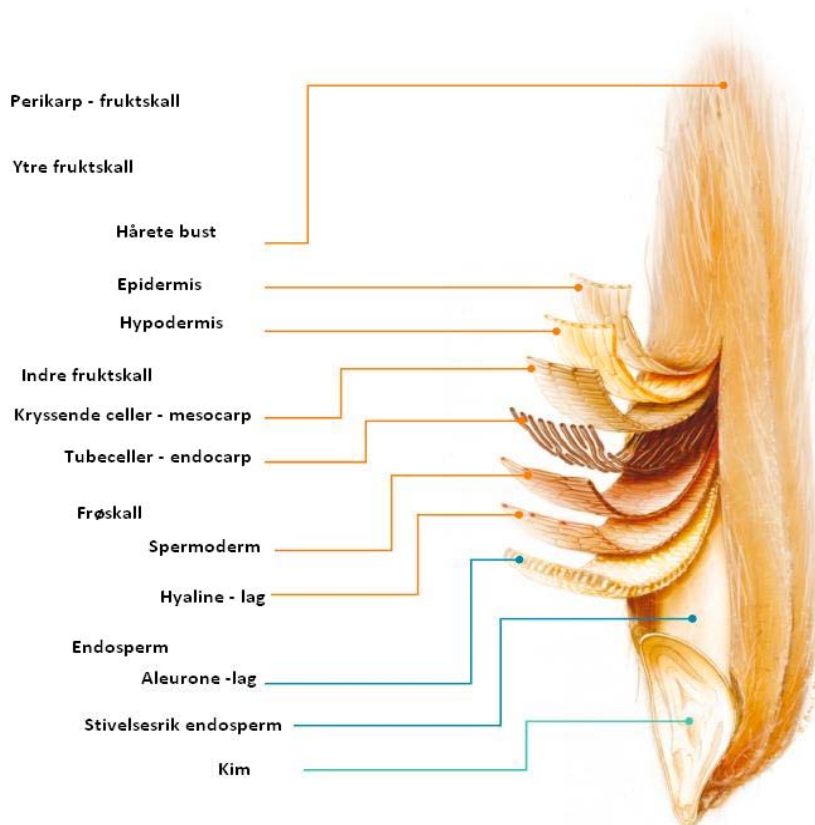


Figur 2.1: Havre i risle øverst, og havrekorn nederst (Norgesfôr 2012)

Selve havrekornets oppbygning er illustrert i figur 2.2. Havrekornet består av skall, endosperm og kim. Skallet skal beskytte kornet mot ytre forhold. Skallet er delt opp i flere lag og inneholder fruktskallet, frøskallet og aleuronlaget. Ytterst er fruktskallet, som er dekket av et tynt hårlag mot enden lengst fra kimen. Fruktskallet og frøskallet består av flere lag med celler som ligger i ulike retninger (Webster &Wood 2011).

Aleuronlaget er et celledags tykt og er genetisk en del av endospermen, men det skilles med skallet ved prosessering. Skallene går under betegnelsen kli og inneholder mineraler, vitaminer, fenoler, aromatiske aminer og antioksidanter. Aleuronlaget inneholder lipider, proteiner, tokoferoler, β -glukaner og enzymer til nedbryting av endospermen ved spiring av kimen (Webster &Wood 2011).

Endospermen inneholder de næringsstoffene kimen trenger for å danne et embryo og spire. Den inneholder stivelse, proteiner, lipider og β -glukaner. Næringsstoffene hydrolyseres av enzymer under spiring (Webster & Wood 2011).



Figur 2.2: Bildet (Kampffmeyer 2012) illustrerer et havrekorn med lagene fruktskall, frøskall, aleuronelag, endosperm og kim.

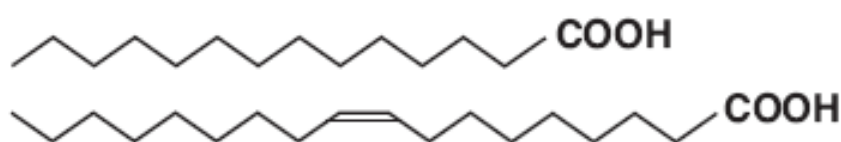
2.2 Lipider

Lipider er en gruppe organiske komponenter, som gjerne omtales som fett eller oljer. Lipider kan klassifiseres etter deres struktur, fysikalske egenskaper (fast/flytende) eller polaritet. Nøytrale lipider er løselige i organiske løsemidler, men uløselige i vann. Eksempler på nøytrale lipider er lengre fettsyrer, glyserider, steroler, sterolestere, karotenoider, voks og tokoferoler. Polare lipider er løselige i vann. Eksempler på polare lipider er fosfolipider, glykolipider og kortkjedete fettsyrer med mindre enn 6-8 karbonatomer. Majoriteten av lipider er derivater av fettsyrer. Fettsyrene opptrer oftest som estere, men noen som amider. Estere inneholder syre og alkoholkomponenter (Gunstone 1996; Belitz & Grosch 1999).

2.2.1 Fettsyrer

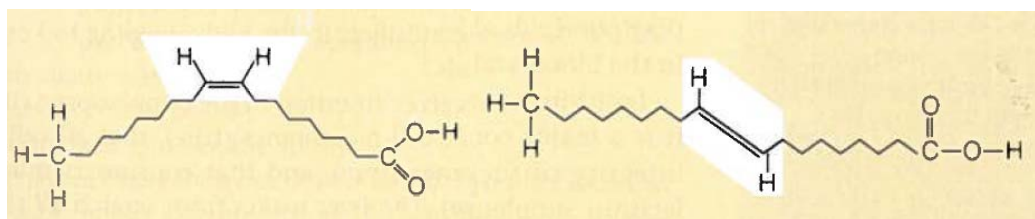
Fettsyrer består av karbon (C), hydrogen (H) og oksygen (O). C-atomene i en fettsyre er sammensatt i korte eller lengre hydrokarbonkjeder (4 til 36 C-atomer). I den ene enden av fettsyren er en karboksylgruppe (-COOH). I den andre enden av fettsyren er en metylgruppe (-CH₃) (Belitz & Grosch 1999).

Mettede fettsyrer har en rett hydrokarbonkjede med enkle bindinger. Enumettede fettsyrer har en dobbeltbinding mellom to C-atomer i hydrokarbonkjeden. Strekformel av en umettet og en enumettet fettsyre vises i figur 2.3. Flerumettede fettsyrer har flere dobbeltbindinger mellom C-atomene i hydrokarbonkjeden (Hart et al. 2003).



Figur 2.3: Mettet fettsyre og enumettet fettsyre illustrert med strekformel. Hver vinkel betyr et C-atom i hydrokarbonrekken (Grønneberg 2008).

Mettede fettsyrer har en fastere konsistens og et høyere smeltepunkt enn enumettede og flerumettede fettsyrer. Dobbelbindinger bidrar til å redusere smeltepunktet. Hvilken retning hydrokarbonkjeden går etter en dobbeltbinding avgjør om det er en *cis* eller *trans*-konfigurasjon i dobbeltbindingen. Det illustreres i figur 2.4. *Cis*-konfigurasjon er den vanligste i naturen og gir en knekk på hydrokarbonkjeden slik at fettsyrene ikke pakkes tett sammen. *Trans*-konfigurasjon gir en rettere kjede og et høyere smeltepunkt enn hos *cis*-konfigurasjonen (Hart et al. 2003).

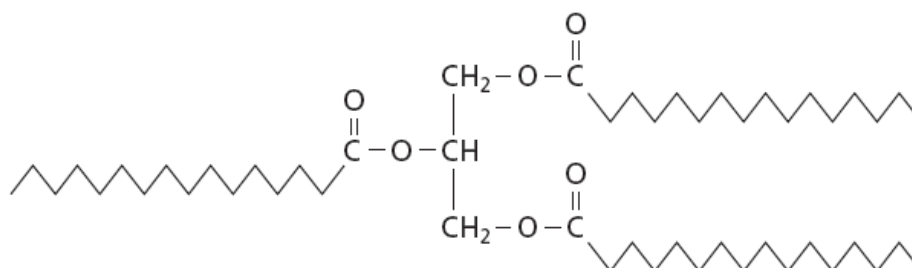


Figur 2.4: Til venstre illustreres *cis*-konfigurasjon. Til høyre illustreres *trans*-konfigurasjon (Whitney & Rolfes 2005).

Fettsyrer med en eller flere hydroksylgrupper (-OH) på hydrokarbonkjeden kalles hydroksyfettsyrer. Andre grupper som kan finnes seg på hydrokarbonkjeden er blant annet epoksy og furanoidgrupper (Gunstone 1996).

2.2.2 Triglyserider

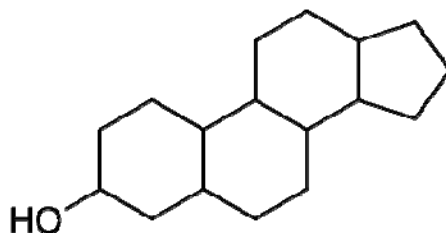
Den vanligste alkoholen i lipider er glyserol. Glyserol er treverdig og kan forme mono, di eller triester med en, to eller tre ulike fettsyrer. Triglyserider, som vises i figur 2.5, er vanligere enn mono og diglyserider. Karboksylgruppen i fettsyren esterifiseres med hydroksylgruppene på glyserolmolekylet (Belitz & Grosch 1999).



Figur 2.5: Triglyserid er glyserol og tre forestrede fettsyrer (Grønneberg 2008).

2.2.3 Steroler

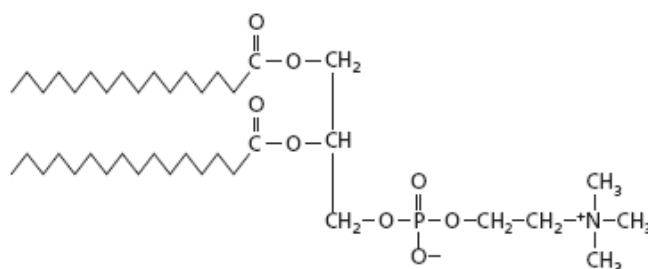
Steroler er en gruppe av steroider karakteriserer med et karbonskjelett med et lukket ringsystem og en hydroksylgruppe, som vist i 2.6. Grunnstrukturen er lik hos alle steroler med unntak av små variasjoner i sidegruppene. Kolesterol er det vanligste steroidet i dyr og mennesker og kan syntetiseres videre til blant annet kjønnshormoner og gallesyrer. I planter er det vanlig med campe-, stigma- og sitosteroler (Belitz & Grosch 1999).



Figur 2.6: Grunnstrukturen til sterol med karbonskjelett i ringsystem og en hydroksylgruppe (Wikipedia.org).

2.2.4 Fosfolipider og glykolipider

Fosfo- og glykolipider er amfipatiske, dvs at de har en polar og en upolar del. Det gjør at de kan forme cellemembraner, miceller og lignende. Fosfolipider er strukturert som et triglyserid, men den ene estergruppen er byttet ut med en fosfatidylamingruppe. Lecitin er en fosfolipid og illustreres i figur 2.7. Glykolipider inneholder en eller flere polare sukkerenheter (Belitz & Grosch 1999; Hart et al. 2003).

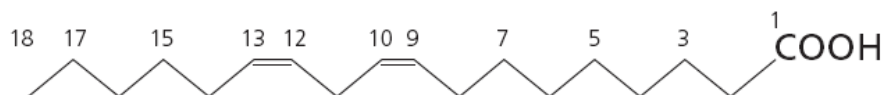


Figur 2.7: Fosfolipidet lecitin der fettsyrene til venstre i figuren er upolare, mens fosfatidylamingruppen til høyre er polar (Grønneberg 2008).

2.2.5 Nomenklatur

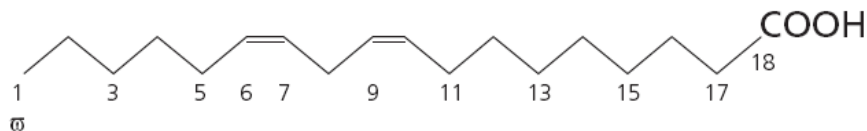
Fettsyrer navnesettes ved å benytte systematisk nomenklatur med IUPAC-terminologi, trivialnavn eller forkortelser. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) lagde en internasjonal standard da det var mange og forvirrende systemer for navnsetting (Akoh & Min 2002).

I følge IUPAC-terminologi navnesettes fettsyrer etter antall hydrokarboner. En fettsyre med 18 hydrokarboner navngis oktadekansyre etter det 18. hydrokarbonet, som kalles oktadekan. Uten dobbeltbindinger får fettsyren endingen –ansyre. Dersom det er en dobbeltbinding får fettsyren endingen –ensyre. Forstavelsen di, tri, tetra osv legges på ved to, tre, fire eller flere dobbeltbindinger. Dobbeltbindinger angis med det greske tegnet delta Δ , som beskriver avstanden fra karboksylenden med karboksylatomet som nummer 1. Dobbeltbindingens posisjon er angitt foran fettsyrens navn: $\Delta 9$ -oktadekansyre eller bare 9-oktadekansyre. Det oppgis også om dobbeltbindingen har en *cis* eller *trans*-konfigurasjon med forkortelsen *c* eller *t* (Akoh & Min 2002). I figur 2.8 illustreres fettsyren *c*-9, *c*-12 –oktadekadiensyre.



Figur 2.8: IUPAC terminologi beskriver fettsyren ved at karboksylatomet er nummer 1.
Her er *c*-9, *c*-12 –oktadekadiensyre (Grønneberg 2008).

Forkortelser av fettsyrer beskriver antall karbonatomer etterfulgt av kolon og antall dobbeltbindinger. Bokstaven *n* brukes for å beskrive første dobbeltbinding i forhold til metylenden i hydrokarbonkjeden. Fettsyren linolsyre, som vises i figur 2.9, forkortes til C18:2 *n*-6. Den første dobbeltbindingen er plassert mellom karbon nr. 6 og nr. 7 fra metylenden. Forkortelser av fettsyrer kan ikke benyttes for *trans*-fettsyrer eller fettsyrer med ekstra funksjonelle grupper. Ofte benyttes omega ω i stedet for *n* for å angi dobbeltbindingens posisjon (Akoh & Min 2002).



Figur 2.9: Med forkortelse beskrives fettsyren ved at C-atomet i metylenden er nr. 1.

Her vises C 18:2 n-6 (IUPAC: c-9, c-12 – oktadekadiensyre) (Grønneberg 2008).

I tabell 2.2 vises noen av fettsyrene som det analyseres etter med gasskromatografi i denne oppgaven. Fettsyrene vises med standard IUPAC- terminologi, trivialnavn og med forkortelser.

Tabell 2.2: Eksempler på fettsyrer navngitt med henholdsvis IUPAC- terminologi, trivialnavn og forkortelser.

| IUPAC- termonologi | Trivialnavn | Forkortelser |
|--|-------------------------|--------------|
| Tetradekansyre | Myristinsyre | C14:0 |
| c-9- tetradekaensyre | Myristoleicsyre | C14:1n-5 |
| Heksadekansyre | Palmitinsyre | C16:0 |
| c-9- heksadekaensyre | Palmitolsyre | C16:1n-7 |
| Oktadekansyre | Stearinsyre | C18:0 |
| c-9-oktadekaensyre | Oljesyre | C18:1n-9 |
| c-11-oktadekaensyre | Asclepicsyre | C18:1n-7 |
| c-9, c-12-oktadekadiensyre | Linolsyre | C18:2n-6 |
| c-6, c- 9, c- 2- oktadekatriensyre | γ-linolensyre | C18:3n-6 |
| c-9,c-12,c-15- oktadekatriensyre | α-linolensyre | C18:3n-3 |
| Eicosansyre | Archinsyre | C20:0 |
| c-11- eicosaensyre | Gadoleinsyre | C20:1n-9 |
| c-5,c-8,c-11,c-14-eikosatetraensyre | Arakidonsyre (AA) | C20:4n-6 |
| c-5,c-8,c-11,c-14,c-17-eicosapentaensyre | Eikosapentaensyre (EPA) | C20:5 n-3 |
| Dokosansyre | Behensyre | C22:0 |
| c-13-dokosaensyre | Erukasyre | C22:1n-9 |
| c-4,c-7,c-10,c-13,c-16,c-19-docosahexaensyre | Docosahexaensyre (DHA) | C22:6n-3 |

2.3 Lipider i havre (*A. Sativa*)

Havre har et høyere innhold av lipider enn andre kornarter. Havre kan inneholde fra 2 - 18 % lipider i form av glyserider, fosfolipider, glykolipider, steroler og frie fettsyrer. Majoriteten av lipidene (86 – 90 %) befinner seg i endospermen og rundt 7 % er i kimen (Banas et al. 2007). Vekstforhold påvirker det totale innholdet av lipider i havre. Lave temperaturer øker lipidinnholdet og mengde umettede fettsyrer. Kunstgjødsel med høyt innhold av nitrogen gir et litt lavere lipidinnhold (Webster & Wood 2011).

Av lipidene i havre er ca. 50 – 85 % glyserider, hvorav majoriteten er triglyserider. Under 10 % er mono- og diglyserider. Fosfo- og glykolipider utgjør mellom 20 – 40 % av lipidene. De vanligste glykolipidene er digalaktosyldiglyserid (4 - 8 %), samt monogalaktosyldiglyserid og monogalaktosylmonoglyserid (0,6 – 4,5 %). Det vanligste fosfolipidet i havre er lecitin.

Det totale innholdet av steroler ligger mellom 30 – 70 mg/100 g havre tørrvekt. B-sitosterol utgjør 50 – 80 % etterfulgt av avenasterol, campesterol og stigmasterol (Webster & Wood 2011).

Majoriteten (90 - 95 %) av fettsyrene i havre er palmitinsyre, oljesyre og linolsyre. Andre fettsyrer i havre er blant annet stearinsyre, linolensyre, myristinsyre og gadoleinsyre. Små mengder av fettsyrene (<1 %) er oxylipider med hydrokso eller epokso- grupper. Fettsyresammensetningen varierer i havretypene med lavt og høyt fettinnhold. En havreart med 4,2 % fettinnhold hadde en oljesyrekonsentrasjone på 25,8 %. En annen havreart med 11,8 % fettinnhold hadde en oljesyrekonsentrasjon på 41,3 % (Webster & Wood 2011).

2.4 Prosessering av havre

Havre har et høyere innhold av lipider og en høyere lipaseaktivitet enn andre korn typer. Det gir utfordringer for havreindustrien siden hydrolyse av lipider kan gi bitter smak og forringe kvaliteten. Hastigheten på hydrolysen avhenger av vannaktiviteten. Det kan ta flere måneder dersom det er lav vannaktivitet, men er havren i et fuktig miljø kan det ta timer. Til prosessering av havre blir enzymene nesten alltid inaktivert. Kvaliteten til havren måles ved å undersøke mengde frie fettsyrer og lipaseaktiviteten (Webster & Wood 2011).

Havre blir høstet med inneragnene på, som tilsvarer rundt 25 % av total vekt. Havrekornene blir rensset og inneragnene fjernes. Deretter blir havrekornene varmebehandlet med damp i 0,5 – 2 timer ved 95 – 100 °C før tørking. Varmebehandlingen inaktiverer enzymer som lipase, lipoxygenase og lipoperoxidase. Havren får en brunere farge med en nøtteaktig smak. Det blir lettere å fjerne frukt- og frøskallene (Hoseney 1986; Mälkki 2001).

Havrekornet blir avskallet og sortert ut i fra hva havren skal brukes til. Havrekli inneholder skallet og gir mye fiber. Havregryn er uten skall og presset sammen i en valse, se figur 2.10. Havremel er steinmalt/ hammermalt med eller uten skall (Hoseney 1986).



Figur 2.10: *Prosessert havregryn (Ultra 2012).*

2.4.1 Enzymer og antioksidantaktivitet

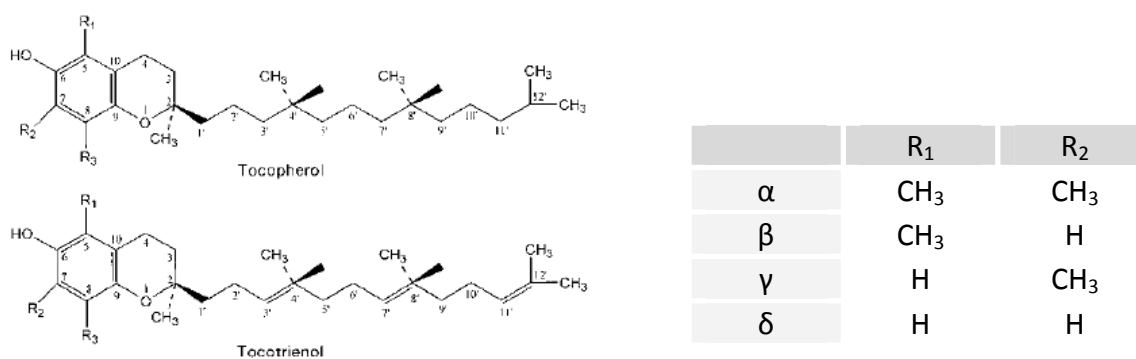
Når havrekornet begynner å spire frigjøres enzymer fra aleuronlaget og endospermen. Amylaser hydrolyserer stivelseslageret av amylose og amylopektin. Proteaser og peptidaser hydrolyserer peptidene. Lipidene brytes ned til energiproduksjon i glykoxysomer, en spesiell organelle som oppstår i endospermen under spiring (Banas et al. 2007).

Lipaser hydrolyserer esterbindingene i lipidene og frigjør fettsyrene. Lipoksygenase katalyserer oksygenering av umettede fettsyrer med oksygen og gir hydroperoksid av fettsyren.

Lipoksygenase kan omdanne linolensyre til 13-hydroperoksylinolensyre eller 9-hydroperoksylinolensyre. De er ustabile og kan degraderes til oksidasjonsprodukter. Lipoperoksidase kan redusere fettsyrehydroperoksidene til hydroksyl- og epoksyssyrer (Belitz & Grosch 1999). Havre har gode antioksidantegenskaper. Antioksidanter er komponenter som reduserer oksidering av lipider og stabiliserer frie radikaler. De to hovedgruppene med antioksidanter i havre er: lipofile antioksidanter og andre forbindelser som fenoliske forbindelser (Webster & Wood 2011).

Studier viser at raffinert havreolje er mer oksidativt stabil enn soyaolje, antagelig på grunn av det høye nivået av vitamin E (Kalbasiastari & Hammond 1977). Vitamin E (figur 2.11) er en lipofil antioksidant. Innholdet av vitamin E i havre er ca. 20 – 30 mg/kg med hovedsakelig α - tokoferoler (18 %) og α - tokotrienoler (43 %). Det er også detektert betydelige mengder β -, γ -, δ - tokoferoler og tokotrienoler (1,4 – 9,1 %) (Lásztity et al. 1980).

Nivået av tokotrienoler øker med oljekonsentrasjonen i havren. Nivået av tokoferoler er uavhengig av oljekonsentrasjonen. Tokotrienoler er hovedsakelig lokalisert i endospermen, mens tokoferolene er lokalisert i kimen. Innholdet av vitamin E er stabilt under prosessering, men unntak av et moderat tap av tokotrienoler. Avenasteroler og fosfolipidet lecitin har også gode antioksidantegenskaper (Peterson & Wood 1996; Webster & Wood 2011). Fenoliske antioksidanter er viktige for å beskytte lipidene i havre. Det er identifisert 24 ulike fenoliske komponenter i havre med antioksidanteffekt. Av disse var de viktigste komponentene derivater av hydroxycinnamic syre med kaffeisk og ferulisk syre ansvarlig for antioksidanteffekten (Webster & Wood 2011).



Figur 2.11: Strukturen til tokoferol og tokotrienol med variasjonene i R₁ og R₂. R₃ er CH₃ (Akoh & Min 2002).

2.5 Havre til humant konsum – ernæring

Det finnes mange ulike havreprodukter på markedet, som smakstilsatte havregrøtvarianter, frokostblandinger, havrekjeks, müslibarer og lignende. Havre inneholder ikke gluten og må blandes sammen med andre korn typer ved bruk til baking. Havre kan således spises av glutenallergikere dersom det ikke inneholder spor av gluten fra andre kornprodukter. Det er variasjoner i sammensetningen til havre på grunn av vekstforhold og genetiske forskjeller (Banas et al. 2007).

Havre inneholder mange næringsstoffer som ansees å ha ernæringsmessige fordeler. Karbohydratene i havre gir en lav glykemisk indeks med jevnt blodsukker, som sammen med et høyt innhold av umettede fettsyrer gir en god metthetsfølelse (Havreforening 2012). Havre har en god fordøyelighet med proteiners fordøyelighet på 90 % og karbohydraters fordøyelighet på 97 – 100 % (Webster & Wood 2011). Havre inneholder vitamin E og flere B – vitaminer (tiamin, riboflavin, niacin, B6, folat) i tillegg til mineralene kalsium, jern, magnesium, sink, selen, kobber og fosfor (Matportalen 2012).

Havre inneholder de essensielle fettsyrene linolsyre (18:2 n-6) og α -linolensyre (18:3 n-3). Essensielle fettsyrer må tilføres via kostholdet. Med utgangspunkt i linolsyre og α -linolensyre kan det syntetiseres en rekke ulike fettsyrer i de to fettsyrefamiliene (n-6 og n-3) i fordøyelsessystemet. Det skjer ved at hydrokarbonkjeden forlenges med to C-atomer av gangen og det formes dobbeltbindinger (Whitney & Rolfes 2005).

US Food and Drug Administration (FDA) godkjente i 1997 en helsepåstand om havreprodukter. FDA gikk gjennom 37 studier. De konkluderte med at en diett med β – glukaner fra fullkornshavre, med lavt innhold av mettet fett og kolesterol, kan redusere risikoen for hjerte- og karsykdommer (FDA 1997). The European Food Safety Authority (EFSA) gav i 2010 ut en rapport der det sto at en diett med minimum 3 g β -glukaner fra bygg eller havre daglig bidrar til å opprettholde et normal konsentrasjon av kolesterol i blodet (EFSA 2010). β -glukan er en ikke-stivelses polysakkarid og et løselig fiber (Webster & Wood 2011).

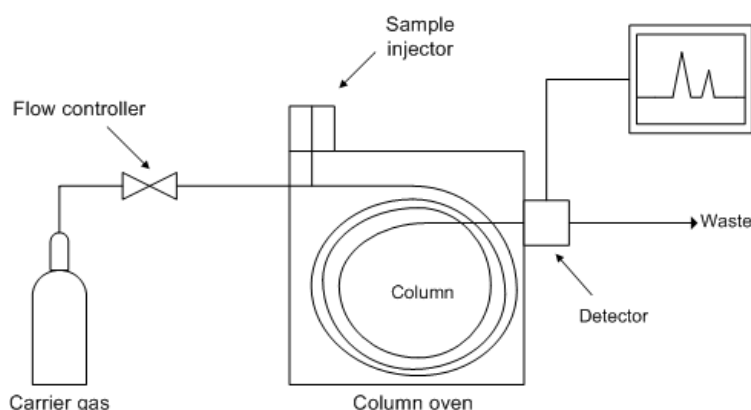
2.6 Fettsyresammensetning

En velkjent metode for å identifisere fettsyresammensetningen i biologisk materiale er å benytte en kombinasjon av gasskromatografi (GC) og flamme- ioniserings detektor (FID) (Pacchiarotta et al. 2010). Før lipidene kan analyseres med GC må fettsyrene spaltes av og omdannes til flyktige fettsyremetylestere (FAME). Denne prosessen kalles derivatisering og gjennomføres med ulike prosedyrer som inkluderer syrer, baser, saltløsninger og varmebehandlinger (Wittkowski & Matissek 1993; Liu 1994).

En ofte benyttet derivatisering av fettsyrer inkluderer syrekatalysert metylering med metanolisk saltsyre (HCl). Når FAME formes i en reaksjon mellom lipider og metanol kalles reaksjonen metylering. Reaksjonen er reversibel, derfor er det nødvendig med et overskudd av vannfri metanol med en egnet syrekatalysator slik at FAME dannes. Varmebehandling gjør at reaksjonen går raskere (Liu 1994).

2.6.1 Gasskromatografi

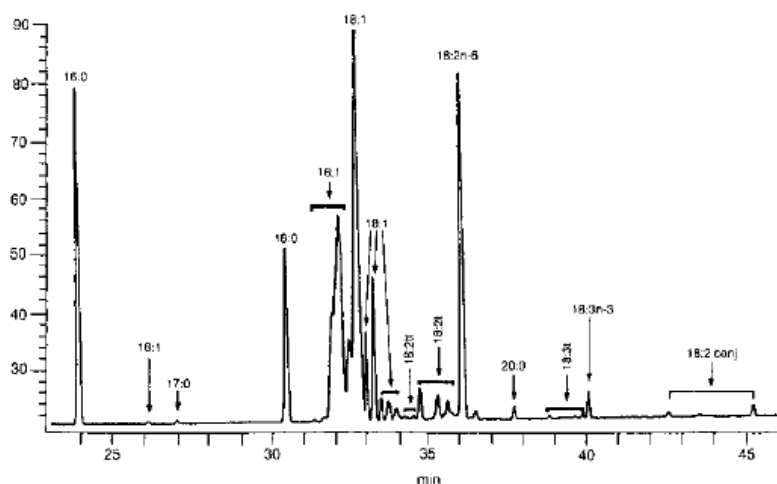
Prinsippet bak GC baseres på at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom en mobil og en stasjonær fase. Den mobile fasen består av en bæregass, som frakter flyktige stoffer gjennom en injektor, en kapillærkolonne og til en FID (se figur 2.12). Stasjonærfasen er en ikke-flytende væske bundet til veggen inne i kapillærkolonnen (Greibrokk et al. 1994).



Figur 2.12. Skjematisk presentasjon av en gasskromatograf (Wikipedia 2012). Til venstre i bildet er bæregass. I midten er injektoren og kapillærkolonnen. Flamme- ioniserings detektoren sender elektriske signaler slik at et kromatogram dannes.

En angitt prøvemengde blir sprøytet inn i den oppvarmede injektoren til fordampning. De flyktige stoffene beveger seg med ulik hastighet gjennom kapillærkolonnen grunnet stoffenes likevektsfordeling mellom stasjonær og mobilfase. Likevektsfordelingen påvirkes av FAME sin ulike polaritet, umettethet og kjedelengde. Dette er basis for en kromatografisk separasjon. Når de flyktige stoffene passerer FID skapes det elektriske signaler som danner et kromatogram. FID er den vanligste detektoren. Prinsippet bak FID er at den elektriske ledningsevnen i gass er proporsjonal med konsentrasjonen av ladede partikler i gassen (Greibrokk et al. 1994; Pacchiarotta et al. 2010).

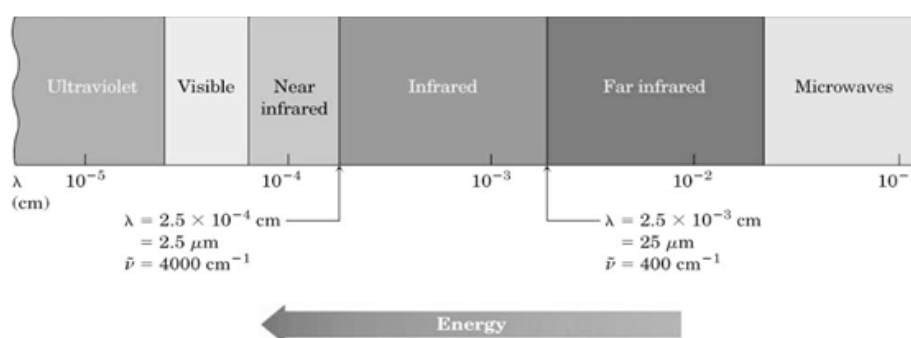
Retensjonstiden gir en definisjon av stoffenes retensjon på en gitt stasjonærfase. Det er mulig å identifisere FAME ved hjelp av sammenligning med retensjonstiden til kjente FAME - eksterenstandarder. Et kromatogram viser fettsyresammensetningen der de ulike toppene representerer hver sin fettsyre, som det vises i figur 2.13. Retensjonstiden vises med minutter i abscisse, mens ordinaten viser areal (Greibrokk et al. 1994).



Figur 2.13: Eksempel på et kromatogram der de ulike toppene representerer hver sin fettsyre. Retensjonstiden med minutter vises i abscisse, mens areal vises i ordinat (Akoh & Min 2002).

2.7 Spektroskopi

Mat har ofte en kompleks sammensetning. Vibrasjonsspektroskopi er en gruppe teknikker som har den fordelen at det kan analyseres direkte i matvarer uten noen spesiell forbehandling. Prøvene kan være flytende, faste eller i gassform (Li-Chan et al. 2010). Infrarød (IR) stråling er elektromagnetisk stråling med lengre bølgelengder enn synlig lys og kortere bølgelengder enn mikrobølger, som det vises i figur 2.14. IR-regionen kan deles inn i nær-IR, midt-IR og fjern-IR (Barth 2007).

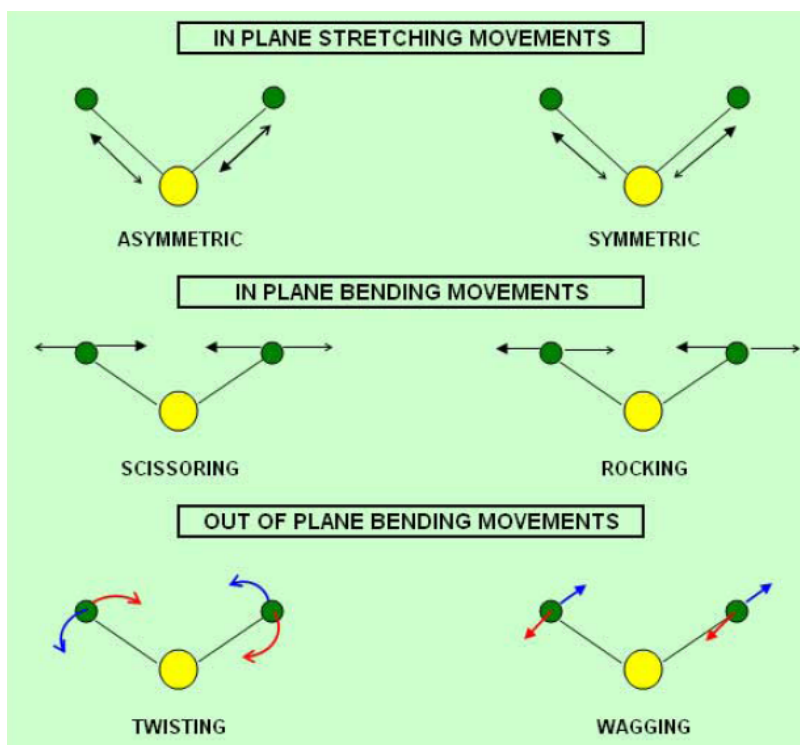


Figur 2.14: Det elektromagnetiske spektrum. Den infrarøde regionen er mellom synlig lys og mikrobølgerregionen (McMurry 2004).

2.7.1 Atomenes bevegelse

IR - spektroskopi er basert på at det sendes IR-stråling gjennom organisk materiale. IR-strålingen fører til en transisjon mellom energinivåene slik at det oppstår vibrasjoner i bindingene mellom atomene. Energien er avhengig av hva slags binding det er mellom atomene (enkel, dobbel, trippel) og av massen til de individuelle atomene. Et molekyl absorberer bare bestemte frekvenser av IR-stråling. Det oppstår en interaksjon når IR-strålingens energi er lik den energien forbundet med en bestemt vibrasjon i molekylet. På denne måten kan FT-IR spektroskopi identifisere bestemte funksjonelle grupper i et molekyl (Li-Chan et al. 2010).

Vibrasjonene blir klassifisert ved strekkende eller bøyende bevegelser og om de beveger seg jevnt (in plane) eller ujevnt (out of plane). De strekkende bevegelsene er symmetriske eller asymmetriske, og de bøyende bevegelsene kalles "scissoring", "rocking", "twisting" eller "wagging" (Williams & Fleming 2008), som det vises i figur 2.15. For at en funksjonell gruppe skal absorbere IR-stråling må den ha en viss grad av polaritet. Symmetriske molekyler som H_2 og Cl_2 absorberer ikke IR-stråling. Polare bindinger som C=O, N-H og O-H har sterke midt-IR absorpsjonsbånd. Upolare og mindre polare bindinger som C-C, C-S og S-S gir svakere midt-IR absorpsjonsbånd (Li-Chan et al. 2010).



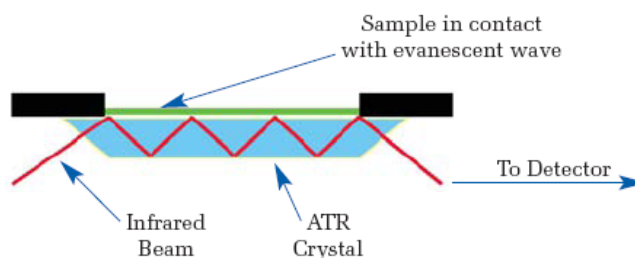
Figur 2.15: Atomene i et molekyl kan vibrere når de absorberer IR-stråling. Strekkende bevegelser er asymmetrisk eller symmetrisk. Bøyende bevegelser kalles "scissoring", "rocking", tvisting eller "wagging" (ptli 2012).

2.7.2 Fourier transform infrarød (FT-IR) spektroskopi

Det elektromagnetiske området som benyttes ved FT-IR spektroskopi er det midt-infrarøde området fra 4000 cm^{-1} til 538 cm^{-1} (Barth 2007). FT-IR spektroskopi kan benyttes både til kvalitative og kvantitative analyser, grunnet at intensiteten av absorpsjonen er relatert til konsentrasjonen. Analysen tar kort tid, det trengs lite prøvemateriale, det benyttes ikke kjemikalier og metoden er ikke-destruktiv (Barth 2007; Li-Chan et al. 2010).

Selve FT-IR prinsippet går ut på at en IR-stråle med hele midt-IR frekvensområdet blir delt inn i to stråler med lik intensitet av et interferometer. Et interferometer består av et fast speil og et bevegelig speil (Barth 2007). Den ene IR-strålen passerer til prøven, mens den andre IR-strålen er en referanse. De to IR-strålene møtes og interfererer med hverandre. Det dannes et interferogram, som blir transformert ved hjelp av *fourier transform* i et dataprogram slik at det dannes et FT-IR spekter (Williams & Fleming 2008).

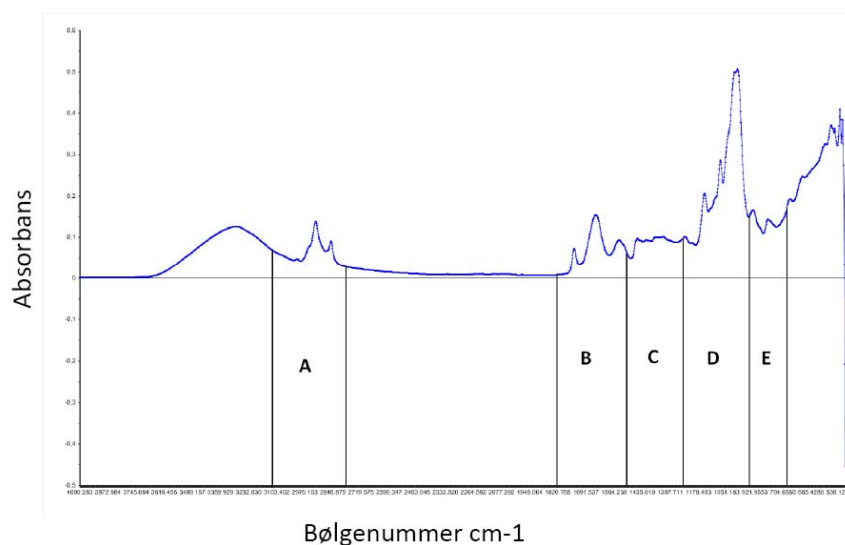
FT-IR spektroskopi som analyseteknikk har gitt opphav til flere ulike prøvepresentasjonsteknikker. Den vanligste måten å måle IR på, er å måle lys som blir transmittert gjennom en prøve. Refleksjonsmålinger har imidlertid blitt mer vanlige de senere år. ATR (Attenuated Total Reflection) er en refleksjonsteknikk der IR-strålen sendes mot en krystall der prøven befinner seg, se figur 2.16. Den interne refleksjonen av IR-strålen i krystallen danner en transient flyktig bølge som beveger seg ut fra krystallens overflate $0,5 - 5\text{ }\mu\text{m}$ inn i prøven. Der hvor prøven absorberer energi vil den flyktige bølgen bli dempet. Det oppstår endringer i IR-strålen som kommer ut i motsatt ende av krystallen og måles av en detektor. ATR krystaller produseres av germanium (Ge), zinkselenid (ZnSe) eller diamant (C) (Li-Chan et al. 2010).



Figur 2.16: ATR krystall der IR-strålen kommer inn på den ene siden og det dannes en flyktig bølge som trenger inn i prøven. IR-strålen endres av absorbert energi og kommer ut av den andre siden av krystallen (PerkinElmer 2005).

2.7.3 FT-IR spekter

Posisjonen til et absorpsjonsbånd i FT-IR spekteret kan uttrykkes med mikrometer (μm). Det vanligste er å uttrykke absorpsjonsbåndet i bølgenummer (cm^{-1}), som er proporsjonalt med transisjonsenergien og frekvensen av absorbert stråling. Et FT-IR spekter kan tolkes ved å se på absorpsjonsbåndene og hvilke funksjonelle grupper de representerer (Williams & Fleming 2008). Et FT-IR spekter (se figur 2.17) har bølgenummer (cm^{-1}) vist i abscisse og absorpsjons vist i ordinat.



Figur 2.17: FT-IR spekter fra havremel med bølgenummer (cm^{-1}) i abscisse og absorpsjons i ordinat.

A) 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} : Enkle bindinger mellom C og H med strekkende vibrasjoner i dette området, men bøyende vibrasjoner i *fingerprint* regionen absorberes. *Cis*-CH båndene har strekkende vibrasjoner og absorberes svakt. CH_2 og CH_3 viser sterke absorpsjonsbånd fra asymmetrisk- og symmetrisk strekkende vibrasjoner.

B) 1800 cm^{-1} til 1500 cm^{-1} : Det absorberes flere strekkende og bøyende vibrasjoner og kombinasjonsbånd. C=O er en del av karboksylgruppen i lipider og gir et sterkt absorpsjonsbånd. Amid I og amid II bånd i proteiner absorberes.

C) 1500 cm^{-1} til 1200 cm^{-1} : I dette området og lavere ligger *fingerprint*- regionen. Enkle bindinger C-C absorberes, men gir svake bånd. Amid III bånd fra proteiner og fosfatgrupper absorberes. Enkle bindinger mellom C H, CH_2 og CH_3 (som i A) har bøyende vibrasjoner.

D) 1200 cm⁻¹ til 900 cm⁻¹: Det absorberes strekking mellom C-O i estere og C-O-C i karbohydrater. *Trans*-konfigurasjoner (mellom CH bindinger) i fettsyrer absorberes.

E) 900 cm⁻¹ til 700 cm⁻¹: Det absorberes CH og ringstrukturer i sukkerarter og CH₂ bøyende vibrasjoner i lipider. Kilder fra punkt A til E. (Guillen & Cabo 1997; Socrates 2001; Williams & Fleming 2008).

2.7.4 Analyse av lipider med FT-IR spektroskopi

FT-IR spektroskopi er ofte benyttet for å klassifisere og identifisere oljer grunnet at flytende oljer kan plasseres direkte på ATR-krystallen (Yang et al. 2005). Det er blant annet bestemt grad av umettethet og jodverdi (Hendl et al. 2001) og mengde frie fettsyrer i oljer (Che Man & Setiowaty 1999). FT-IR spektroskopi er også benyttet til analyse av ulike lipidkomponenter i flere type matvarer gjennom mange publikasjoner som kvantitativt fettinnhold i majones (Chippie et al. 2002), metode for fast fett indeks (van de Voort et al. 1996) og fettsyresammensetning med innholdet av ω -3 og ω -6 fettsyrer i svinekjøtt (Olsen et al. 2008). I tillegg er FT-IR spektroskopi den foretrukne metoden for kvantitativ analyse av *trans*-fett (Mossoba et al. 2007).

For å benytte FT-IR spektroskopi til analyse av lipider fokuseres det på absorpsjonsbåndene til CH, CH₂ og CH₃, C=O, O-H og C-O. Disse funksjonelle gruppene har blant annet opphav i triglyserider, fosfolipider og andre lipider (Li-Chan et al. 2010). Umattethet i fettsyrene blir identifisert ved absorbering av *cis*- konfigurasjonen i bindingen mellom CH ved 3008 cm⁻¹ (Guillen & Cabo 1997). *Trans*-fett blir identifisert ved absorbering av *trans*-konfigurasjonen i bindingen mellom CH ved 966 cm⁻¹ (Mossoba et al. 2007). Absorpsjonsbåndene til de funksjonelle gruppene i lipider vises i detalj i tabell 4.3 i resultatdelen.

FT-IR spektrometer i kombinasjon med IR mikroskop er benyttet til å undersøke de ulike delene av et havrekorn som aleuronlaget og kjernen. Det er en vanlig metode for å undersøke den romlige sammensatte kjemien i korn (Webster & Wood 2011). Det er ikke funnet publikasjoner som omhandler analyse av lipider med FT-IR spektroskopi med ATR,

som benyttes i denne oppgaven, på havre. Det er benyttet nær-IR spektroskopi for dette formålet (Krishnan et al. 2000). Et nær-IR spekter har bredere og mer overlappende bånd enn et midt-IR spekter, som gjør det vanskeligere å gjennomføre strukturelle og kvantitative analyser (Li-Chan et al. 2010). I en studie der ulike spektroskopiske metoder for klassifisering av olje ble sammenlignet ble FT-IR ATR spektroskopi ansett som den beste metoden, foran FT-Raman spektroskopi og nær-IR spektroskopi. En av grunnene til at FT-IR ATR spektroskopi ble foretrukket var at midt-IR spekter viser "fingerprint" regionen til de funksjonelle gruppene mer intenst og med smalere topper enn de andre metodene (Yang et al. 2005).

2.8 Dataanalyser

Spektroskopiske datasett består av et stort antall kolineære variabler. Variablene er kolineære dersom det er høy korrelasjon mellom variablene, som det ofte er i moderne spektroskopi med mange variabler pr. prøve. I slike typer datasett er det vanskelig å finne en struktur i resultatene. Multivariat dataanalyse er en god metode for å analysere disse. Multivariat dataanalyse gjennomføres ofte ved hjelp av statistiske dataprogrammer, som Unscrambler. Når det analyseres et datasett kan Principal Component Analysis (PCA) hjelpe til å finne den underliggende strukturen og variasjonen i datasettet. Hvis man så ønsker å koble eller korrelere informasjon fra ulike datasett eller ulike målinger så kan det være nyttig å benytte Partial Least Squares Regression (PLSR) (Næs 2002).

2.8.1 Forbehandling av rådataene

Forbehandling er viktig i data analyse. Hovedformålet med forbehandling er å fjerne fysiske effekter i dataene som ikke har direkte sammenheng med den kjemiske sammensetningen i prøvene (Næs 2002).

2.8.1.1 Andre derivering

Et FT-IR spekter fra en kompleks biologisk masse kan være sammensatt av mange overlappende absorpsjonsbånd. Konsekvensen av dette er at informasjon kan ligge gjemt under brede ubestemmelige absorpsjonsbånd. For å hente denne informasjonen kan derivering benyttes (Gomez-Ordóñez & Ruperez 2011). Derivering benyttes også for å fjerne additive effekter og brede underliggende grunnlinjevariasjoner i spektrene.

Et spekter som er 1. derivert ligner på originalspekteret, med de høyeste topper der originalspekteret har de bratteste kurver. Et spekter som er 2. derivert ligner mye på originalspekteret med topper på ca. de samme stedene, men det 2. deriverte spekteret er invertert. Et problem med derivering er at signalet fra prøven blir redusert, mens det blir mer støy (Næs 2002). Reduksjonen i signal-til-støyforholdet kan til en viss grad reduseres ved å benytte glattefunksjoner for derivering beskrevet av Savitzky og Golay (Savitzky & Golay 1964).

2.8.1.2 Extended multiplicative scatter correction (EMSC)

I et spektroskopisk datasett vil forstyrrende fysisk informasjon (spredning) kunne påvirke spektrene. Den forstyrrende fysiske informasjonen kan være at strålingskilden blir redusert over tid eller at den optiske veilegden endres. Denne reduksjonen i intensitet gir opphav til multiplikative effekter i spektrene. For å skille mellom forstyrrende fysisk informasjon og kjemisk informasjon kan det gjøres en normalisering av datasettet. Normaliseringen gjør spektrene fra prøver med samme relative sammensetning like. Normaliseringen kan gjennomføres med den modellbaserte forbehandlingen EMSC (Nortvedt 1996).

2.8.2 Kalibrering

I alle kalibreringssituasjoner inneholder modellen ukjente konstanter og parametere som trenger å bli estimert ved å benytte data fra en rekke kalibreringsprøver. Kvaliteten på kalibreringsresultatene avhenger av antall prøver og variasjonen av disse (Næs 2002).

2.8.2.1 Principal component analysis (PCA)

PCA er en matematisk metode som benyttes for å komprimere store datamengder slik at det blir enklere å tolke resultatene. Ettersom variabler i spektroskopiske datasett ofte er kolineære er det vanskelig å finne en struktur i dataene. PCA fjerner kolineariteten og er et viktig verktøy for å identifisere uteliggere. Uteliggere er prøver som skiller seg fra resten av datasettet. Det kan skyldes instrumentfeil eller uventede forskjeller i prøvene. Uteliggere kan føre til store feil i modellen, så det er viktig å identifisere disse (Nortvedt 1996).

Datasettet presenteres ofte som en datamatrix (Krishnan et al.) med n prøver og p variabler. Matrisen sentreres ved at gjennomsnittet til alle prøvene trekkes fra hver enkelt prøve. Hver prøve plottes inn i et skår-plott (et koordinatsystem) slik at prøvene danner en punktsverm i rommet. Det er hovedvariasjonene i dataene det er ønskelig å finne ut. Retningen til den første prinsipale komponenten PC_1 er der prøvene har maksimal variasjon i prøvesvermens lengderetning. Den andre prinsipale komponenten PC_2 ligger ortogonalt (vinkelrett) på PC_1 og indikerer de nest største variasjonene. PCA gir oversikt over prøvene og hvordan de ligger i forhold til hverandre, og man kan finne ut av relasjoner, likheter, ulikheter og grupperinger (Esbensen et al. 2001).

2.8.2.2 Partial least square regression (PLSR)

Multivariat kalibrering involverer å relatere to datasett (X -matrisen og Y -matrisen) ved eksempelvis en regresjonsanalyse (PLSR). I stedet for å fokusere på variasjonen i X- matrisen som i PCA, blir det fokusert på den informasjonen i X-matrisen som samsvarer mest mulig med informasjonen i Y-matrisen. X- matrisen inneholder analysedataene fra kjente prøver. Fra spektroskopiske analyser er X- variablene bølgenummer og X –dataene absorpsjons. Y – matrisen inneholder referansedata for de samme prøvene (Esbensen et al. 2001).

RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) indikerer de gjennomsnittelige feilene som forventes assosiert med fremtidige estimeringer. RMSEP- verdiene kan benyttes for å sammenligne forskjellige modeller dersom enhetene er like. En lavere RMSEP- verdi betyr en bedre modell. R^2 sier noe om hvor stor del av den totale variasjonen i Y-matrisen som kan forklares med regresjonsmodellen. R^2 –verdien ligger mellom 0 og 1, der 1 indikerer den beste modellen. Antall PLS komponenter som er nødvendig for å lage modellen indikerer hvor mye variasjoner det er i Y-verdiene og kompleksiteten i modellen. Regresjonskoeffisienten vises som et spekter i et diagram med bølgenummer (cm^{-1}) i abscisse og regresjonskoeffisienten i ordinat. Spekteret i diagrammet viser toppe i absorpsjonsområdene relatert til de funksjonelle gruppene som betyr mest for modellen (Esbensen et al. 2001).

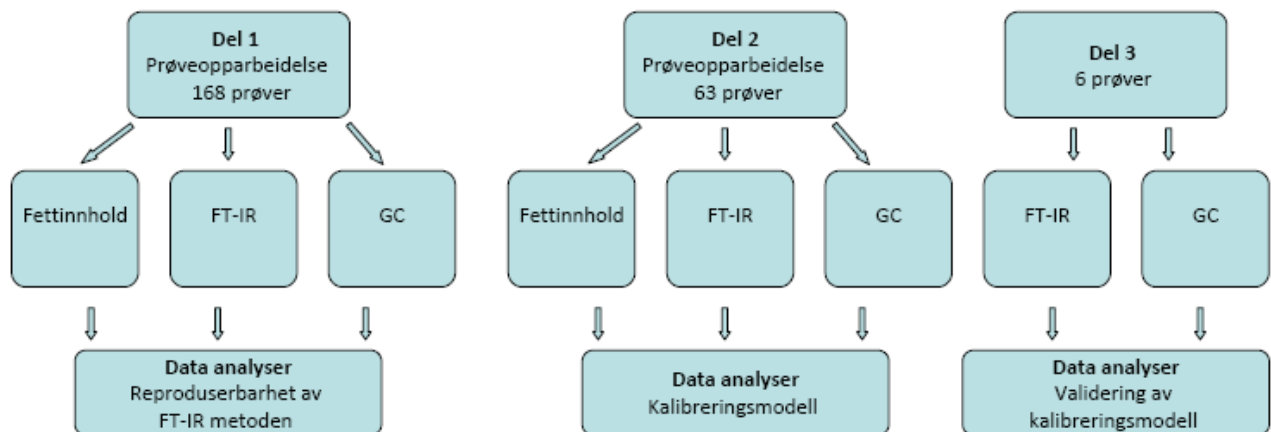
2.8.3 Validering

Validering brukes for å teste om kalibreringsmodellen man lager er god, og hvor nøyaktig metoden faktisk er. En vanlig måte å validere spektroskopiske kalibreringer på, er gjennom kryss-validering. Denne typen validering gjøres samtidig med regresjonen. Man velger seg ut en prøve som utelates av modellen, og så lager man en kalibrering av de resterende prøver. Denne kalibreringen brukes så for å predikere den utelatte prøven. Dette repeteres til alle prøver har blitt utelatt fra kalibreringsmodellen, og man kan da regne ut standard regresjonsparametre (som RMSEP og R^2 –verdier). En annen form for validering som er anbefalt er test-sett validering. Det er å teste ut kalibreringsmodellen man har bygget opp med ukjente prøver som er lignende prøvene i kalibreringsmodellen. Dette vil være den avgjørende testen som viser hvordan denne modellen kan brukes rent praktisk (Esbensen et al. 2001).

3 Materialer og metoder

3.1 Beskrivelse av forsøket

Arbeidet i denne oppgaven kan deles inn i tre hoveddeler. Hovedpunktene i gjennomføringen av forsøket er illustrert i flytskjemaet i figur 3.1.



Figur 3.1: Flytskjemaet viser hovedpunktene i gjennomføringen av forsøket. Formålet er å utvikle en ikke-destruktiv metode for å estimere fettinnhold og fettsyresammensetning i havre basert på IR spektroskopi.

3.1.1 Del 1: Reproduserbarhet av FT-IR metoden

Det ble først gjennomført et forsøk for å undersøke hvordan prøvene skulle analyseres med FT-IR spektroskopi og for å undersøke reproduserbarheten. 15 havremelprøver (Regal Bjørn havremel, steinmalt og varmestabilisert) ble analysert med ulike vaskerutiner mellom replikatene. 5 prøver ble analysert med vask og bakgrunnspekter, 5 prøver bare med vask og 5 prøver uten vask og bakgrunnspekter.

Det bygget opp et forsøksdesign som lå til grunn for en større kalibrering. Designet ble bygget opp ved å blande flere typer eksperimentelle design (utført av veileder ved Nofima), og hadde det formål å skape best mulig variasjon i fettsyresammensetning og fettinnhold. Det ble opparbeidet totalt 168 prøver med havremel blandet med ulike oljer i konsentrasjonene 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % av totalvekt prøve. Prøvene ble FT-IR

analysert romtemperert etter et døgn i kjøleskap (4 °C). Periodiske tekniske problemer med FT-IR instrumentet gjorde imidlertid at denne prosedyren ikke alltid kunne følges. Antall dager mellom prøveopparbeidelse og analyse varierte mellom 1 og 10 dager. De 168 prøvene ble opparbeidet og FT-IR analysert i randomisert rekkefølge. Det ble analysert 3 replikater av hver prøve. Fettsyresammensetningen av havremelet, oljene og utvalgte havremel/olje prøver ble analysert med GC. Fra disse data kunne fettsyresammensetningen i de resterende prøvene beregnes. Fettinnhold ble analysert på havremelet med NMR (Maran Ultra LF-NMR). Havremelet benyttet i del 1 er kommersielt tilgjengelig og rimelig og var derfor ideelt for å teste ut metodikken.

3.1.2 Del 2: Kalibrering

Med informasjon fra del 1 ble et nytt design laget og en ny kalibrering gjennomført. For det nye designet valgte man ved hjelp av PCA ut prøver fra forsøksdesignet i del 1 som spente ut variasjonsrommet. Prøvene bidro til jevn variasjon av alle ønskelige komponenter (utført av veileder ved Nofima). Det ble opparbeidet 63 prøver med havre blandet med ulike oljer i konsentrasjonene 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % av totalvekt prøve. Det ble benyttet 3 ulike typer havremel: Belinda, Mathilda og Ringsaker (alle havresorter ble på forhånd oppmalt hos CropTailor). Havremelene var ubehandlet og ble holdt kjølig og mørkt. De 63 prøvene ble analysert i randomisert rekkefølge med FT-IR spektroskopi. Fettsyresammensetning med GC og fettinnhold med NMR ble analysert på havremelene.

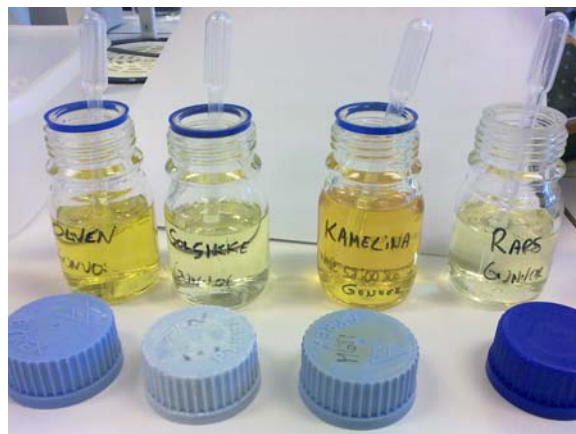
Ettersom de tre ulike havremeltypene var ubehandlet ble prøvene analysert direkte etter prøveopparbeidelse. For å kontrollere at prøvene ikke ble oksidert ble det gjennomført en holdbarhetsanalyse. Belinda ble lagt fremme i romtemperatur og det ble analysert 5 replikater med FT-IR spektroskopi etter 0 min, 30 min, 1 t, 3 t og 5 t.

3.1.3 Del 3: Validering av kalibreringen

For å validere kalibreringen fra del 2 ble det benyttet 6 ulike typer med havremel (oppmalt fra CropTailor) til en test-sett validering. Havreprøvene ble ikke blandet ut med oljer. De ble analysert med FT-IR spektroskopi og analysert for fettsyresammensetningen med GC. Grunnet lite prøvemateriale ble ikke fettinnholdet analysert.

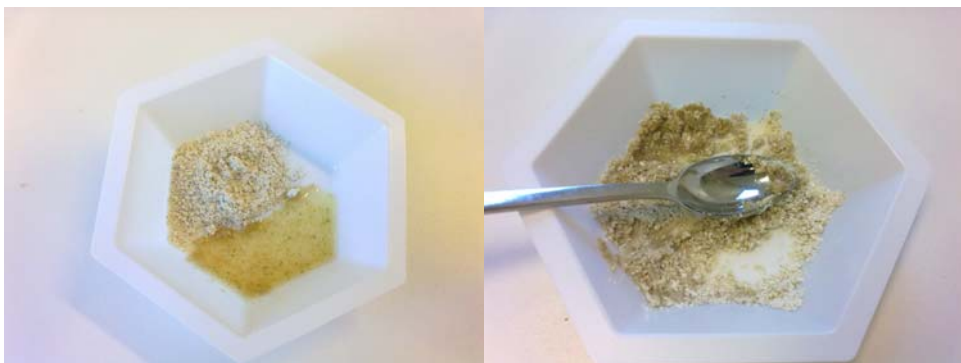
3.2 Prøveopparbeidelse

Opparbeidelse av prøvene ble gjort manuelt. Havremel ble overført med en spatel til målebeger og ble veiet (Mettler PM480 DeltaRange®). Oljene ble overført med en plastpipette til målebegeret. En spatel ble benyttet til å blande oljetyperne sammen med havremelet. Oljene som ble iblandet havremelet vises i figur 3.2: olivenolje (Eldorado), solsikkeolje (Eldorado), Camelinaolje (Bioforsk) og rapsolje (Eldorado). Havremelet benyttet i del 1 er kommersielt tilgjengelig og ble blandet slik at det totale volum pr. prøve ble 2 g. Havremelene benyttet i del 2 var fra CropTailor og det var ca. 10 g av hver type. Det resulterte i at prøvene som ble laget måtte være betraktelig mindre i volum for at havremelene skulle holde til alle prøvene. Totalt prøvevolum i del 2 ble 0,25 g pr. prøve. Blanding av havremel og olje vises i figur 3.3.



Figur 3.2: Oljene benyttet i opparbeidelse av prøvene.

Fra venstre: olivenolje, solsikkeolje, Camelinaolje og rapsolje (Foto Gunvor Ruud).

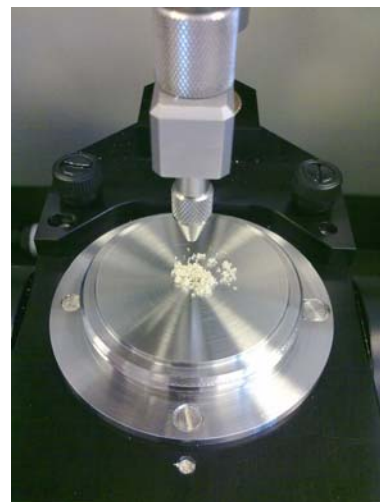


Figur 3.3: Havre og olje ble blandet sammen med en spatel (Foto Gunvor Ruud).

3.3 Fourier transform infrarød (FT-IR) spektroskopi

Et FT-IR spektroskop (Equinox 55, Bruker) utstyrt med en Universal ATR (PIKE MIRacle TM single reflection) prøvetakingsinnretning med zinkselenid/diamant- krystall ble benyttet til analyse. Hver prøve ble analysert med 3 replikater. Prøven ble overført til krystallen med en spatel slik at krystallen ble dekket. Små mengder prøvemateriale (ca 10 – 100 µg) ble påført. Stempelet ble ført ned over prøven for å sikre at prøven fikk god kontakt med krystallen. En datamaskin med dataprogrammet OPUS (Spectroscopy software version 6) var koblet til for å gjennomføre analysen og lage et spekter i frekvensområdet 4000 cm^{-1} til 538 cm^{-1} .

Før hver analyse og mellom hver replikat ble krystallen vasket og et bakgrunnspekter ble målt for å redusere forstyrrelse fra vann og CO_2 nivå, og unngå variasjoner grunnet annen type bakgrunnsstøy som intensitetsvariasjoner i lyskilden og lignende. Et tørkepapir ble benyttet til å fjerne prøvematerialet. Et tørkepapir fuktet med såpevann vasket området rundt krystallen. Et tørkepapir fuktet i vann fjernet såperestene før isopropanol (Kemetyl, Norge) ble påført området rundt krystallen.



Figur 3.4: Til venstre vises FT-IR spektroskopet. Til høyre vises ATR-krystallen dekket med havremel
(Foto Gunvor Ruud).

3.4 Fettsyresammensetning

3.4.1 Ekstrahering av fett

Prøvene med ulik oljekonsentrasjon ble veiet (Mettler Toledo PG503-3, DeltaRange®) i sentrifugeglass slik at det var like mye totalt fett (50 mg) i hver prøve. Det ble analysert to paralleller av hver prøve. Det ble tilsatt 10 ml kloroform (Merck, 1024442500, Damstadt, Tyskland) og metanol (Merck, 1060092500, Damstadt, Tyskland) i blandingsforhold 2:1.

Prøvene ble ristet (M52 minishaker, IKA works Inc, USA) i 2,5 minutter. Det ble tilsatt 1 ml destillert vann, rørene ble ristet 3 sekunder og sentrifugert i 10 minutter på 2000 rpm (Minifuge RF, Heraeus Sepatech, Tyskland).

Etter sentrifugeringen var kloroformfasen i bunn, havremelet i midten og vannfasen øverst. En glasspipette ble ført ned til kloroformfasen, som ble overført til et nytt glassrør med kork. Det ble tilsatt 1 ml destillert vann til glassrøret, og det ble sentrifugert i 10 minutter på 2000 rpm. Kloroformfasen ble overført på samme måte som i forrige punkt over til et nytt glassrør. Kloroformfasen ble dampet inn under nitrogen ved 37 °C på varmeplate (Stuart Block heater, SBH130013, England) i avtrekkskap.

3.4.2 Metylering

Glassrørene fra ekstraheringen og glassrørene med 50 mg olje ble tilsatt 1 ml benzen (Merck, 1017832500, Damstadt, Tyskland) og ristet i 10 sekunder. Det ble tilsatt 3 ml 3N Metanolisk syre (Supelco analytical, LB87007, USA) og 200 µl 2,2-dimethoxy propan (Sigma-aldrich, MKBF3356V, USA) og ristet i 10 sekunder. Prøvene ble plassert i 80 °C vannbad (Grants instruments, England) 20 min i avtrekkskap. Glassrørene med korker ble kontrollert etter 5 min i vannbadet slik at ikke innholdet ble fordampet.

Etter avkjøling av prøvene ble det tilsatt 1 ml isooktan (Merck, 1047272500, Damstadt, Tyskland), deretter ble det tilsatt 1 ml 5 % NaCl (Merck, 1064041000, Damstadt, Tyskland). Prøvene ble ristet (3 sek) og sentrifugert i 5 min ved 2000 rpm. Etter sentrifugeringen ble den øverste fasen isooktan overført med glasspipette til nye glassrør.

Prøvene ble tilsatt 1 ml 2 % NaHCO₃ (Merck, Art:6329, Damstadt, Tyskland), ristet (3 sek) og sentrifugert som forrige steg. Det øverste isooktanlaget ble overført til GC-vials med glasspipette. Det ble tilsatt litt tørr natriumsulfat (Merck, 66491000, Damstadt, Tyskland). Lokkene ble satt på før analyse med gasskromatografi.

3.4.3 Gasskromatografisk analyse for fettsyresammensetning

To paralleller av hver prøve, en eksterstandard 68 D (Nu-Check Prep Inc) og en blank prøve (isooktan) ble analysert ved hver sekvenskjøring. Gasskromatografen som ble brukt til separering av FAME var en Hewlett-Packard 6890 series gasskromatograf (Waldbronn, Tyskland) med helium som bæregass, se figur 3.5. Injeksjonsvolumet var på 1 µl med splittmodus. FAME ble separert på en 60 m SGE BPX-70 kapillærkolonne med en indre diameter på 0,25 med mer og 0,25 µm film tykkelse (SGE Analytical Science, Australia).

FAME ble detektert ved hjelp av en flamme- ioniseringsdetektor (FID) og verifisert ved sammenligning av retensjonstidene til kjente fettsyrer i den eksterne standardblandingen.



Figur 3.5: Gasskromatografen med injektoren og alle prøvene i en prøvekarusell (Foto Gunvor Ruud).

3.5 Fettinnhold

Fettinnholdet i havremelene ble analysert med NMR (nuclear magnetic resonance) med instrumentet Maran Ultra LF-NMR. Analysen ble gjort av en ingeniør på Nofima. Havremel (ca.2 g) ble veiet opp (Mettler PM480 DeltaRange[®]) i en teflonbeholder. Hver prøve ble analysert i to paralleller. Teflonbeholderen ble plassert i en NMR termostat ved 41 °C i 30 min. Teflonbeholderen ble deretter festet til en teflonstav og overført til magnetbrønnen. Magnetbrønnen med prøvebeholderen ble koblet til en datamaskin med NMR programvare der analysen ble gjennomført (Lundby 2009).

Prinsippet går ut på at både vann og fett inneholder protoner. Når hydrogenprotoner plasseres i et magnetisk felt får de evnen til resonans, eller til å bli utsatt for radiobølger med korrekt frekvens. Når det magnetiske feltet og radiofrekvensen sammenfaller vil protonene absorbere energi, for så å avgi energi. Energien måles og det bestemmes hvor mange protoner som resonnerer i prøven. Resonanssignalet blir kalibrert mot et kjent innhold og fettinnholdet bestemmes kvantitativt (Lundby 2009).

3.6 Dataanalyse

3.6.1 Analyse av X-verdiene

X-matrisen består av spektrene (3 replikater pr. prøve) analysert med FT-IR spektroskopi. For å benytte spektrene til PCA og PLSR i statistikkprogrammet Unscrambler (versjon X 10.1) ble OPUS-filene konvertert til JCAMP-DX –filer. I Unscrambler ble alle råspektrene analysert med PCA i området 3100 cm^{-1} til 600 cm^{-1} og uteliggere ble identifisert. Bakgrunnen til uteliggerne ble undersøkt og de ble vurdert fjernet.

Tre ulike forbehandlingsmetoder ble gjennomført på råspektrene:

- Rådata: ingen forbehandling
- 2. derivering: Det ble benyttet 2. derivering etter Savitzky og Golay, 2. gradspolynom og en vindusstørrelse på 13 enheter.
- 2. derivering først og deretter normalisering med EMSC (områdene 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1}).

Etter forbehandling beregnet man gjennomsnittet av de gjenværende replikatene av hver prøve.

3.6.2 Analyse av Y-verdiene

Y-matrisen består av dataene fra referanseanalysene og designene. Fettsyresammensetningen fra GC ble utregnet ved å sammenligne retensjonstidene med eksterstandardens retensjonstider. Arealet til hver fettsyre ble registrert og utregnet prosentvis av det totale arealet. Det ble benyttet 2 paralleller av hver prøve som ble snittet sammen.

Designene ble laget i dataprogrammet Excel (Microsoft office 2003 versjon). Designet i del 2 var en mindre utgave av forsøksdesignet i del 1, men med samme oppbygging. Designene ble laget av veileder på Nofima ved å bruke et Simplex-Lattice design av grad 5 uten hjørnepunkter. Prøvene ble tilfeldig spredt utover konsentrasjonsområdet med

oljekonsentrasjon 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % av total vekt pr. prøve. Den reelle fettkonsentrasjonen ble regnet ut ved å registrere antall gram havremel og olje pr. prøve, samt referansedata for fettinnhold for havremelene.

Fettsyresammensetningen ble uttrykt både som % av total vekt prøve og % av total olje på bakgrunn av referanseanalysene. Summen av henholdsvis mettede, enumettede, og flerumettede fettsyrer ble også beregnet. To metoder ble benyttet for å regne ut grad av umettethet for prøvene:

- Beregne jodverdi i hver prøve. Dette ble gjort fra GC-dataene ved å beregne dobbeltbindingsbidraget for hver enkelt fettsyre. Ved denne beregningen ble molvekten for metylesterekvivalenten til hver fettsyre benyttet.
- Beregne antall dobbeltbindinger i fettsyrer med 18 C-atomer. Dette kan anses som en enklere versjon av jodverdien. Det beregnes ved å summere fettsyrene ($\sum \text{C18:1}$) + ($\sum \text{C18:2} \times 2$) + ($\sum \text{C18:3} \times 3$).

Analyse av fettsyresammensetningen med GC i utvalgte havremel/olje prøver ble gjort for å sammenligne de verdiene med fettsyresammensetningen utregnet til den eksperimentelle datakalibreringen.

3.6.3 Kalibrering og prediksjon

Kalibreringen ble laget ved hjelp av regresjonsanalyse (PLSR). X-matrisen med FT-IR spektrene ble korrelert opp mot y-verdiene fettinnhold, grad av umettethet, de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. Full kryssvalidering ble brukt ved oppbygging av kalibreringsmodellene. For alle regresjonsmodeller ble det spektrale området 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} benyttet. Optimalt antall PLS komponenter ble bestemt direkte fra programvaren benyttet (Unscrambler). Prediksjon av fettsyreparametre for ukjente prøver (del 3) ble også utført direkte i Unscrambler.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Del 1: Reproduserbarhet av FT-IR metoden

4.1.1 Variasjon i prøvesettet

De følgende resultatene viser variasjonene av fettinnholdet og de vesentligste fettsyrene i havre, som er palmitinsyre, oljesyre, linolsyre og α -linolensyre. I tillegg vises sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer, beregnet antall dobbeltbindinger og jodverdi i de 168 prøvene. Tabell 4.1 viser fettsyresammensetningen angitt som % av totalvekt prøve.

Tabell 4.1: Variasjonen, gjennomsnitt og standardavviket for totalt fettinnhold, de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve.

| Måleparameter (% av totalvekt prøve) | Variasjon % | Gj. snitt % | SD % |
|---|-------------|-------------|------|
| Totalt fettinnhold | 5,8 - 31,5 | 21,5 | 6,9 |
| Palmitinsyre C16:0 | 1,0 - 3,6 | 1,9 | 0,55 |
| Oljesyre C18:1n-9 | 2,0 - 20,7 | 9 | 4,0 |
| Linolsyre C18:2n-6 | 2,4 - 16,2 | 6,3 | 3,0 |
| α -linolensyre C18:3n-3 | 0,1 - 10,0 | 2,0 | 2,2 |
| Sum mettede fettsyrer | 1,0 - 4,8 | 2,7 | 0,8 |
| Sum enumettede fettsyrer | 2,2 - 21,5 | 10,2 | 4,0 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 2,5 - 17,2 | 8,6 | 3,9 |

Fettsyresammensetningen analysert med GC i havremelet og oljene vises i vedlegg 1. Oljen fra havremelet inneholder mest flerumettede fettsyrer med 41 % linolsyre i tillegg til 35,4 % oljesyre og 16,3 % palmitinsyre. De ulike oljene tilsatt i havremelet bidrar til stor variasjon av fettsyrer i prøvesettet. Rapsoljen inneholder mest enumettede fettsyrer med 59,7 % oljesyre i tillegg til blant annet 19 % linolsyre og 9,4 % α -linolensyre. Solsikkeoljen inneholder mest flerumettede fettsyrer med 55 % linolsyre i tillegg til blant annet 33 % oljesyre. Olivenoljen inneholder mest enumettede fettsyrer med 74 % oljesyre i tillegg til blant annet 11 % palmitinsyre. Camelinaoljen inneholder mest flerumettede fettsyrer med hele 38,5 % α -linolensyre og 16 % linolsyre i tillegg til blant annet 14,7 % gadoleinsyre, og 12 % oljesyre. Camelina er en plante med opptil 45 % innhold av olje som finnes viltvoksende i Norge. Den er en uutnyttet ressurs og interessant i forskningssammenheng (Risbråthe 2010).

Resultater og diskusjon

Fettinnholdet i havremelet og de ulike oljene bidrar til stor variasjon av fettsyrer i tabell 4.2 på samme måte som i tabell 4.1. Tabell 4.2 viser fettsyresammensetningen angitt som % av total olje. Unntaket er av grad av umettethet som angis med beregnet antall dobbeltbindinger og jodverdier.

Tabell 4.2: Variasjonen, gjennomsnitt og standardavviket til de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje.

| Måleparameter (% av total olje) | Variasjon % | Gj. snitt % | SD % |
|------------------------------------|--------------|-------------|------|
| Palmitinsyre C16:0 | 6,5 – 17,3 | 9,9 | 2,1 |
| Oljesyre C18:1n-9 | 15,8 - 68,7 | 42,2 | 12,8 |
| Linolsyre C18:2n-6 | 12,3 - 53,0 | 29,4 | 10,3 |
| α -linolensyre C18:3n-3 | 0,4- 33,2 | 9,1 | 8,6 |
| Sum mettede fettsyrer | 8,7 - 18,8 | 12,9 | 2,0 |
| Sum enumettede fettsyrer | 32,2- 71,2 | 47,6 | 10,6 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 13,2 - 56,5 | 39,5 | 11,2 |
| Dobbeltbindinger* | 97,8 - 155,5 | 129,8 | 13,8 |
| Jodverdier* | 84,6-153,8 | 117,0 | 15,9 |

* Beregnet jodverdi: $g I_2 / 100 g$ fett og dobbeltbindinger ($\sum C18:1$) + ($\sum C18:2 \times 2$) + ($\sum C18:3 \times 3$).

Analyse av fettsyresammensetningen med GC i utvalgte havremel/olje blandinger ble gjort for å sammenligne de verdiene med fettsyresammensetningen (y-verdiene) utregnet til den eksperimentelle data kalibreringen. Resultatene (vedlegg 2) viser at det ikke er stor forskjell mellom disse verdiene. I en prøve med havremel iblandet 12 % raps og 3 % solsikke er det med GC bestemt en oljesyre konsentrasjon på 50,2 %, mens den tilsvarende utregnede y-verdi er på 49,9 %.

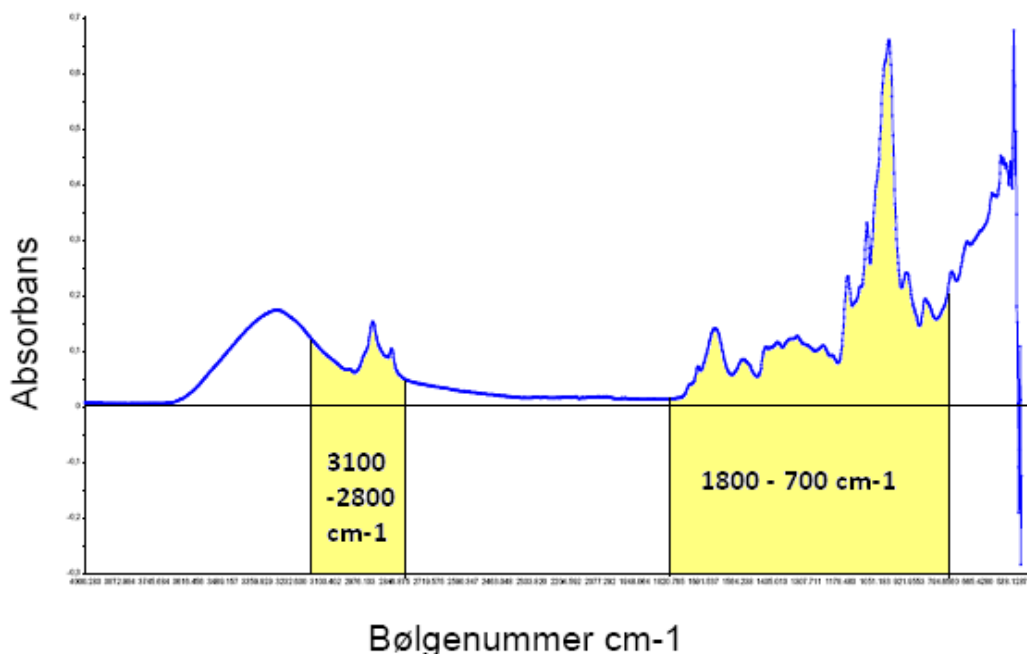
4.1.2 FT-IR spektrene

4.1.2.1 Reproduserbarhet

15 havremelprøver ble analysert med ulike vaskerutiner mellom replikatene. Resultatene viste at det var nødvendig med vask og bakgrunnsspekter mellom hver replikat da det ellers ble mye fysisk støy i spekteret. Den samme havremelprøven ble analysert 15 ganger og spektrene var like, med unntak av noe støy der det ikke var benyttet vask og bakgrunnsspekter. Det viste at det var god reproduserbarhet ved å benytte FT-IR spektroskopi, hvis måleprotokollene følges nøyaktig.

4.1.2.2 Betydning av absorpsjonsbånd

FT-IR spekteret har bølgenummer i området 4000 cm^{-1} til 538 cm^{-1} vist i abscisse og absorbans vist i ordinat. I figur 4.1 vises et FT-IR spekter fra analyse av havremelet. De markerte områdene i FT-IR spektrene som benyttes til regresjonsanalyse er 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} .



Figur 4.1: Et FT-IR spekter (4000 cm^{-1} til 538 cm^{-1}). Områdene som benyttes ved regresjonsanalysen er 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} .

Resultater og diskusjon

Absorpsjonsbåndene som er relevante for lipider er der de funksjonelle gruppene CH, CH₂, CH₃, C=O, O-H og C-O absorberes. Tabell 4.3 viser FT-IR frekvensenes absorpsjonsband med posisjoner til de ulike funksjonelle gruppene, type vibrasjon og intensitet.

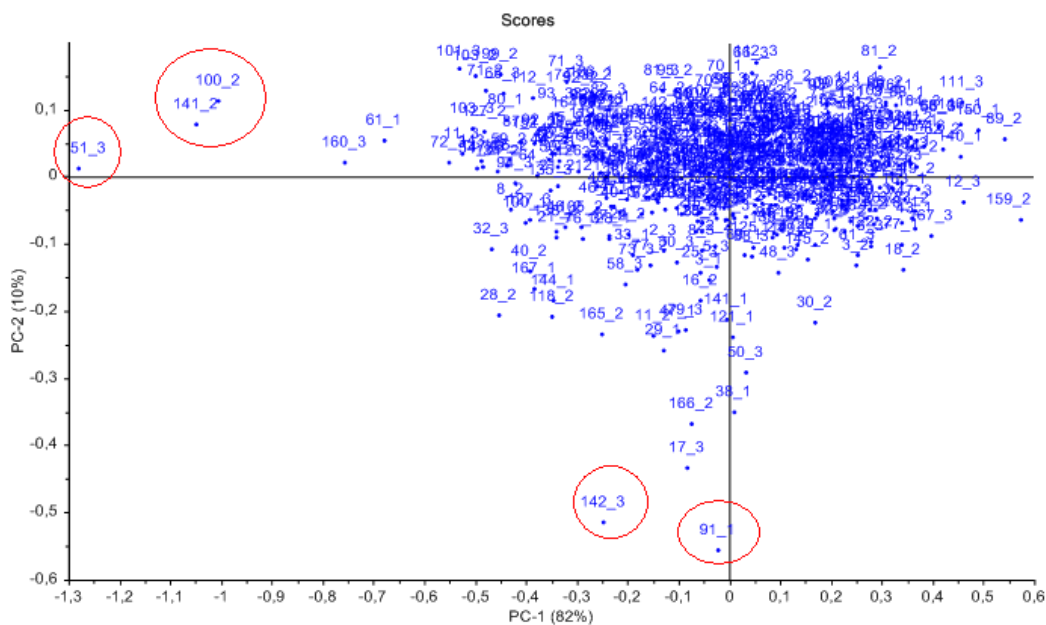
Tabell 4.3: FT-IR frekvensenes absorpsjonsband med posisjonene til de funksjonelle gruppene, type vibrasjon og intensitet.

| Valgte områder til regresjon (cm ⁻¹) | Topp ved Posisjon (cm ⁻¹) | Funksjonell Gruppe | Type vibrasjon | Intensitet |
|--|---------------------------------------|--------------------|--------------------|------------|
| 3100 - 2800 | 3008 | <i>cis</i> =CH | Strekk | W |
| | 2959 | CH ₃ | Asymmetrisk strekk | M |
| | 2923 | CH ₂ | Asymmetrisk strekk | S |
| | 2873 | CH ₃ | Symmetrisk strekk | M |
| | 2852 | CH ₂ | Symmetrisk strekk | S |
| 1800 - 700 | 1745 | C=O | Strekk | S |
| | 1467 | OH | | M |
| | | CH ₂ | Bøy - scissoring | |
| | 1415 | CH | Bøy - rock | M |
| | 1379 | CH ₃ | Bøy | M |
| | 1172 | CO | Strekk | M |
| | 1161 - 1096 | CO | Strekk | M |
| | 1020 | CO | Strekk | M |
| | 966 | <i>trans</i> =CH | out-of-plane | W |
| | 721 | CH ₂ | Bøy - rock | M |

S= sterk, m= medium og w= svak (weak). (Guillen & Cabo 1997; Socrates 2001; Williams & Fleming 2008).

4.1.3 PCA

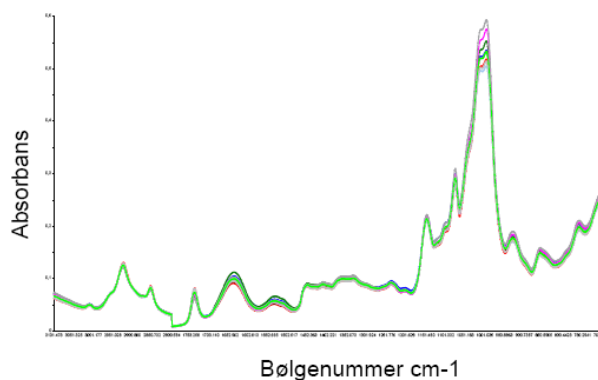
Analysene med FT-IR spektroskopi gav 504 spektre. Disse rådataene ble vist i et PCA skårplott (figur 4.2) med hele absorpsjonsområdet 3100 cm^{-1} til 600 cm^{-1} . Punktsvermen viser hovedvariasjonene og identifiserer flere uteliggere. Uteliggerene ble undersøkt for å finne årsaken til at de avviker fra de andre prøvene. Det ble funnet ut at de 5 uteliggere markert i figur 4.2 viste store avvik i forhold til de andre replikatene i hver sin prøve. Det ble konkludert med at det skyldtes feil ved analysen eller instrumentfeil i de 5 tilfellene, og de ble fjernet før videre analyser.



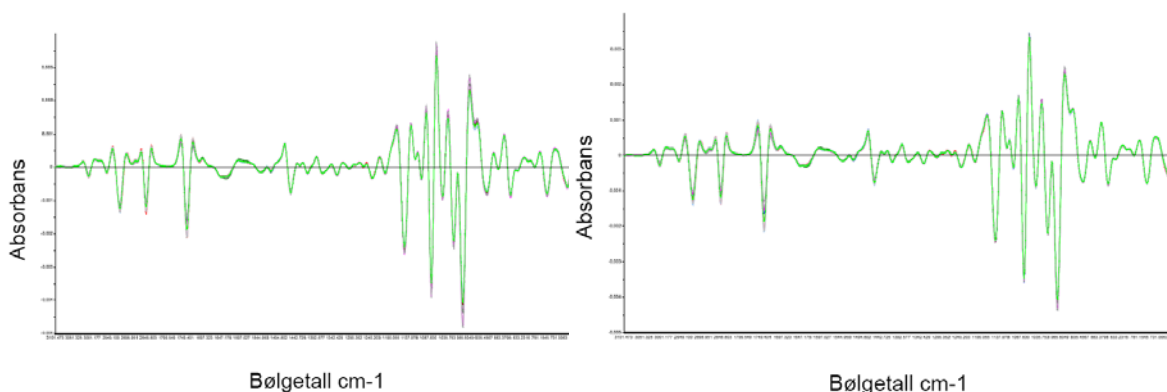
Figur 4.2: PCA skår-plott av rådata i området 3100 cm^{-1} til 600 cm^{-1} . Det ble funnet 5 uteliggere som markeres i figuren. Uteliggerne viste store avvik i forhold til de andre replikatene fra hver sin prøve og ble fjernet.

4.1.4 Effektene av forbehandling

Det ble gjennomført tre forbehandlingsmetoder på de 504 spektrene for å undersøke hva som fungerer best. Spektrene ble benyttet uten forbehandling som rådata, eller de ble forbehandlet med bare 2. derivering eller 2. derivering + normalisering EMSC. Områdene som ble benyttet var 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} . En tilfeldig valgt konsentrasjon med 25 % tilsatt camelinaolje i havremel ble brukt til å illustrere hvordan spektrene så ut etter de ulike forbehandlingene. I forsøksdesignet var det 3 prøver (totalt 9 replikater) med 25 % tilsatt camelinaolje.



Figur 4.3: Rådata FT-IR spekter av havre med 25 % camelina (3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1}).



Figur 4.4: Rådata FT-IR spekter av havremel med 25 % camelinaolje (3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1}). Til venstre vises forbehandling 2. derivering. Til høyre vises forbehandlingene 2. derivering + EMSC.

Resultatene viser at spekteret som er 2. derivert i tillegg til normalisert (EMSC) har mindre spisse topper enn spekteret som bare er 2. derivert.

4.1.5 Regresjonsanalyse

Multivariat kalibrering med regresjonsanalyse (PLSR) ble gjennomført i områdene 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} . X- matrisen består av de 168 FT-IR spektrene med bølgenummer som X- variablene og absorbanse som X –data. Y-matrisen består av dataene fra referanseanalysene og forsøksdesignet.

4.1.5.1 Fettsyresammensetning angitt som % av totalvekt prøve

Tabell 4.4 viser hvordan de ulike forbehandling metodene påvirker regresjonene med fettsyresammensetning angitt som % av totalvekt prøve. Y-verdiene i regresjonen er totalt fettinnhold, de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer.

Tabell 4.4: Regresjoner med de ulike forbehandling metodene rådata, 2. derivert og 2. derivert + EMSC. Y-verdiene er totalt fettinnhold, de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve.

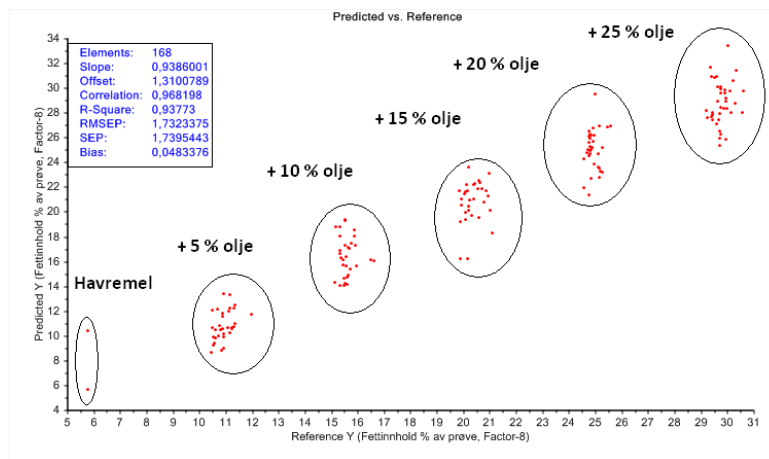
| Måleparameter (% av totalvekt prøve) | Rådata | | | 2. derivert | | | 2. derivert + EMSC | | |
|---|--------|----------------|-------|-------------|----------------|-------|--------------------|----------------|-------|
| | n-PLS | R ² | RMSEP | n-PLS | R ² | RMSEP | n-PLS | R ² | RMSEP |
| Fettinnhold | 7 | 0,924 | 1,9 | 8 | 0,938 | 1,7 | 5 | 0,915 | 2,0 |
| Palmitinsyre C16:0 | 15 | 0,860 | 0,2 | 12 | 0,895 | 0,2 | 12 | 0,894 | 0,2 |
| Oljesyre C18:1 n-9 | 8 | 0,880 | 1,4 | 7 | 0,897 | 1,3 | 4 | 0,875 | 1,4 |
| Linolsyre C18:2 n-6 | 12 | 0,864 | 1,1 | 8 | 0,889 | 1,0 | 7 | 0,877 | 1,0 |
| α-linolensyre C18:3 n-3 | 11 | 0,873 | 0,8 | 6 | 0,882 | 0,8 | 6 | 0,873 | 0,8 |
| Sum mettede fettsyrer | 15 | 0,879 | 0,3 | 12 | 0,908 | 0,4 | 11 | 0,894 | 0,2 |
| Sum enumettede fettsyrer | 9 | 0,883 | 1,4 | 7 | 0,900 | 1,3 | 6 | 0,895 | 1,3 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 8 | 0,881 | 1,3 | 6 | 0,902 | 1,2 | 6 | 0,90 | 1,2 |

Antall PLS-komponenter (n-PLS), R-square (R²) og Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP)

Regresjonsmodellene fungerer stort sett bra. Høye R² –verdier opp til 0,938 viser at en stor del av den totale variasjonen i Y-matrisen kan forklares med regresjonsmodellene. Tabellen viser at antall PLS komponenter går ned ved 2. derivert, og ytterligere ned ved 2. derivert i tillegg til normalisering EMSC, med unntak av for totalt fettinnhold. RMSEP-verdiene og R² –verdier er ikke veldig ulike mellom de forskjellige forbehandlingene. Antall PLS –komponenter som er nødvendig for å lage modellen indikerer kompleksiteten i modellen. Lavere kompleksitet kan bety at modellen er mer robust ved bruk i fremtidige prediksjoner. Resultatene viser at forbehandling metoden med 2. derivert og EMSC er best egnet grunnet et lavere antall PLS-komponenter.

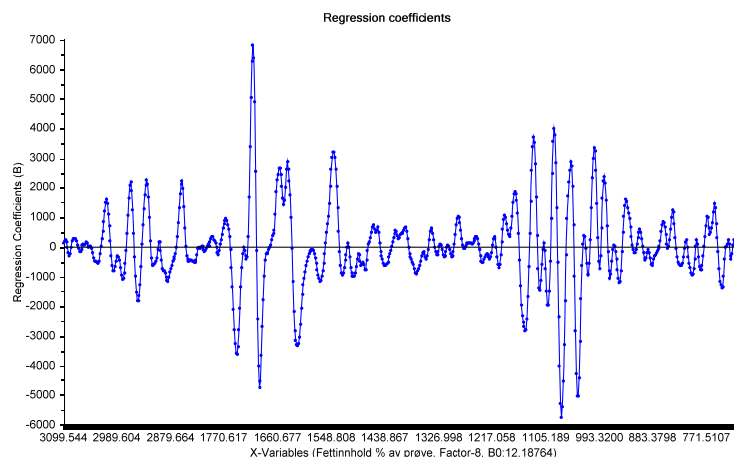
Resultater og diskusjon

Et estimert vs. referanse-plott for total fettinnhold (2. derivert) er vist i figur 4.5. Plottet viser tydelige grupperinger relatert til oljekonsentrasjonene. Prøvene hadde en oljekonsentrasjon på 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % olje av total vekt prøve. R^2 -verdien er 0,94 og RMSEP er på 1,73 som indikerer at det er en god modell, selv om spredningen innenfor hver gruppering er relativt høy.



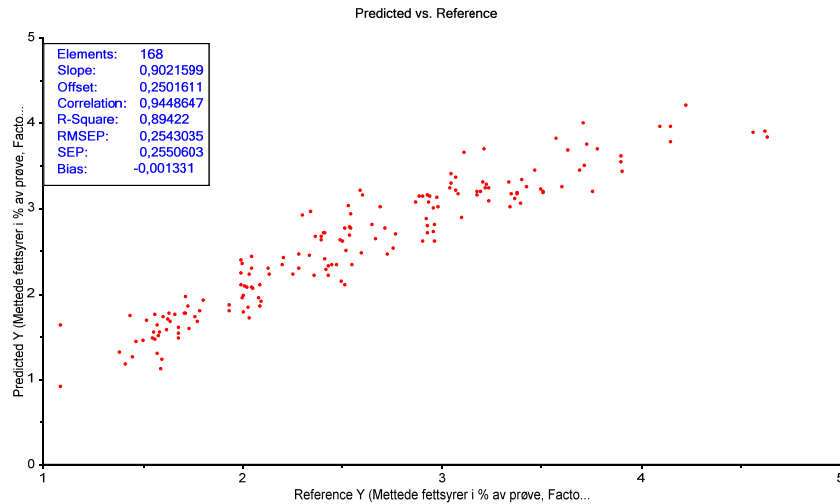
Figur 4.5: Estimert vs. referanse -plott for total fettinnhold (2. derivert) viser grupperinger basert på ulikt innhold av olje. Prøvene hadde en oljekonsentrasjon på 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % olje av totalvekt prøve.

Regresjonskoeffisienten for total fettinnhold vises i figur 4.6. De områdene med de høyeste toppene er viktigst for modellen. Ved 1745 cm^{-1} absorberes $\text{C}=\text{O}$, som er en del av karboksylgruppen i fettsyrer. I området ved 1130 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} og 1037 cm^{-1} absorberes CO strekk (se tabell 4.3). Dette betyr at den aktuelle kalibreringsmodellen baserer seg på kjemisk sett logiske deler av IR spektrene.



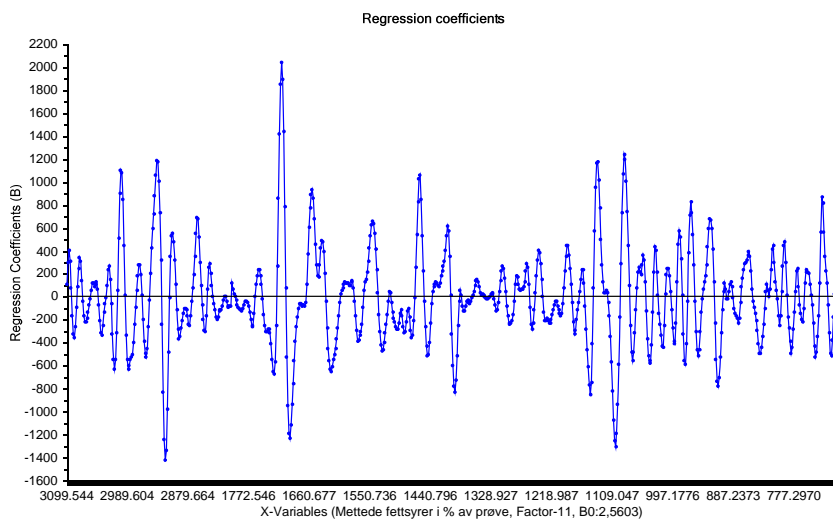
Figur 4.6: Regresjonskoeffisienten for fettinnhold angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert).

Total mengde mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.7. Kurven har en liten krumming, hvilket indikerer at det kan foreligge ikke-lineære forhold i dataene som modellen ikke tar høyde for.



Figur 4.7: Estimert vs. referanse -plott for mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC)

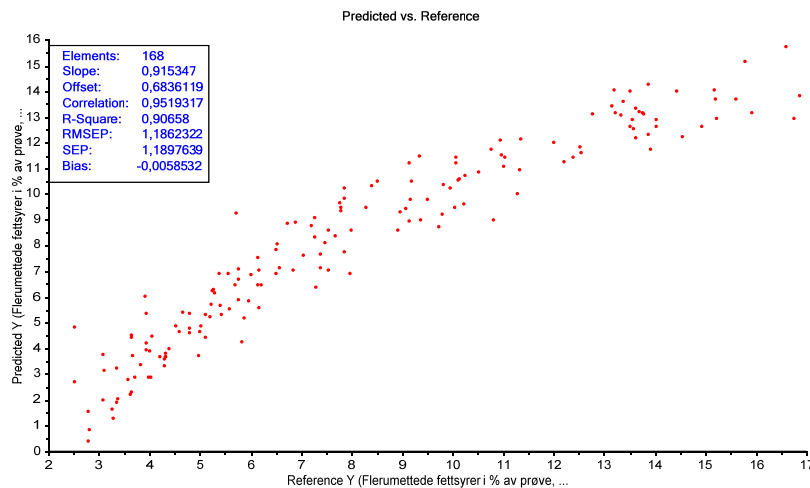
Regresjonskoeffisienten for total mengde mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve vises i figur 4.8. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er 2933 cm^{-1} og 2920 cm^{-1} der symmetriske og asymmetriske strekk av CH_2 og CH_3 absorberes og området rundt toppene 1136 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} og 1083 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3).



Figur 4.8: Regresjonskoeffisienten for mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC).

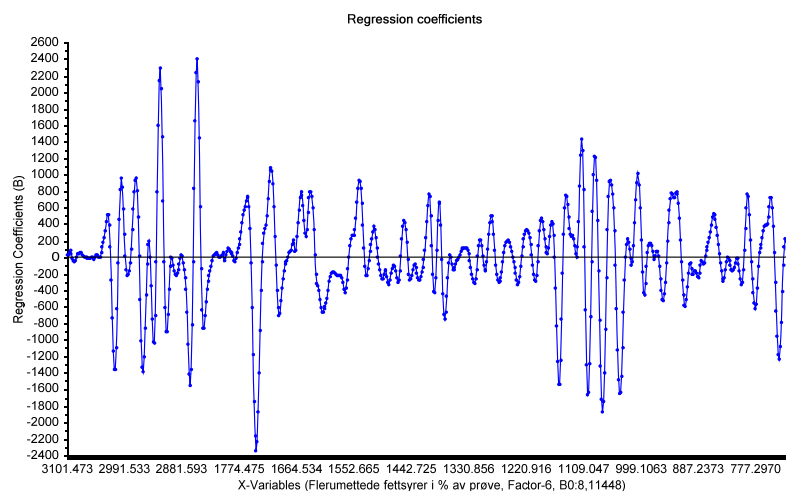
Resultater og diskusjon

Total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.9. Kurven indikerer igjen en krumming. R^2 -verdien på 0,90 og RMSEP-verdien på 1,19 indikerer at modellen likevel er god.



Figur 4.9: Estimert vs. referanse -plott for mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC)

Regresjonskoeffisienten for total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve vises i figur 4.10. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er 3008 cm^{-1} der umettede *cis*-CH bindinger absorberes og ved 2954 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} og 2859 cm^{-1} der symmetriske/asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk absorberes. I tillegg til topp 1741 cm^{-1} der C=O absorberes og toppene 1155 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} og 1039 cm^{-1} der CO absorberes (se tabell 4.3).



Figur 4.10: Regresjonskoeffisienten for totalt innhold flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC).

4.1.5.2 Fettsyresammensetning angitt som % av total olje

Tabell 4.5 viser hvordan de ulike forbehandling metodene påvirker regresjonene med fettsyresammensetning angitt som % av total olje. Y-verdiene i regresjonen er de vesentligste fettsyrene, sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer, dobbeltbindinger og jodverdi.

Tabell 4.5: Regresjoner med de ulike forbehandling metodene rådata, 2. derivert og 2. derivert + EMSC. Y-verdiene er de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje. * Beregnet jodverdi: $g I_2 / 100 g$ fett og dobbeltbindinger ($\sum C18:1$) + ($\sum C18:2 \times 2$) + ($\sum C18:3 \times 3$).

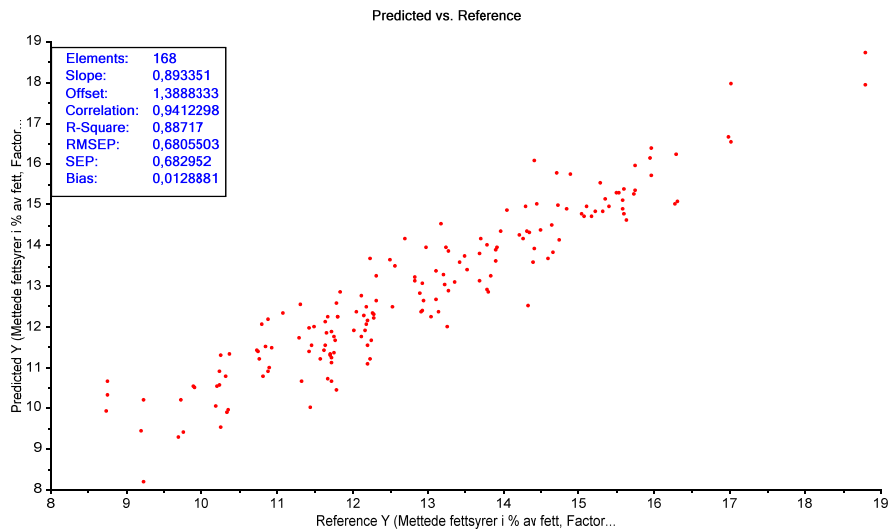
| Måleparameter (% av total olje) | Rådata | | | 2. derivert | | | 2. derivert + EMSC | | |
|------------------------------------|--------|----------------|-------|-------------|----------------|-------|--------------------|----------------|-------|
| | n-PLS | R ² | RMSEP | n-PLS | R ² | RMSEP | n-PLS | R ² | RMSEP |
| C16:0 | 14 | 0,889 | 0,7 | 11 | 0,918 | 0,6 | 11 | 0,904 | 0,7 |
| C18:1 n-9 | 9 | 0,925 | 3,5 | 8 | 0,952 | 2,8 | 4 | 0,912 | 3,8 |
| C18:2 n-6 | 12 | 0,896 | 3,3 | 8 | 0,939 | 2,5 | 7 | 0,923 | 2,9 |
| C18:3 n-3 | 11 | 0,952 | 1,9 | 8 | 0,967 | 1,6 | 6 | 0,945 | 2,0 |
| Sum mettede fettsyrer | 15 | 0,826 | 0,8 | 12 | 0,884 | 0,7 | 13 | 0,887 | 0,7 |
| Sum umettede fettsyrer | 11 | 0,901 | 3,3 | 8 | 0,934 | 2,7 | 8 | 0,932 | 2,8 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 10 | 0,906 | 1,2 | 7 | 0,960 | 2,2 | 6 | 0,949 | 2,5 |
| Dobbeltbindinger* | 9 | 0,963 | 2,7 | 6 | 0,961 | 2,7 | 4 | 0,952 | 3,5 |
| Jodverdier* | 8 | 0,965 | 2,9 | 6 | 0,967 | 2,9 | 5 | 0,960 | 3,2 |

Antall PLS-komponenter (n-PLS), R-square (R²) og Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP).

Sammenlignet med tabell 4.4 er R² verdiene bedre (nærmere 1) i tabell 4.5. De gode R² verdiene i tillegg til at det er et lavere antall PLS-komponenter i tabell 4.5 indikerer at det kan være fornuftig å uttrykke fettsyresammensetningen som % av total mengde olje. Tabell 4.5 viser også at antall PLS komponenter går ned ved 2. derivert, og ytterligere ned ved 2. derivert i tillegg til normalisering (EMSC), med unntak av sum mettede fettsyrer. Det viser at forbehandling metoden med 2. derivert og EMSC er best egnet. RMSEP-verdiene og R² –verdiene er imidlertid ikke veldig ulike mellom de forskjellige forbehandlingene. Det er viktig å bemerke at RMSEP-verdiene mellom tabell 4.4 og 4.5 ikke kan sammenlignes direkte, fordi enhetene er ulike.

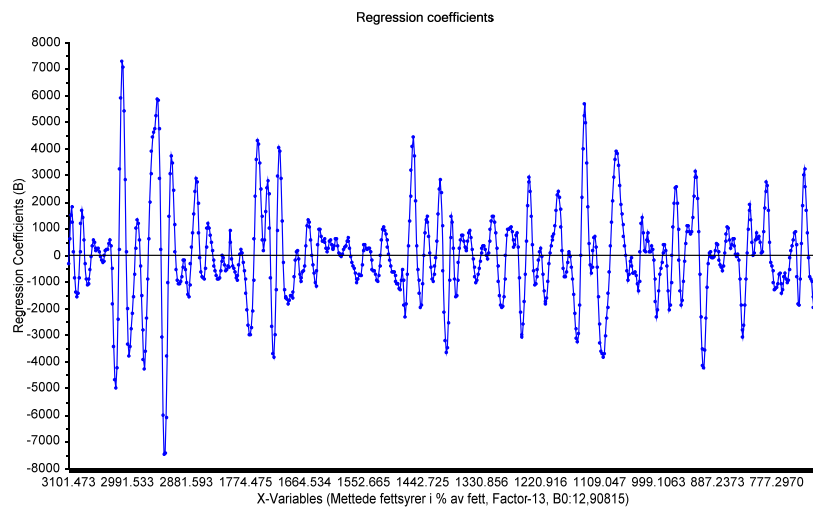
Resultater og diskusjon

Total mengde mettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.11. Kurven er mer lineær enn figur 4.7, som er mettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve. En R^2 -verdi på 0,88 viser at modellen er god.



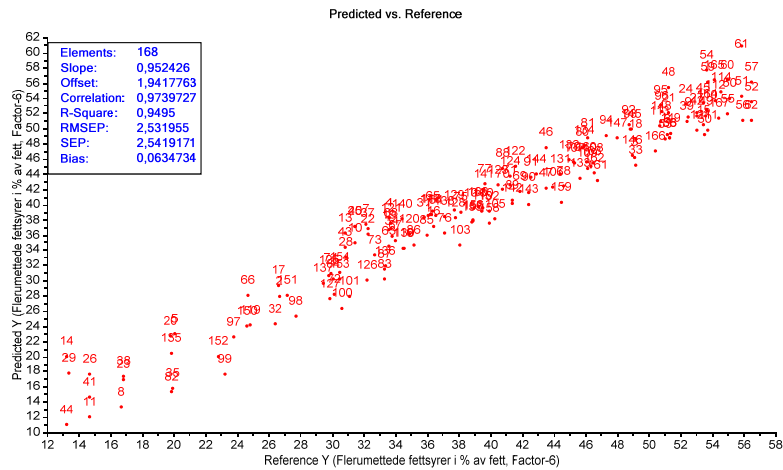
Figur 4.11: Estimert vs. referanse -plott for mettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC)

Regresjonskoeffisienten for total mengde mettede fettsyrer angitt som % av total olje vises i figur 4.12. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er rundt 2935 cm^{-1} og 2922 cm^{-1} der symmetriske/asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk absorberes, rundt 1749 cm^{-1} der $\text{C}=\text{O}$ absorberes, rundt 1458 cm^{-1} der OH og bøyene CH_2 absorberes og i området rundt 1136 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} og 1074 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3). Det er mange av de samme toppene som mettede fettsyrer angitt som % av prøve (figur 4.8)



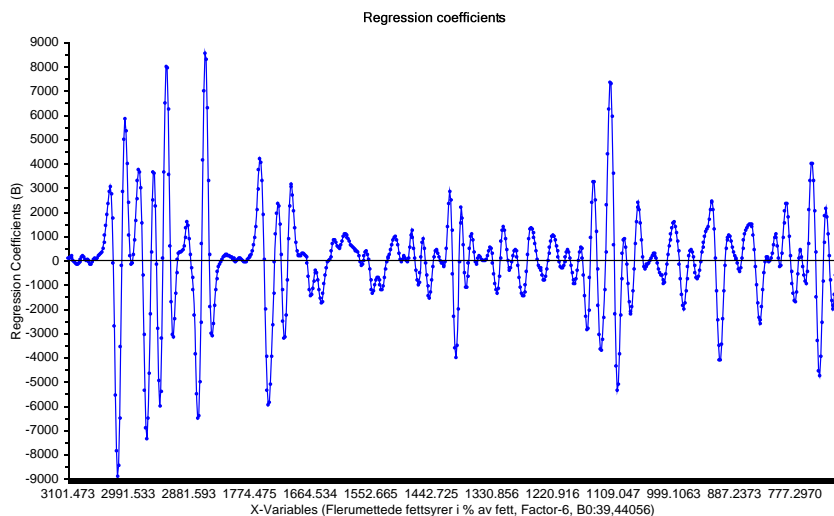
Figur 4.12: Regresjonskoeffisienten for mettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

Total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.13. Kurven er mer lineær og har en bedre R²-verdi enn i figur 4.9 (flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve).



Figur 4.13: Estimert vs. referanse -plott for flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC)

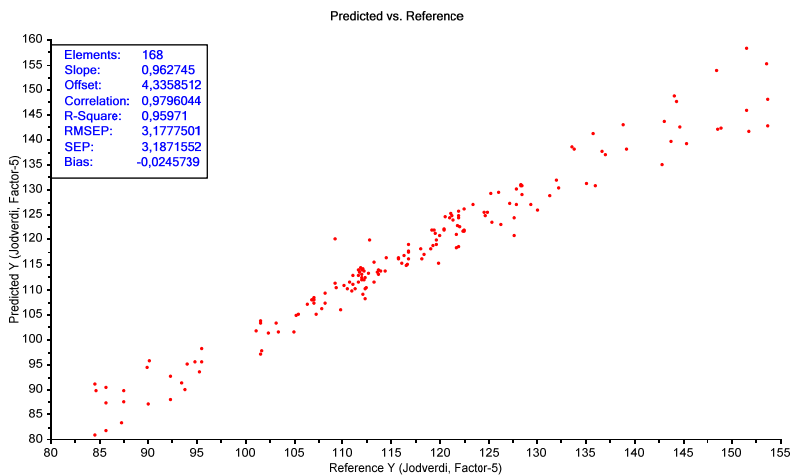
Regresjonskoeffisienten for total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje vises i figur 4.14. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er 3008 cm⁻¹ der umettede *cis*-CH bindinger absorberes. I området rundt toppene 2956 cm⁻¹, 2922 cm⁻¹, 2862 cm⁻¹ og 2850 cm⁻¹ absorberes symmetriske/asymmetriske CH₃ og CH₂ strekk. I området rundt 1737 cm⁻¹ absorberes C=O og i området rundt 1112 cm⁻¹ og 1101 cm⁻¹ absorberer CO strekk (se tabell 4.3). Dette indikerer igjen at modellen baseres på spektrale bånd som er logisk i forhold til parameteren som det kalibreres for.



Figur 4.14: Regresjonskoeffisienten for flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

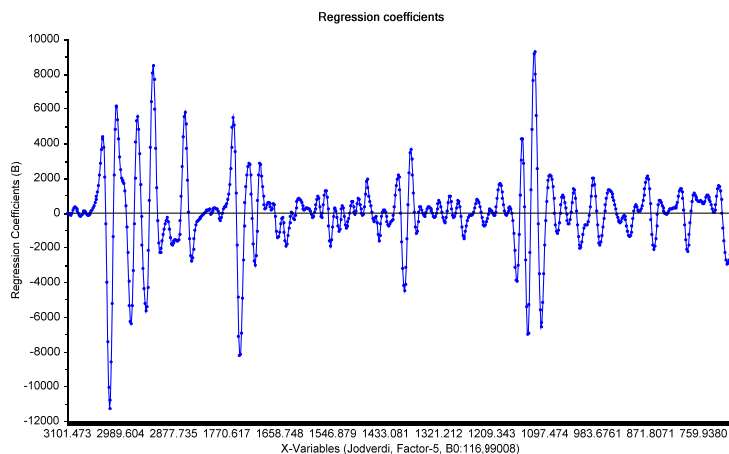
Resultater og diskusjon

En metode for å bestemme grad av umettethet er måling eller beregning av jodverdier (Gunstone 1996). Figur 4.15 vises et estimert vs. referanse-plott for jodverdier (2. derivert + EMSC). Kurven er forholdsvis lineær og modellen har en R^2 -verdi på 0,96.



Figur 4.15: Estimert vs. referanse -plott for jodverdier (2. derivert + EMSC).

Regresjonskoeffisienten for jodverdi vises i figur 4.16. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen rundt 3012 cm^{-1} der umettede *cis*-CH bindinger absorberes. I området rundt toppene 2968 cm^{-1} , 2954 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} og 2852 cm^{-1} absorberes symmetriske/ asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk. I området rundt 1755 cm^{-1} - 1739 cm^{-1} absorberes C=O og i området rundt 1130 cm^{-1} , 1116 cm^{-1} og 1101 cm^{-1} absorberer CO strekk (se tabell 4.3). Denne regresjonskoeffisienten ligner mye på figur 4.14 flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje og reflekterer dermed forventede og kjemisk logiske spektrale bånd.



Figur 4.16: Regresjonskoeffisient for jodverdier (2. derivert + EMSC).

4.2 Diskusjon del 1

Variasjonen i prøvesettet med de 168 havremel/olje prøvene var stor (tabell 4.1). Fettinnholdet varierte i prøvene fra 5,8 % til 31,5 % av total vekt prøve. Ved opparbeidelse av havremel/olje prøvene var det stor forskjell i konsistens på prøvene med 5 %, 10 %, 15 %, 20 % og 25 % fett. Det var ikke mulig å lage prøvene 100 % homogene da de ble blandet manuelt. Ved blanding av prøvene ble det synlig oljelag igjen på kanten av målebegeret i de prøvene med høy oljekonsentrasjon. I prøvene med lav oljekonsentrasjon var det vanskelig å få oljen jevnt fordelt utover i havremelet. Det betyr at ved analyse kunne det være små forskjeller mellom replikatene fra samme prøve. Dette indikerer en usikkerhet i prediksjon av fettinnhold. Vekten som ble benyttet til oppveining av prøvene ble testet ved å regne ut standardavviket ved 10 analyser av et kalibreringslodd på 23,438 g. Det ble funnet et standardavvik på 0,000516 noe som indikerer at nøyaktigheten på vekten er god.

Resultatene i vedlegg 1 viser fettsyresammensetningen i havremelet og oljene analysert med GC som ble benyttet i del 1. Teorien sier at 90 - 95 % av lipidene i havre er palmitinsyre, oljesyre og linolsyre (Webster & Wood 2011). Det stemmer godt overens med resultatene fra GC på havremelet der de fettsyrene utgjorde 92,7 %. De ulike oljene bidro til varierende fettsyresammensetning og god spredning. Oljen som bidro mest til palmitinsyre og oljesyre var olivenolje. Oljen som bidro mest til linolsyre var solsikkeolje. Oljen som bidro mest til α -linolensyre var camelinaolje med nesten fire ganger så høyt nivå som i raps, mens olivenolje og solsikkeolje hadde svært lave verdier. Camelinaoljen hadde også 14,7 % gadoleinsyre, som de resterende oljene hadde svært lave forekomster av. Det viser at ved å benytte disse fire oljene i kombinasjon og med ulike konsentrasjoner ble det en god spredning av fettsyresammensetningen.

Analyse av fettsyresammensetningen med GC i utvalgte havremel/olje prøver ble gjort for å sammenligne de GC-verdiene med y -verdiene fra utregning av fettsyresammensetningen i forsøksdesignet benyttet til regresjonsanalysen (vedlegg 2). Resultatene viste at det ikke var store forskjeller mellom disse verdiene. Det indikerer at opparbeidelsen av prøvene var vellykket, og fettsyresammensetningen ble sammenfallende med det som var utregnet i forsøksdesignet.

For å undersøke reproduserbarheten til FT-IR spektroskopiet ble den samme prøven med havremel analysert 15 ganger. Det ble samtidig undersøkt hva slags vaskerutiner som var nødvendig. Ved å se på spektrene ble det konkludert med at det var nødvendig med grundig vask med såpe, vann og isopropanol i tillegg til et bakgrunnsspekter mellom hver måling. Det gjør at analysen blir litt mer tidkrevende, men hver prøve tar bare noen minutter så det er en hurtig analysemetode uansett. Ved å se på de 15 spektrene ble det klart at reproduserbarheten ved å måle prøven med FT-IR spektroskopi var god. Ved analyse av de 168 prøvene ble det benyttet 3 replikater per prøve. Det ga muligheten til å oppdage feil med analysen/instrumentet dersom den ene replikaten avviket mye fra de andre.

Et usikkerhetsmoment ved FT-IR analysene var at antall dager fra opparbeidelse av prøve til analyse varierte mellom 1 og 10 dager grunnet periodiske instrumentfeil. Det gjorde at analysene ikke ble gjort likt hele tiden. Alle de 168 prøvene ble analysert i randomisert rekkefølge, og det bidro til at tilfeldigheter i analyseforskjeller ble mindre. Havremelet var varmemestabilisert som betyr at enzymene som øker faren for oksidering av fett er inaktivert (Mälkki 2001). Det høye naturlige antioksidantnivået med særlig vitamin E (Peterson & Wood 1996) i havre i tillegg til at prøvene lå i kjøleskapet under lagring gjør at det antas at prøve kvaliteten var tilfredsstillende.

Variasjonen i FT-IR spektrene ble vist i et PCA-plott. Punktsvermen viste hovedvariasjonene og identifiserte noen uteliggere. Man skal være veldig forsiktig med å fjerne uteliggere bare for å forbedre modellen. Uteliggere kan inneholde viktig fakta om datasettet. Dersom uteliggerne er et resultat av feilaktige målinger eller instrumentfeil bør de fjernes for at modellen skal bli korrekt (Esbensen et al. 2001). I dette tilfellet ble 5 uteliggere fjernet fordi de viste store avvik fra de andre replikatene i hver sin prøve. Feil ved analysen kan f.eks komme av at prøven ikke dekte hele ATR-krystallen.

Det ble gjennomført tre forbehandlingsmetoder på spektrene for å undersøke hva som fungerte best. Spektrene ble benyttet uten forbehandling som rådata, eller de ble forbehandlet med bare 2. derivering eller 2. derivering + normalisering EMSC. Forbehandlingen som fungerte best var 2. derivering i tillegg til normalisering EMSC. Dette

stemmer med tidligere erfaringer fra analysearbeid ved Nofima. I spektrene som viser de ulike forbehandlingene (figur 4.3 og 4.4) er det tydelig at spekteret med forbehandling 2. derivering og EMSC gir et jevnere spekter. Resultatene fra regresjonsanalysene i tabell 4.4 og 4.5 viser at antall PLS komponenter som er nødvendig for å lage modellen er lavest ved forbehandling 2. derivering og EMSC. Antall PLS komponenter som er nødvendig for å lage modellen sier noe om variasjonene i y-verdiene. Det betyr at forbehandling 2. derivering og EMSC har gitt mindre variasjoner i y-verdiene. Det er også viktig å påpeke at normalisering med EMSC kan bidra til å redusere effekten av konsentrasjonsforskjeller mellom prøver. Dette kan forklare at resultatet for prediksjon av fettinnhold er marignalt bedre med rådata enn med data som er normalisert.

Regresjonsanalysene viste at det var best å uttrykke fettsyresammensetningen som % av totalt oljeinnhold. Regresjonene med fettsyresammensetningen angitt som % av total olje i tabell 4.5 hadde generelt bedre R^2 verdier og et lavere antall PLS komponenter enn regresjonene med fettsyresammensetningen angitt som % av totalvekt prøve (tabell 4.4). Dette kan skyldes at fett generelt gir bedre IR signaler enn de andre hovedkomponentene i havren, og at spektret i seg selv derfor bidrar til at fettinformasjonen i første rekke varierer relativt til fett. I estimert vs. referanse -plottene for total mengde mettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av totalvekt prøve (figur 4.7 og 4.9) var kurvene i tillegg krummere enn tilsvarende estimert vs. referanse-plott angitt som % av total olje (figur 4.11 og 4.13). En lineær kurve indikerer at modellen er god (Esbensen et al. 2001).

Regresjonskoeffisientene viste hvilke funksjonelle grupper som var viktige for modellene. I regresjonskoeffisientene til total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje var det en topp rundt 3008 cm^{-1} . Der absorberes *cis*-CH bindinger og indikerer umettethet (Guillen & Cabo 1997). I regresjonskoeffisientene til både mettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje var det topper i fettsyreområdet rundt 2959 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2873 cm^{-1} og 2852 cm^{-1} der symmetriske og asymmetriske CH_3 og CH_2 bindinger absorberes (Socrates 2001). Det var også en topp rundt 1745 cm^{-1} der C=O absorberes og topper rundt 1172 cm^{-1} til 1020 cm^{-1} der CO absorberes (Guillen & Cabo 1997; Socrates 2001). Det er logisk at disse funksjonelle gruppene er viktige for modellene siden fettsyrer inneholder karbonyl C=O i karboksylsyren, metylgrupper CH_3 , metylengrupper CH_2 og CO

(Belitz & Grosch 1999). Det viser at FT-IR er en god metode for å identifisere funksjonelle grupper relatert til lipider.

Det ble prøvd to metoder for å regne ut grad av umettethet i forsøksdesignet. Resultatene viste at beregnet jodverdi ble mer nøyaktig og bedre egnet enn beregnet antall dobbeltbindinger. Jodverdi ble beregnet ved å ta hensyn til alle fettsyrene med deres dobbeltbindinger og molvekt. Den enklere versjonen av jodverdi ble å summere antall dobbeltbindinger i fettsyrene med 18 C-atomer. Det gav en slags dobbeltbindingskoeffisient med et mindre nøyaktig resultat siden det ikke tas hensyn til alle fettsyrene. Estimert vs. referanse-plott og regresjonskoeffisienten til jodverdien (figur 4.15 og 4.16) lignet mye på tilsvarende hos total mengde flerumettede fettsyrer angitt som i % av total olje (figur 4.13 og 4.14). Det betyr at begge modellene representerer umettethet, og at modellene baseres på spektrale bånd som er logisk i forhold til parameteren det kalibreres for.

4.3 Del 2: Kalibrering

4.3.1 Variasjon i prøvesettet

Med erfaring fra del 1 ble fettsyresammensetningen angitt som % av total olje i del 2. Resultatene fra del 1 viste at grad av umettethet best ble beregnet med jodverdi. De følgende resultatene i tabell 4.6 viser variasjonene av fettinnholdet, de vesentligste fettsyrene, sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer og jodverdi i de 63 havremel/olje prøvene.

Tabell 4.6: Variasjonen, gjennomsnitt og standardavviket til totalt fettinnhold, de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje.

| Måleparameter (% av total olje) | Variasjon % | Gj. snitt % | SD % |
|------------------------------------|--------------|-------------|------|
| Totalt fettinnhold (% av prøve) | 4,9 – 35,7 | 21,4 | 7,4 |
| Palmitinsyre C16:0 | 6,7 – 16,5 | 10,1 | 2,0 |
| Oljesyre C18:1n-9 | 17,3 – 69,4 | 44,1 | 12,9 |
| Linolsyre C18:2n-6 | 12 - 53,6 | 28,8 | 9,2 |
| α -linolensyre C18:3n-3 | 0,3 – 30,9 | 8,2 | 8,3 |
| Sum mettede fettsyrer | 9,3 – 18,2 | 13,2 | 1,9 |
| Sum enumettede fettsyrer | 32,4 – 71,8 | 48,9 | 10,5 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 12,7 – 55,7 | 37,8 | 11,2 |
| Jodverdier* | 84,2 - 150,3 | 114,3 | 16 |

*Beregnet jodverdi: g I₂/100 g fett

Oljene tilsatt i prøvene bidro til variasjoner i fettsyresammensetningen med nærmest tilsvarende verdier som i del 1. De tre havretypene hadde ulikt fettinnhold slik at det totale fettinnholdet og fettsyresammensetningen i prøvene ble litt annerledes enn i del 1. I vedlegg 6.3 er resultatene fra analyse av fettsyresammensetning med GC. Belinda hadde et totalt fettinnhold på 6,6 % hvorav majoriteten var linolsyre (39,9 %), deretter oljesyre (39,3 %) og palmitinsyre (15,8 %). Ringsaker hadde et totalt fettinnhold på 4,9 % hvorav majoriteten var linolsyre (43,4 %), deretter oljesyre (35,0 %) og palmitinsyre (16,5 %). Mathilda hadde et totalt fettinnhold på 11,7 % hvorav majoriteten var oljesyre (45,7 %), deretter linolsyre (35,4 %) og palmitinsyre (14,1 %). Analyse av fettsyresammensetningen med GC i utvalgte havremel/olje prøver ble gjort for å sammenligne de GC-verdiene med fettsyresammensetningen (y-verdiene) utregnet til den eksperimentelle data kalibreringen.

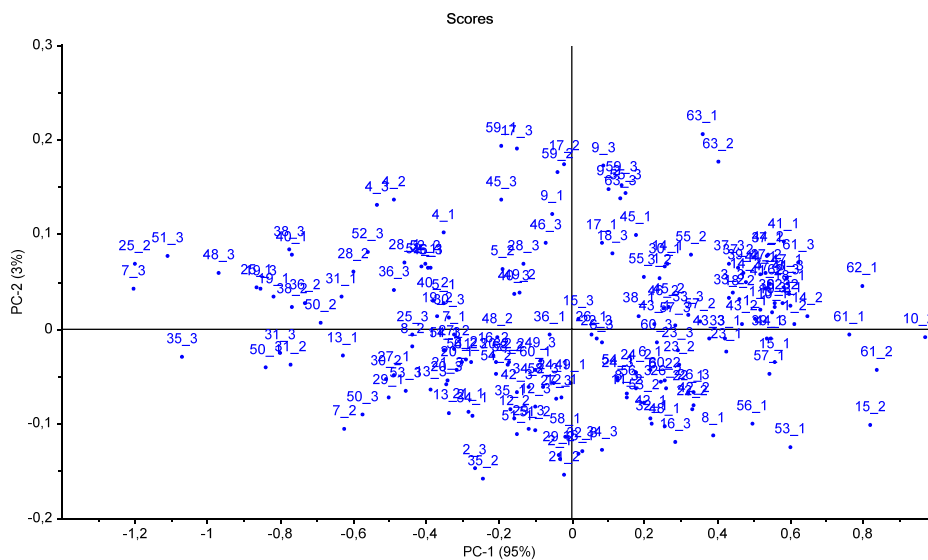
Resultatene (vedlegg 3) viser at det ikke er stor forskjell mellom disse verdiene på samme måte som i del 1 (vedlegg 2).

4.3.2 FT-IR spektrene

For å kontrollere at fettene i prøvene ikke ble oksidert grunnet manglende inaktivering av enzymer ble det gjennomført en holdbarhetsanalyse. Belinda ble lagt fremme i romtemperatur og analysert med FT-IR spektroskopi etter 0 min, 30 min, 1 t, 3 t og 5 t. Ved oksidering ville toppen ved 1743 cm^{-1} som absorberer C=O strekk blitt deformert. Resultatene viste at dette ikke skjedde med FT-IR spektrene i holdbarhetsanalysen, som indikerer at de 63 prøvene ikke ble påvirket av oksidering.

4.3.3 PCA

Analysene med FT-IR spektroskopi til kalibreringen gav 189 spektre. Disse rådataene ble vist i et PCA skår-plott (figur 4.17) med hele absorpsjonsområdet 3100 cm^{-1} til 600 cm^{-1} . Det var færre prøver i del 2 og det var ingen åpenbare uteliggere.



Figur 4.17: PCA skår-plott av rådata i området 3100 cm^{-1} til 600 cm^{-1} .

4.3.4 Regresjonsanalyse

Multivariat kalibrering med regresjonsanalyse (PLSR) ble gjennomført i områdene 3100 cm^{-1} til 2800 cm^{-1} og 1800 cm^{-1} til 700 cm^{-1} . X- matrisen består av de 63 FT-IR spektrene og Y- matrisen består av dataene fra referanseanalysene og designet. Med erfaring fra del 1 ble forbehandlingsmetodene 2. derivering + EMSC benyttet, da de gav best resultat.

Tabell 4.7 viser fettsyresammensetningen angitt som % av total olje. Y-verdiene i regresjonen er de vesentligste fettsyrene, sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer, dobbeltbindinger og jodverdi.

Tabell 4.7: Resultatene fra regresjonsanalysene. Y-verdiene er de vesentligste fettsyrene og sum mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje. Totalt fettinnhold angis som % av total prøve.

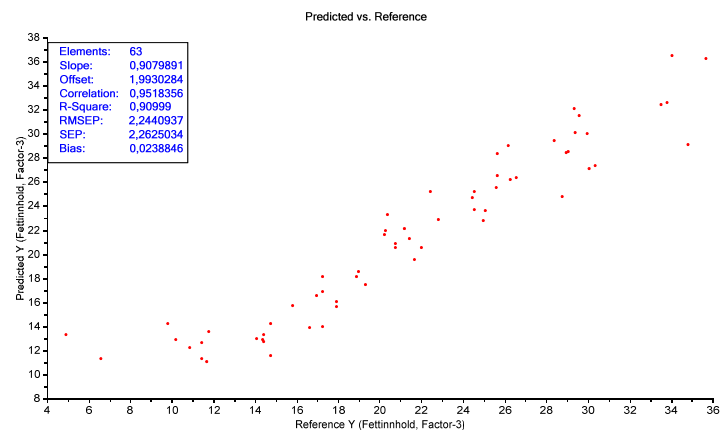
| Måleparameter (% av total olje) | 2. derivert + EMSC | | |
|------------------------------------|--------------------|----------------|-------|
| | n-PLS | R ² | RMSEP |
| Totalt fettinnhold (% av prøve) | 3 | 0,910 | 2,2 |
| Palmitinsyre C16:0 | 13 | 0,773 | 1,0 |
| Oljesyre C18:1 n-9 | 3 | 0,854 | 5,0 |
| Linolsyre C18:2 n-6 | 5 | 0,809 | 4,0 |
| α-linolensyre C18:3 n-3 | 6 | 0,86 | 3,1 |
| Sum mettede fettsyrer | 13 | 0,738 | 1,0 |
| Sum enumettede fettsyrer | 3 | 0,837 | 4,3 |
| Sum flerumettede fettsyrer | 2 | 0,877 | 4,0 |
| Jodverdier* | 3 | 0,881 | 5,6 |

Antall PLS-komponenter (n-PLS), R-square (R²) og Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP).

*Beregnet jodverdi: g I₂/100 g fett

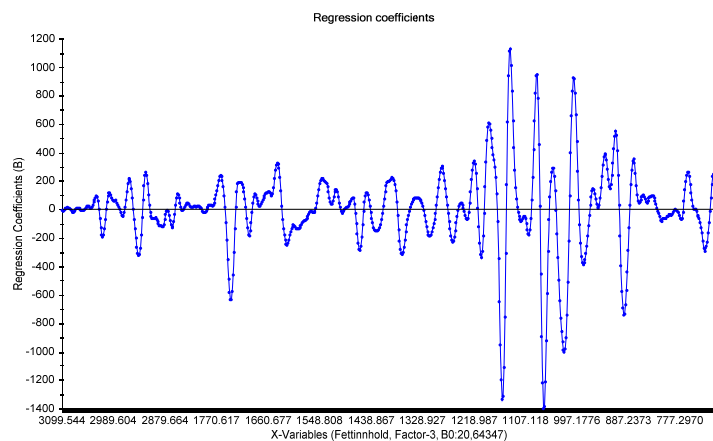
Regresjonsmodellene fungerer stort sett bra, men sammenlignet med regresjonsmodellene i del 1 (tabell 4.5) er modellene i del 2 (tabell 4.7) litt mindre bra. Det er ikke mulig å sammenligne direkte RMSEP-verdiene mellom del 1 og del 2 fordi variasjonen ikke er helt lik. Antall PLS komponenter er likt eller lavere i del 2 enn i del 1, med unntak av C16:0. Antall PLS komponenter som er nødvendig for å lage modellen indikerer kompleksiteten i modellen. I del 2 er det færre prøver slik at modellen får en lavere kompleksitet. Alle R² verdiene er lavere i del 2 sammenlignet med del 1, som betyr at regresjonsmodellene i del 2 er litt mindre bra.

Variasjonen i totalt fettinnhold (2. derivert + EMSC) angitt som % av totalvekt prøve vises i et estimert vs. referanse-plott i figur 4.18. Kurven har en jevnere spredning og har en litt lavere R^2 -verdi enn tilsvarende figur i del 1 (figur 4.5). Variasjonen i fettinnholdet har en jevnere spredning fordi det er benyttet 3 havremeltyper med ulikt fettinnhold (4,9 %, 6,6 % og 11,7 %). Det er imidlertid to prøver med lavt fettinnhold som bidrar til at plottet ikke er helt lineært.



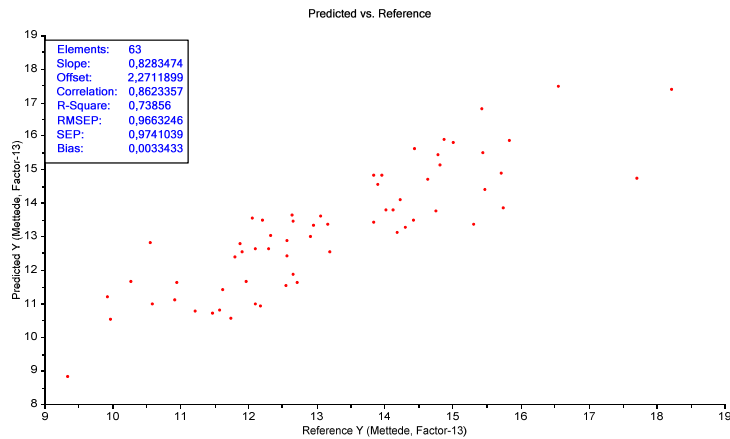
Figur 4.18: Estimert vs. referanse -plott for totalt fettinnhold (2. derivert + EMSC) angitt som % av totalvekt prøve. 3 havremeltyper med ulikt fettinnhold bidrar til at det er stor variasjon i spredningen.

Regresjonskoeffisienten for totalt fettinnhold vises i figur 4.19. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er ved 1745 cm^{-1} der C=O absorberes og i området rundt toppene 1157 cm^{-1} , 1139 cm^{-1} , 1066 cm^{-1} og 1002 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3). Sammenlignet med totalt fettinnhold i del 1 (figur 4.6) er regresjonskoeffisienten relativt lik. Dette betyr at kalibreringsmodellen baserer seg på kjemisk sett logiske deler av IR spektrene.



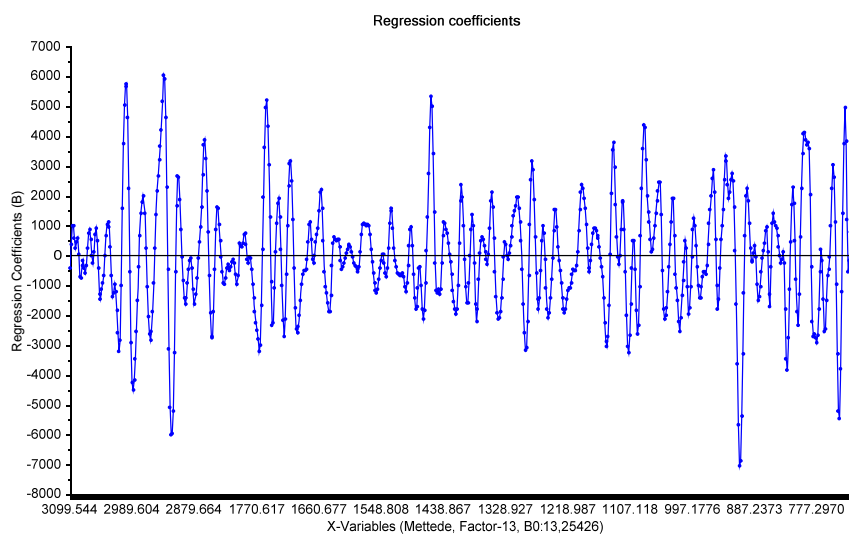
Figur 4.19: Regresjonskoeffisienten for totalt fett innhold angitt som % av totalvekt prøve (2. derivert + EMSC).

Total mengde mettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.20. Kurven er ikke like lineær som tilsvarende kurve i del 1 (figur 4.11).



Figur 4.20: Estimert vs. referanse -plott for total innhold mettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

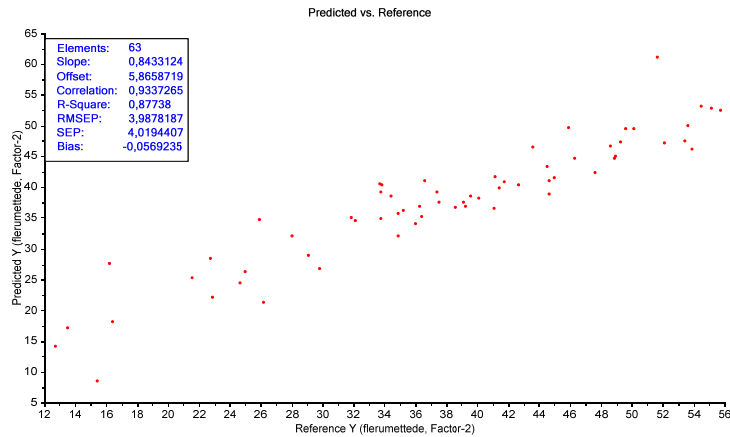
Regresjonskoeffisienten for total mengde mettede fettsyrer angitt som % av total olje vises i figur 4.21. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er rundt 2931 cm^{-1} og 2918 cm^{-1} der symmetriske/asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk absorberes, rundt 1751 cm^{-1} der $\text{C}=\text{O}$ absorberes, ved 1460 cm^{-1} der OH og bøyende CH_2 strekk absorberes og ved 1002 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3). Regresjonskoeffisienten i del 2 for mettede fettsyrer har stort sett de samme toppene som tilsvarende figur i del 1 (4. 12).



Figur 4.21: Regresjonskoeffisienten for total innhold mettet fett angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

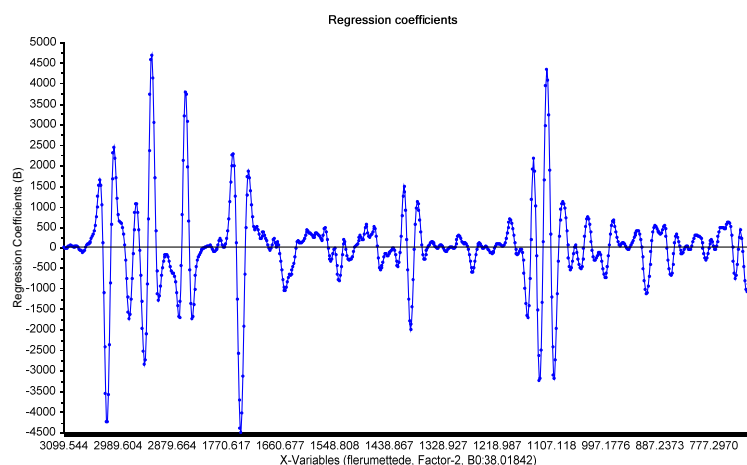
Resultater og diskusjon

Total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.22. Kurven er ikke like lineær og har en lavere R^2 verdi enn tilsvarende kurve i del 1 (figur 4.13).



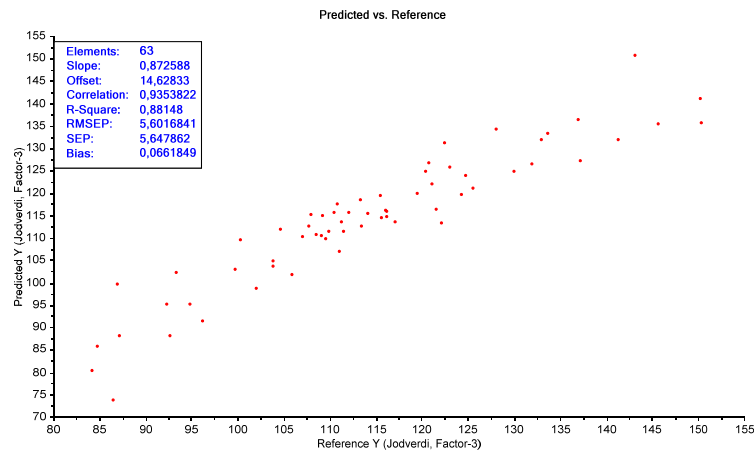
Figur 4.22: Estimert vs. referanse -plott for totalt innhold flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

Regresjonskoeffisienten for total mengde flerumettede fettsyrer angitt som % av total olje vises i figur 4.23. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen er rundt 3012 cm^{-1} der umettede *cis*-CH bindinger absorberes, området rundt toppene 2920 cm^{-1} og 2852 cm^{-1} der symmetriske/asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk absorberes, ved 1741 cm^{-1} der $\text{C}=\text{O}$ absorberes og ved 1130 cm^{-1} , 1116 cm^{-1} og 1103 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3). Regresjonskoeffisienten i del 2 for flerumettede fettsyrer har stort sett de samme toppene som tilsvarende figur i del 1 (figur 4.14).



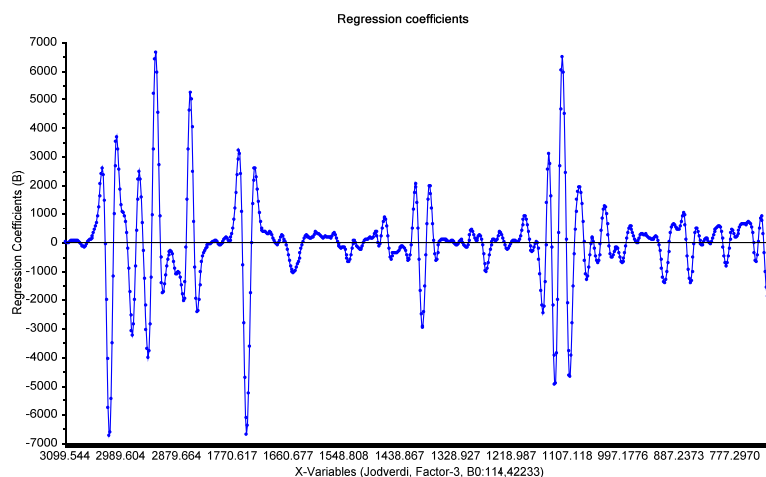
Figur 4.23: Regresjonskoeffisienten for totalt innhold flerumettet fett angitt som % av total olje (2. derivert + EMSC).

Jodverdier (2. derivert + EMSC) vises i et estimert vs. referanse -plott i figur 4.24. Denne modellen har en lavere R^2 verdi (0,88) enn jodverdien i del 1 ($R^2 = 0,96$ i figur 4.15).



Figur 4.24: Estimert vs. referanse -plott for jodverdier (2. derivert + EMSC).

Regresjonskoeffisienten for jodverdien vises i figur 4.25. De områdene med de høyeste toppene som er viktigst for modellen rundt 3010 cm^{-1} der umettede *cis*-CH bindinger absorberes, rundt toppene 2961 cm^{-1} , 2933 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} og 2852 cm^{-1} der symmetriske/asymmetriske CH_3 og CH_2 strekk absorberes, rundt 1741 cm^{-1} der $\text{C}=\text{O}$ absorberes og rundt 1130 cm^{-1} , 1116 cm^{-1} og 1101 cm^{-1} der CO strekk absorberes (se tabell 4.3). Denne regresjonskoeffisienten er nesten lik jodverdien i del 1 (figur 4.16) og reflekterer dermed forventede og kjemisk logiske spektrale bånd.



Figur 4.25: Regresjonskoeffisienten for jodverdier (2. derivert + EMSC).

4.4 Diskusjon del 2

Designet og kalibreringen med regresjonsanalyse i del 2 ble laget med informasjon fra del 1. Ved hjelp av PCA skår-plottet i del 1 ble det valgt ut prøver med oljekonsentrasjoner som spente ut variasjonsrommet og bidro til en jevn variasjon av fettinnhold og fettsyresammensetning til del 2. Det ble laget 63 havremel/olje prøver. Det var lite tilgjengelig havremel så prøvevolumet måtte reduseres til 0,25 g (2 g i del 1). Det gjorde at det ble vanskeligere å fordele de små mengdene olje i havremelet. Olje helt ned til 0,005 g ble veiet og blandet sammen med havremelet. Dette kan ha gitt et vesentlig bidrag til at regresjonsmodellene i del 2 generelt gir litt mindre bra resultater enn tilsvarende modeller fra del 1.

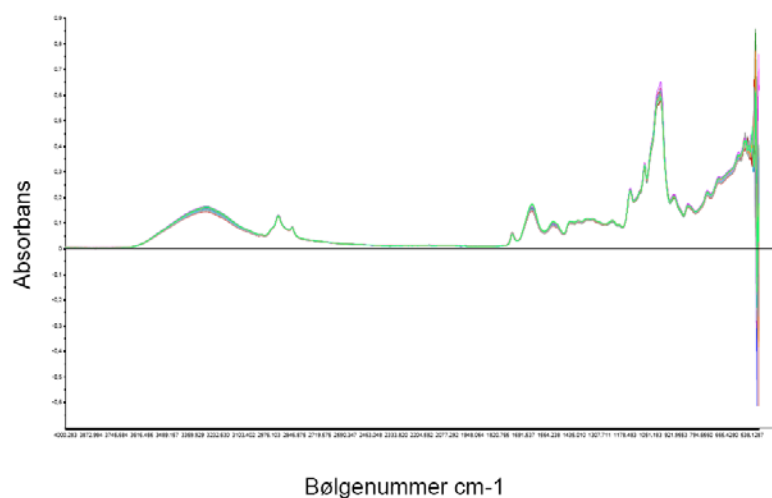
Et usikkerhetsmoment ved FT-IR analysene i del 2 var at havremelene var ubehandlet slik at enzymer i teorien kunne oksidert fett (Mälkki 2001) og påvirket analysene. Holdbarhetsanalysen viste at fett i havremelet ikke var oksidert etter 5 timer i romtemperatur, da FT-IR spektrene viste C=O strekk bånd som ikke ga tegn til deformasjoner. Etersom havremel/olje prøvene ble analysert rett etter prøveopparbeidelse var det sannsynlig at prøvekvaliteten var god og at de mindre bra regresjonsmodellene skyldes en annen grunn.

Med erfaring fra del 1 ble fettsyresammensetningen angitt som % av total olje i del 2. Oljene bidro til fettsyresammensetningen på samme måte som i del 1. Siden det var tre havremeltyper ble det en jevnere spredning av fettinnhold i prøvene. I del 1 stemte teorien med at 90 - 95 % av lipidene i havre er palmitinsyre, oljesyre og linolsyre (Webster & Wood 2011). Resultatene fra GC i del 2 (vedlegg 3) viste at i Belinda utgjorde disse fettsyrene 97 %, i Ringsaker 94,9 % og i Mathilda 95,2 %, så teorien stemte med unntak av et litt høyere innhold i Belinda. Fettsyresammensetningen analysert med GC i utvalgte havremel/olje prøver ble sammenlignet med y -verdiene fra utregning av fettsyresammensetningen i designet benyttet til regresjonsanalysen (vedlegg 3). På samme måte som i del 1 var det lite forskjell mellom disse verdiene. Det indikerer at prøveopparbeidelsen var god, men regresjonsanalysen viser at prøveopparbeidelsen antagelig ikke var like god som i del 1.

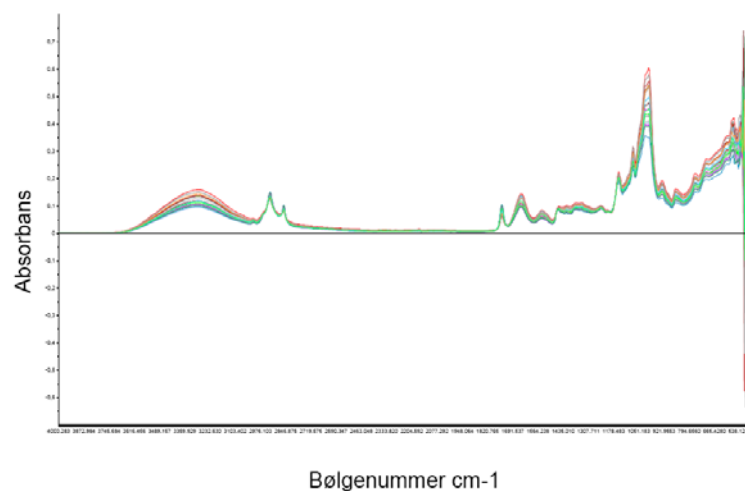
Regresjonsanalysene fra del 2 viste at alle R^2 verdiene var lavere sammenlignet med del 1. Selv om det er likt eller lavere antall PLS-komponenter i del 2 kan det ikke sammenlignes direkte med del 1 ettersom det er færre prøver. RMSEP-verdiene kan heller ikke sammenlignes direkte mellom del 1 og del 2 ettersom variasjonen ikke er helt lik. De lave R^2 verdiene indikerer at regresjonsmodellene i del 2 er mindre bra enn del 1. En metode å undersøke om kalibreringsmodellene i del 2 er gode er å teste kalibreringen med ukjente prøver, som ble gjort i del 3 av oppgaven.

4.5 Del 3: Validering av kalibreringen

For å validere kalibreringen ble 6 ferdig oppmalte havreprøver fra CropTailor benyttet. Prøvene ble analysert med FT-IR spektroskopi og fettsyresammensetningen ble bestemt med GC som referanseanalyse slik at jodverdien kunne beregnes. I figur 4.26 vises FT-IR spektrene fra de 6 havreprøvene (18 replikater). Spektrene har den samme spektrale signaturen som FT-IR spektrene fra 18 tilfeldig utplukkede replikater fra kalibreringen i del 2, se figur 4.27. Det er ulik intensitet i spektrene, men selve signaturen er lik uten visuelle forskjeller.



Figur 4.26: FT-IR spektrene fra de 6 havremelprøvene til valideringen i del 3.



Figur 4.27: FT-IR spektrene fra 18 tilfeldig utvalgte replikater i kalibreringen del 2.

Det ble gjennomført en test-sett validering der kalibreringen fra del 2 ble benyttet for å predikere jodverdien for de 6 ukjente havremelprøvene. I tabell 4.8 vises resultatene fra de predikerte jodverdiene fra test-sett valideringen. Ved å sammenligne med de utregnede jodverdiene på grunnlag av fettsyresammensetningen fra GC-analysene får man en indikasjon på hvor godt kalibreringen fungerer.

Tabell 4.8: De predikerte jodverdiene fra test-sett valideringen med de 6 havremelprøvene og de beregnede jodverdiene på grunnlag av fettsyresammensetningen med GC. Beregnet jodverdi: g I₂/100 g fett.

| Prøve | Beskrivelse | Jodverdi | |
|-------|-------------|----------|----------|
| | | Pred | Beregnet |
| 1 | CT 225 | 104,9 | 108,3 |
| 2 | 91512 | 103,7 | 107,4 |
| 3 | CT832 | 105,4 | 109,1 |
| 4 | CT265 | 103,4 | 106,8 |
| 5 | 91514 | 99,2 | 107,1 |
| 6 | CT1831 | 105,8 | 109,3 |

Jodverdiene tar hensyn til alle fettsyrene og indikerer umettetheten i havremelene. Test-sett valideringen fungerer relativt bra siden de predikerte jodverdiene ikke skiller seg mye fra de utregnede jodverdiene, med unntak av prøve nr 5. Kalibreringen i del 2 ble ikke så god som kalibreringen fra del 1, men valideringen viser uansett at det fungerer. Kalibreringen har et forbedringspotensiale, og en ser at alle prøvene får predikerte jodverdier som er lavere enn referanseverdien. Ved å utvikle kalibreringen videre kan det bli mulig å predikere jodverdiene mer nøyaktig, samtidig som man også kan inkludere andre mer detaljerte parametere som enkelte fettsyrer.

4.6 Generell diskusjon

Resultatene fra del 1 viser at fremgangsmåten med å lage et design med prøveopparbeidelse av havremel blandet med ulike oljer for å få en bred variasjon av fettinnhold og fettsyresammensetning fungerer bra. Dette ser en også ved å sammenligne spektrene fra havremel/olje blandinger med spektrene av «ren» havre. FT-IR spektroskopi gir god reproduserbarhet av havreprøvene. Resultatene viste at det var best å uttrykke fettsyresammensetningen som % av total olje, at den beste forbehandlingsmetoden var å benytte 2. derivering og EMSC, og at den beste måten å uttrykke umettethet på var å benytte jodverdi. Kalibreringen med regresjonsanalyse PLSR gav gode R^2 verdier. Designet i del 2 ble laget på samme måte som forsøksdesignet i del 1. Det ble benyttet færre prøver, men den samme variasjonen i fettsyresammensetning. Kalibreringen i del 2 fungerte ikke like bra siden alle R^2 verdiene var lavere sammenlignet med del 1. Modellene for parametere som jodverdier og sum flerumettede fettsyrer var bra i del 2, men ikke like bra som i del 1. Man kunne imidlertid godt sammenligne regresjonskoeffisientene fra del 1 og del 2, hvilket betyr at regresjonsmodellene som er laget baseres på logisk kjemisk informasjon i spektrene.

Test-sett valideringen i del 3 viste igjen at kalibreringen i del 2 var god, men ikke optimal. De predikerte jodverdiene skilte seg ikke mye fra de utregnede jodverdiene, med unntak av prøve nr 5. FT-IR spektrene fra del 2 og 3 ser like ut, som det vises i figur 4.26 og 4.27. Spektrene har den samme spektrale signaturen selv om det er ulik intensitet i spektrene. Det kan være nyttig å undersøke hvorvidt det er mer fosfolipider i havremelprøvene enn havremel/olje prøvene og om dette kan utgjøre en betydelig forskjell. Havremelene fra del 2 og 3 var oppmalt på samme måte hos CropTailor. Det er ønskelig å bygge opp en kalibrering med prøver fra CropTailor da denne bedriften er interessert i en slik hurtig lipidanalyse med FT-IR spektroskopi. Det må derfor benyttes havremelprøver oppmalt på akkurat den måten siden utgangspunktet bør være likt for alle prøvene til fremtidige analyser. Det er også forventet at oppmalingsmåten kan påvirke IR spektrene på ulike måter.

Studien viser generelt det potensialet som ligger i bruk av FT-IR spektroskopi for å måle fettsyresammensetningen i havre. Studien viser også at det bør være mulig å øke nøyaktigheten i kalibreringene. De små prøvevolumene under prøveopparbeidelsen i del 2

kan være en av grunnene til at kalibreringen i denne delen ikke nådde opp til nøyaktigheten oppnådd i del 1. Det er flere veier som vil kunne føre til et enda bedre kalibreringsresultat. Å inkludere flere prøver fra del 1 vil kunne være en mulighet. En annen vil være også å inkludere også flere reelle havreprøver. En mer spesifikk utvelgelse av de spektrale regioner brukt i kalibreringen vil også kunne gi en positiv effekt på kalibreringsresultatet.

5 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å utvikle en metode for å estimere fettinnhold og fettsyresammensetning i havre basert på infrarød spektroskopi av små mengder prøvemateriale. Resultatene viste at kalibreringen med FT-IR spektrene korrelert mot referanseanalysene relatert til fettinnhold og fettsyresammensetning fungerte bra med gode R^2 verdier. Regresjonskoeffisientene viste at kalibreringen ble basert på logiske spektrale FT-IR absorpsjonsbånd. Den er hensiktsmessig å benytte forbehandlingene 2. derivering og EMSC på FT-IR spektrene og vise fettsyresammensetningen angitt som % av total olje i prøven. Oppbyggingen av designene fungerer bra og predikeringen av jodverdiene er gode, men kalibreringen har et forbedringspotensiale og må utvikles videre for å kunne estimere fettinnhold og detaljert fettsyresammensetning. En av grunnene til at kalibreringen i del 2 ikke nådde opp til nøyaktigheten i del 1 kan være de små prøvevolumene under prøveopparbeidelsen i del 2. Kalibreringen kan utvikles videre ved f.eks å inkludere flere prøver fra del 1, inkludere flere reelle havreprøver eller benytte en mer spesifikk utvelgelse av de spektrale regionene brukt i kalibreringen. Med en bedre kalibrering kan det bli mulig å benytte FT-IR spektroskopi industrielt til screening av havreprøver i nær fremtid, da metoden er ikke-destruktiv, krever lite kjemikalier, er enkel i bruk og gir raske reproducerbare resultater relatert til lipider.

6 Referanser

- Akoh, C. C.&D. B. Min (2002). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry*. New York, M. Dekker. xiii, 1005 s.
- Banas, A., et al. (2007). "Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition." *J Exp Bot* 58(10): 2463-70.
- Barth, A. (2007). "Infrared spectroscopy of proteins." *Biochim Biophys Acta* 1767(9): 1073-101.
- Belitz, H. D.&W. Grosch (1999). *Food chemistry*. Berlin, Springer. XLII, 992 s.
- Che Man, Y. B.&G. Setiowaty (1999). "Application of Fourier transform infrared spectroscopy to determine free fatty acid contents in palm olein." *Food Chemistry* 66(1): 109-114.
- Chippie, A. L., et al. (2002). "Quantitative analysis of fat and moisture in mayonnaise using fourier transform infrared spectrometer." *International Journal of Food Properties* 5(3): 655-665.
- EFSA. (2010, 03.05.2012). "*Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to oat beta glucan and lowering blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006.*" Retrieved 03.05.2012, from <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1885.htm>.
- Esbensen, K., et al. (2001). *Multivariate data analysis - in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*. Oslo, Camo. XX, 598 s.
- FDA. (1997). "*FDA final rule for federal labelling: health claims, oats and conorary heart disease.*" 03.05.2012. from <http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims/HealthClaimsMeetingSignificantScientificAgreementSSA/ucm074719.htm>.
- Gomez-Ordenez, E.&P. Ruperez (2011). "FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds." *Food Hydrocolloids* 25(6): 1514-1520.
- Greibrokk, T., et al. (1994). *Kromatografi: separasjon og deteksjon*. Oslo, Universitetsforlaget. 300 s.
- Grønneberg, T. (2008). *Kjemien stemmer: kjemi 2 [i.e. 2] grunnbok*. [Oslo], Cappelen. 260 s.
- Guillen, M. D.&N. Cabo (1997). "Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region." *Journal of the American oil chemists society* 74(10): 1281-1286.

- Gunstone, F. D. (1996). *Fatty acid and lipid chemistry*. London, Blackie Academic & Professional. XI, 252 s.
- Hart, H., et al. (2003). *Organic chemistry: a short course*. Boston, Houghton Mifflin. XXIV, 566 s.
- Havreforening, N. (2012). "Norsk havreforening " Retrieved 02.05.2012, from [http://www.norskhavre.no/nor/Produkter/\(offset\)/36](http://www.norskhavre.no/nor/Produkter/(offset)/36).
- Hendl, O., et al. (2001). "A rapid and simple method for the determination of iodine values using derivative Fourier transform infrared measurements." *Analytica Chimica Acta* 427(1): 75-81.
- Hoseney, R. C. (1986). *Principles of cereal science and technology*. St. Paul, Minn., American Association of Cereal Chemists. 327 s.
- Kalbasiastari, A.&E. G. Hammond (1977). "Oat Oil - Refining and Stability." *Journal of the American oil chemists society* 54(8): 305-307.
- Kampffmeyer, G. (2012). "oat Kernel Illustrations." Retrieved 30.04.2012, from <http://grain-gallery.com/>.
- Krishnan, P. G., et al. (2000). "Robustness of near infrared reflectance spectroscopy measurement of fatty acids and oil concentrations in oats." *Cereal Foods World* 45(11): 513-519.
- Lásztity, R., et al. (1980). On the presence and distribution of some bioactive agents in oat varieties. *Cereals for Food and Beverages*. New York Munck, eds. Academic Press.: 429-445.
- Li-Chan, E., et al. (2010). *Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science - volume 1 & 2*. West sussex, United kingdom. , John Wiley & Sons.
- Liu, K. S. (1994). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of lipids in Biological Materials " *Journal of the American oil chemists society* 71(11).
- Lundby, F. (2009). "Bestemmelse av fettinnhold med Maran Ultra LF-NMR." *Upublisert manuskript Nofima*. Ås. : 11 s.
- Matportalen. (2012). "Informasjon om mat og helse fra offentlige myndigheter - kostråd." Retrieved 03.05.2012, from http://www.matportalen.no/kosthold_og_helse/tema/kostrad/.
- Matportalen. (2012). "Matvaretabellen." Retrieved 24.05.2012, from <http://matportalen.no/>.
- McMurry, J. (2004). *Organic Chemistry*. Belmont, Thomson-Brooks/Cole.

- Mossoba, M. M., et al. (2007). "Determination of total trans fats and oils by infrared spectroscopy for regulatory compliance." *Anal Bioanal Chem* 389(1): 87-92.
- Mälkki, Y. (2001). Oat fiber: production, composition, physicochemical properties, physiological effects, safety, and food applications. *Handbook of dietary fiber*. New York, Cho, S. S; Dreher, M. L.: 497-517.
- Nordbø, T. (2012). "Fakta om havre." Opplysningskontoret for brød og korn Retrieved 24.04.2012, from <http://www.brodogkorn.no/fakta/havre/>.
- Norgesfôr. (2012). "Bilde av Havre." Norgesfôr - bondens trygge valg Retrieved 24.04.2012, from <http://www.norgesfor.no/Produkter/Korn/Havre/>.
- Nortvedt, R. (1996). *Anvendelse af kjemometri innen forskning og industri*. Norsk Kjemisk Selskaps Faggruppe for Kjemometri.
- Næs, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester, NIR Publications. VIII, 344 s.
- Olsen, E. F., et al. (2008). "Determination of omega-6 and omega-3 fatty acids in pork adipose tissue with nondestructive Raman and fourier transform infrared spectroscopy." *Appl Spectrosc* 62(9): 968-74.
- Pacchiarotta, T., et al. (2010). "Evaluation of GC-APCI/MS and GC-FID as a complementary platform." *J Biomol Tech* 21(4): 205-13.
- Perkinelmer. (2005). "Bilde av ATR-krystall." Retrieved 21.05.2012, from http://shop.perkinelmer.com/content/technicalinfo/tch_ftiratr.pdf.
- Peterson, D.&D. Wood (1996). "Composition and Structure of High-Oil Oat." *Journal of Cereal Science* 26: 121-128.
- ptli. (2012). "Bilde av "Atomic Stretching and Bending"." Retrieved 07.05.12, from <http://www.ptli.com/testlopedia/tests/FTIR-E168andE1252-more.asp>.
- Risbråthe, M. (2010). "Gamle vekster gir god olje." Retrieved 30.09.2010, from <http://www.nofima.no/nyhet/2010/09/gamle-vekster-gir-god-olje>.
- Savitzky, A.&M. J. E. Golay (1964). "Smoothing + Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." *Analytical Chemistry* 36(8): 1627-&.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. Chichester, Wiley. XV, 347 s.
- Ultra. (2012). "Bilde av ferdig prosessert havregryn." Retrieved 09.05.2012, from <http://www.ultra.no/Bakern/Korn/Havre/Havregryn/>.

van de Voort, F., et al. (1996). "Determination of solid fat index by fourier transform infrared spectroscopy." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(4): 411-416.

Webster, F. H. (1986). *Oats: chemistry and technology*. St. Paul, Minn., American Association of Cereal Chemists. 433 s.

Webster, F. H.&P. J. Wood (2011). *Oats: chemistry and technology*. St. Paul, Minn., American Association of Cereal Chemists. XII, 376 s.

Whitney, E. N.&S. R. Rolfes (2005). *Understanding nutrition*. Belmont, CA, Thomson Wadsworth. xviii, 714 s., flere pag.

Wikipedia. (2012). "*Bilde av gasskromatograf*." Retrieved 04.05.12, from http://no.wikipedia.org/wiki/Fil:Gas_chromatograph.png.

Williams, D. H.&I. Fleming (2008). *Spectroscopic methods in organic chemistry*. 6 London, McGraw-Hill. XIII, 329 s.

Wittkowski, R.&R. Matissek (1993). *Capillary gas chromatography in food control and research*. Lancaster, Pa, Technomic Publishing. 379 s.

Yang, H., et al. (2005). "Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy." *Food Chemistry* 93(1): 25-32.

7 Vedlegg

Vedlegg 1: Fettsyresammensetningen fra C14:0 til C22:5 i havremelet og oljene (raps, solsikke, oliven og Camelina) analysert med GC. Måleparameter er angitt som % fettsyrer av totalt mengde fett.

| Beskrivelse | C14:0 | C14:1n-5 | C16:0 | C16:1n-7 | C18:0 | C 18:1n-9 | C18:1n-7 | C18:2n-6 | C18:3n-6 | C18:3n-3 |
|------------------|-------|----------|----------|----------|-------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| Havremel (Regal) | 0,17 | 0,00 | 17,26 | 0,29 | 1,38 | 35,43 | 0,94 | 41,21 | 0,00 | 1,90 |
| Raps | 0,05 | 0,00 | 4,73 | 0,20 | 1,47 | 59,70 | 2,55 | 19,11 | 0,27 | 9,14 |
| Solsikke | 0,07 | 0,00 | 6,18 | 0,12 | 3,11 | 33,55 | 0,59 | 55,08 | 0,00 | 0,11 |
| Oliven | 0,03 | 0,00 | 11,37 | 0,85 | 3,25 | 74,36 | 1,42 | 7,45 | 0,03 | 0,62 |
| Camelina | 0,06 | 0,00 | 5,64 | 0,08 | 2,40 | 12,50 | 0,63 | 15,95 | 0,17 | 38,46 |
| Beskrivelse | C20:0 | C20:1n-9 | C20:2n-6 | C20:3n-3 | C22:0 | C22:1n-9 | C20:5n-3 | C24:0 | C24:1n-9 | C22:5 |
| Havremel (Regal) | 0,00 | 0,82 | 0,00 | 0,29 | 0,00 | 0,21 | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Raps | 0,50 | 1,30 | 0,07 | 0,00 | 0,29 | 0,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,12 |
| Solsikke | 0,23 | 0,14 | 0,00 | 0,00 | 0,60 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,21 | 0,00 |
| Oliven | 0,34 | 0,23 | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,00 |
| Camelina | 1,20 | 14,67 | 2,21 | 1,91 | 0,26 | 2,81 | 0,00 | 0,49 | 0,56 | 0,00 |

Vedlegg

Vedlegg 2: Fettsyresammensetning fra C14:0 til C22:5 i prøver analysert med GC. Prøvene ble sammenlignet med Y-verdi fettsyresammensetningen fra kalibreringen beregnet i designet. Måleparameter er % fettsyrer av totalt mengde fett. *Havremel + X % tilsatt olje.

| | Havreblandinger | C14:0 | C14:1n-5 | C16:0 | C16:1n-7 | C18:0 | C 18:1n-9 | C18:1n-7 | C18:2n-6 | C18:3 | C18:3n-3 |
|-------------|--|-------|----------|----------|----------|-------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| GC | 5% oliven * | 0,09 | 0,00 | 13,81 | 0,53 | 2,43 | 55,70 | 1,26 | 24,02 | 0,00 | 1,23 |
| Kalibrering | 5% oliven * | 0,10 | 0,00 | 14,47 | 0,56 | 2,27 | 53,88 | 1,17 | 25,21 | 0,01 | 1,29 |
| GC | 16 % raps + 4 % Camelina * | 0,08 | 0,02 | 7,17 | 0,19 | 1,69 | 47,49 | 2,01 | 22,45 | 0,17 | 12,40 |
| Kalibrering | 16 % raps + 4 % Camelina * | 0,07 | 0,00 | 7,19 | 0,20 | 1,61 | 47,55 | 1,94 | 22,67 | 0,20 | 12,58 |
| GC | 10 % raps + 10 % solsikke + 5 % Camelina * | 0,08 | 0,02 | 7,24 | 0,17 | 2,22 | 38,42 | 1,34 | 33,75 | 0,08 | 10,49 |
| Kalibrering | 10 % raps + 10 % solsikke + 5 % Camelina * | 0,07 | 0,00 | 7,17 | 0,16 | 2,18 | 38,68 | 1,31 | 33,58 | 0,12 | 10,65 |
| GC | 8 % oliven + 2 % Camelina * | 0,08 | 0,00 | 12,00 | 0,51 | 2,54 | 51,74 | 1,22 | 20,19 | 0,05 | 6,95 |
| Kalibrering | 8 % oliven + 2 % Camelina * | 0,08 | 0,00 | 12,45 | 0,54 | 2,50 | 51,86 | 1,14 | 20,03 | 0,04 | 6,87 |
| GC | 4 % raps + 1 % oliven * | 0,11 | 0,00 | 11,63 | 0,31 | 1,71 | 49,16 | 1,67 | 28,70 | 0,10 | 4,49 |
| Kalibrering | 4 % raps + 1 % oliven * | 0,11 | 0,00 | 11,92 | 0,31 | 1,59 | 48,39 | 1,60 | 29,57 | 0,10 | 4,54 |
| GC | 12 % raps + 3 % solsikke * | 0,08 | 0,02 | 7,83 | 0,21 | 1,77 | 50,18 | 1,88 | 29,61 | 0,15 | 5,94 |
| Kalibrering | 12 % raps + 3 % solsikke * | 0,08 | 0,00 | 7,99 | 0,21 | 1,69 | 49,92 | 1,87 | 29,82 | 0,16 | 6,04 |
| | Havreblandinger | C20:0 | C20:1n-9 | C20:2n-6 | C20:3n-3 | C22:0 | C22:1n-9 | C20:5n-3 | C24:0 | C24:1n-9 | C22:5 |
| GC | 5% oliven * | 0,24 | 0,54 | 0,00 | 0,14 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | 5% oliven * | 0,16 | 0,54 | 0,00 | 0,15 | 0,02 | 0,11 | 0,05 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| GC | 6 % raps + 4 % Camelina * | 0,57 | 3,48 | 0,42 | 0,40 | 0,26 | 0,90 | 0,00 | 0,10 | 0,21 | 0,00 |
| Kalibrering | 16 % raps + 4 % Camelina * | 0,52 | 3,39 | 0,40 | 0,36 | 0,23 | 0,82 | 0,02 | 0,08 | 0,09 | 0,08 |
| GC | 10 % raps + 10 % solsikke + 5 % Camelina * | 0,48 | 3,39 | 0,45 | 0,42 | 0,36 | 0,76 | 0,00 | 0,15 | 0,19 | 0,00 |
| Kalibrering | 10 % raps + 10 % solsikke + 5 % Camelina * | 0,47 | 3,37 | 0,44 | 0,40 | 0,34 | 0,73 | 0,01 | 0,09 | 0,18 | 0,04 |
| GC | 8 % oliven + 2 % Camelina * | 0,42 | 2,71 | 0,36 | 0,44 | 0,11 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | 0,14 | 0,00 |
| Kalibrering | 8 % oliven + 2 % Camelina * | 0,36 | 2,64 | 0,34 | 0,39 | 0,06 | 0,50 | 0,03 | 0,08 | 0,09 | 0,00 |
| GC | 4 % raps + 1 % oliven * | 0,30 | 0,98 | 0,00 | 0,23 | 0,16 | 0,35 | 0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | 4 % raps + 1 % oliven * | 0,22 | 0,95 | 0,03 | 0,15 | 0,11 | 0,30 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,05 |
| GC | 12 % raps + 3 % solsikke * | 0,38 | 1,06 | 0,05 | 0,11 | 0,30 | 0,41 | 0,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | 12 % raps + 3 % solsikke * | 0,34 | 1,01 | 0,04 | 0,07 | 0,26 | 0,35 | 0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,07 |

Vedlegg 3: Fettsyresammensetning fra C14:0 til C22:5 i havremel Belinda, Ringsaker og Matilda og 3 havremel/olje blandinger analysert med GC. De tre prøvene ble sammenlignet med Y-verdi fettsyresammensetningen fra kalibreringen beregnet i designet. Måleparameter er % fettsyrer av totalt mengde fett.

| | Havreblandinger | C14:0 | C14:1n-5 | C16:0 | C16:1n-7 | C18:0 | C 18:1n-9 | C18:1n-7 | C18:2n-6 | C18:3 | C18:3n-3 |
|-------------|---|-------|----------|----------|----------|-------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| GC | Belinda | 0,16 | 0,00 | 15,79 | 0,19 | 1,61 | 39,35 | 0,62 | 39,87 | 0,03 | 1,51 |
| GC | Ringsaker | 0,19 | 0,00 | 16,48 | 0,24 | 1,43 | 35,01 | 0,72 | 43,37 | 0,03 | 1,60 |
| GC | Matilda | 0,10 | 0,00 | 14,08 | 0,14 | 2,19 | 45,72 | 0,46 | 35,39 | 0,01 | 0,98 |
| GC | B + 15% oliven + 5% solsikke + 5% camelina* | 0,08 | 0,00 | 10,04 | 0,45 | 3,02 | 52,09 | 1,30 | 21,76 | 0,00 | 6,89 |
| Kalibrering | B + 15% oliven + 5% solsikke + 5% camelina* | 0,06 | 0,00 | 10,29 | 0,49 | 2,81 | 51,43 | 1,02 | 21,85 | 0,05 | 7,21 |
| GC | M + 5% raps + 10% oliven + 10% camelina * | 0,07 | 0,00 | 9,32 | 0,32 | 2,65 | 46,50 | 1,36 | 19,17 | 0,10 | 12,88 |
| Kalibrering | M + 5% raps + 10% oliven + 10% camelina * | 0,06 | 0,00 | 9,35 | 0,33 | 2,44 | 46,18 | 1,11 | 19,12 | 0,10 | 13,28 |
| GC | R + 5% raps + 20% solsikke * | 0,10 | 0,00 | 7,61 | 0,15 | 2,80 | 38,89 | 1,13 | 46,24 | 0,00 | 1,87 |
| Kalibrering | R + 5% raps + 20% solsikke * | 0,08 | 0,00 | 7,19 | 0,15 | 2,59 | 38,67 | 0,98 | 46,84 | 0,05 | 2,00 |
| | Havreblandinger | C20:0 | C20:1n-9 | C20:2n-6 | C20:3n-3 | C22:0 | C22:1n-9 | C20:5n-3 | C24:0 | C24:1n-9 | C22:5 |
| GC | Belinda | 0,15 | 0,72 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| GC | Ringsaker | 0,13 | 0,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| GC | Matilda | 0,19 | 0,74 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| GC | B + 15% oliven + 5% solsikke + 5% camelina* | 0,48 | 2,72 | 0,38 | 0,32 | 0,00 | 0,47 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | B + 15% oliven + 5% solsikke + 5% camelina* | 0,44 | 2,78 | 0,38 | 0,33 | 0,16 | 0,48 | 0,00 | 0,09 | 0,13 | 0,00 |
| GC | M + 5% raps + 10% oliven + 10% camelina * | 0,62 | 4,81 | 0,68 | 0,57 | 0,00 | 0,94 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | M + 5% raps + 10% oliven + 10% camelina * | 0,58 | 4,82 | 0,67 | 0,57 | 0,13 | 0,91 | 0,00 | 0,15 | 0,17 | 0,02 |
| GC | R + 5% raps + 20% solsikke * | 0,28 | 0,46 | 0,00 | 0,00 | 0,46 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Kalibrering | R + 5% raps + 20% solsikke * | 0,27 | 0,44 | 0,01 | 0,00 | 0,46 | 0,09 | 0,00 | 0,00 | 0,14 | 0,02 |

* B= Belinda, M= Matilda, R= Ringsaker havremel + % tilsatt olje