

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## Forord

Denne oppgaven er en del av masterstudiet i matvitenskap ved Universitetet for miljø- og biovitenskap. Arbeidet ble påbegynt august 2011 og ble avsluttet mai 2012. Masteroppgaven er et samarbeid med Nofima AS på Ås, hvor all arbeid ble utført. Hovedmålet med oppgaven var å studere effekten av varmebehandling og lagring på innholdet av enkle fenoler og polyfenoler i brokkoli.

Først og fremst vil jeg takke mine to veiledere seniorforsker Gunnar Bengtsson og Stefan Sahlstrøm for god og målrettet veiledning gjennom dette året. Jeg er takknemlig for all tid dere har avsatt til meg, og deres engasjement. Dere har vært til stor inspirasjon, og jeg hatt glede av dette arbeidet fra start til slutt.

Takk til stipendiat Anastacia Hole for din solide kunnskap og erfaring med HPLC, og for at du alltid svarte på spørsmålene mine.

Takk til Lene Ruud Lima for god hjelp og hyggelig selskap på laben. Jeg vil også takke John-Erik og Per Lea for hjelp til statistikk.

Jeg retter en takk til Gerd Vegarud som stilte opp som hovedveileder på UMB.

Takk til mine flotte medstudenter som har bidratt til hyggelige sosialt samvær i lunsjene.

Takk til min kjære Robin for all støtte, tålmodighet og ikke minst for lånet av bil gjennom min tid på UMB.

Til sist vil jeg takke alle som har gjort dette året til et spennende og lærerikt år!

Ås, mai 2012

Silje Johansen.

## Sammendrag

Fenoliske komponenter som flavonoler og fenoliske syrer finnes i de fleste vaskulære planter, og er en integrert del av et menneskets kosthold. Studier har vist at fenoler har høy kjemisk antioksidant aktivitet, og det er i tillegg vist at noen fenoler har positiv helseeffekt. Imidlertid er både mengden som inntas og biotilgjengeligheten av disse komponentene viktig for å oppnå den gunstige effekten. Maten vi spiser blir som oftest behandlet i en eller annen form, og for omfattende prosessering inkludert varmebehandling, kan skade komponentene. Selv om forbruket av prosessert mat er økende, er det fremdeles liten informasjon om hvordan disse helsefremmende komponentene blir bevart under ulike prosesseringer og lagring.

I denne oppgaven er fokuset rettet mot de norske råvarene brokkoli (*Brassica oleracea* ssp. *Italica*) og bygg (*Hordeum vulgare* L.), som er rike på fenoliske komponentene. Oppgaven tar for seg effekten av prosessering, varmebehandling og lagring på innholdet av frie og bundne fenoler.

Det ble benyttet både industrielle kokemetoder og vanlige tilberedningsmetoder på enkeltråvarene, og i tillegg ble brokkoli og bygg satt sammen med laks som et eksempel måltid. Brokkolien ble lagret over 18 dager, og måltidet over ni dager. Hensikten var å se i hvilken grad behandlingene bevarte fenolene, og sammenligne behandlingene mot hverandre. Det eksperimentelle arbeidet inkluderer analyse av flavonoler og fenoliske syrer, antioksidantkapasitet (FRAP) og totale fenoler (Folin-Ciocalteu's metode).

De ulike varmebehandlingene viste ulik effekt på innholdet av fenoler. Kokemetoder som benyttet mindre vann og kortere koketid bevarte størst andel av fenolene i brokkoli. Koking av bygg viste at stort vannvolum førte til tap av fenoler ut i kokevann. Kjølelagring av varmebehandlet brokkoli over 18 dager, hadde ingen effekt på flavonoler eller fenoliske syrer, og komponentene viste god stabilitet under lagringen. Det var heller ingen signifikant effekt av lagring på det hele måltidet (laks, brokkoli og bygg) ved ni dager, men mikrovarming økte innholdet av bundne fenoliske syrer i brokkoli. Da det i tillegg var et stabilt bakterienivå fra seks til ni dager, ble det konkludert med at lagringstiden kunne forlenges ytterligere med tanke på disse to råvarene.

## Abstract

Phenolic components such as flavonols and phenolic acids are found in most vascular plants, and are an integral part of human diet. Studies have shown that phenols have high chemical antioxidant activity in vitro. It is also shown that some phenols have health benefits. However, both the amount consumed and the bioavailabilities of these components are important to achieve possible beneficial effects. Most foods are usually heat treated before consuming, and extensive processing may damage these food components. Although the consumed volume of industrially processed foods is increasing, there is still inadequate information on how healthy food components are preserved by various processing methods and storage.

In this paper, the focus is directed towards Norwegian raw material, broccoli (*Brassica oleracea* ssp. *italica*) and barley (*Hordeum vulgare* L. var), which are good sources of phenolic components. The thesis examines the effect of processing including heat treatment and storage on the content of free and bound phenols. Both industrial cooking methods and conventional cooking methods were used on the individual ingredients, and in addition, broccoli and barley combined with salmon as a complete meal. Broccoli was stored for 18 days, and the meal for nine days. The purpose was to see to what extent the treatments preserved phenolics, and compare treatments against each other. The experimental work includes the analysis of flavonols and phenolic acids, antioxidant capacity (FRAP) and total phenols (Folin-Ciocalteu's method).

The different heat treatments showed different effects on the content of phenols. Cooking methods that use less water and shorter cooking time preserved the highest proportion of phenolics in broccoli. Cooking with a large volume of water led to the loss of phenols from barley into the boiling water. Cold storage for at least 18 days of heat-treated broccoli had no effect on the content of flavonols and phenolic acids. There was no significant effect of nine days storage on the whole meal (raw salmon, raw broccoli and boiled barley), but micro-heating increased the content of bound phenolic acids in broccoli. When the bacterial levels were found acceptable after nine days, it was concluded that the storage time could be further extended in terms of these two ingredients.

## Forkortelser

CA	Kaffesyre (caffeic acid)
DMSO	Dimetylsulfoksid
FA	Ferulsyre (Ferulic acid)
FRAP	Antioksidantkapasitet (Ferric Reducing Antioxidant Power)
MeOH	Metanol
MilliQ	Dobbelt destillert ionebyttet vann
p- CA	p- kumarinsyre (p- Coumaric acid)
SA	Sinapinsyre (Sinapic acid)
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>I</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 BAKGRUNN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 FORMÅLET MED OPPGAVEN</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 FENOLISKE KOMPONENTER</b> .....	<b>2</b>
1.3.1 KLASSIFISERING AV FENOLER .....	3
1.3.2 FENOLISKE SYRER .....	4
1.3.3 FLAVONOIDER .....	5
1.3.4 OPPTAK AV ENKLE FENOLER OG POLYFENOLER .....	6
1.3.5 DAGLIG INNTAK AV ENKLE FENOLER OG POLYFENOLER .....	6
<b>1.4 FRIE RADIKALER OG ANTIOKSIDANTER</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 BROKKOLI(BRASSICA OLERACEA SSP. ITALICA)</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 FENOLISKE KOMPONENTER I BROKKOLI.....	8
<b>1.6 MATPLANTER</b> .....	<b>9</b>
1.6.1 PLANTECELLENS OPPBYGGING .....	9
1.6.2 PLANTENS INNHOLD AV FENOLER OG FAKTORER SOM PÅVIRKER NIVÅET .....	9
<b>1.7 PROSESSERING AV MATPLANTER</b> .....	<b>9</b>
1.7.1 MINIMAL PROSESSERING .....	10
1.7.2 KOKING .....	10
1.7.3 BLANSJERING.....	11
1.7.4 SOUS VIDE .....	11
1.7.5 OPPVARMING I MIKROBØLGEOVN .....	11
<b>1.8 LAGRING AV MATPLANTER</b> .....	<b>12</b>
1.8.1 KJØLELAGRING.....	12
1.8.2 FRYSELAGRING.....	12
<b>1.9 EFFEKT AV PROSESSERING PÅ PLANTEMATERIALET</b> .....	<b>13</b>
1.9.1 EFFEKT AV VARMEBEHANDLING PÅ FENOLISKE INNHOLDSSTOFFER.....	13
1.9.2 EFFEKT AV LAGRING .....	14
<b>1.10 BYGG (HORDEUM VULGARE L.)</b> .....	<b>14</b>
1.10.1 FENOLISKE SYRER I BYGG.....	15
1.10.2 PROSESSERING AV BYGG .....	16
<b>1.11 ANALYSEMETODIKK</b> .....	<b>17</b>
1.11.1 IDENTIFISERING AV FLAVONOIDER .....	17
1.11.2 IDENTIFISERING AV FENOLISKE SYRER .....	17
1.11.3 FERRIC REDUCING ANTIOKSIDANT POWER/ ANTIOKSIDANTKAPASITET.....	17
1.11.4 TOTALE FENOLER/ FOLIN-CIOCALTEAU’S METODE.....	17

<b>2 EKSPERIMENTELT</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 INTRODUKSJON</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 OVERSIKT OVER KJEMIKALIER OG UTSTYR BENYTTET I EKSPERIMENTER</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 BROKKOLI</b> .....	<b>21</b>
2.3.1 UTGANGSMATERIALET .....	21
2.3.2 PRØVEPREPARERING .....	22
2.3.3 FRYSETØR KING OG HOMOGENISERING .....	22
2.3.4 EKSTRAKSJON AV FENOLER .....	23
2.3.5 EKSTRAKSJON AV FRIE FENOLISKE SYRER FRA BROKKOLI .....	23
2.3.6 EKSTRAKSJON AV BUNDNE FENOLISKE SYRER FRA BROKKOLI .....	24
2.3.7 ANALYSEMETODER .....	25
<b>2.4 BYGG</b> .....	<b>27</b>
2.4.1 MATERIALET.....	27
2.4.2 HOMOGENISERING .....	28
2.4.3 PRØVEPREPARERING .....	28
2.4.4 ANALYSEMETODER .....	29
<b>2.5 ET SAMMENSATT MÅLTID AV "DET SUNNE MÅLTID" («DOUBLE FRESH»)</b> .....	<b>31</b>
2.5.1 MATERIALET.....	31
2.5.2 UTFØRELSE AV "DOUBLE FRESH"-FORSØK.....	32
2.5.3 PRØVEPREPARERING AV ENKELTKOMPONENTENE.....	33
<b>2.6 GRAFER OG STATISTIKK</b> .....	<b>33</b>
<b>3 RESULTATER</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 IDENTIFISERING AV FENOLISKE KOMPONENTER VED BRUK AV HPLC</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 BROKKOLI</b> .....	<b>35</b>
3.2.1 UTARBEIDING AV METODE FOR ANALYSE AV BUNDNE FENOLISKE SYRER I BROKKOLI.....	35
3.2.2 INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER I RÅ BROKKOLI.....	36
3.2.3 EFFEKT AV BLANSJERING PÅ INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER.....	39
3.2.4 EFFEKT AV SOUS VIDE KOKING PÅ INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER .....	41
3.2.5 EFFEKT AV SOUS VIDE KOKING PÅ INNHOLD AV FRIE FLAVONOLER .....	42
3.2.6 EFFEKT AV SOUS VIDE KOKING PÅ INNHOLD AV BUNDNE FENOLISKE SYRER.....	42
3.2.7 EFFEKT AV LAGRING PÅ INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER.....	43
3.2.8 EFFEKT AV KJØLELAGRING PÅ BLANSJERT BROKKOLI .....	43
3.2.9 EFFEKT AV KJØLELAGRING PÅ SOUS VIDE KOKT BROKKOLI.....	45
<b>3.3 BYGG</b> .....	<b>47</b>
3.3.1 INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER I RÅ BYGG.....	47
3.3.2 TOTALE FENOLER OG FRAP VERDI I HELKORN, AVSKALLET KORN OG BYGGMEL.....	48
3.3.3 FRIE OG BUNDNE FENOLISKE SYRER I HELKORN, AVSKALLET KORN OG BYGGMEL.....	48
3.3.4 INNHOLD AV FENOLISKE KOMPONENTER I BLØTLAGT OG VARMEBEHANDLET BYGG .....	49
<b>3.4 ET SAMMENSATT MÅLTID, «DOUBLE FRESH» - FORSØK</b> .....	<b>53</b>
3.4.1 INTRODUKSJON.....	53
3.4.2 EFFEKT AV OPPVARMING I MIKROBØLGEOVN OG KJØLELAGRING AV ET SAMMENSATT MÅLTID. ....	54
<b>4 ANALYSE</b> .....	<b>59</b>
4.1 BROKKOLI ANALYSE.....	59
<b>4.2 BYGG ANALYSER</b> .....	<b>61</b>
<b>4.3 ET SAMMENSATT MÅLTID «DOUBLE FRESH» - FORSØK</b> .....	<b>62</b>



<b>5 DISKUSJON .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1 INNHOLD AV FENOLER I BROKKOLI OG BYGG .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2 VARMEBEHANDLING AV BROKKOLI .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3 VARMEBEHANDLING AV BYGG .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4 EFFEKT AV LAGRING PÅ FLAVONOLER OG FENOLISKE SYRER .....</b>	<b>66</b>
<b>5.5 KJEMISK ANALYSEMETODE.....</b>	<b>66</b>
<b>5.6 VIDERE ARBEID .....</b>	<b>67</b>
<b>6 KONKLUSJON .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERANSELISTE .....</b>	<b>70</b>
<b>VEDLEGGSLISTE .....</b>	<b>75</b>
<b>1. EKSEMPEL PÅ UTREGNET MENGDE FENOLISKE KOMPONENTER I PRØVE. ....</b>	<b>76</b>
<b>2. TALLMATERIALER TIL GRUNN FOR FIGURER .....</b>	<b>77</b>
<b>3. OPPSKRIFT PÅ VARMEBEHANDLING AV BYGG .....</b>	<b>82</b>
<b>4. TOTALKIM I BYGG OG BROKKOLI FRA «DOUBLE FRESH»- FORSØK .....</b>	<b>83</b>

# 1 Bakgrunn

## 1.1 Innledning

Et sunt kosthold legger grunnlaget for en god helse. For å sikre et helsegunstig kosthold i befolkningen, blir det gitt ut offentlige anbefalinger. Alle anbefalinger inkluderer å øke inntak av frukt og grønnsaker, samt høyere inntak av helkorn. Både frukt, grønnsaker og helkorn er viktige kilder til næringsstoffer som vitaminer, mineraler og fiber, men også andre biologiske aktive komponenter som er gunstig for helsen. Komponentene kalles både enkle fenoler og polyfenoler, og er forbindelser som er svært utbredt i planteriket. Interessen for de helsefremmende komponentene har økt de senere årene, og skyldes hovedsakelig av deres potensielle helsefremmende virkning i kroppen (kapittel 1.3-1.4).

Helkorn må prosesseres for å danne et spiselig produkt, og som oftest blir grønnsaker også behandlet i en eller annen form. Det kritiske spørsmålet som vier mange forskeres interesse er i hvilken grad behandlingene påvirker de helsefremmende komponentene.

Varmebehandling er ansett til å ha en negativ effekt på næringsstoffer, men ulike metoder har vist seg å ha ulik effekt [Yuan et al., 2009; Turkmen et al., 2005]. Både kjemisk sammensetning og biotilgjengelighet av komponentene kan bli endret under varmebehandling. Hva som skjer med enkle fenoler og polyfenoler under ulike prosesseringstrinn er det fremdeles liten informasjon om. Komponentene er ustabile og sensitive for varme, og kan lett gjennomgå endringer under behandling.

Tilsynelatende vil prosessering av mat øke inntak av næringsstoffer. Industrien bruker prosessering som blant annet avskalling og maling av korn til å lage produkt som kan tilsettes supper, grøt, brød, osv. Fryselagring er en annen teknikk benyttet på grønnsaker, som forlenger holdbarheten på produktene og samtidig gjør dem tilgjengelige året rundt. Kokemetoder som "sous vide" lager retter, som raskt og enkelt kan tilberedes i hjemmet. Forbruket av ferdigprosesserte matretter øker stadig. Ved å studere de ulike varmebehandlingenes evne til å bevare helsefremmende komponenter som enkle fenoler og polyfenoler, kan det hjelpe industrien og forbrukerne til å velge den optimale kokemetoden (1.7-1.9, 1.10.2).

## **1.2 Formålet med oppgaven**

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt som pågår ved Nofima AS.

Prosjektet "Det sunne måltid" handler om å få en bedre forståelse av samspillet mellom måltid, fordøyelsessystemet og immunforsvaret. Fokuset er rettet mot norske råvarer, og eksempel måltidet som består av laks, brokkoli og bygg. Fedme er et økende problem i Norge og resten av verden, og i følge Verdens Helse Organisasjon (WHO) har industriell mat mye av skylden. Et av målene til prosjektet er derfor å lage sunnere alternativer til ferdigmat, hvor næringsstoffer beholdes i størst mulig grad.

Det overordnede målet med oppgaven er å vurdere effekten av varmebehandling og lagring på innhold av enkle fenoler og polyfenoler i brokkoli og bygg.

Delmålene har vært:

- Studere effekten av avskalling, maling og varmebehandling på innhold av frie og bundne fenoliske syrer i bygg, samt effekt på totale fenoler og antioksidantkapasitet.
- Studere effekten av varmebehandlingsmetoder etterfulgt av kjølelagring på innhold av frie flavonoider og bundne fenoliske syrer i brokkoli.
- Studere effekten av varmebehandling og lagring på enkle fenoler og polyfenoler i brokkoli og bygg, satt sammen til et helt måltid. Måltidet vil gjennomgå minimal prosessering, varmebehandling og tilbereding, og består av brokkoli, bygg og laks.

## **1.3 Fenoliske komponenter**

Fenoliske komponenter er en stor gruppe forbindelser som finnes i planteriket, og er dannet ved sekundær metabolisme. Deres kjemiske struktur varierer fra enkle fenoler til store polymeriserte komponenter som tanniner. Det er identifisert mer enn 8000 fenoliske forbindelser, og det store mangfoldet gir komponentene mange ulike egenskaper [ Pandey et al., 2009].

Forbindelsene er vesentlige i plantens fysiologi, og er involvert i blant annet vekst, reproduksjon, morfologi og resistens mot patogene organismer. Forbindelsene beskytter i tillegg planten mot skadelig UV stråling, og kan modulere aktiviteten til en rekke enzymer, cellereseptorer og transkripsjonsfaktorer [ Lule and Xia, 2005; Hole et al., 2009].

Visse polyfenoler er naturlige pigmenter, og gir planten farge. Komponentene kan være fargeløse i uprosessert tilstand, men omdannes til fargeprodukter ved preparering og prosessering.

Forbindelsene er viktige bidragsyttere til smak, og bidrar til bitterhet i sitrusfrukter og grapefrukt. I tillegg har de en viktig rolle i å bevilge smak i øl og vin [ Robichaud and Noble, 2006].

Tidligere har polyfenoler blitt ansett som antinæringsstoffer på grunn av evnen til å interagere med andre næringsstoffer. Fenoler kan binde seg til og reagere med proteiner, karbohydrater, vitaminer og mineraler, og danner store uløselige komplekser som svekker absorpsjon av næringsstoffene [ Lule and Xia, 2005]. Fenoler kan føre til misfarging av produkter. Behandling som kutting, knusing, lagring og for høy eller lav temperatur, kan føre til økt grad av ikke enzymatiske (oksidasjon) og enzymatiske reaksjoner som resulterer i misfarget og bruning av produktet [ Lule and Xia, 2005].

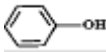
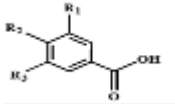
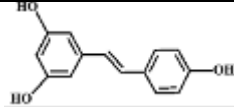
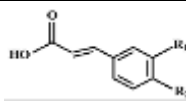
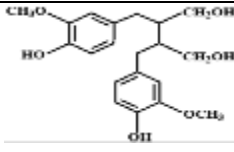
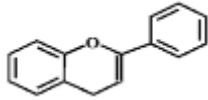
En av de viktigste egenskapene til komponentene er derimot antioksidant egenskapen. Fenoler er svært ustabile forbindelser, og deres kjemiske struktur gir dem egenskap som antioksidant med antiradikal potensialet [ Salah et al., 1995].

### **1.3.1 Klassifisering av fenoler**

Fenoliske komponenter defineres som aromatiske forbindelser med en eller flere hydroksylgrupper. Enkle fenoler inneholder en aromatisk ring, mens forbindelser med flere ringer kalles polyfenoler. Polyfenoler finnes primært i konjugert form, bundet til en eller flere suktermolekyler. De vanligste suktermolekylene er glukose, rhamnose, galaktose, arabinose og xylose. De kan også bindes til hverandre og til andre karbohydrater og organiske syrer, som gir et stort mangfold av forbindelsene. Polyfenoler klassifiseres ut ifra antall fenolringer og elementer som binder dem sammen. Det kan deles inn i hovedgruppene fenoliske syrer og flavonoider, og to mer ukjente grupper stilbener og lignaner [Spencer et al.,2008]. Fenylalanin danner utgangspunkt for fenoler og første trinn blir katalysert av Fenylalanin Ammonium Lyase (FAL). FAL fjerner ammonium og danner trans- kaneltsyre, som blir katalysert videre til andre fenoler [Andersen og Markham, 2006].

Hovedgruppenes kjemiske struktur er vist i tabell 1.1.

Tabell 1.1 Hovedklasser av fenoliske komponenter

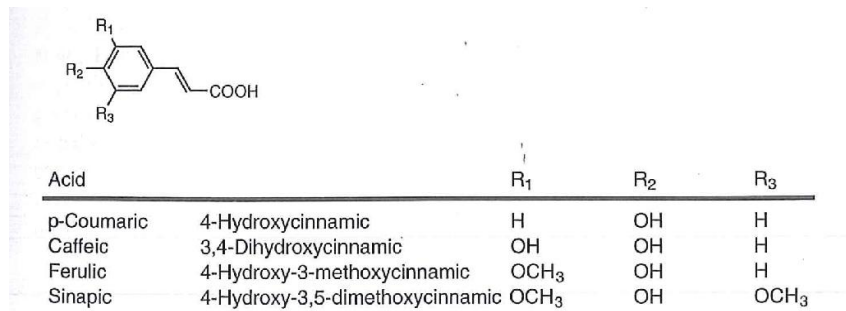
Klasse	Grunnskjelett	Struktur
Enkle fenoler	C6	
Fenoliske syrer:		
Derivater av benzosyre	C6-C1	
Derivater av cinnamisyre	C6-C3	
Stilbener	C6-C2-C6	
Lignaner	(C6-C3)n	
Flavonoider	C6-C3-C6	

### 1.3.2 Fenoliske syrer

Fenoliske syrer sammenfatter en gruppe av ulike organiske syrer. Syrene som finnes i planter kan deles i to undergrupper, avhengig av antall karbonatomer i sidekjeden festet til den aromatiske ringen. De to gruppene er derivater av benzosyre (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) og kanelisyre (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) [Waterman & Mole, 1994].

Fenoliske syrer utgjør en tredjedel av polyfenoliske komponenter i kosten, og finnes i alle planter [Pandey & Rizvi, 2009].

I spiselige planter er konsentrasjonen av hydroksybenzosyre generelt lav, med unntak av noen få frukt og grønnsaker som kan ha større mengder. Hydroksykanelysyrer er mer vanlig, og hovedrepresentantene er p- kumarinsyre (p- CA), ferulsyre (FA), sinapinsyre (SA) og kaffeinsyre (CA). Syrederivatene finnes i nesten all plantemat og er spredt i røtter, stammen, frøet og bladene [Robbins, 2003]. Figur 1.1 viser den kjemiske strukturen til de mest rikelige syrene.



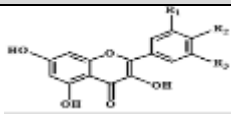
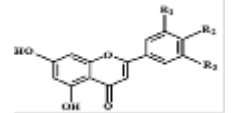
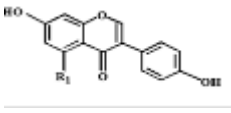
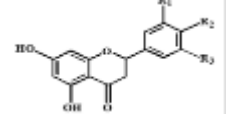
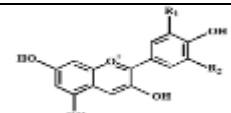
**Figur 1.1** Kjemisk struktur på fenoliske syrer.

Hovedsakelig finnes syrene i bundet tilstand, men kan også eksistere som frie. De bundne syrene kan være glykosylerte, polymere eller ester- bundet. De mest rikelige syrene i korn er ester bundet til arabinosylan og ligning i celleveggen [ Holtekjølen, et al., 2006]. Kryssbindingen kan påvirke flere egenskaper til planten som blant annet reduserer enzymatisk degradering av cellevegg og har en positiv påvirkning på celleveggs varmestabilitet[ Bunzel, et al., 2004].

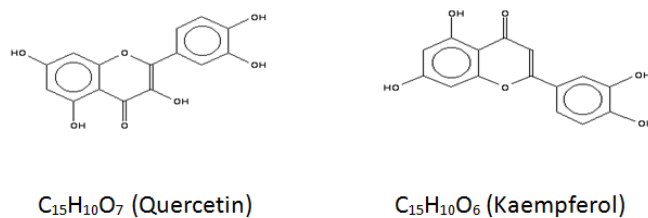
### 1.3.3 Flavonoider

Flavonoider består av to aromatiske ringer som er bundet av tre karbonatomer som danner heterocykliske forbindelser. Forbindelsene kan deles inn i seks undergrupper: flavonol, flavon, isoflavon, flavanon, antocyanin og flavanol. Det er innholdet av ulike typer heterosykliske molekyler som bestemmer hvilken undergruppe flavonoidet tilhører. Den kjemiske strukturen til undergruppene er vist i tabell 1.2

**Tabell 1.2** Kjemisk struktur til undergrupper av flavonoider.

Undergruppe	Struktur
Flavonol	
Flavon	
Isoflavon	
Flavanon	
Antocyanin	

Flavonoider er de mest rikelige polyfenoliske komponentene i kosten, og flavonol er den største representanten. To store flavonoler er quercetin og kaempferol. Komponentene er glykosylerte, det vil si at de er bundet til et suktermolekyl. Dette sukkeret er som oftest glukose eller rhamnose, men kan også involvere andre som blant annet galaktose og arabinose [Manach et al., 2004]. Den kjemiske strukturen til flavonolene er vist i figur 1.2. Hovedsakelig er suktermolekylet bundet til flavonoidets kjerne via en  $\beta$ - glykosid binding, og kan bindes til flere posisjoner på flavonoidet. Dette resulterer i et stort antall ulike glykosider. Glykosider er hovedsakelig lokalisert i cellens vakuoler.



Figur 1.2 Kjemisk struktur til to hovedrepresentanter av flavonol, quercetin og kaempferol. [ <http://webbook.nist.gov>].

Flavonoider som ikke er bundet til et suktermolekyl, kalles aglykoner. Et aglykon danner grunnkjellet i molekylet. Aglykoner er ikke til stede i ferske matplanter, men kan bli dannet ved prosessering av maten [Santos-Buelga & Williamson, 2003].

### 1.3.4 Opptak av enkle fenoler og polyfenoler

Mat inneholder varierende mengde enkle fenoler og polyfenoler. Komponentene som finnes i størst mengde i maten, behøver ikke nødvendigvis å være de mest aktive i kroppen. Dette kan være av årsaker som dårlig absorpsjon i tarm og høy grad av metabolisering. Den delen av næringsstoffene som blir fordøyd, absorbert og metabolisert kalles biotilgjengelighet, og varierer fra et polyfenol til et annet. Det er også varierende hvor polyfenolene blir absorbert. De fleste aglykoner kan absorberes i tynntarmen, men i maten er polyfenoler oftest til stede som estere, glykosider og polymere og kan ikke absorberes. Det vil si at de må gjennom en hydrolyse utført av tarm enzymer eller tarmflora før absorpsjon. En rekke konjugeringer i tarmcellene fører til at metabolittene som når blod og vev, er ulike fra de som finnes i maten. Det er komponentenes kjemiske struktur, og ikke mengde, som bestemmer absorpsjon og hvilke metabolitter som til slutt sirkulerer rundt i blodet [Manach, et al., 2004; Pandey & Rizvi, 2009; D'Archivio et al., 2007].

### 1.3.5 Daglig inntak av enkle fenoler og polyfenoler

Et plantebasert måltid vil vanligvis resultere i et inntak av relativt små mengder av flere forskjellige fenoliske komponenter. Sannsynlig er det den samlede effekten av alle komponentene som gir helsegevinst, og det er dette som er observert ved inntak av frukt, grønnsaker og korn. Det offentlige

rådet for daglig inntak av frukt og grønnsaker er 250gram hermetiske, rå eller varmebehandlede grønnsaker. Det anbefales å spise grove kornprodukter hver dag. Kornproduktene bør gi til sammen 70- 90g fullkorn, og inkludere 25-35g fiber [Helsedirektoratet, 2011, kostholdsråd]. Det er derimot ingen konkrete råd om inntak av enkle fenoler og polyfenoler. Mat inneholder varierende mengder av komponentene, som kan gjøre det vanskelig å råde befolkningen om mengde som bør inntas. Et kosthold helt fritt for polyfenoler er imidlertid vanskelig å finne. Studier viser at et daglig inntak av polyfenoler kan variere mellom 100 mg og 2 g. En stor faktor er i midlertidig om personen drikker kaffe [Scalbert & Williamson, 2000; Clifford, 2004]. Andre studier viser at daglig inntak av fenoliske syrer varierte mellom 6mg og 987 mg [Radtke et al., 1998], og inntak av flavonoler mellom 20-25 mg [Justesen et al., 1997].

#### **1.4 Frie radikaler og antioksidanter**

Kroppen danner frie radikaler i naturlig metabolisme, som kan være en del av immunforsvaret mot virus og bakterier.

Frie radikaler er svært ustabile, reaktive og energirike molekyler som har uparet elektroner. Frie radikaler kan sammenfattes som ROS (reaktive oksygen arter) og inkluderer superoksid ( $O_2^-$ ), hydroksyl ( $-OH^{\cdot}$ ), peroksyd ( $-ROO^{\cdot}$ ), alkosyl ( $-RO^{\cdot}$ ), nitroksid ( $-NO^{\cdot}$ ) radikaler. Faktorer som kan forårsake frie radikaler er blant annet forurensing, stråling og sigarett røyk. Frie radikaler angriper andre molekyler og kaprer elektronene som trengs for stabilitet. De angrepne molekylerne blir til frie radikaler og kjedereaksjoner starter. Kjedereaksjonene kan initiere lipidperoksidasjon, og resultere i destabilisering av cellemembraner og oksidasjon av andre komponenter som protein og DNA.

En antioksidant er et molekyl som er i stand til å bremse ned eller hindre oksidering av andre molekyler. Antioksidanter virker ved å donere egne elektroner til de frie radikalene og bryter kjedereaksjonene ved å fjerne radikale mellomprodukter. Fordi antioksidanter er stabile i begge tilstander, resulterer ikke dette i dannelsen av et nytt radikal. Ved ubalanse i nivået mellom antioksidanter og frie radikaler, svekkes kroppens forsvar mot sykdommer som blant annet kreft og hjerte - kar sykdom.

Antioksidanter blir benyttet i industrien som konserveringsmiddel, og kan begrense nedbrytning, harskning og misfarging som forårsakes av oksidasjon [Kaur & Kapoor, 2001].



### **1.5 Brokkoli (*Brassica oleracea ssp. Italica*)**

Brokkoli tilhører korsblomstfamilien og slekten *Brassica*, sammen med blant annet grønnkål og blomkål. Den gamle kulturplanten kom ikke til Norge før i slutten av 1930 tallet, men ble dyrket av grekerne og romerne allerede for over 2000 år siden.

Brokkoli har et grønt, kolorofyllrikt hode, som har blomsterknopper på alle forgreiningene. Forgreiningene er tykke og sprø blomsterstilker, som strekker seg oppover og slik at hodet løser seg opp [Figur 1.3]. Brokkoli må høstes før blomsterknoppene åpner seg [Bavoll, 1995]. Brokkoli er en næringsrik vekst, og har et høyt innhold av vitamin, jern, kalsium. Den er i tillegg en ypperlig kilde til andre helsefremmende komponenter som polyfenoler, karotenoider og glukosinolater. Grønnsaken blir spist både i rå og varmebehandlet tilstand.



Figur 1.3 En brokkoli (*Brassica oleracea ssp. Italica*). [Opplysningskontoret for frukt og grønt].

#### **1.5.1 Fenoliske komponenter i brokkoli**

Innholdet av fenoliske komponenter i brokkoli varierer, avhengig av vekstforhold, vær, sort, etc. i tillegg til at fordelingen mellom ulike plantedeler kan være ujevn. Mengden av komponentene som detekteres er også avhengig av analysemetode benyttet [Kong et al. 2012]. Flavonoider er den dominerende klassen av fenoliske komponenter i brokkoli, hvor flavonol aglykonene, quercetin og kaempferol, er de største representantene [Bahorun 2004].

Tidligere studier fant at brokkoli har et totalt flavonol innhold på 100mg/kg [Hollman & Arts,], og tilsvarende 600mg/kg totale flavonoider. [Vallejo, et al.<sup>a</sup>, 2003]. Mengden var beregnet per frisk materialet.

Det totale fenolinnholdet i brokkoli ble målt til mellom 800- 1200mg/ 100g tørrvekt ved to andre studier [Gliszczynska-Swiglo, et al., 2006; Turkmen et al., 2005] hvilket tilsvarer det omtrent det samme innholdet som i 1 kg fersk brokkoli. Det er de ytre delene av brokkolien som inneholder høyest konsentrasjon (kapittel 1.5.2).

## **1.6 Matplanter**

### **1.6.1 Plantecellens oppbygging**

En plantecelle består av cytoplasma hvor cellekjerne, vakuole, mitokondrier og andre organeller finner sted. Hver av de ulike organellene har en spesiell funksjon.

En membran omgir cellen, og bestemmer bevegelse av molekyler inn og ut av cellen. Denne membranen er igjen omgitt av en cellevegg som består hovedsakelig av cellulose - og pektin forbindelser. Plantevevets form er avhengig av både sammensatte cellevegger, trykk fra innsiden av cellen og støtte fra cellestrukturen [Beckett, 1995].

### **1.6.2 Plantens innhold av fenoler og faktorer som påvirker nivået**

En plante inneholder varierende mengder fenoler. Løselige fenoler er lokalisert i plantens vakuoler, mens uløselige er bundet til celleveggen. [Pandey & Rizvi, 2009; Wink, 1997]. Den største mengden av fenoler ligger i det ytre cellesjiktet, kalt epidermis [Bengtsson, et al., 2006]. Fenoliske komponenter er svært følsomme for endringer i miljøet, og blir påvirket av biotiske (insektbitt eller infeksjon av patogene organismer) og ikke-biotiske stressfaktorer (som lys, temperatur, vekstforhold og UV-stråling) på planten. Alle faktorer som eksponering av sollys, modenhet ved høstetidspunkt, og behandling etter høsting som lagringsforhold og prosessering påvirker plantens totale innhold av polyfenoler [Galgano, et al., 2007].

## **1.7 Prosessering av matplanter**

Prosessering av matplanter inkluderer en rekke metoder som omdanner det rå plantematerialet til et mer spiselig produkt. Industrien prosesserer mat for å danne et stabilt og holdbart produkt.

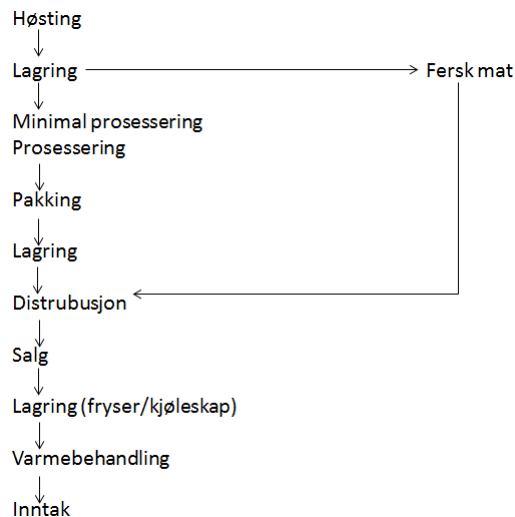
Varmebehandling er en av de viktigste metodene benyttet ved prosessering av mat. Metodene kan forbedre produktets smak og tekstur, og samtidig ødelegge enzym og mikrobiologisk aktivitet, insekter og parasitter. Varmebehandling er en av de viktigste årsakene til endring av matens næringsinnhold. Noen viktige endringer er økt fordøyelighet av stivelse og proteiner, nedbrytning av antinæringsstoffer, varmelabile og oksygensensitive vitaminer [Fellows, 1992].

Maten blir ofte minimalt prosessert (vasket, trimmet, kuttet, strimlet, etc.) som en innledning til varmebehandling. Varmebehandling kan være blansjering (en lett varmebehandling) før nedkjøling eller frysing. Dette blir gjort for å spare plass, kostnad og forlenge holdbarheten på produktet.

Videre blir maten tilberedt i hjemmet, og vanlige metoder benyttet er koking i vann, vanndamp og varming i mikrobølgeovn (varmebehandling med varierende styrke).

Kvalitet kan defineres ved flere faktorer og inkluderer tekstur, smak, farge og næringsinnhold. Målet ved matproduksjon er å optimalisere prosesseringsteknologien. Dette innebærer å bevare eller forbedre matens ønskelige egenskaper i størst mulig grad, og redusere skader ved prosessering.

Hvert trinn i matproduksjon kan påvirke produktets kvalitet (se figur 1.4)



Figur 1.4 Trinnene ved matproduksjon fra høsting av materialet til et spiseklart produkt for forbrukerne

### 1.7.1 Minimal prosessering

Minimale prosesserte grønnsaker inkluderer vasking, skrelling, kutting eller strimling før innpakning og lagring, uten at plantedelens celler dør. Kun de celler som skåres over dør. Hensikten med minimal prosessering er å bevare produktet fersk, men lett stelt uten å tape næringskvalitet. Produktet bør også ha tilstrekkelig lang holdbarhet til å gjennomføre distribusjon til ulike områder. Minimal prosessering kan gi produktet nærmest lik kvalitet som den ferske råvaren, og omfatter smak, tekstur, farge og det generelle utseende. De lett prosesserte produktene er særlig viktig for matservice industrien, som restauranter og catering, som sparer tid og oppnår mindre avfallutbytte [Beckett, 1995].

### 1.7.2 Koking

Koking er en varmebehandlings teknikk som benyttes til å forbedre produktets smak og spiselighet. Teknikken omfatter flere behandlinger som koking i vann og i mikrobølgeovn. Koking utføres ved å eksponere produktet for kokende vann (100 °C) eller damp i en viss tid avhengig av type, bitstørrelse og ønsket slutt kvalitet på produktet. Kokt mat kan ofte lagres lenger ved riktig kjøle temperatur, enn ved deres ukokte tilstand.

### 1.7.3 Blansjering

Blansjering er en metode hvor produktet blir utsatt for varmt vann (80 -100 °C) få minutter, og deretter raskt avkjølt. Blansjeringstiden varierer med type materiale, bitstørrelse og blansjeringstemperatur. Hensikten med metoden er å inaktivere enzymer, som gir forringelse av produktet (usmak og misfarge), og redusere antall mikroorganismer. Blansjering utføres for å danne et lagringsdyktig, stabilt produkt med høy kvalitet. Frysing av ublansjerte produkter, kan ikke inaktivere enzymer alene, og det oppstår uønskede endringer på utseende og næringsinnhold under lagringen [ Jongen, 2002].

### 1.7.4 Sous vide

"Sous vide"- teknikken er en innovativ variant av blansjering, og interessen øker stadig blant cateringindustrien. Det rå materialet blir pakket inn i vakuumposer, og kokt ved produktets spesifikke temperatur. Vakuumpakning gir produktet en skånsom varmebehandling uten oksygentilgang, som beskytter komponenter som lett oksideres.

Sous vide metode er kjent for å gi en utmerket kvalitet, sensorisk og næringsinnhold, på produktet. En av fordelene ved metoden, er mindre lekkasje av vannløselige komponenter [Werlein, 1998].

En risiko ved sous vide prosessering, er derimot potensialet for anaerobe mikroorganismer.

### 1.7.5 Oppvarming i mikrobølgeovn

Mikrobølger er elektromagnetisk energi som penetrerer maten med bølger, og blir omdannet til varme. Mikrobølgene absorberes av vannmolekylene som vil bevege seg raskere. Denne bevegelsesenergien omvandles underveis til infrarød stråling, som vi oppfatter som varme. Varmeabsorpsjonen fra bølgene blir delvis bestemt av matens vanninnhold. Mat med høyere vanninnhold vil dermed absorbere energi og varme raskere. Mikrobølgene, (samt radiobølger) gir en ujevn oppvarming på grunn av ulik energiabsorpsjon i ulike materialer. Interessen for mikrobølgevarming blir stadig større, og mye av grunnen er den raske oppvarmingen og lite synlige endringer på produktet. Metoden brukes mest ved tilberedning, men også ved fremstilling av noen ferdigmatprodukter. Sikker varmebehandling med mikrobølger bør alltid være sterkere enn et produkt eller en rett, enn det som er optimal for alle deler. Det vil si at materialet som krever lengst tid til oppvarming, bør bestemme energien som er nødvendig for hele retten [ Fellows, 1992].

## **1.8 Lagring av matplanter**

### **1.8.1 Kjølelagring**

Kjølelagring er en metode hvor temperaturen på maten er redusert til mellom -1 °C og 8 °C. Metoden benyttes til å redusere biokjemiske og mikrobiologiske endringer, og forlenge holdbarheten til det ferske eller prosesserte produktet.

Kjølelagring i løpet av en begrenset tid fører til minimale endringer av kvaliteten, sensorisk og næringsinnhold, på produktet. På grunn av dette kan produktene ansees som "sunne" og "ferske" [Fellows, 1992].

Temperatur er en helt avgjørende faktor ved lagring. Lav temperatur reduserer respirasjon og transpirasjon, vekst av mikroorganismer, etylenproduksjon og hemmer enzymreaksjoner.

For lav temperatur kan derimot gi produktet frost skade. Det vil medføre celleødeleggelse og det oppstår enzymatiske og ikke -enzymatiske reaksjoner. Resultatet er endret kvalitet på produkt som tap av smak og misfarging.

En annen kritisk faktor ved lagring er produktets vanninnhold. Vann er nødvendig for enzymaktivitet, mikrobiologisk vekst og kjemiske reaksjoner. Biologisk materiale vil hele tiden justere fuktinnholdet ved å avgi og absorbere vann. Ved lagring av materialet er det viktig å hindre denne vann utvekslingen, samt forlenge lagringstiden. Dette kan gjøres ved kontrollert fjerning av vann, som frysetørking, og ved innpakning av materialet. Når det "frie" vannet i materialet fjernes, reduseres veksten av mikroorganismer [Beckett, 1995].

### **1.8.2 Fryselagring**

Fryselagring er en metode hvor temperaturen til produktet er redusert til under frysepunkt, og vannet omdannes til is krystaller. Rask nedfrysing gir mindre is krystaller. Is har et større volum (9 %) enn rent vann, og ved frysing kan produktet bli utvidet. Vanlig lagringstemperatur over lengre tid er -18 °C.

Fryselagring er en mye benyttet metode, og har ført til tilgang på grønnsaker også utenom sesongtid [Fellows, 1992].

## **1.9 Effekt av prosessering på plantematerialet**

Enkle fenoler og polyfenoler er svært ustabile forbindelser som kan gjennomgå flere reaksjoner ved prosessering og lagring av mat. Reaksjonene inkluderer biokjemiske og kjemiske prosesser. Den viktigste biokjemiske prosessen er enzymatisk oksidasjon, og starter når cellens integritet ødelegges. Det finnes i tillegg andre enzymer som kan katalysere degradering og omdannelse av fenolene, og de vanligste er polyfenoloksidase og peroksidase [Fellows, 1992]. Kjemiske reaksjoner forekommer samtidig, men blir relativt sterkere når enzym aktiviteten reduseres [Cheynier, 2005].

### **1.9.1 Effekt av varmebehandling på fenoliske innholdsstoffer**

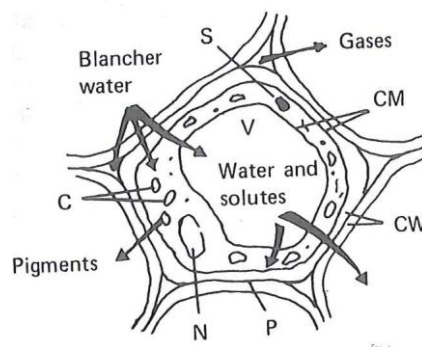
Varmebehandling ødelegger cellenes integritet og cellevegger, som fører til at komponenter lekker ut eller kommer i kontakt med enzymer. Dette vil starte reaksjoner som kan endre de fenoliske komponentene som finnes i cellen. Ved tilstrekkelig sterk varmebehandling vil alle enzymer denaturere og inaktiveres. Dette er hovedhensikten med blansjering, slik at fenoler, næringsstoffer og andre innholdsstoffer ikke så lett brytes ned.

Effekten av varmebehandling på fenoler og flavonoider har vist å være ulik i ulike produkter. Forskjeller i prosesseringsmetodene vil i tillegg ha ulik effekt på de enkelte komponentene. Industriell prosessering som blansjering og andre kokemetoder, samt frysing er forventet å påvirke både kjemisk sammensetning, utbytte og biotilgjengelighet av antioksidantene [Turkmen, et al., 2005; Podsdek, et al., 2006; Cermak, 2009]. Antioksidantene kan ved behandling omdannes til mer aktive komponenter som følge av blant annet deglykosylering. Figur 1.5 viser virkningen av blansjering på plantevevet.

Mengden vann benyttet ved koking påvirker også utlekking og tap av komponenter. Kokemetoder som anvender mindre kokevann, særlig dampkoking, har vist større retensjon [Lopez-Berenguer et al., 2007]

Varmebehandling påvirker også enzym aktiviteten, og de potensielt farlige enzymene kan bli inaktivert. Generelt vil høyere temperaturer over lengre tid føre til større ødeleggelse av enzymer og mikroorganismer. Naturlige pigmenter kan bli degradert ved varmebehandling, og produktet kan endre farge. Flere studier viser at klorofyll blir degradert ved koking [Knøchel & Vangsgaard, 1997; Yuan, et al., 2009].

Ved varmebehandling øker vannkapasiteten til produktet, luft blir fjernet fra cellen, vevet blir mykere, og dette resulterer i en bløtere tekstur på produktet [Jongen, 2002].



**Figur 1.5 Effekt av blansjering på plantevevet. S, gelatinisert stivelse; CM, endret cytoplasmisk membran; CW, endret cellevegg; P, modifiserte pektiner; N, denaturerte proteiner fra nukleus og cytoplasma; C, forvridde kloroplaster [Fellows, 1992]**

### 1.9.2 Effekt av lagring

Kjøling er den mest vanlige teknikken benyttet til å forsinke forringelse og tap av kvalitet på produktet. Imidlertid kan bruk av denne teknikken fortsatt føre til betydelig tap av naturlige antioksidanter [Galgano, et al. 2007].

Lagring av ustabile produkter kan føre til oksidering av fenoliske komponenter, og resultere i dannelse av polymeriserte substanser. Substansene kan endre produktets kvalitet, slik at fargen blir brun eller svart

Frysing er en annen godt benyttet teknikk, som nedsetter kjemiske reaksjoner i produktet. Den vil derimot ikke inaktivere enzymer, og blir derfor ofte anvendt etter blansjering. Nedfrysing fører til dannelse av is krystaller i produktet. Krystalliseringen vil punktere celle membraner, og produktet kan miste sin faste tekstur. Nedbrytningen av cellene, kan også føre til at enzymer (dersom de ikke har blitt inaktivert) og substrater blir blandet, og det kan utvikles uønsket farge og smak på produktet. Rask nedfrysing gir mindre is krystaller, fastere tekstur og bedre kvalitet [Beckett, 1995].

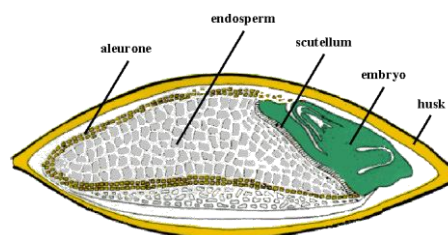
### 1.10 Bygg (*Hordeum vulgare L.*)

Bygg er en av de eldste dyrkede kornslagene, og rangeres som blant topp fem av korn produksjon i hele verden. Kornet er en god kilde til mel, dyrefôr og malt til øl. Interessen for bygg til bruk i mat produksjon øker, mye på grunn av kornets høye innhold av helsefremmende bioaktive komponenter. Bygg har et stort potensial til å redusere risiko for kroniske livsstilssykdommer, som hjerte- kar sykdom og Diabetes type II. Den positive helsegevinsten er hovedsakelig koblet til et høyt innhold av kostfiber, men også fenoliske komponenter bidrar til den positive effekten [Newman & Newman, 2008].

Bygg er en plantesort som tilhører familien *Poaceae*, stammen *Triticeae* og slekten *Hordeum*. Slekten inkluderer totalt 32 arter, og deles i seksjoner etter morfologiske trekk og geografisk opprinnelse. Dyrket bygg (*H. vulgare. ssp. Vulgare*) som benyttes i dag, er trolig utviklet gjennom mutasjoner fra sin ville form (*H. vulgare. ssp. Spontaneum*) Det finnes bygg både med to - og seks korn rader i akset. Dyrket bygg kan ha begge typer, mens vill bygg vanligvis har to korn rader [ Newman & Newman, 2008].

Et modent byggkorn inneholder mellom 78-83 % karbohydrater, hvor stivelse utgjør rundt 50-70 % og befinner seg i endospermen. De resterende karbohydratene er polysakkarider i celleveggen, inkludert  $\beta$ -glukan, cellulose og arabinoksyfan. Det meste av vitaminer, mineraler og kostfiber finnes i de ytre lagene av kornet.

Bygg blir høstet med et intakt skall, men det finnes også bygg sorter uten skall. En byggkjerne veier gjennomsnittlig 35gram, og består av et frøhus, frøkappe kim og endosperm. De ytre lagene av kornet kalles aleuronlaget, som er omgitt av et ytre skall[ Figur 1.6]. De grunnleggende anatomiske delene av bygg planten er røtter, stammen, blader, akset og kjerne.



Figur 1.6 Et byggkorn som består av frøhus, frøkappe, kim og endosperm. De ytre lagene som omgir kjernen, er kalt aleuronlaget. Kornet er beskyttet av et ytre skall.

### 1.10.1 Fenoliske syrer i bygg

Det totale innholdet av fenoliske syrer i bygg er avhengig av både byggsort og dyrkingsforhold. En studie fant det totale fenoliske syreinnholdet til å variere mellom 604 to 1346 $\mu$ g/g i byggmel [Holtekjølen et al., 2006]. Det ytre laget av kornet inneholder størst mengde av totale fenoliske syrer (0,6-0,9 %), mens i endosperm er mengden betydelig lavere ( $\geq 0,1$  %) [Shahidi, 1997]. Bygg inneholder både frie og bundne fenoliske syrer. Ferulsyre er den dominerende frie syren både i frøet og kien. Det totale innholdet av fenoliske syrer har vist et innhold på tre til seks ganger høyere i umodne frø enn i modne frø ved høstetidspunkt. Bundne syrer i bygg inkluderer blant annet sinapinsyre og kaffesyre, og de to dominerende syrene ferulsyre og p- Kumarinsyre. Den største mengden av syrene er lokalisert i de ytre lagene av kornet, hvor 75-90 % av totale mengden ferulsyre



og p- Kumarinsyre finnes. Ferulsyre er den dominerende syren i aleuronlaget, mens p- Kumarinsyre er størst i skallet [Shahidi & Naczki, 2004].

Syrene er esterbundet til arabinoksylen og ligning i celleveggen, både i aleuronceller og skallet. Den bundne FA kan danne diferulsyre (DFA) broer, kryssbinde arabinoksylenkjeder og dermed styrke celleveggen [Holtekjølen, et al., 2006].

### 1.10.2 Prosessering av bygg

Bygg må prosesseres for å bli spiselig. Prosesseringsmetodene endrer kornets fysiske form og størrelse, forbedrer smaken, endrer fordøyeligheten av næringsstoffer og forlenger holdbarhet. Som tidligere nevnt blir bygg høstet med et intakt skall.

Skallet(inneragn) sitter fast på karyopsen, og må slipes bort. Avskalling og sliping er prosesser hvor det ytre laget på kornet blir gradvis fjernet. Skallet kan representere 10-13 % av kornets tørrvekt, men ved kommersielle slipemaskiner kan så mye som 20 % fjernes. Sliping forekommer vanligvis etter avskalling, og utføres i tre eller flere trinn. Slipingsgraden blir angitt i prosent, som gjengir mengde kjerne fjernet under prosessen. Kommersiell slipt byggkorn representerer vanligvis 60-70 % av det opprinnelige kornet [Newman & Newman, 2008]. Under behandlingen fjernes inneragn, frøskall, aleuronlaget og kime, og kun den sentrale kjernen blir til gryn. Det ufordøyelige skallet og kimens høye fettinnhold, samt kontaminanter, blir fjernet og produktets holdbarhet forlenges. Samtidig vil sliping føre til reduksjon i uløselige fiber, protein, vitaminer og mineraler som ligger i de ytre lagene, og øker innholdet av stivelse og  $\beta$ -glukan. Kornet kan også bli malt til både helkorn og avskallet mel ved hjelp av ulike møller, og kan tilsettes i brød, supper etc.

Byggkornet gjennomgår endringer under koking som gelatinisering av stivelse, denaturering av proteiner og dannelse av stivelse- lipid komplekser. Koking inaktiverer antinæringsstoffer som hemmer blant annet proteinfordøyelighet, og øker fordøyeligheten av også andre næringsstoffer. Samtidig fører koking og etterfulgt avkjøling til utvikling av resistens stivelse(som har samme funksjon som kostfiber). Fordi stivelsen øker vannbindingsevne, blir resultatet et mykere og mer spiselig byggkorn [Slavin et al., 2000; Newman og Newman, 2008]

Under koking vil også cellulære komponenter brytes ned og kan føre til økt frigjørelse av bundne fenoliske syrer. Dette var observert ved økt innhold av totale fenoler [Gallegos-Infante et al., 2010; Boateng et al., 2008]

## **1.11 Analysemetodikk**

### **1.11.1 Identifisering av flavonoider**

Flavonoider kan identifiseres ved HPLC som gir et typisk elektromagnetisk spektrum som består av to absorpsjonstopper i området 240-285nm(bånd II), og 300-450nm(bånd I). Alle flavonoider viser maksimum bølgelenge absorpsjon i bånd II, som gir en mer uspesifikk identifikasjon enn i bånd I.

Det er ikke bare toppene som er viktig i identifisering av flavonoidene, men også spekterets form. Ulike hydroksyl substituenten kan påvirke spekterets form, som gir variasjon innenfor områdene [ Santos & Williamson, 2003].

### **1.11.2 Identifisering av fenoliske syrer**

Derivater av benzosyre har et absorpsjonsmaksimum i et spekter i området 200-290nm. Fordi kanelsyrederivatene har en ytterligere konjugering, inneholder de i tillegg et bredt absorpsjonsbånd i området 270-360nm.

Absorpsjonstoppene har store likheter, og ved identifisering av syrene bør både retensjonstid, topp symmetri og UV-spektrum sammenlignes [ Robbins, 2003].

### **1.11.3 Ferric Reducing Antioksidant Power/ Antioksidantkapasitet**

For å måle planteekstraktets totale antioksidantkapasitet kan en FRAP metoden benyttes, som er en enkel og rask metode. Prinsippet med metoden er å måle ekstraktets evne til å redusere et Fe(III) kompleks til Fe(II).

Når jernet  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$  reduseres til  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$  gir det en endring i absorpsjon ved 593nm, og en blåfarge fremkommer. Denne endringen er proporsjonal med den totale reduserende evnen til elektron-donerende antioksidanter i reaksjonsblandingen. Ved å sammenligne absorbansen i prøvene med en standardkurve med kjent antall reduktanter, kan antioksidant aktiviteten i materialet måles. Den uspesifikke metoden skiller ikke mellom ulike komponenter, men måler kun den totale aktiviteten.

Antioksidantkapasiteten (FRAP -verdien) blir uttrykt mmol Fe/L prøve [Benzie og Strain, 1999].

### **1.11.4 Totale fenoler/ Folin-Ciocalteu's metode**

Folin -Ciocalteu er en metode for å kunne kvantifisering fenoliske komponenter.

Metoden er basert på reduksjon av molybden og wolframoksider av fenoler i basisk løsning. I basisk løsning vil det fenoliske protonet skille seg, og det dannes et anion som kan redusere Folin-Ciocalteaus reagens(FCR). Metoden er rask og enkel, og brukes til å bestemme innhold av totale

fenoler. Metoden skiller derimot ikke mellom de ulike gruppene av fenoler. [Singleton, 1999]. Det medfører at andre komponenter i maten, som karotenoider, aminosyrer, sukker og vitamin C, kan forstyrre og resultatet blir overdrevet. Det totale fenolinnholdet blir uttrykt som mg gallesyreekvivalenter(GAE)/100 g [Singleton and Rossi, 1965].

## 2 Eksperimentelt

### 2.1 Introduksjon

Den eksperimentelle delen av oppgaven ble delt i tre deler. Del I (Brokkoli), del II (Bygg) og del III (Et helt måltid). Tabell 2.1 viser oversikten over materialet, prosesseringsmetode og analyser som ble utført i den eksperimentelle delen av oppgaven.

**Tabell 2.1 Oversikt over materialet, prosesseringsmetode og analyser som ble utført i eksperimentene**

Del	Materialet	Prosessering	Analyse
I	<b>Brokkoli</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hele buketter</li> <li>• Halve buketter</li> <li>• Knopper</li> </ul>	Kok/kjøøl, Sous vide, Kjølelagring	Flavonoider, fenoliske syrer
II	<b>Bygg</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Helkorn</li> <li>• Avskallet bygg</li> <li>• Byggmel</li> </ul>	Avskalling, maling, bløtlegging, koking, grøt	FRAP, totale fenoler, fenoliske syrer
III	<b>Et sammensatt måltid</b>		
	(Laks, brokkoli, bygg)	Minimal prosessering, lagring, mikrobølgevarming	Flavonoider, fenoliske syrer, totale fenoler, FRAP

### 2.2 Oversikt over kjemikalier og utstyr benyttet i eksperimenter

**Tabell 2.2 Kjemikalier**

Produkt	Leverandør
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eddiksyre	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Etylacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	Sigma Chemical
Ferulic acid (standard)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Folin-Ciocalteu`s fenolreagens	VWR International, CE
Gallesyre	Sigma-Aldrich, Norway AS
Hydrogenklorid, HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Jernsulfat	Riedel-de Haen AG
Kaempferol (standard)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tyskland
Caffeic acid (standard)	Fluka, (Sigma Aldrich, Sveits)
Chlorogenic acid (standard)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tyskland

Metanol	Merck KGaA, Tyskland
Natriumkarbonat	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Nitrogen, flytende	
N <sub>2</sub> - gass	
P-Coumaric acid (standard)	Sigma-Aldrich,
Quercetin (standard)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tyskland
Sinapinsyre standard	Fluka Chemie GmbH, (Sigma-Aldrich, Sveits)
TPTZ	Fluka Chemie GmbH, (Sigma- Aldrich, Sveits)
Trolox	Fluka Chemie GmbH, (Sigma-Aldrich, Sveits)
Forkortelser er brukt i henhold til tidligere oversikt	

Tabell 2.3 Utstyr

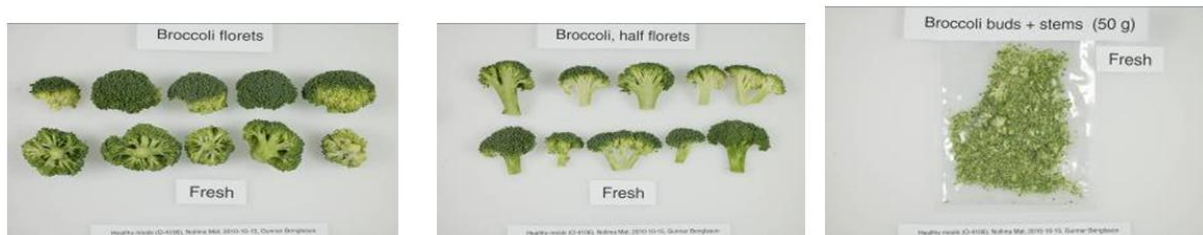
Utstyr	Leverandør
Bisan OS 10 rystemaskin	OS-10 Biosan orbital shaker
Frysetørker	Christ Gamma 1-16
Hamilton sprøyte	KEBO Lab AB
Headspacerør	Agilent Technologies
Kyvette, 2.5ml	Brand GmbH, Tyskland
Morter	
Mølle	Retsch
Pipette	Eppendorf VWR
pH- meter	PHM210 Meterlab
Rotavapor	Buchi E1 131, Sveits
Sentrifugerør, 50 ml	VWR, USA
Spektrofotometer	UV mini 1240
Sentrifuge	VWR International AS
Speed vac inndamper	Thermo electron corporation
Ultralydbad	VWR
Vannbad	GFL
Whirlmikser	VWR
Filter 0,45 µm	Millexpore

## 2.3 Brokkoli

### 2.3.1 Utgangsmaterialet

Brokkoli materialet som ble benyttet i forsøket var tidligere gjennom et varmebehandlingsforsøk utført ved Nofima (2010). Brokkolien var av sorten Ironman og ble dyrket på Skallerud gård på Jeløy i Moss. De ble høstet 107 dager etter såing, og lagret i ett døgn ved 2 °C.

Prøveprepareringen startet med å vaske brokkolihodene i kaldt vann for å fjerne jord og eventuelle kålormer. Hodene ble så delt i hele buketter (kuttet ~ 2cm fra sekundær stilk), halve buketter og knopper+ knoppstilker, med en vekt på henholdsvis 200, 100 og 50gram. Bukettene fra hvert hode ble blandet og tilfeldig fordelt. Figur 2.1 viser brokkolimaterialet ferdig kuttet i buketter.



**Figur 2.1 Brokkolimaterialet benyttet i forsøket. Fra venstre hele buketter (kuttet ~ 2cm fra sekundær stilk.), halve buketter og knopper +knoppstilker med henholdsvis vekt på 200, 100 og 50gram. Foto: Gunnar Bengtsson Nofima AS**

#### 2.3.1.1 Rå brokkoli

Rå brokkoli ble fryst ned ved hjelp av flytende nitrogen, vakuumpakket og lagret ved -80 °C.

#### 2.3.1.2 Varmebehandlet materialet

Det ble benyttet to ulike prosesseringsmetoder, kok - og kjøll og "sous vide"- metode (kapittel 1.7)

Metoden kok - og kjøll ble utført på hele buketter, og vil si at bukettene ble varmebehandlet først, så raskt avkjølt og pakket i vakuumposer. Varmebehandlingen ble utført i både 1,5 minutter og 5 minutter.

"Sous vide" - metoden ble brukt på halve buketter og knopper + stilker. Prøvene ble først pakket i vakuumposer, så varmebehandlet i henholdsvis 8 og 3 minutter og tilslutt avkjølt.

Varmebehandlingen ble utført dag 0, og prøver ble lagret ved 4 °C i mørket 7, 14 eller 18dager. Fra hvert tidspunkt ble det fryst prøver, som ble lagret ved -80 °C for senere kjemisk analyse. Det ble tatt mikrobiologisk undersøkelse (totale antallet aerobe bakterier) av alle prøvene og ut i fra resultatene ble det bestemt at alle prøvene unntatt hele buketter fra dag 14 og 18 skulle analyseres videre. Dette med grunn at hele buketter fra disse to dagene hadde et høyt mikrobiologisk nivå  $\geq 10^6$  cfu/g. Tabell 2.4 viser en enkel oversikt over hvilke materialer som ble benyttet videre i forsøket.

**Tabell 2.4 Brokkolimaterialet som ble benyttet videre i forsøket**

Brokkoli	Dag 0	Dag 7	Dag 14	Dag 18
Hel bukett	+	+	-	-
Halv bukett	+	+	+	+
Knopper +stilker	+	+	+	+

### 2.3.2 Prøvepreparering

Fenoliske komponenter kan bli nedbrutt av enzymaktivitet i fersk eller utørket tilstand, og det var derfor viktig å holde brokkolimaterialet nedfrosset [ Andersen & Markham, 2006]. Dette ble gjort ved å legge brokkolimaterialet i en isoporeske med flytende nitrogen, og kjøle ned alt av utstyr som skulle benyttes i prepareringen. Det ble benyttet ulik preparering av det ubehandlede og varmebehandlede brokkolien.

#### 2.3.2.1 Rå materiale

I det rå materialet av hele og halve buketter, ble grønne knopper skrapet fra stilk og hvite knopper ved bruk av en pinsett. Dette ble ikke gjort i materialet som allerede var preparert som knopper +knoppstilker. For å homogenisere prøvene, ble det benyttet en kjøkkenmaskin som var fryst på forhånd. Alle prøvene ble kvernet i ett minutt.

#### 2.3.2.2 Varmebehandlet materiale

Brokkoli som hadde blitt varmebehandlet, var vanskeligere å håndtere. Det ble lagt i en fryser på – 20 °C, 60minutter før preparering. De grønne knappene kunne ikke skrapes ut, så hele materialet måtte brukes. Først ble brokkoli bukettene grovknut ved bruk av en gummihammer og en metallplate. Så ble de kvernet i kjøkkenmaskinen i ett minutt.

### 2.3.3 Frysetørking og homogenisering

Det ble veid inn 15 gram brokkoliprøve i et 50 mL sentrifugerør, som ble satt til frysetørking over fire dager. Dette er en skånsom metode for å fjerne vann fra prøven. Rørene ble lagt i -40 °C en time før tørking, og ved innsetting ble lokkene åpnet halvveis. Dette må gjøres effektivt for at rørene ikke skal tine og dermed forringe prøvematerialet.

Etter frysetørking ble tørrstoffprosenten til prøvene bestemt ved hjelp av tørrstoffmåler. For å kunne benytte materialet til ekstraksjon, ble det malt til pulver ved bruk av en morter. Ved å bruke en morter, reduseres partikkel størrelsen ytterligere og materialet homogeniseres. I tillegg knuses cellene i materialet, og innholdet i cellen blir frigjort til ekstraksjon løsemiddelet. Figur 2.2 viser frysetørket brokkolimaterialet og morter benyttet i forsøket.



Figur 2.2 En morter som ble benyttet til å male frysetørket brokkolimaterialet til pulver

### 2.3.4 Ekstraksjon av fenoler

Hensikten med ekstraksjon er å fjerne alle fenoliske substanser fra det faste resten av plante materialet.

Det er flere faktorer som kan påvirke ekstraksjonseffektiviteten. Temperatur, pH, antall ekstraksjons omganger og type løsningsmiddel er slike faktorer [Santos-Buelga & Williamson, 2003]. Hvilket løsningsmiddel som benyttes blir valgt ut i fra type fenol som skal ekstraheres. Et eksempel er at polare flavonoid glykosider og aglykoner er vannløselige, og metanol/vannløsning er et godt løsemiddel å benytte til ekstrahering av disse. Ved mindre polare flavonoider, kan etylacetat være et bedre alternativ til ekstrahering [Andersen & Markham, 2006].

### 2.3.5 Ekstraksjon av frie fenoliske syrer fra brokkoli

Metoden som ble utarbeidet for forsøket var en bearbeiding av to tidligere metoder for brokkoli og bygg ved Nofima [Rybarczyk, 2010; Holte et al., 2009].

Det ble veid inn 200 mg brokkolipulver i et 50 mL sentrifugerør med skrukork. For å sikre så lik prepareringstid som mulig, ble prøveserien holdt til under seks prøver. Det ble laget 70 % MeOH i en 150 mL flaske, som ble satt til forvarming i et vannbad med en temperatur på 73 °C. Prøverørene ble satt i vannbadet til temperering i tre minutter. Det ble tilsatt 4,5 mL 70 % MeOH til prøvene og blandet forsiktig. Prøvene stod i vannbadet ytterlige tre minutter. Rørene ble overført til en eske med is for nedkjøling. Siden prøvene også skulle brukes til analyse av glukosinolater i et annet forsøk, ble det tilsatt 100 µL intern standard (sinigrin) ved hjelp av en Hamilton sprøyte.

Prøvene ble sentrifugert ved 4400opm ved 4 °C i 15 minutter. Supernatanten ble overført til nye 15 mL sentrifugerør, og satt på is.

Det ble tilsatt 3 mL 70 % MeOH (romtemperatur) til pelletten, og ved hjelp av en whirl mikser ble den resuspendert. Prøvene ble sentrifugert en gang til som ovenfor, og supernatanten ble kombinert med den første. Det ble overført 2 mL av ekstraktet til headspacerør, som skulle gjennom en syrehydrolyse. Pelletten ble benyttet videre til ekstraksjon av bundne fenoliske syrer.



Det ble utført en syrehydrolyse slik at aglykoner av quercetin og kaempferol ble frigjort.

Det ble tilsatt 2 mL 2M HCl til hvert headspacerør, og nitrogen-gass ble flushet over i ca 15 sekunder.

Prøvene ble satt i vannbad med 94 °C i 90 minutter. Etter hydrolysen ble de nedkjølt på is.

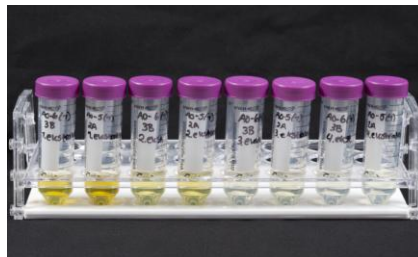
### 2.3.6 Ekstraksjon av bundne fenoliske syrer fra brokkoli

For ekstraksjon av bundne fenoliske syrer, gikk pelletten fra 2.3.3 gjennom en basehydrolyse.

Hydrolysen ble utført ved å tilsette 10 mL 2M NaOH til pelletten.

I metoden ble hydrolysetidene, en, to, fire og 20 timer testet på ekstraktet. På bakgrunn av utbytte av fenoliske syrer, ble 16-20 timer hydrolysetid bestemt. Vurderingen ble støttet av et tidligere utført forsøk på grønnkål [upubl., Olsen, 2008]. Etter hydrolysen ble prøvene nøytralisert til pH 1.3-1.5 med 6M HCL. Det ble deretter utført etylacetat ekstraksjon.

Det ble utført et forsøk av ekstraksjonsutbytte for å bestemme antall ekstraksjonsomganger som skulle benyttes. Det viste seg at to ekstraksjonsrunder var optimalt, da andre ekstraksjonsrunde gav kun en økning i utbytte på 12 % (kapittel 3.2.1) Ved tre ekstraksjonsomganger var utbyttet minimalt. Figur 2.3 viser ekstraktens farge, som var en indikator på fenolinnhold, etter hver av ekstraksjonsrundene.



**Figur 2.3 Bildet viser fargeforskjell etter hver ekstraksjonsutbytte (fra høyre første, andre, tredje og fjerde ekstraksjonsutbytte med to paralleller hver)**

#### *Etylacetat ekstraksjon:*

Det ble tilsatt 10 mL etylacetat til prøvene. De ble ristet på en rystemaskin ved 350opm i 10 minutter, og deretter sentrifugert ved 2800opm i 15 minutter. Etylacetat laget ble overført til nye 50 mL sentrifugerør. Ekstraksjonsrunden ble gjentatt en gang til, og supernatantene ble kombinert.

Prøvene ble inndampet i en speed vac inndamper. Med et volum på ~ 20 mL, tok det mellom to og tre timer å dampe inn prøvene.

Prøvene ble løst i 2 mL 25 % MeOH. Først løst opp i 0,5 mL 100 % MeOH, ristet godt på whirlmikser og så fortynnet med 1,5 mL MilliQ vann.

Alle prøver ble tilslutt filtrert gjennom et 0,45µm filter, og injisert i en HPLC.

### 2.3.7 Analysemetoder

#### 2.3.7.1 Analyse ved bruk av høytrykks væskrokromatografi(HPLC)

Høytrykks væskrokromatografi bruker høyt trykk til å separere løsningsene gjennom en kolonne bestående av partikler som gir separasjon. Et HPLC system består av løsemiddelsystem, injektor, kolonne, kolonne ovn til å kontrollere temperaturen til kolonnen, detektor og en datamaskin til å kontrollere systemet å vise resultater.

I forsøket ble det benyttet et HPLC system med rask separasjon, med en UV-vis detektor med lysdiod-rekke (DAD)( Ultimate 3000 RS Diode Array Detektor, Dionex, California, USA) til å identifisere og kvantifisere fenoliske komponenter. Denne typen detektor tillater at flere kromatogrammer ved ulike bølgelengder kan tas opp samtidig.

Kromatografisk separasjon ble utført ved å injisere 10µL prøve på en Acquity UPLC BEH C8 kolonne 1,7 µm, 2,1 x 150mm, Waters, Massachusetts, USA. Temperaturen på kolonne ovnen var 50 °C og trykket på 500-600 bar. HPLC-system inneholdt Cromeleon™ Chromatography Information Management System (Dionex, California, USA).

Komponentene ble identifisert ved 320nm(fenoliske syrer) og 360nm(flavonoider).

Mobilfaser ble benyttet for å separere komponentene som var interessante. Mobilfase A bestod av 1 % eddiksyre i MilliQ vann, og mobilfase B av 1 % eddiksyre i acetonitril. Fluksen var satt til 0,45mL/minutt, med 95 % mobilfase A og 5 % mobilfase B ved start. Tabell 2.5 viser gradient benyttet i forsøket.

**Tabell 2.5 Gradient benyttet i forsøket**

Tid [minutter]	1,2	2,4	4,0	5,7	8,0	9,0
Mobilfase B [%]	10	15	21	27	50	100

#### 2.3.7.2 Preparering av standardløsninger

Det ble benyttet eksterne standarder for å kvantifisere fenoler i materialet. Ved å sammenligne spektrale data, retensjonstid og toppsymmetri kan stoffer i prøven identifiseres. En forutsetning er at den kjente standarden må ha samme betingelser som prøven.

Alle standardene ble filtrert gjennom et 0,45µm filter før injeksjon på HPLC.

### 2.3.7.3 Standard til analyse av frie fenoler i brokkoli

Det ble benyttet to kommersielle standarder, quercetin og kaempferol, til analyse av frie fenoler i syrehydrolysert prøve. Standardene ble detektert med DAD ved en bølglengde på 360nm.

Standardene ble laget ved å veie inn 0,5 mg av hvert ren stoff, og overført kvantitativt til samme 5mL målekolbe. Stoffet ble fortynnet i 5 mL 70 % MeOH. Målekolben ble satt til røring i 30minutter slik at stoffet ble løst opp. Stamløsningen rommet en konsentrasjon på 0,1 mg/mL. Det ble pipettert ut 1mL fra stamløsningen og fortynnet videre i 70 % MeOH, til konsentrasjoner mellom 20 og 2,5 µg /g. Tabell 2.6 viser fortynningsvolum og sluttkonsentrasjoner på standardene benyttet i analyse.

**Tabell 2.6 Fortynningsvolum og sluttkonsentrasjon på standarder benyttet i analyse av frie flavonoler i brokkoli**

Standard	Stamløsning [mL]	Fortynningsvolum [mL]	Sluttkonsentrasjon [µg/g]
1	1	5	20
2	1	10	10
3	1	20	5
4	1	40	2,5

### 2.3.7.4 Statistisk analyse av behandlingene for brokkoli

Det ble utført en variansanalyse av alle varmebehandlingene på brokkoli, ved hjelp av programmet Unscrambler PCA (prinsipal komponent analyse). Hensikten var å se signifikante forskjeller mellom behandlingene. Først ble det utført analyser av rådata fra alle behandlingene. Deretter ble det utført analyser etter vekting av prøvene, som vil si 1/stdavvik. Figur 4.1 viser et resultat av rådata fra alle behandlingene. Resterende resultater fra Unscrambler er vist i vedlegg.

## 2.4 Bygg

### 2.4.1 Materialet

I forsøkene ble det benyttet helkorn, avskallet korn og byggmel fra Sjøk. Avskallet bygg vil si at hele korn ble slipt 10-15 % av skall/inneragn. Byggmelet ble avskallet og malt ved bruk av en steinmølle med 1,0 mm sjikt. Kornene ble analysert både ubehandlet og varmebehandlet. Tørrstoffprosenten på alt byggmaterialet ble målt ved hjelp av tørrstoffmåler. Figur 2.4 viser de tre type kornene som ble benyttet i forsøket.



Figur 2.4 Bygg fra Sjøk som ble benyttet i forsøket. Øverst til høyre: Helkorn, avskallet korn og byggmel fra kommersielle pakninger. Nederst til høyre: Helkorn og avskallet korn malt til mel under forsøket.

#### 2.4.1.1 Ubehandlet bygg

Helkorn og avskallet bygg ble malt til mel ved hjelp av en Retsh mølle med 0,5mm sikt. Melet ble så lagret ved -20 °C.

#### 2.4.1.2 Varmebehandling av bygg

Varmebehandling av byggkornene og byggmelet ble utført på tre ulike måter. Oppskrift på varmebehandlingene blir vist i vedlegg. Hver av varmebehandlingene inkluderte 45g bygg blandet med 300 mL.

1. Avskallet bygg ble lagt til bløt over natten med vann, deretter kokt i 15 minutter.
2. Avskallet bygg ble kokt direkte i 45 minutter.
3. Byggmel ble kokt til grøt i 20 minutter.

Kornene ble overført til plastbeger og frysetørket over 4 dager. De ble deretter lagret i -20 °C.

### 2.4.2 Homogenisering

Frysetørket materialet ble malt ved bruk av samme mølle som ved ubehandlet bygg. Ved lite volum av byggkornene ble det benyttet en morter. Hensikten med knusing av materialet, var at innholdet i alle cellene ble frigjort til ekstraksjonsmiddelet. Melet ble benyttet videre til analyser.

### 2.4.3 Prøvepreparering

Det ble veid inn 0,2 gram av malt byggkorn i 50 mL sentrifugerør med skrukork. For å ekstrahere frie fenoler fra byggen, ble det tilsatt 10 mL kald aceton/vann til røret. Prøven ble satt til sentrifugering i 10 minutter ved 2800opm, og deretter ble acetonblandingen avdekantert til nye sentrifugerør. Fra dette ekstraktet ble det målt løselige totale fenoler og antioksidantkapasitet(FRAP).

#### 2.4.4.1 Ekstraksjon av frie fenoliske syrer

Ekstraksjon av fenoliske syrer ble utført i henhold til metode [Hole et al., 2007]. Følgende steg ble gjennomført (tabell 2.7)

**Tabell 2.7 Ekstraksjon av fenoliske syrer**

Metanol-ekstraksjon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Det ble veid inn 1 gram malt prøve i et 50 mL sentrifugerør med skrukork og 10 mL 50 % MeOH ble tilsatt.</li> <li>• Prøvene ble satt i et ultralydbad i 30minutter ved 0 °C og deretter sentrifugert i 15 minutter ved 4000opm.</li> <li>• Supernatanten ble overført til en 100 mL glasskolbe. Pelletten ble tilsatt 5mL 50 % MeOH, og sentrifugert ved 4000opm i 15minutter.</li> <li>• Supernatanten ble overført til samme rundkolbe som tidligere, og dette ble gjentatt en runde til.</li> </ul>
Inndamping ved bruk av rotavapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metanolekstraktet ble inndampet ved bruk av en rotavapor.</li> <li>• Med vannbad på 37 °C, ble ekstraktet dampet inn på 60-90minutter.</li> <li>• Det inndampede ekstraktet ble reløst i 10 mL surgjort MilliQ vann (pH 2). Vannet ble surgjort ved å tilsette 6M HCl. Ved reløsning av prøvene ble vannet tilsatt i 4 omganger a` 2,5 mL, og deretter overført til 50mL sentrifugerør. Disse rørene ble videre brukt ved ekstrahering.</li> </ul>
Ekstraksjon med etylacetat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• For å ekstrahere frie fenoliske syrer ble det utført samme etylacetat ekstraksjon som for bundne fenoliske syrer i brokkoli [ 2.3.4] Det ble derimot utført 4 ekstraksjonsrunder.</li> <li>• Ekstraktet ble inndampet i en speed vac inndamper. Med et volum på ~40mL tok det mellom 4-5 timer å dampe inn prøvene. Det inndampede ekstraktet ble reløst i 1mL 25 % MeOH. Først ble det tilsatt 0,25 mL MeOH, ristet godt og så tilsatt 0,75 mL MilliQ vann.</li> </ul>

#### 2.4.4.2 Ekstraksjon av bundne fenoliske syrer

Det ble veid inn 0,2 gram prøve i et 50 mL sentrifugerør og 10 mL 50 % MeOH ble tilsatt. Samme prosedyre som ved frie fenoliske syrer i bygg (kapittel 2.7.1), men kun pelletten ble benyttet videre. Det vil si at ekstraktet ble forkastet. Deretter ble metoden for bundne fenoliske syrer i brokkoli benyttet (2.3.6) Det ble utført 4 ekstraksjonsrunder, og ekstraktet på ~ 40 mL ble inndampet. Alle prøvene ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter før injisert på HPLC.

## 2.4.4 Analysemetoder

### 2.4.4.1 FRAP/ Ferric Reducing Antioxidant Power

En metode, FRAP, ble benyttet til å måle plante ekstraktets totale antioksidant kapasitet (kapittel 1.11.3). Det ble laget en FRAP arbeidsløsning, bestående av acetatbuffer, jernklorid og TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) i forholdet 10:1:1. Tabell 2.8 viser løsninger benyttet til å lage arbeidsløsningen. Det ble tatt ut 2,4 mL av FRAP arbeidsløsning som ble blandet med 0,1 mL prøve i glass rør. Prøvene ble overført til kyvetter og satt mørkt i romtemperatur i 60 minutter. Absorbansen ved 593 nm ble lest av i et spektrofotometer, og vann ble benyttet som blank. Prøvene måtte bli målt etter nøyaktig samme tid, da reaksjonen ikke er en fullstendig endepunksreaksjon. Ekstraktets FRAP verdi ble uttrykt som mmol Fe/L.

Tabell 2.8 Løsninger benyttet ved tillaging av FRAP arbeidsløsning

Løsning	Komponent	Mengde
Acetatbuffer (300mM)(pH 3,6)	Natriumacetat	1,79g (s)
	Eddiksyre	16mL
	Destillert vann	984mL
TPTZ (10mM)	TPTZ	(s)
	Hydrogenklorid	40mM (l)
Jernklorid (10mM)	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	(s)
	Destillert vann	

### 2.4.4.2 Totale fenoler/ Folin-Ciocalteu's metode

Folin Ciocalteu metode er en enkel metode benyttet til å bestemme ekstraktets innhold av totale fenoler (1.11.4).

Det ble veid inn 200 µL prøve i et prøverør, og 1 mL av Folin- Ciocalteaus(FC) reagens ble tilsatt. Etter to minutter ble 800 µL Natriumkarbonat(7.5 %) tilsatt, og prøvene ble overført til kyvetter. Kyvettene fikk deretter stå i 60 minutter uten tilgang på lys. Absorbansen ved 765 nm ble målt ved hjelp av et spektrofotometer. Ekstraktets totale fenolinnhold ble uttrykt som gallesyre ekvivalenter(GAE) i milligram per 100 gram prøve.

### 2.4.4.3 Spektrofotometer

Spektrofotometri er en enkel kvantitativ teknikk, som i hovedsak innebærer å måle mengde lys en prøve absorberer ved en spesifikk bølgelengde (220-850). Målingen kan brukes til å bestemme konsentrasjonen til en spesifikk substans eller en gruppe substanser [ Waterman & Mole, 1994].

Spektrofotometri benytter en matematisk modell basert på Beer-Lambert Law, som stadfester at en løsnings absorpsjon av lysets bevegelse, er proporsjonal med:

1. Lengden lyset beveger seg gjennom løsningen.
2. Det kjemiske av substansen som er ansvarlig for absorpsjonen
3. Konsentrasjonen av (2).

#### 2.4.4.4 Analyse av fenoliske komponenter ved bruk av høytrykks væskrokromatografi(HPLC)

Det ble benyttet samme HPLC system som ved analyse av brokkoli[ 2.3.7.1]

##### Standard til analyse av fenoliske syrer:

Kaffesyre (CA), p- kumarinsyre(p- CA), ferulsyre(FA) og sinapinsyre(SA) ble benyttet SOM fire eksterne standarder til deteksjon med DAD ved en bølgelengde på 320nm. Disse standardene var CA, p- CA, FA og SA. Disse fire fenoliske syrene ble identifisert i prøvene ved å sammenligne spekter og retensjonstid til de eksterne standardene.

Det ble veid inn 10mg av hver standard i en 20 mL målekolbe. Det ble tilsatt 5 mL MeOH slik at stoffet ble oppløst, og deretter fortynnet med MilliQ vann til merket. Stammløsningene fikk en konsentrasjon på 500 µg/mL.

Det ble så pipettert ut 2 mL stammløsning, som ble fortynnet til 10 mL i en målekolbe med MilliQ vann. Disse ble kalt arbeidsløsninger og hadde en konsentrasjon på 100 µg/mL.

For tillaging av standard 4, ble 1 mL av alle arbeidsløsninger overført til en 10 mL målekolbe og fortynnet med MilliQ vann. Denne standarden fikk en konsentrasjon på 10 µg/mL. Ved å tilføre varierende mengde standard 4 + MilliQ vann, ble standard 1, 2 og 3 laget. Tabell 2.9 viser tilsatt mengde vann og standard 4, og sluttkonsentrasjonen på de ulike standardene.

**Tabell 2.9 Tilsatt mengde standard 4 og vann, og sluttkonsentrasjoner på standardrekken**

Standard	Tilsatt standard 4 [mL]	Tilsatt vann [mL]	Sluttkonsentrasjon [µg/mL]
1	1	3	2,5
2	1	1	5
3	3	1	7,5

## 2.5 Et sammensatt måltid av "Det sunne måltid" («Double Fresh»)

### 2.5.1 Materialet

Det sammensatte måltidet bestod av 144 g laks, 100 g brokkoli og 120 g bygg.

De tre komponentene ble behandlet på ulike måter.

1. Rå laks fra Bremnes Seashore («Salmalaks») ble pakket inn i en åpen polyetenpose.
2. Buketter ble kuttet fra vaskede brokkolihoder, vasket og sentrifugert. Bukettstilken ble kuttet ca 2cm fra første sidegren på buketten.
3. Avskallet bygg fra Skjåk ble blandet med vann og kokt i 45minutter. (60gram byggkorn ble blandet med 400 mL vann, som gav 150g kokt byggris.)

Komponentene ble pakket i en plastskål. Byggrisen ble lagt nederst i skålen, og dekket med et lokk av stiv plast. Deretter ble laksen(en hel filet) og så brokkolibukettene lagt over. Den stive platen og posen rundt laksen hindret væskelekkasje fra den ene komponenten til den andre. Figur 2.5 viser det sammensatte måltidet av laks, brokkoli og bygg, ferdig pakket i en plast skål. Pakningen ble dekt til med toppfilm fra Amcor, og fire små hull i filmen ble laget. Gassblanding i pakningen var:

- O<sub>2</sub>–5 %
- CO<sub>2</sub>– 10 %
- N<sub>2</sub>–85 %



Figur 2.5 Et helt måltid, bestående av laks, brokkoli og bygg. Foto: Oddvin Sørheim, Nofima AS



### 2.5.2 Utførelse av "Double Fresh"-forsøk

Da bygg og brokkoli var fokuset i denne oppgaven, ble kun disse to komponentene tatt for seg videre.

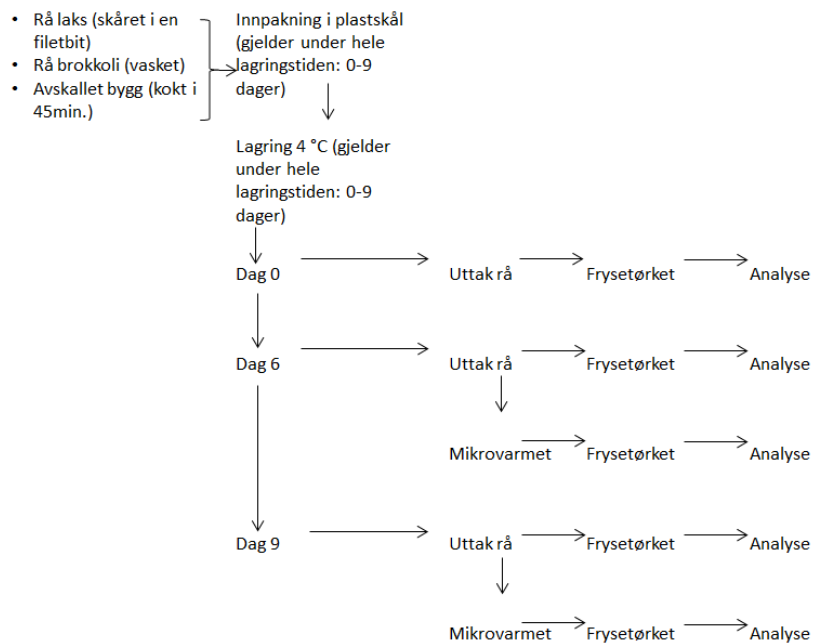
Pakningene ble lagret ved 4 °C i totalt 9 dager. Det var fem uttak dag 0, og ti uttak ved dag 6 og 9. Ved ti uttak ble fem analysert råe, mens resterende fem ble varmet i 4 minutter ved 750W. Tabell 2.10 viser uttak av pakninger ved de ulike dagene.

Måltidet gikk først igjennom en sensorisk test, hvor konsistens og farge ble studert. Deretter ble en liten del av hver komponent tatt ut til mikrobiologisk undersøkelse. Det gjenstående av hver komponent ble pakket og fryst ned. Brokkoli ble fryst ned ved hjelp av flytende nitrogen etterfulgt av vakuumpakning. Posene ble lagret ved -80 °C.

Byggriksen ble overført til plastkopper og lagret ved -20 °C. Figur 2.6 viser hele prosessen ved «Double Fresh» - forsøket.

**Tabell 2.10 Uttak av pakninger ved de tre ulike dagene i forsøket**

Dag	Uttak rå pakninger	Uttak mikrovarmet pakninger	Totalt
0	5	0	5
6	5	5	10
9	5	5	10



**Figur 2.6 Trinnene ved prosessering av det sammensatte måltidet ved "Double Fresh" -forsøk**

## **2.5.3 Prøvepreparering av enkeltkomponentene**

### *2.5.3.1 Brokkolimaterialet*

Brokkolimaterialet ble preparert som tidligere beskrevet (kapittel 2.3), unntak av hele råe buketter som denne gangen ble kvernet hele i en kjøkkenmaskin. En liten mengde kvernet brokkoli ble veid inn i 50 mL sentrifugerør, og frysetørket over fire dager. Analysene som ble utført av brokkoli i det sammensatte måltidet, var frie flavonoider og bundne fenoliske syrer. Det ble benyttet samme ekstraksjon og analysemetode som ved analyse av brokkoli tidligere i forsøket 2.3.5- 2.3.6.

### *2.5.3.2 Byggmaterialet*

Bygggrisen ble frysetørket over fire dager. Analysene som ble utført av bygggrisen var totale fenoler, antioksidantkapasitet/FRAP, frie og bundne fenoliske syrer. Det ble benyttet samme ekstraksjons og analysemetode som ved tidligere analyse av bygg (2.4.3-2.4.4).

## **2.6 Grafer og statistikk**

Resultatene er fremstilt ved hjelp av Microsoft Excel 2010. Alle figurer er laget med grunnlag av gjennomsnittsverdi og standardavvik. Til statistisk analyse ble det utført en parvis sammenligning ved hjelp av en t-test. For sammenligning av flere grupper ble variansanalyse utført ved bruk av både Unscrambler PCA (prinsipalkomponentanalyse), og One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Tukey's test. En p-verdi på  $< 0,05$  ble ansett som signifikant.

### 3 Resultater

Resultatene i denne oppgaven blir presentert i tre deler, I-III.

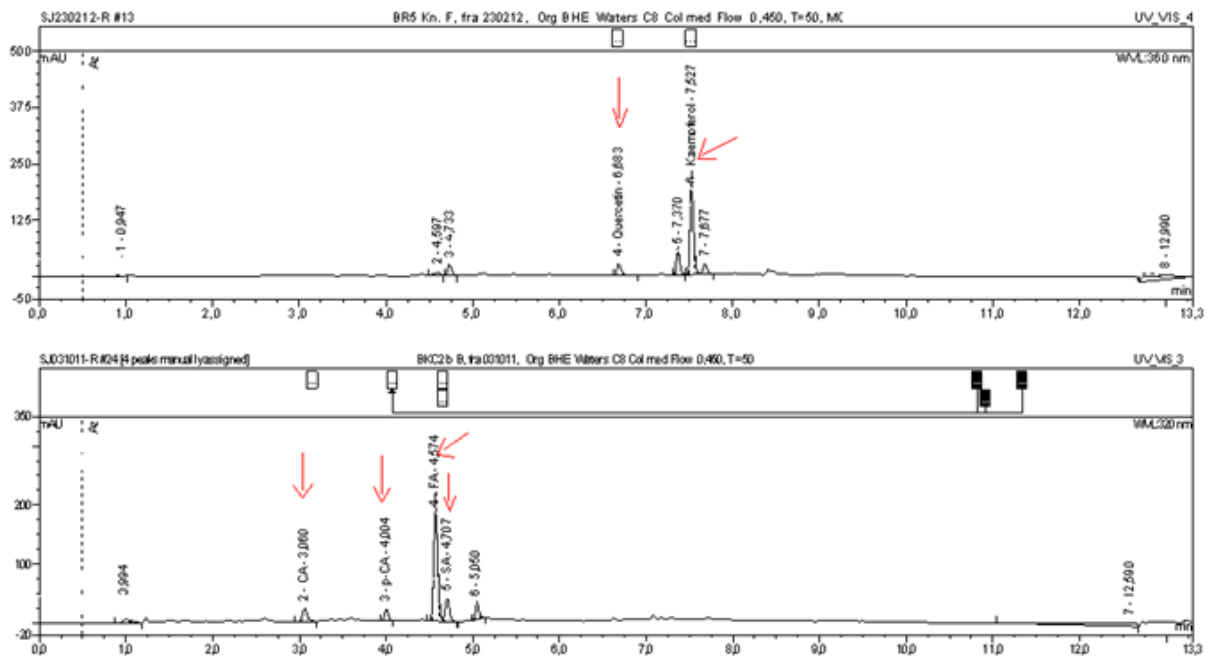
Effekt av varmebehandling etterfulgt av kjølelagring på brokkoli blir presentert i del I. Komponentene som ble analysert var frie flavonoler og bundne fenoliske syrer. Metodene som ble benyttet på brokkoli var kok - og kjøll og sous vide.

I del II blir effekt av varmebehandling på byggkorn presentert. Materialet var helkorn, avskallet korn og byggmel. Prosesseringsmetodene som ble utført var bløtlegging og koking, og ulike koketider ble undersøkt. Analysene som ble utført var frie og bundne fenoliske syrer, samt FRAP og totale fenoler i materialet.

I del III blir resultatene fra varmebehandling og lagring på et helt måltid presentert. Måltidet var sammensatt av tre komponenter; brokkoli, bygg og laks. Måltidet ble analysert før og etter varming i mikrobølgeovn, og lagret over ni dager. Analysene som ble utført var frie flavonoler og bundne syrer i brokkoli, og totale fenoler, FRAP og fenoliske syrer i bygg.

#### ***3.1 Identifisering av fenoliske komponenter ved bruk av HPLC***

De fenoliske komponentene ble identifisert og kvantifisert ved bruk av HPLC med DAD (kapittel 2.3.7.1). Komponentene har absorpsjonsmaksimum i UV-B området, og komponentenes UV-absorpsjon er karakteristisk for hver av de enkelte. Flavonoler ble detektert ved en bølgelengde på 360nm, og fenoliske syrer ved 320 nm. For å gi et inntrykk av hvordan komponentene blir detektert i prøvematerialet, vises et eksempel på et kromatogram for hver av fenolgruppene. Kromatogrammet er fra en tilfeldig valgt prøve. Det ble benyttet en blank prøve til kontroll, og denne inneholdt løsningsmiddel med samme betingelser som prøvene. Figur 3.1 viser et kromatogram av quercetin og kaempferol etter syrehydrolyse, og et kromatogram av p- CA, CA, FA og SA etter basehydrolyse.



**Figur 3.1** Kromatogram fra tilfeldig valgt prøve. Øverst: Frie flavonoler i syrehydrolysert brokkoliekstrakt. Nederst: Bundne fenoliske syrer i byggekstrakt som har gjennomgått basehydrolyse og etylacetatekstraksjon. Rød pil peker ut de interessante komponentene i denne oppgaven

Komponentene ble identifisert ved å sammenligne retensjonstid, toppsymmetri og UV- spekter med en kjent standard. Et eksempel på utregning av mengde komponent i prøven, er vist i vedlegg.

## 3.2 Brokkoli

### 3.2.1 Utarbeiding av metode for analyse av bundne fenoliske syrer i brokkoli

Det ble utarbeidet en metode for analyse av både flavonoler og fenoliske syrer fra samme brokkoliprøve. Metoden var en bearbeiding av to tidligere utviklede metoder benyttet til analyse av brokkoli og bygg (Rybarczyk, 2011; Hole et al., 2009)

Til analyse av frie flavonoler ble metoden for brokkoli benyttet, og den gjenstående pelleten ble benyttet til analyse av bundne fenoliske syrer. Pelleten gjennomgikk en basehydrolyse. Det ble testet ut tre ulike hydrolysetider; en, fire og 20 timer. Det viste seg at en time hydrolyse av pelleten gav mindre utbytteprosent av fenoliske syrer enn fire timer. Metoden som var utviklet for analyse av bundne syrer i bygg, var satt til 16-20 timer hydrolysetid (Hole et al., 2009). Denne hydrolysetiden ble derfor testet ut på brokkoli, og utbytteprosenten ved 16-20 timer ble større enn ved fire timer. På bakgrunn av dette ble metoden etablert med en hydrolysetid på 16-20 timer. Tabell 3.1 viser mengde utbytte ved de hydrolysetidene 1,2 og 4.

Tabell 3.1 Mengde utbytte ved de tre ulike hydrolysetidene.

Prøve	Hydrolysetid [timer]	Mengde FA [mg/L]
A	1	5,815
B	2	7,234
C	4	8,010

En annen faktor som ble testet ut var antall ekstraksjonsomganger med etylacetat. I metoden for bygg var det bestemt fire ekstraksjonsomganger med 10 mL etylacetat. En annen metode for grønnkål utført ved Nofima hadde vist at ved tre ekstraksjoner med etylacetat, var det tredje ekstraksjonsutbytte minimalt [upubl. Olsen, 2009]. Det ble på dette grunnlaget testet utbytte etter hver av de fire ekstraksjonsomganger med etylacetat. Fargen på ekstraktene etter hver ekstraksjon indikerte et betydelig mindre utbytte ved tredje omgang (figur 2.3) Analysen av fenoliske syrer viste at mengde utbytte var kun 12 % etter andre ekstraksjon. Etter vurdering av tap av stoff og tid, ble antall ekstraksjonsomganger bestemt til to omganger. Tabell 3.2 viser utbytte av syrene etter hver ekstraksjon.

Tabell 3.2 Utbytte av bundne feruloyl syrer ved hver ekstraksjon av blansjert(1.5min.) brokkoli, hydrolysetid 1 time.

Prøve	Ekstraksjonsomgang	FA [µg/g]
Hel bukett	1	61,9
Hel bukett	2	7,13
Hel bukett	3	-

### 3.2.2 Innhold av fenoliske komponenter i rå brokkoli

Brokkolimaterialet som ble benyttet i forsøket, var delt i hele- og halve buketter, samt knopper + knoppstilker. Materialet (hele og halve buketter) ble preparert ved å skille de grønne knoppene på brokkolihodet, fra de hvite knoppene og knoppstilkene. Den sistnevnte delen blir videre presentert som kun stilker. All materiale ble frysetørket, og knust til et fint pulver i en morter. Analysene som ble utført var frie flavonoler og bundne fenoliske syrer. For å sammenligne mengden komponenter i rå brokkoli videre i forsøket, ble innholdet i hele buketter beregnet. Bukettene ble beregnet ved hjelp av ligning 1, og er uttrykt per tørrstoff.

$$\text{Mengde per bukett} [\mu\text{g/g, ts}] = \frac{(\text{Knopper(a)} \cdot \text{knopper(total)}) + (\text{stilker (a)} \cdot \text{stilker (total)})}{\text{Knopper} + \text{stilker(total)}}$$

Hvor,

**a**, er analyseverdi uttrykt som µg/g tørrstoff.

**total**, vil si total gram tørrstoff av bukett.

**tv**, står for tørrstoff.

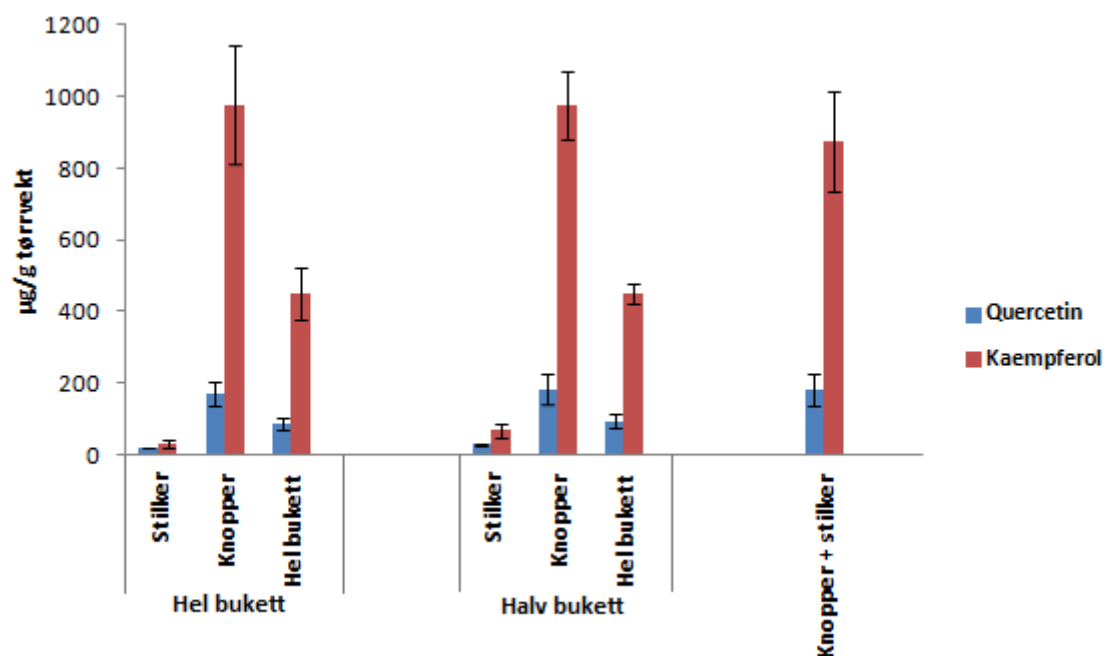
En faktor som bør nevnes i denne sammenheng er at mengden fenoliske komponenter er basert på tørrstoff (ts). En brokkoli består av omtrentlig 90 % vann, og dermed kun 10 % tørrstoff. Dette vil i praksis bety at en fersk brokkoli inneholder rundt 10 % av mengden som blir bestemt videre i forsøket.

### 3.2.2.1 Frie flavonoler i rå brokkoli

Det var ønskelig å studere innholdet av frie flavonoler i de ulike delene av en brokkolibukett. De utvalgte flavanolene var quercetin og kaempferol, som er de største representantene [Bahorun 2004].

Brokkoliprøven gjennomgikk metanolekstraksjon, og syrehydrolyse i 90 minutter. Figur 3.2 viser innholdet av quercetin og kaempferol i blomsterknopper og stilker fra hele- og halve buketter, samt i de ferdig preparerte knoppene + knoppstilker.

Det er flere faktorer som påvirker innholdet i en brokkoli og forårsaker stor variasjon av komponentene i brokkoli (kapittel 1.6 2). Det var derfor ønskelig å få en innsikt i den biologiske variasjonen, og flere paralleller av brokkoli ble benyttet i forsøket [Figur 3.2]. Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.2 er vist i vedlegg.



Figur 3.2 Innhold av frie flavonoler i rå brokkoli. Brokkoliprøvene ble ekstrahert med metanol, og syrehydrolysert. Ekstraktet ble analysert på HPLC. Hel bukett: innhold av komponenter i stilker (n= 4), blomsterknopper (n= 5), og utregnet mengde i hel bukett (n= 4). Halv bukett: innhold av komponenter i stilker (n=2), blomsterknopper (n= 2), og utregnet mengde i hel bukett (n= 2). Til høyre: innhold av komponenter i knopper + knoppstilker (n= 3). Figuren viser gjennomsnittlige verdier og standard avvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg

Blomsterknopper av hele buketter inneholdt  $172 \pm 33.6$  og  $975 \pm 164$   $\mu\text{g/g}$  ts av henholdsvis quercetin og kaempferol, mens stilkene inneholdt  $19.3 \pm 2.36$  og  $29.5 \pm 11.9$   $\mu\text{g/g}$  ts av henholdsvis quercetin og kaempferol. Det vil si at av det totale innholdet funnet i blomsterknopper og stilker, inneholdt blomsterknopper 89 % quercetin og 97 % kaempferol. Det ble funnet samme fordeling og mengde av komponentene i halve buketter.

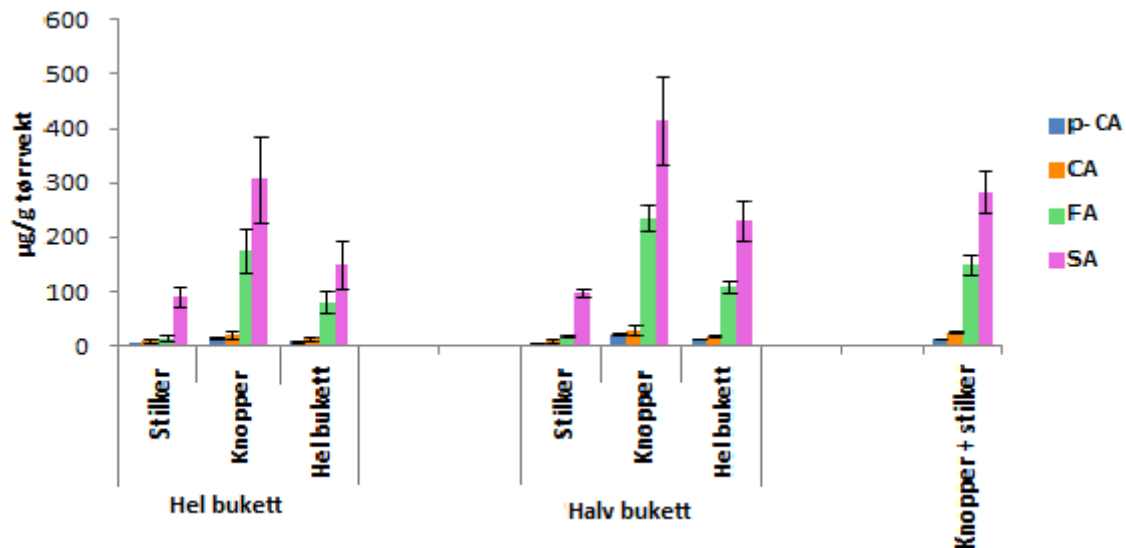
Materialet som allerede var preparert som knopper + stilker, inneholdt  $179 \pm 45.0$  tv og  $874 \pm 140$   $\mu\text{g/g}$  ts av henholdsvis quercetin og kaempferol. Innholdet var ikke signifikant forskjellig fra hele og halve buketter.

Resultatene viste store standardavvik i prøvene.

Innholdet av quercetin og kaempferol ble beregnet i hele buketter, og bestemt til henholdsvis  $86,41 \pm 16,58$  og  $449 \pm 74,35$   $\mu\text{g/g}$  ts bukett (hel bukett), og  $94,17 \pm 18,55$  og  $449 \pm 28,60$   $\mu\text{g/g}$  ts (halv bukett). Resultatene blir benyttet videre som et sammenligningsgrunnlag med varmebehandlet brokkoli.

### *3.2.2.2 Innhold av bundne fenoliske syrer i rå brokkoli*

Det var ønskelig å studere innholdet av bundne fenoliske syrer i ulike deler av rå brokkoli. De utvalgte bundne syrene var FA, SA, p- CA og CA, og er de mest rikelige i planteriket [Robbins, 2003]. Brokkolimateriale var det samme som ved analyse av frie flavonoler. Pelleten ble hydrolysert med NaOH i 16 timer, og ekstrahert med etylacetat. I likhet med forrige forsøk, var det ønskelig å få en innsikt i den biologiske variasjonen i brokkoli, og det ble benyttet flere paralleller. Figur 3.3 viser innholdet av bundne fenoliske syrer i ulike deler av rå brokkoli. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



**Figur 3.3** Innholdet av bundne fenoliske syrer i rå brokkoli. Brokkoliprøvene gjennomgikk en basehydrolyse, og deretter ekstrahert med etylacetat. Hel bukett: innhold av komponenter i stilker (n= 4), blomsterknopper (n= 5) og utregnet mengde i hel bukett (n= 4). Halv bukett: innhold av komponenter i stilker (n=2), blomsterknopper (n= 2), og utregnet mengde i hel bukett (n= 2). Til høyre: innhold av komponenter i knopper + knoppstilker (n= 3). Figuren viser gjennomsnittlige verdier og standard avvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Analyse av hele buketter viste et innhold på  $307 \pm 79.6$  og  $174 \pm 40.7$  µg/g ts av henholdsvis SA og FA i blomsterknoppene. Syrene p- CA og CA ble derimot funnet i mer beskjeden mengde, og tilsvarte henholdsvis  $14.9 \pm 2.62$  og  $21.0 \pm 7.50$  µg/g ts. Stilkene inneholdt  $90.4 \pm 18.4$  og  $13.4 \pm 5.08$  µg/g ts av henholdsvis SA og FA, samt  $2.11 \pm 1.44$  og  $8.50 \pm 2.96$  µg/g ts av henholdsvis p- CA og CA. Det vil si at av det totale innholdet av syrene funnet i knopper og stilker, inneholdt blomsterknoppene 92 % FA, 71 % SA, 86 % p- CA og 59 % CA. Det ble samtidig observert store standardavvik i parallellene.

Samme fordeling av syrene ble observert i halve buketter. Innholdet av syrene var imidlertid høyere i både stilker og blomsterknopper sammenlignet med delene av hel bukett. Innholdet av syrene i de ferdig preparerte knoppene + knoppstilkene tilsvarte innholdet i knopper fra hele buketter.

Innholdet av syrer i hele buketten ble beregnet til å være  $150 \pm 45,31$  og  $80,07 \pm 19,69$  µg/g ts bukett (hel bukett), og  $231 \pm 37,7$  og  $110 \pm 10,81$  µg/g ts bukett (halv bukett) av henholdsvis SA og FA. Resultatene blir benyttet videre som et sammenligningsgrunnlag med varmebehandlet brokkoli.

### 3.2.3 Effekt av blansjering på innhold av fenoliske komponenter

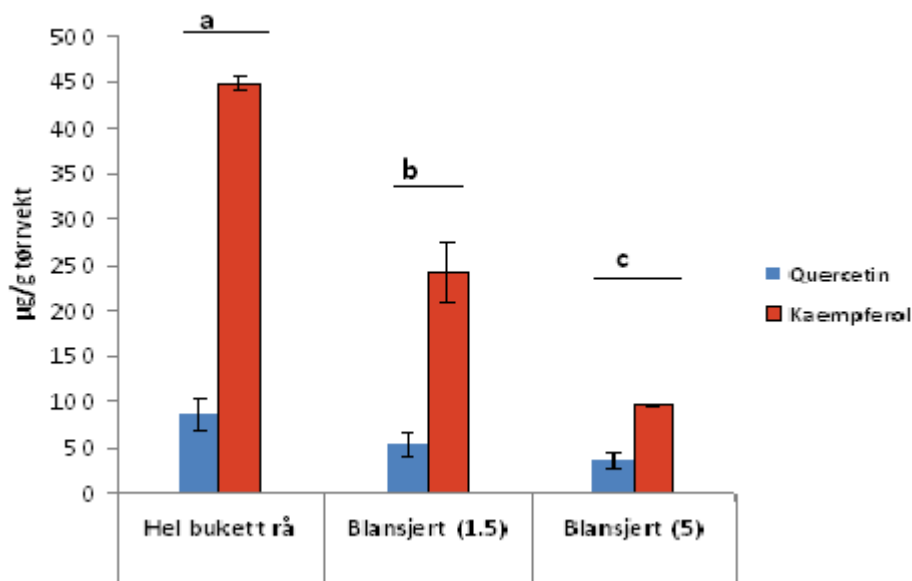
Blansjering er en mye brukt metode i industrien og hensikten er å bevare kvaliteten på produktet ved langtidslagring. Det var ønskelig å se effekten av blansjering på innholdet av fenoliske komponenter i brokkoli. Brokkolien var blansjert ved to tider, 1.5 og 5 minutter (97 °C), for å se om effekten på



komponentene ble større ved lenger blansjeringstid. Materialet i forsøket var hele buketter (200g). Bukettene ble kværnet i en kjøkkenmaskin, frysetørket og deretter mortet til et fint pulver.

### 3.2.3.1 Effekt av blansjering på frie flavonoler

Det var ønskelig å se effekten av blansjering på innholdet av frie flavonoler i brokkoli. Brokkoliprøven ble ekstrahert med metanol og syrehydrolysert i 90 minutter. Figur 3.4 viser innholdet av quercetin og kaempferol i blansjert brokkoli. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



**Figur 3.4** Innholdet av Quercetin og Kaempferol i blansjert brokkoli. Brokkoliprøven ble ekstrahert med metanol og syrehydrolysert, før analyse på HPLC. Til venstre: innhold av komponenter i rå brokkoli (n= 4), 1.5 min. blansjert bukett (n= 4) og 5 min. blansjert bukett (n= 2). Figuren viser gjennomsnittlige verdier og standard avvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

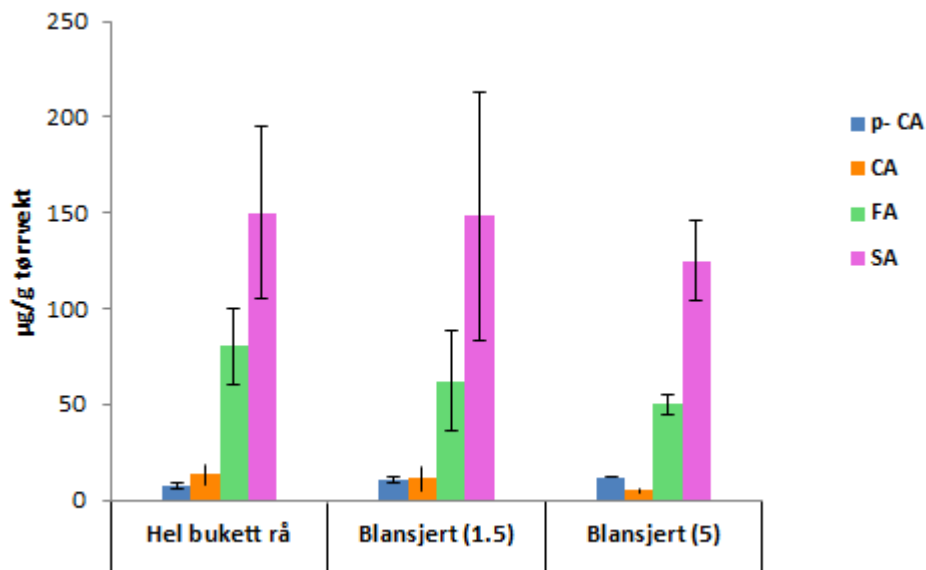
Blansjering hadde en signifikant effekt på innholdet av quercetin og kaempferol. Etter blansjering i 1.5 minutt, ble innholdet av quercetin og kaempferol redusert med henholdsvis 39 % og 46 % sammenlignet med rå brokkoli.

Blansjering i 5 minutter reduserte innholdet til quercetin og kaempferol med henholdsvis 58 % og 79 % sammenlignet med rå brokkoli. Det var en signifikant forskjell mellom koketidene, og mengden quercetin og kaempferol ble redusert med ytterligere 32 % og 60 % ved lenger tid sammenlignet med 1.5 minutt koking.

### 3.2.3.2 Effekt av blansjering på innhold av bundne fenoliske syrer

Det var ønskelig å studere hvordan SA, FA, p- CA og CA ble påvirket av blansjering. Det ble benyttet samme materialet som ved analyse av frie flavonoler. Pelleten ble hydrolysert med NaOH i 16 timer

og ekstrahert med etylacetat. Figur 3.5 viser innholdet av bundne fenoliske syrer i blansjert brokkoli. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



**Figur 3.5** Innholdet av bundne fenoliske syrer i blansjert brokkoli. Til venstre: innhold av syrer i rå bukett (n= 4), 1.5 min. blansjert bukett (n=3) og i 5 min. blansjert bukett (n=2). P-verdi > 0,05. Brokkoliprøven gikk igjennom en basehydrolyse og etylacetat ekstraksjon, og deretter analysert ved HPLC. Figuren viser gjennomsnittlige verdier og standard avvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Det var ingen signifikant effekt av blansjering på syrene. Etter 1.5 minutt blansjering var innholdet av SA og FA henholdsvis  $148 \pm 65.1$  og  $62.1 \pm 26.2$  µg/g ts.

Brokkoli blansjert i 5 minutter innholdt  $125 \pm 21.0$  og  $49.9 \pm 5.39$  µg/g ts av henholdsvis SA og FA.

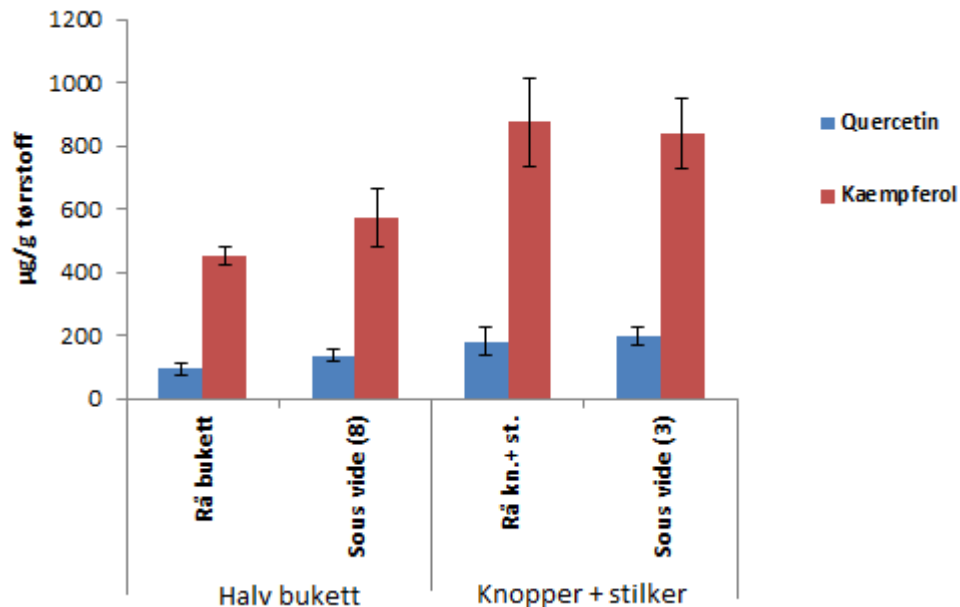
Det var ingen signifikant forskjell mellom koketidene, men det ble observert en reduksjon av alle syrene utenom p- CA som følge av lenger koketid.

### 3.2.4 Effekt av sous vide koking på innhold av fenoliske komponenter

”Sous vide”- metoden er en relativt ny utgave av kok - og kjøll metoden, og er mye benyttet i industri og catering bransjen. Metoden innebærer å vakuumpakke produktet før koking. Brokkolimaterialet som ble benyttet i dette forsøket var halve buketter og blomsterknopper+ stilker. Materialet var behandlet ved to ulike koketider (97 °C), 8 minutter for halve buketter og 3 minutter for knopper + stilker. Brokkoliprøven ble kvernet i en kjøkkenmaskin, frysetørket og deretter mortet til et fint pulver.

### 3.2.5 Effekt av sous vide koking på innhold av frie flavonoler

Det var ønskelig å se effekt av sous vide koking på innhold av frie flavonoler i brokkoli. Brokkoliprøven ble ekstrahert med metanol og syrehydrolysert i 90 minutter. Figur 3.6 viser innholdet av quercetin og kaempferol i halve buketter og blomsterknopper + stilker. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



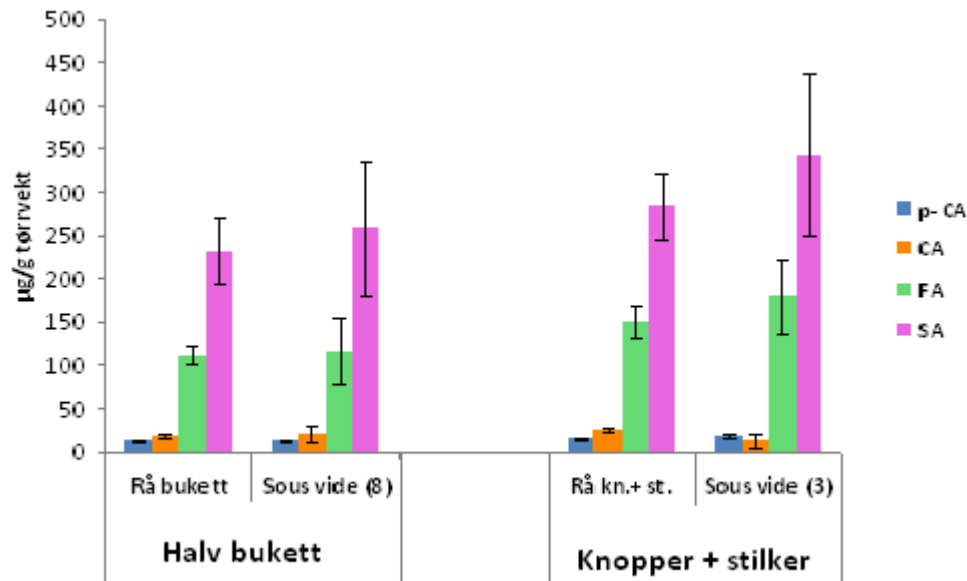
Figur 3.6 Innhold av frie flavonoler i sous vide kokt brokkoli. Brokkoliprøven er ekstrahert med metanol, syrehydrolysert og analysert ved HPLC. Til venstre: innhold av quercetin og kaempferol i rå brokkoli (n= 2), sous vide kokt i 8 min. (n= 3), og innhold i rå blomsterknopper og stilker (n= 3), kokt i 3min. (n= 2). Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Sous vide koking hadde ingen signifikant effekt på innholdet av quercetin og kaempferol i verken halve buketter eller knopper + stilker. Som figuren viser kan det imidlertid bli observert en økning av quercetin og kaempferol i halve buketter, og etter 8minutter koking var innholdet henholdsvis  $134 \pm 18.4$  og  $571 \pm 90.0$  µg/g ts.

Etter 3minutter koking av knopper + stilker var innholdet av quercetin og kaempferol  $198 \pm 97.7$  og  $840 \pm 111$  µg/g ts.

### 3.2.6 Effekt av sous vide koking på innhold av bundne fenoliske syrer

Det var ønskelig å se effekten av sous vide koking på bundne fenoliske syrer i brokkoli. Brokkoliprøven ble hydrolysert med NaOH i 16 timer og ekstrahert med etylacetat. Figur 3.7 viser innholdet av syrer i sous vide kokte halve buketter og blomsterknopper + stilker. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



**Figur 3.7** Innhold av bundne fenoliske syrer i sous vide kokt brokkoli. Innhold av syrer i rå bukett (n= 2), 8min. kokt bukett (n=3), og innhold av syrer i rå blomsterknopper + stilker (n= 3), 3min. kokt blomsterknopper + stilker (n= 2). Brokkoliprøven gikk gjennom en basehydrolyse og etylacetat ekstraksjon, og deretter analysert ved HPLC. Figuren viser gjennomsnittlige verdier og standard avvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Sous vide koking hadde ingen signifikant effekt på innholdet av bundne syrer i brokkoli, men alle syrene økte som følge av kokingen. Et unntak var CA i knopper + stilker som ble redusert med 53 % etter koking 3 minutter. Etter 8minutter koking av halve buketter var innholdet av SA og FA henholdsvis  $258 \pm 78.8$  og  $115 \pm 39.1$   $\mu\text{g/g}$  ts.

Innholdet av SA og FA i knopper + stilker kokt i 3minutter var henholdsvis  $342 \pm 93.2$  og  $178 \pm 43.6$   $\mu\text{g/g}$  ts.

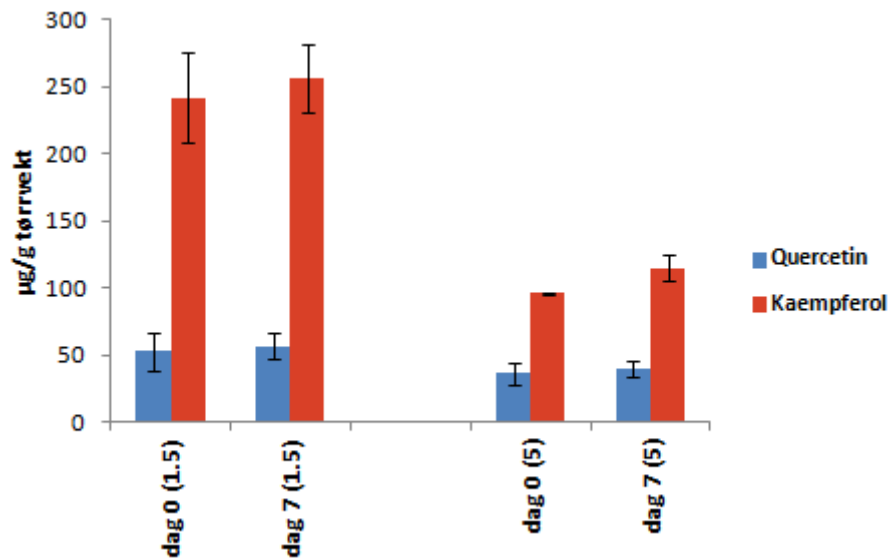
### 3.2.7 Effekt av lagring på innhold av fenoliske komponenter

Kjølelagring er en mye brukt metode til å lagre produkter, og det var ønskelig å se effekten av kjølelagring på innholdet av fenoliske komponenter i brokkoli. Kjølelagring er ofte kombinert med en kokemetode, og i dette forsøket ble brokkolimaterialet enten blansjert eller sous vide kokt. Brokkolimaterialet ble lagret over et tidsrom på 18 dager, og det var uttak ved dag 0, 7, 14 og 18.

### 3.2.8 Effekt av kjølelagring på blansjert brokkoli

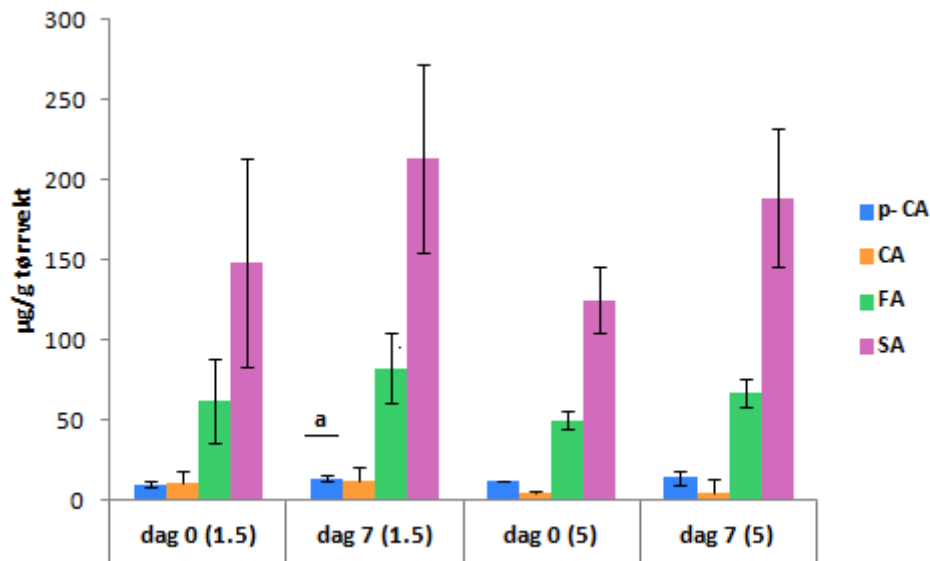
Det var ønskelig å se effekten av lagring på innholdet av frie flavonoler og bundne fenoliske syrer. Brokkolimaterialet som ble benyttet var hele buketter, blansjert i 1.5 og 5 minutter. Da brokkolien lagret i 7 dager hadde et mikrobiologisk nivå  $\leq 10^6$ , ble det bestemt at kun buketter fra 0 og 7 dager skulle bli analysert. Brokkoliprøven ble opparbeidet og analysert som ved blansjeringsforsøket. (kapittel 3.2.3.1 og 3.2.2.2)

Figurene 3.8 og 3.9 viser effekt av lagring på innholdet av henholdsvis frie flavonoler og bundne fenoliske syrer. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.



Figur 3.8 Innhold av frie flavonoler i brokkoli lagret i 7 dager. Til venstre: innhold av quercetin og kaempferol i blansjert bukett 1.5 min ved dag 0 (n= 4) og 7(n= 3), og blansjert bukett 1.5 min (n= 2) og 7(n= 3). Brokkoliprøven er ekstrahert med metanol, syrehydrolysert og analysert ved HPLC. Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Lagring over syv dager hadde ingen signifikant effekt på innholdet av frie flavonoler. Det kan imidlertid bli observert en økning av begge komponentene ved lagring syv dager. Etter syv dager var innholdet av quercetin og kaempferol i 1.5 minutter blansjert brokkoli henholdsvis  $56.8 \pm 9.28$  og  $257 \pm 25.3$  µg/g ts, og etter 5 minutter blansjering henholdsvis  $39.6 \pm 6.31$  og  $115 \pm 9.84$  µg/g ts.



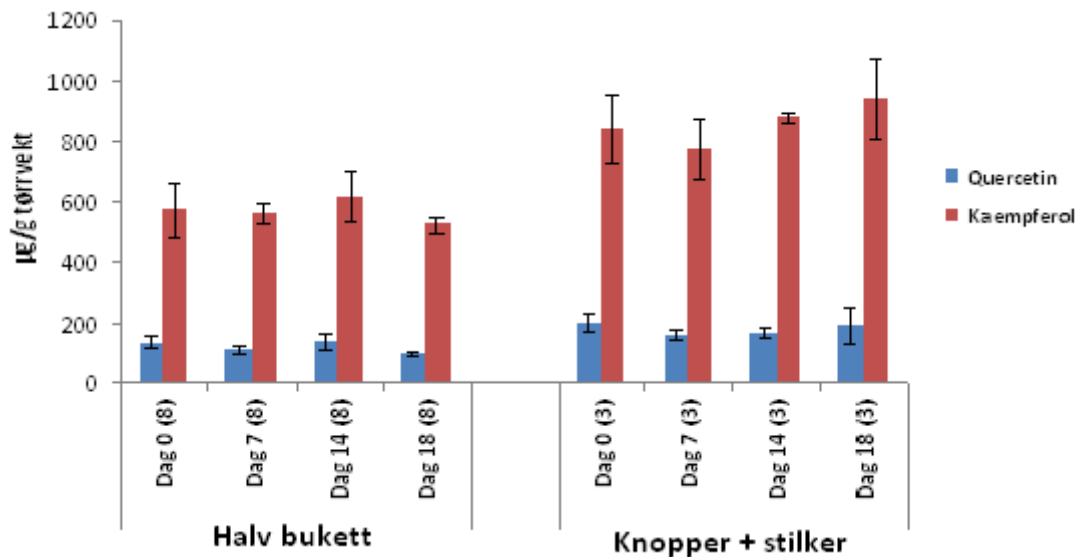
**Figur 3.9** Innhold av bundne fenoliske syrer i brokkoli lagret i 7 dager. Til venstre: innholdet av syrer i blansjert bukett 1.5 min ved dag 0 (n= 3) og 7(n= 3), og blansjert bukett 5 min ved dag 0(n= 2) og 7(n= 2). Bokstaver indikerer signifikant forskjell. Brokkoliprøven var basehydrolysert, ekstrahert med etylacetat og analysert ved HPLC. Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik.

Lagring av brokkoli over syv dager hadde en signifikant effekt på p- CA, som økte etter 7 dager lagring. Det var ingen signifikant effekt på innholdet av de andre bundne syrene, men det ble observert en økning av alle syrer utenom CA etter syv dager lagring. Etter syv dager var innholdet av SA og FA 1.5minutter blansjert brokkoli henholdsvis  $213 \pm 59.1$  og  $82.4 \pm 22.0$  µg/g ts , og i 5 minutter blansjert brokkoli henholdsvis  $189 \pm 42.9$  og  $87.2 \pm 8.36$  µg/g ts. I tillegg ble det observert store standardavvik i de blansjerte brokkolibukettene.

### 3.2.9 Effekt av kjølelagring på sous vide kokt brokkoli

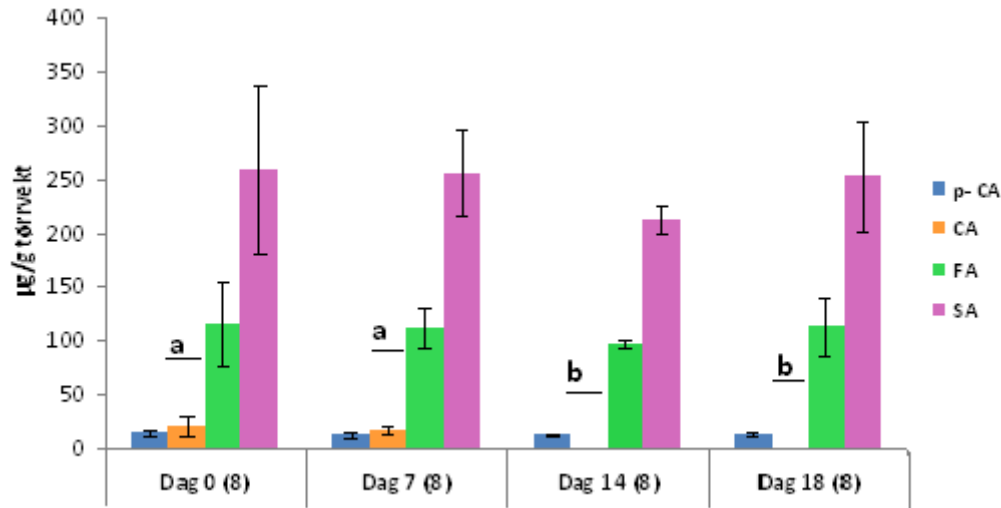
Kjølelagring av sous vide produkter har mange fordeler som gjør den godt egnet ved langtidslagring av produkter(kapittel 1.7.4, 1.9). Brokkolimaterialet som ble benyttet var halve buketter kokt i 8minutter, og blomsterknopper + stilker kokt i 3minutter. Prøvene ble opparbeidet og analysert som ved sous vide forsøk (kapittel 3.4.1 og 3.4.2).

Figurene 3.10, 3.11 og 3.12 viser effekt av lagring på innholdet av henholdsvis frie flavonoler og bundne fenoliske syrer. Tallmaterialet som ligger til grunn for figurene er vist i vedlegg.



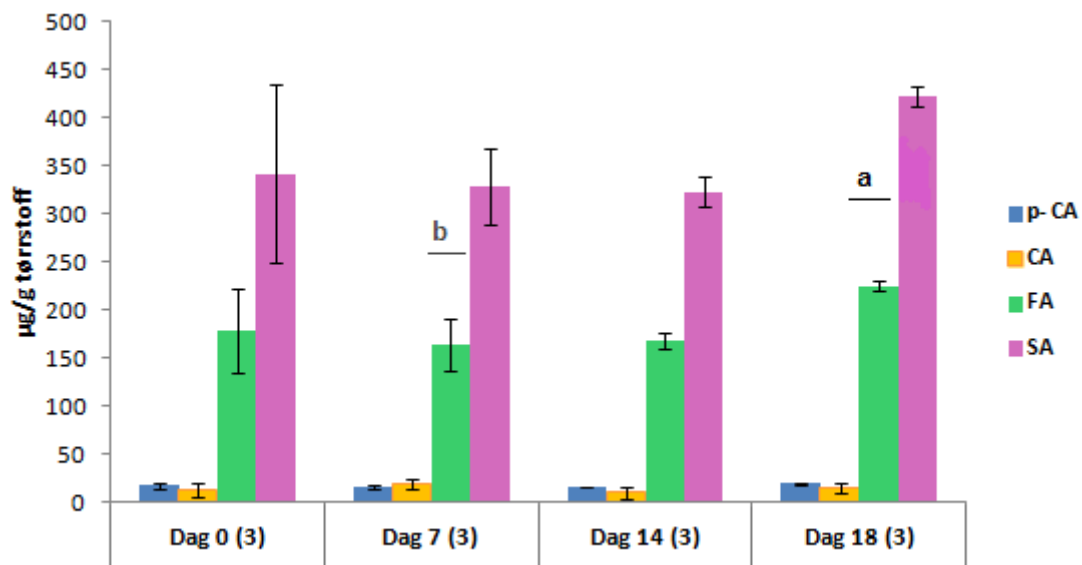
Figur 3.10 Innhold av frie flavonoler i brokkoli lagret over 18 dager. Til venstre: Innhold av komponenter i sous vide kott bukett 8 min. (n= 2). Til høyre: innhold i knopper + stilker 3 min. (n=3). Dag 7 (n= 5), dag 14 (n= 3) og dag 18 (n= 3). Brokkoliprøven er ekstrahert med metanol, syrehydrolysert og analysert ved HPLC. Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figur er vist i vedlegg.

Lagring av sous vide kott brokkoli hadde ingen signifikant effekt på innholdet av frie flavonoler. Etter 18 dager lagring var innholdet av quercetin og kaempferol i halve buketter henholdsvis  $94.1 \pm 5.76$  og  $524 \pm 27.9$  µg/g ts, og i 3minutter kott knopper + stilker henholdsvis  $193 \pm 67.7$  og  $937 \pm 134$  µg/g ts.



Figur 3.11 Innhold av bundne fenoliske syrer i broccolibukett lagret over 18 dager. Til venstre: innholdet av syrer i sous vide kott bukett 8 min. (n= 2) ved dag 0, dag 7 (n= 5), dag 14 (n= 3) og dag 18 (n= 3). Brokkoliprøven har gjennomgått basehydrolyse, ekstraksjon med etylacetat, og analysert ved HPLC. Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figur er vist i vedlegg.

Lagring av sous vide kott halv bukett hadde kun en signifikant effekt på CA, som ikke ble funnet i brokkoli ved 14 dager lagring. Etter 18 dager lagring var innholdet av SA og FA henholdsvis  $252 \pm 51.6$  og  $112 \pm 27.2$  µg/g ts.



Figur 3.12 Innhold av bundne fenoliske syrer i blomsterknopper + stilker av brokkoli lagret over 18 dager. Brokkoliprøven har gjennomgått basehydrolyse, etylacetatekstraksjon og analysert ved HPLC. Innhold i sous vide kokt knopper + stilker 3min. Dag 0 (n= 2), dag 7 (n= 5), dag 14 (n= 3) og dag 18 (n= 3). Bokstaver betyr signifikant forskjell. Figur viser gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figur er vist i vedlegg.

Det var ingen signifikant effekt av lagring over 18 dager på innholdet av CA og p- CA. Lagring fra 7 til 18 dager viste en signifikant økning av FA, og etter 18 dager innholdt knopper + stilker  $225 \pm 4.86$  µg/g ts og tilsvarte en økning på 27 % sammenlignet med dag 7. Det var ingen signifikant effekt av lagringen på SA, men det ble observert et økt innhold etter 18 dager (p-verdi= 0,048). Etter 18 dager var innholdet av SA  $422 \pm 10.9$  µg/g ts.

### 3.3 Bygg

#### 3.3.1 Innhold av fenoliske komponenter i rå bygg

Bygg prosesseres før den spises, og det var ønskelig å se effekten av avskalling og maling på innholdet av totale fenoler og enkelte fenoliske syrer, samt antioksidantkapasitet i bygg.

Byggmaterialet som ble benyttet var helkorn, avskallet korn og byggmel. Både helkorn og avskallet korn ble malt til mel på en mølle.



For å sammenligne fenolinnhold på lik basis, ble tørrstoffprosenten på korntypene bestemt og uttrykt som gram per tørrvekt. Et byggkorn inneholder ca 89 % tørrstoff, og i praksis vil kornet ha 11 % mindre mengden av fenolene enn det som blir presentert i resultatene.

### 3.3.2 Totale fenoler og FRAP verdi i helkorn, avskallet korn og byggmel.

For analyse av totale fenoler ble byggprøven opparbeidet i henhold til Folin-Ciocalteu's metode (kapittel 2.8.2), og for analyse av antioksidantkapasitet ble prøven opparbeidet i henhold til FRAP metode utarbeidet av Benzie og Strain, 1999. Begge analysene ble utført på et spektrofotometer, med en absorpsjons ved 593nm (FRAP) og 765nm (totale fenoler). Tabell 3.4 viser innhold av totale fenoler og antioksidantkapasitet i helkorn, avskallet korn og byggmel uttrykt som henholdsvis mg GAE/100 g og mmol Fe/100 g.

**Tabell 3.3 Innhold av totale fenoler og antioksidantkapasitet i bygg (n= 4) \*p < 0,05.**

Korn	Totale fenoler [mg/100g ts]		FRAP [mmol/100g ts]	
	Frie stdav	Bundne stdav	Frie stdav	Bundne stdav
Helkorn	324 ± 14,3	297 ± 5,28	3,92 ± 0,09	3,28 ± 0,16
Avskallet korn	306 ± 65,9	157* ± 1,74	4,10 ± 0,20	1,98* ± 0,05
Byggmel	305 ± 20,9	157* ± 13,2	3,50* ± 0,20	1,90* ± 0,14

Resultatene viste at helkorn hadde det høyeste innholdet av totale fenoler med 324 ± 14.3 og 297 ± 5.28 mg/100g av henholdsvis frie og bundne syrer. Det var ingen signifikant effekt av avskalling og maling på totale frie fenoler. Etter begge prosesseringene var innholdet av totale bundne fenoler signifikant redusert, og tilsvarte et tap på 47 % sammenlignet med helkorn. Avskalling hadde ingen signifikant effekt på antioksidantkapasiteten til frie fenoler, men på bundne. Maling reduserte både kapasiteten til både frie og bundne signifikant.

### 3.3.3 Frie og bundne fenoliske syrer i helkorn, avskallet korn og byggmel

Det var ønskelig å se effekten av avskalling og maling på innhold av frie og bundne fenoliske syrer i byggkornet. De fire syrene som ble studert var ferulsyre (FA), p- Kumarinsyre(p- CA), kaffesyre (CA) og sinapinsyre (SA). Byggprøven ble hydrolysert med NaOH i 16-20 timer, og ekstrahert med etylacetat. Det ble utført analyser av frie syrer i helkorn, avskallet korn og byggmel, mens bundne syrer ble analysert kun i avskallet korn, da denne korntypen ble benyttet som materialet videre i forsøkene. Det ble ikke detektert SA i byggprøvene, og derfor er denne syren ikke vist i tabell. Tabell 3.4 viser innholdet av frie og bundne fenoliske syrer i helkorn, avskallet korn og byggmel uttrykt som µg/g ts.

**Tabell 3.4 Innhold av fenoliske syrer i helkorn, avskallet korn og byggmel(n= 2) \*p < 0,05.**

Korn	FA [µg/g ts]		p- CA [µg/g ts]		CA [µg/g tv]	
	Frie stdav	Bundne stdav	Frie stdav	Bundne stdav	Frie stdav	Bundne stdav
Helkorn	1,23 ± 0,04		1,50 ± 0,02		0,53 ± 0,02	
Avskallet korn	0,78* ± 0,08	519 ± 1,41	0,49* ± 0,03	94,7 ± 5,87	0,31* ± 0,02	17,45 ± 1,70
Byggmel	0,85* ± 0,03		0,66* ± 0,03		0,34* ± 0,01	

Helkorn hadde det høyeste innholdet av frie syrer, og p- CA utgjorde den største delen av syrene med  $1.50 \pm 0.02 \mu\text{g/g ts}$ . Både avskalling og maling reduserte innholdet av frie syrer signifikant. I avskallet korn og byggmel var det høyest innhold av FA, som ble redusert med henholdsvis 37 % og 31 % sammenlignet med helkorn. Det nest høyeste innholdet var av p- CA, og syren ble redusert med 66 % og 56 % etter henholdsvis avskalling og maling. Resultatene viste et tydelig høyere innhold av bundne syrer i kornene, og hovedrepresentanten var FA med  $519 \pm 1,41 \mu\text{g/g ts}$ .

### 3.3.4 Innhold av fenoliske komponenter i bløtlagt og varmebehandlet bygg

Det var ønskelig å se effekten av både bløtlegging og koking på innholdet av totale fenoler og enkelte fenoliske syrer (FA, p- CA, CA og SA), samt antioksidantkapasitet i bygg. For å se effekten av behandlingene, ble rå avskallet bygg benyttet som sammenligningsgrunnlag. I tillegg ble kornene målt før og etter hver behandling, for å vise volumøkning som følge av behandlingene. Tabell 3.5 viser volumøkning av 5 korn veid før og etter behandling.

Byggmaterialet som ble benyttet var avskallet korn og byggmel. Ved behandling ble 45g bygg (korn eller mel) blandet med 300 mL vann. Oppskriften til varmebehandlingene er vist i vedlegg. Det var ønskelig å se hvor mye av syrene som eventuelt lekker ut i kokevann. Byggrisen ble derfor separert fra kokevannet, og det ble utført analyse av byggris og kokevann hver for seg. Etter behandling av byggkornene, ble de frysetørket og malt på en mølle (Retsh ZM 100, Haan, Tyskland<sup>9</sup>). For analyse av frie og bundne fenoliske syrer, ble byggprøven ekstrahert med metanol og etylacetat (frie), basehydrolysert og etylacetatekstraksjon (bundne)( kapittel 2.7)Byggprøven for analyse av totale fenoler og antioksidantkapasitet, ble opparbeidet i henhold til Folin-Ciocalteu's metode og metode utarbeidet av Benzie og Strain, 1999. Tabell 3.6-3.11 viser innholdet av henholdsvis frie og bundne fenoliske syrer, samt totale fenoler ved ulike behandlinger av kornet. Tabell 3.12 viser antioksidantkapasitet i bygg før og etter behandling. Til sammenligningsgrunnlag blir ubehandlet avskallet korn og byggmel (45 g) benyttet.

**Tabell 3.5 Kornenes (5stk) volumøkning etter hver behandling. (n =2)**

Behandling	Før behandling(tørt) [g]	Etter behandling [g]
Bløtlegging	0,192	0,352
Bløtlegging + koking 15min.	0,192	0,456
Koking 45min.	0,192	0,547
Koking av byggmel 20min.,(1ts)	0,412	1,250

Som tabellen viser økte kornets volum som følge av behandlingene. Det var byggmel kokt i 20 minutter og koking av avskallet byggkorn i 45 minutter som gav størst økning, med henholdsvis 3 og 2,9 ganger høyere vekt enn opprinnelige vekt. Bløtlegging av kornet gav den laveste volumøkningen, med økning på 1,8 ganger opprinnelige vekt. For å se på en helhetlig volumøkning etter varmebehandling, ble økning beregnet på 45g byggkorn eller 45 g byggmel. Bløtlegging og deretter koking av kornene gav 105g kokt byggris og koking 45 minutter gav 128g kokt byggris. Byggmel kokt i 20 minutter gav 137g grøt.

**Tabell 3.6 Innhold av totale frie syrer og totale fenoler(Folin Ciocalteus metode) i rå og behandlet byggkorn, samt i kokevann**

Prøve	totale frie syrer [µg]				Totale frie [mg GAE]
	FA F	p- CA F	CA F	SA F	
Rå avskallet bygg (45g)	34,87 ± 3,465	22,05 ± 1,260	13,7 ± 0,95	0	138 ± 1,63
Bløtlagt korn (82,49g)	57,41 ± 2,126	8,505 ± 0,352	11,3 ± 0,35	8,15 ± 0,35	81,4 ± 12,5
Kokt byggris15min.(105g)	76,57 ± 6,108	13,26 ± 1,153	12,4 ± 0,26	7,00 ± 0,71	53,9 ± 3,26
Kokevann	64,50 ± 0,581	10,78 ± 0,635	13,4 ± 1,23	9,78 ± 1,50	27,9 ± 3,33

**Tabell 3.7 Innhold av totale bundne syrer og totale fenoler(Folin Ciocalteus metode) i rå og kokt byggkorn, samt i kokevann**

Prøve	totale bundne syrer [µg]				Totale bundne [mg GAE]
	FA B	p- CA B	CA B	SA B	
Rå avskallet bygg (45g)	23355 ± 40,501	4259 ± 263,3	833 ± 0,95	0	70,9 ± 0,03
Bløtlagt korn (82,49g)	17348 ± 593,74	4055 ± 1205	343 ± 16,3	341 ± 82,5	55,8 ± 2,30
Kokt byggris15min.(105g)	16089 ± 526,01	3285 ± 198,1	144 ± 13,7	258 ± 27,7	49,1 ± 0,06
Kokevann	249,8 ± 1,016	21,10 ± 0,406	34,4 ± 6,76	61,4 ± 0,61	2,00 ± 0,03

Etter bløtlegging og koking 15 minutter inneholdt byggrisen (105g ris) 53,9 mg GAE frie fenoler, som tilsvarte en reduksjon av 84 mg sammenlignet med ubehandlet bygg (45 g avskallet korn). I kokevannet ble det funnet igjen 27,9 mg GAE. Dette gav et tap av 56, 2 mg GAE, som tilsvarte 41 % frie fenoler. Bløtlegging og koking hadde en positiv effekt på frie FA. Den kokte risen inneholdt 76, 6 µg FA, mens i kokevannet ble det funnet igjen 64,5 µg. Dette tilsvarte en økning på 4 ggr av frie FA (tabell 3.6).

I likhet med de frie fenolene, ble også det totale bundne fenolinnholdet redusert som følge av bløtlegging og koking. Den kokte risen inneholdt 49,09 mg GAE, som tilsvarte et tap av 21,79 mg GAE. Det ble funnet kun 2 mg GAE i kokevannet, som medførte et totalt tap av 19,79 mg GAE bundne fenoler. Etter koking inneholdt risen 16 mg (16089 µg) bundne FA, og 0,250 mg (249,8 µg), som tilsvarte et totalt tap av 7,1 mg FA (tabell 3.7).

**Tabell 3.8 Innhold av totale frie syrer og totale fenoler(Folin- Ciocalteus metode) i rå og kokt byggkorn, samt i kokevann**

Prøve	totale frie syrer [µg]				Totale frie [mg GAE]
	FA F	p- CA F	CA F	SAF	
Rå avskallet bygg (45g)	34,87 ± 3,465	22,05 ± 1,260	13,73 ± 0,945	0	137,9 ± 1,625
Kokt byggris 45min.(128g)	48,80 ± 10,18	12,29 ± 3,089	0	0	66,14 ± 5,266
Kokevann					48,73 ± 5,329

**Tabell 3.9 Innhold av totale bundne syrer og totale fenoler(Folin Ciocalteus metode) i rå og kokt byggkorn, samt i kokevann**

Prøve	totale bundne syrer [µg]				Totale bundne [mg GAE]
	FA B	p- CA B	CA B	SA B	
Rå avskallet bygg (45g)	23355±40,501	4259±263,3	832,5±0,951	0	70,88±0,032
Kokt byggris 45min.(128g)	17851±1441,5	3412,3±362,65	368,62±93,03	332,57±53,99	60, 73±5,968
Kokevann					3,647±0,515

Koking 45 minutter reduserte innholdet av både totale bundne og frie fenoler. Etter koking inneholdt risen (128 g) 66, 14 mg GAE frie fenoler, og tilsvarte et tap av 71,76 mg. Det ble funnet igjen 48,73

mg GAE i kokevannet, og det totale tapet som følge av koking var 23,03 mg GAE frie fenoler. Mengden representerte et tap av 16,7 % frie fenoler. Det ble observert en økt mengde av frie FA, som økte til 48,8 µg og tilsvarte en økning på 28 % (tabell 3.8). Den kokte byggriksen inneholdt 60,7 mg GAE bundne fenoler, og viste et tap av 10,2 mg GAE sammenlignet med ubehandlet korn. I kokevann ble det funnet 3,66 mg GAE, og det totale tapet av bundne fenoler var 6,50 mg GAE som tilsvarte 9 %.

Det ble imidlertid ikke utført analyse av syrer i kokevannet ved 45 minutter koking, slik at det totale tapet eller økning av disse mengdene ikke ble observert.

Kokingen hadde en mindre effekt på totale bundne fenoler. Etter koking inneholdt risen 60,73 mg GAE, og 3,647 mg GAE ble funnet igjen i kokevann. Det totale tapet av bundne fenoler var 6,50 mg GAE, som tilsvarte et tap av 9,2 % fenoler. Den kokte byggriksen inneholdt 17 851 mg bundne FA, som tilsvarte et tap av 5 mg (5504 µg) FA. I likhet med frie syrer, ble det ikke utført analyse a kokevannet. (tabell 3.9).

**Tabell 3.10 Innhold av totale frie syrer og totale fenoler(Folin Ciocalteus metode) i byggmel og grøt**

Prøve	totale frie syrer [µg]		CA F	SA F	Totale frie [mg GAE]
	FA F	p- CA F			
Byggmel (45 g)	38,02 ± 1,575	29,48 ± 0,945	15,30 ± 0,630	0	137 ± 6,30
Grøt 20 min (137g)	18,89 ± 3,126	6,313 ± 1,201	0	0	34,4 ± 4,02

**Tabell 3.11 Innhold av totale budne syrer og totale fenoler(Folin Ciocalteus metode) i byggmel og grøt**

Prøve	totale bundne syrer [µg]		CA B	SA B	Totale bundne [mg GAE]
	FA B	p- CA B			
Rå avskallet bygg (45g)	23355 ± 40,501	4259 ± 263,3	832,5 ± 0,951	0	70,88 ± 0,032
Byggmel (45 g)					70,7 ± 6,585
Grøt 20 min (137g)	7746 ± 427,2	2062 ± 150,0	258,5 ± 39,08	163,8 ± 30,06	30,39 ± 1,007

Etter koking inneholdt grøten 34,35 mg GAE frie fenoler, og tilsvarte et tap av 103 mg GAE. Både innholdet av frie FA og p- CA var redusert etter koking, og grøten inneholdt 18,89 µg FA og 6,313 µg p- CA. Dette tilsvarte et tap av 19,13 og 23,17 µg av henholdsvis FA og p- CA (tabell 3.10).

Det totale bundne fenolinnholdet ble i likhet med frie redusert etter koking. Grøten inneholdt 30,39 mg GAE bundne fenoler, og tilsvarte et tap av 40,3 mg GAE. Bundne fenoler ble som følge av koking

reduisert med 57 %. Da det ikke var utført analyser av bundne syrer i ubehandlet byggmel, ble innholdet sammenlignet med avskallet bygg. Det ble observert et lavere innhold av syrer i grøt enn i avskallet byggkorn. Mengden syrer funnet i avskallet bygg var 2-3 ganger høyere enn i grøten (tabell 3.11)

**Tabell 3.12 Antioksidantkapasitet (mmol Fe/100 g) i ubehandlet og behandlet bygg.**

Prøve	Frie	Bundne
Rå, avskallet bygg	1,84 ± 0,1	0,88 ± 0,08
Bløtlagt bygg	0,87 ± 0,03	0,56 ± 0,03
Bløtlagt+ kokt 15min	0,68 ± 0,04	0,47 ± 0,05
Kokevann	0,33 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Kokt 45min	0,78 ± 0,05	0,58 ± 0,10
Kokevann	0,46 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Byggmel	1,57 ± 0,08	0,70 ± 0,06
Grøt	0,44 ± 0,00	0,30 ± 0,02

Resultatene viste at antioksidantkapasiteten var høyest i helkorn, avskallet korn og byggmel, mens kokevann hadde lavest verdi. Ved behandling av kornet, ble antioksidantkapasiteten redusert.

### **3.4 Et sammensatt måltid, «Double Fresh» - forsøk**

#### **3.4.1 Introduksjon**

Måltidet bestod av laks, brokkoli og bygg, som ble pakket i en plastskål med lukk og lagret ved 4 °C. Byggisen var forhåndskokt i 45 minutter, mens brokkoli og laks ble innpakket som rå komponenter(kun minimalt prosessert). Måltidet ble analysert både før og etter mikrovarming. Lagringstiden strakk over ni dager, og det var uttak ved dag 0,6 og 9.

I dette forsøket ble det kun utført analyser på brokkoli og bygg. Brokkolimaterialet ble kvernet i en kjøkkenmaskin, frysetørket og knust til et fint pulver. Byggmaterialet ble frysetørket direkte, og malt til mel ved hjelp av en mølle.

For å studere effekten av varming i mikrobølgeovn og måltidets lagringsevne, ble rå brokkoli buketter og kokt byggryn fra dag 0 og kokt byggryn benyttet til sammenligning.

All prøvematerialet gjennomgikk en mikrobiologisk undersøkelse, hvor det totale antall bakterier ble bestemt. Undersøkelsen ble utført av laboratorieingeniør i mikrobiologisk laboratorium ved Nofima AS. Det totale antallet bakterier var ved dag 0,  $1,98 \pm 0,50$  og  $5,10 \pm 0,54$  log cfu/g for henholdsvis bygg og brokkoli. Det ble observert et stabilt nivå av bakterier i begge komponentene under lagring i 9 dager. Oppvarming i mikrobølgeovn gav imidlertid en stor reduksjon i bakterienivået hos brokkoli, mens byggrynene beholdt et jevnt og lavt nivå. Total kim i hver prøve er vist i vedlegg.

### 3.4.2 Effekt av oppvarming i mikrobølgeovn og kjølelagring av et sammensatt måltid.

Det var ønskelig å se effekten av mikrovarming og kjølelagring på enkeltkomponenter i brokkoli, og enkelt komponenter, totale fenoler, samt antioksidantkapasitet i bygg. Hvert måltid som ble varmebehandlet gjennomgikk en sensorisk test, hvor konsistens, smak og utseende ble studert. Etter fire minutter i mikrobølgeovn hadde brokkolibukettene en fin, mørkegrønn farge, men konsistensen var noe bløt som følge av lett overkoking. Byggrisen var gjennomvarm, og konsistensen var god. Figur 3.13 viser et bilde av måltidet etter oppvarming i mikrobølgeovn.



Figur 3.13 Bildet av måltidet etter oppvarming i mikrobølgeovn. Foto: Oddvin Sørheim, Nofima AS

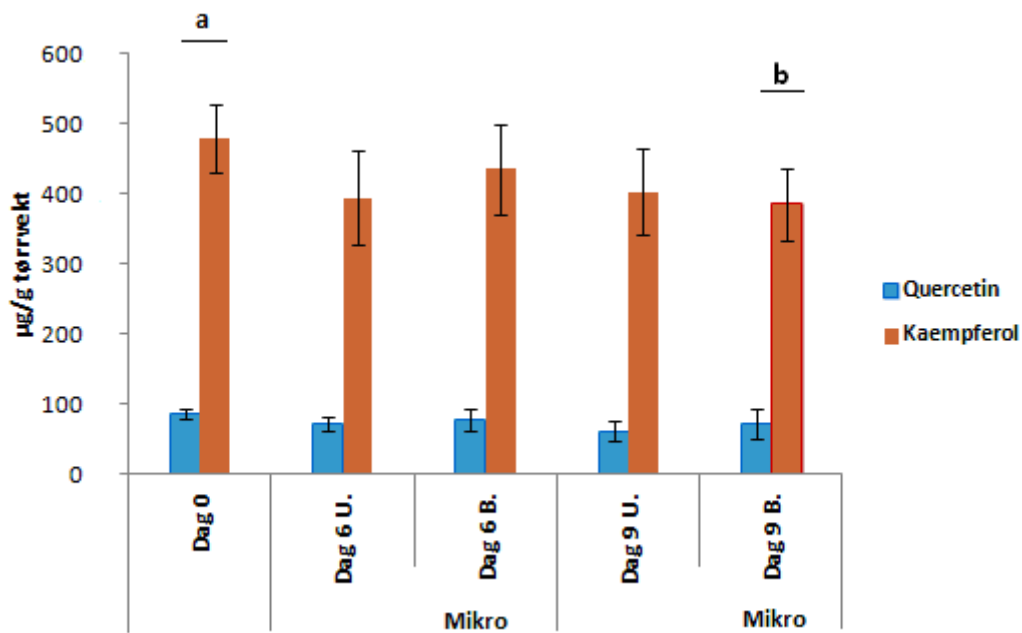
I dette forsøket vil resultatdelen bli fremstilt i to deler:

3.4.2.1 Effekten av oppvarming og lagring på brokkoli.

3.4.2.2 Effekten av koking og oppvarming i mikrobølgeovn, samt lagring på bygg.

#### 3.4.2.1 Effekt av mikrovarming og kjølelagring på innholdsstoffer i brokkoli

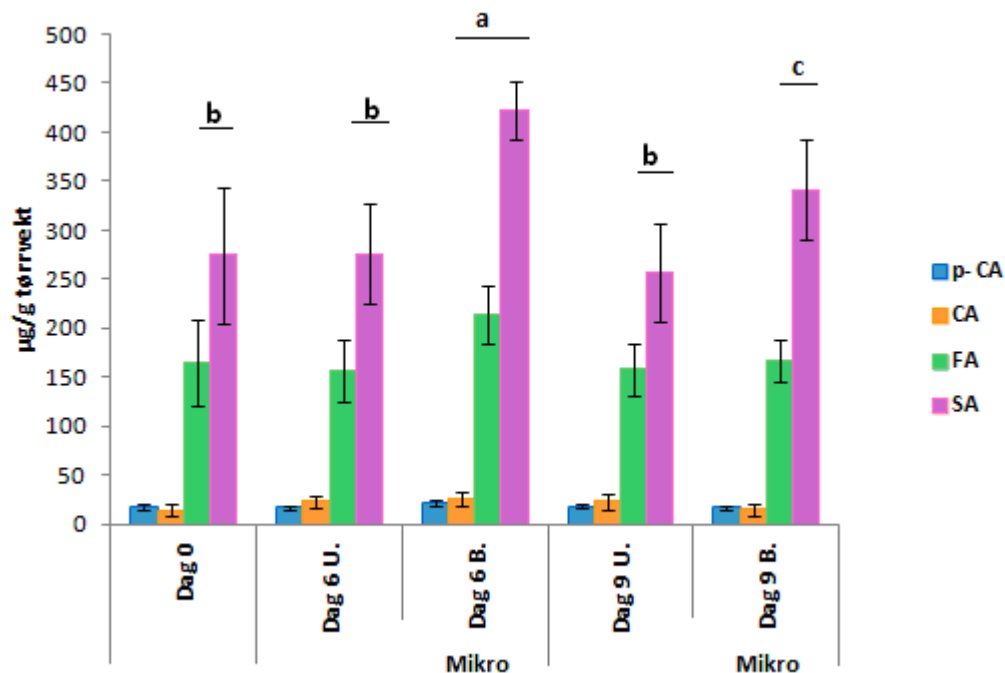
Frie flavonoler og bundne fenoliske syrer ble analysert i brokkoli. Brokkoliprøven ble ekstrahert med metanol og syrehydrolysert (frie flavonoler). Pelleten gikk videre igjennom en basehydrolyse, og etylacetatekstraksjon (bundne fenoliske syrer). Figur 3.14 og 3.15 viser effekten av mikrovarming og lagring på henholdsvis frie flavonoler og bundne fenoliske syrer, sammenlignet med rå brokkoli fra dag 0. Tallmaterialet som ligger til grunn for figurene er vist i vedlegg.



**Figur 3.14** Innhold av frie flavonoler i brokkoli i «Double Fresh» - forsøk. Innhold av quercetin og kaempferol i rå brokkoli ved dag 0 (n=5), dag 6 (n=5) og dag 9 (n=5). U= ubehandlet måltid. B= behandlet (varmet i mikrobølgeovn). Figuren er basert på gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg

Lagring over ni dager hadde ingen signifikant effekt på quercetin og kaempferol, men innholdet var henholdsvis  $71.5 \pm 11.1$  og  $394 \pm 66.7$   $\mu\text{g/g}$  ts etter 6 dager lagring og tilsvarte en reduksjon på 15 % og 17 % sammenlignet med dag 0. Det var ingen signifikant effekt av varming i mikrobølgeovn, men det ble observert en økning av både quercetin og kaempferol etter oppvarming dag 6.





Figur 3.15 Innhold av bundne fenoliske syrer i brokkoli i «Double Fresh» - forsøk. Innhold av syrer i rå brokkoli ved dag 0 (n=5), dag 6 (n=5) og dag 9 (n=5). U= ubehandlet måltid. B= behandlet (varmet i mikrobølgeovn). Figuren er basert på gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

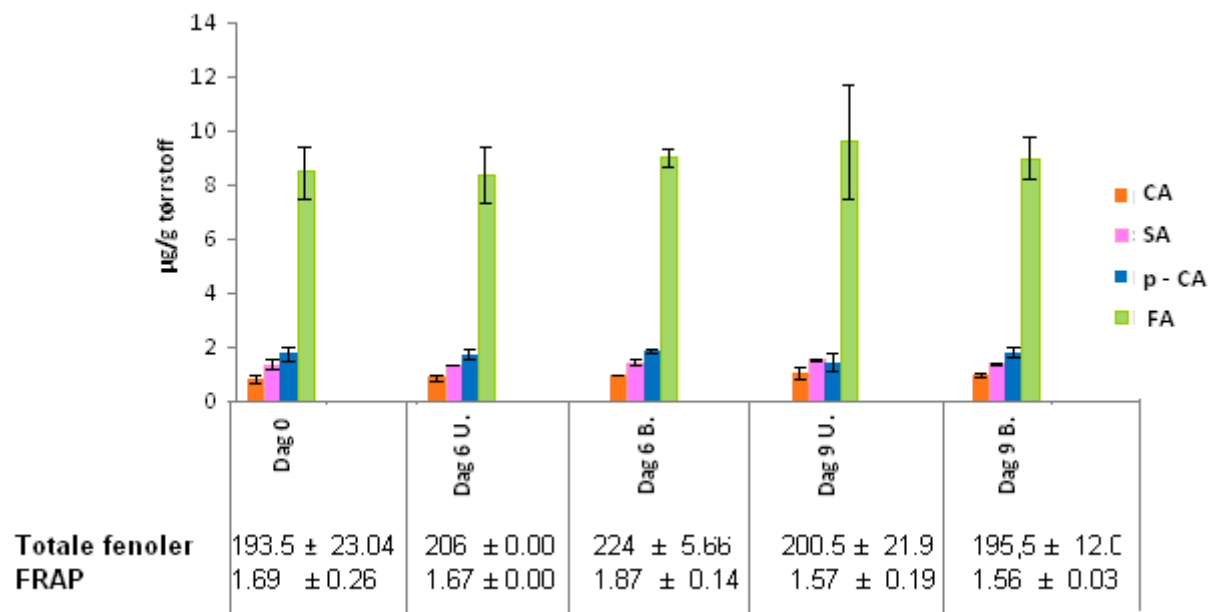
Lagring over ni dager hadde ingen signifikant effekt på bundne syrer, som var stabile gjennom lagringen. Varming i mikro hadde en signifikant effekt på både SA og FA ved dag 6, og etter varming var innholdet henholdsvis  $422 \pm 29.8$  og  $215 \pm 29.7$  µg/g ts og tilsvarte en økning på 35 % og 27 % sammenlignet med før behandling. Varming ved ni dager førte til en signifikant økning av SA innholdet, og tilsvarte en økning på 25 %.

#### 3.4.2.2 Effekt av mikrovarming og kjølelagring på innholdsstoffer i bygg

Analysene som ble utført på bygg var totale fenoler og FRAP, samt frie og bundne fenoliske syrer.

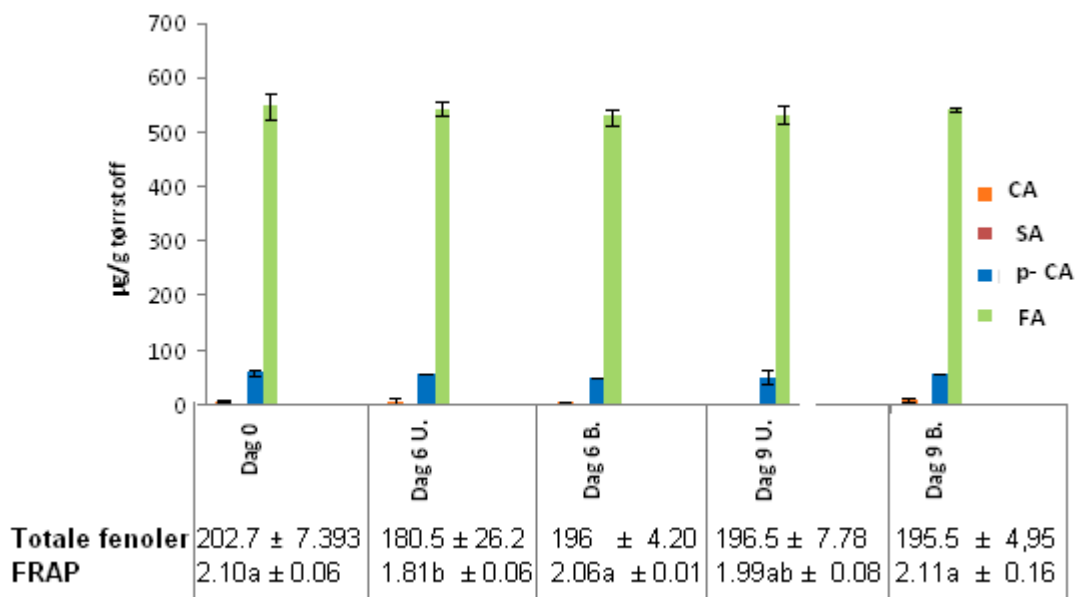
Ved analyse av frie fenoliske syrer ble byggprøven ekstrahert med metanol og etylacetat. Pelleten ble videre benyttet til analyse av bundne syrer, og ble hydrolysert med NaOH i 16 timer og ekstrahert med etylacetat. Byggprøven benyttet til totale fenoler og FRAP, ble opparbeidet og analysert i henhold til Folin-Ciocalteu's metode og metode utarbeidet av Benzie og Strain, 1999. To uker etter første analyse av byggprøvene, ble det igjen utført analyser, da av andre byggparalleller fra måltidet. Det ble ikke utført statistisk analyse på andre analyserunde.

Figur 3.16 og 3.17 viser effekten av oppvarming og lagring på innholdet av henholdsvis frie og bundne fenoliske syrer fra første analyseforsøk. Tallmaterialet som ligger til grunn for figurene er vist i vedlegg.



Figur 3.16 Innhold av totale frie fenoler, FRAP - verdi og frie fenoliske syrer i bygg i "Double Fresh"-forsøket. U= ubehandlet måltid, B= behandlet måltid(varmet i mikrobølgeovn.) Totale fenoler= mg GAE/100 g FRAP= mmol Fe/100 g Figuren er basert på gjennomsnittlige verdier og standardavvik. Dag 0(n=6), dag 6(n= 2) og dag 9(n= 2) Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Det var ingen signifikant effekt av mikrovarming eller av lagring over ni dager på innholdet av fenoliske syrer i byggrisen. Det var heller ingen signifikant effekt på det totale fenolinnholdet og FRAP verdien, men det ble observert en økning ved mikrovarming dag 6. Analysene som ble utført to uker etter første analyserunde viste samme tendens, men det ble observert et tydelig lavere innhold av totale fenoler og de enkelte syrene, sammenlignet med første analyserunde. Det ble ikke detektert CA og SA i prøvene. Tabell av andre analyserunde er vist i vedlegg.



**Figur 3.17** Innhold av totale bundne fenoler, FRAP verdi og fenoliske syrer i bygg i «Double Fresh» - forsøket. U= ubehandlet måltid, B= behandlet måltid(varmet i mikrobølgeovn.) Totale fenoler= mg GAE/100 g FRAP= mmol Fe/100 g. Figuren er basert på gjennomsnittlige verdier og standardavvik.

Dag 0(n=6), dag 6(n= 2) og dag 9(n= 2) Like bokstaver indikerer ingen signifikant forskjell.

Tallmaterialet som ligger til grunn for figuren er vist i vedlegg.

Det var ingen signifikant effekt av mikrovarming eller av lagring over ni dager, på innholdt av totale fenoler og fenoliske syrer i byggrisen. Det ble observert signifikante forskjeller i FRAP verdien. Lagring over 6 dager hadde signifikant effekt på antioksidantkapasitet i byggrisen, som ble redusert med 14 % sammenlignet med dag 0. Mikrovarming ved dag 6 viste også en signifikant effekt på FRAP verdien, og økte med 12 % sammenlignet med før varming. Lagring eller oppvarming ved ni dager hadde i midlertidig ingen effekt.

I likhet med de frie syrene, viste andre analyserunde (to uker etter) et lavere innhold av de bundne fenoliske syrene. Tabell av andre analyserunde er vist i vedlegg.

## 4 Analyse

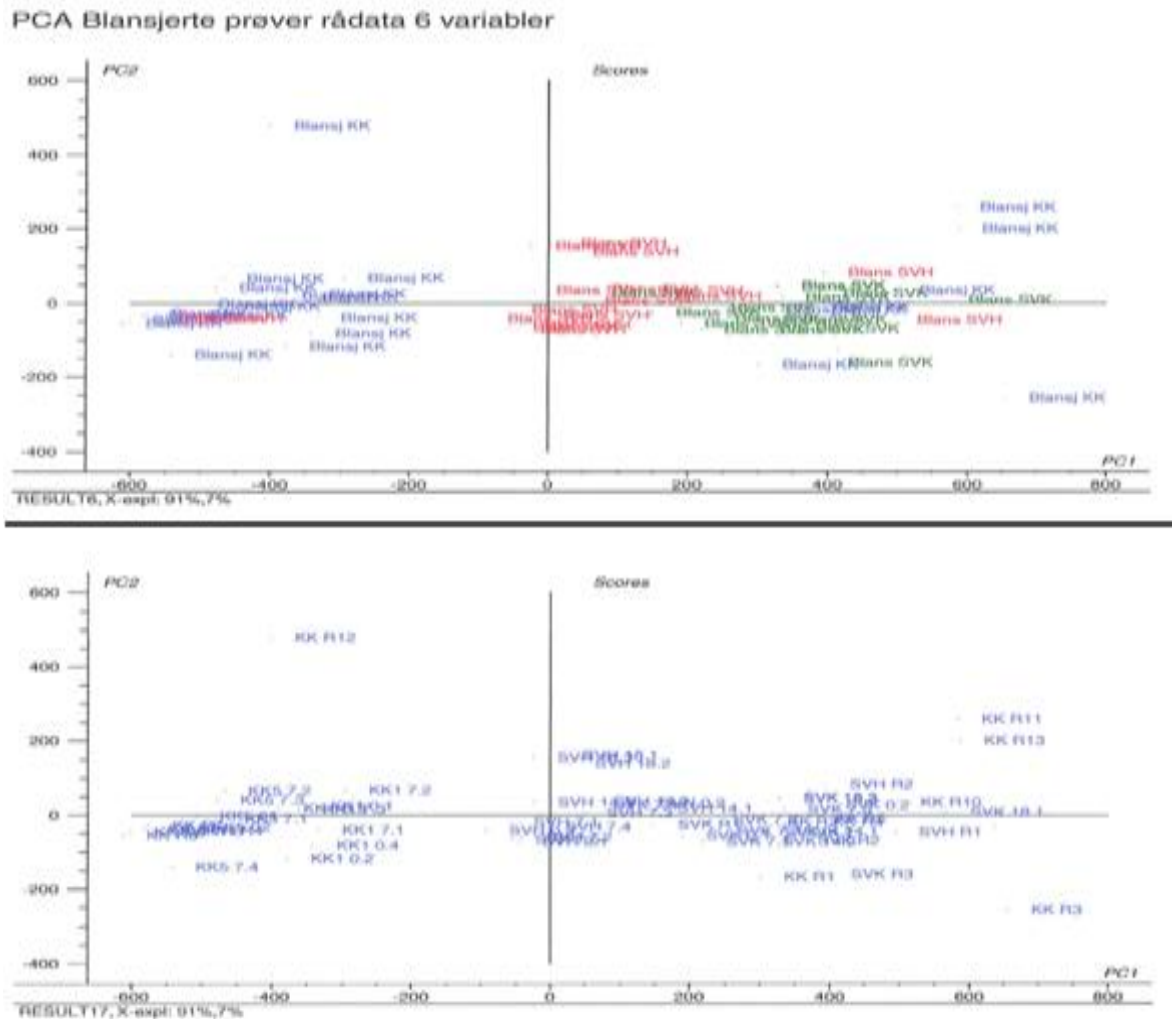
### 4.1 Brokkoli analyse

I denne oppgaven ble både frie flavonoler og bundne syrer i blomsterknopper, stilker og hel bukett studert. Resultatene viste at 60-97 % av flavanolene og syrene befant seg i blomsterknoppene (figur 3.2 og 3.3). Kaempferol var den dominerende av flavanolene, og innholdet var 5 ganger så høyt innhold som quercetin. I syrene var det SA og FA som dominerte, og utgjorde 92 % av det totale innholdet av syrene. Bukettene som var kuttet i to, inneholdt 33 % høyere bundne syrer enn hele bukettene. Ved sammenligning av flavanol og syreinnehold i hel brokkolibukett, var det totale innholdet av flavanolene dobbelt så høyt som det totale syreinneholdet. Det totale innholdet av fenoler analysert i dette forsøket varierte mellom 596- 920 µg/g ts hel brokkolibukett.

Det ble utført to kokemetoder på brokkoli, kok - og kjøll, og sous vide. Kok – og kjøll metoden ble utført ved to tider, 1.5 og 5 minutter. Resultatene viste en signifikant reduksjon av frie flavonoler, mens blansjeringen hadde ingen signifikant effekt på bundne syrer. Ved blansjering 1.5 minutt, ble 61 % og 54 % av quercetin og kaempferol bevart, mens etter 5 minutter var kun 42 % quercetin og 21 % av kaempferol bevart.

Sous vide - koking vil si at brokkolien ble vakuumpakket før koking. Fordelen med metoden er at vannet blir bevart og brokkolien blir dermed beskyttet mot vannløselige innholdsstoffer. I dette forsøket hadde kokingen av halve brokkolibuketter og knopper + stilker ingen signifikant effekt på de frie flavanolene eller bundne syrene.

Det ble utført en statistisk variansanalyse av kokemetodene på brokkoli. Et klart skille fremstod mellom kok - og kjøll og "sous vide"- metoden, og analysen indikerte en signifikant forskjell mellom dem. Variabelplottet viste at det var kaempferol som bidro mest til fordelingen. Etter vekting av prøvene, ble det fortsatt observert klare grupper som indikerte en signifikant forskjell mellom kok - og kjøll og "sous vide"- metoden. Ved sammenligning mellom varmebehandling 3 og 8 min. med "sous vide"- metodene, ble det observert mer spredte prøver og ingen klar signifikant forskjell.



Figur 4.1 En PCA(prinsipalkomponentanalyse) for alle behandlinger av brokkoli. Analysen er utført ved bruk av programmet Unscrambler PCA(prinsipal komponent analyse)Øverst: analyse av rådata fra alle behandlingene. Blå= kok - og kjøll metoden. Rød = "sous vide"- metode (8min.). Grønn = (3min.)Nederst: Forklaring på plottene. KKR= rå hele buketter.

I forsøket ble i tillegg effekten av kjølelagring studert. Kjølelagring er ofte kombinert med en kokemetode, slik at enzymer blir inaktivert før lagringen. Lagring av blansjerte buketter hadde ingen signifikant effekt på frie flavonoler, og av bundne syrer var det kun p-CA som økte signifikant. Det ble imidlertid observert en økning av alle syrene etter 7 dager. Både flavonoler og syrer viste god stabilitet ved lagringen.

Lagring av vakuumpakninger har flere fordeler som å eliminere risikoen for kontaminering under lagring, hemmer usmak forårsaket av oksidering og redusere mikrobiologisk vekst. I dette forsøket hadde lagring av sous vide kokt brokkoli ingen signifikant effekt på frie flavonoler. Bundne FA økte fra 7-18 dager, og i tillegg ble det observert en økning av SA (p-verdi = 0,048) etter 18 dager.

Lagringstiden hadde derimot en signifikant negativ effekt på CA, som ikke ble funnet etter 14 dager lagring.

## ***4.2 Bygg analyser***

Det totale innholdet av fenoler i helkorn av bygg, var i dette forsøket 621 mg GAE/100 g ts. Bygg blir ofte avskallet, slipt og malt til mel, for å danne et spiselig produkt som kan brukes i brød, grøt, supper osv. I forsøket ble både effekten av avskalling, maling og varmebehandlinger studert. Avskalling og maling hadde lik effekt på det totale fenolinnholdet og 75 % av fenoler ble bevart etter prosessering. De frie fenoliske syrene ble signifikant redusert etter både avskalling og maling, men siden det ikke ble utført analyse av bundne syrer i helkorn og byggmel, var det ikke mulig å se effekten av prosesseringen på det totale innholdet av syrer. Mesteparten av syrer sitter i skall og ytre lag, som blir fjernet under avskalling.

Varmebehandlingene som ble utført på avskallet bygg var koking i 15 og 45 minutter, mens byggmel ble kokt til grøt i 20 minutter. Varmebehandling øker vannbindingskapasiteten i kornet slik at det øker i volum, og kornet blir mykt og spiselig. Det ble i dette forsøket studert effekten av bløtlagt og kokt korn. Korn som blir bløtlagt først, trenger mindre koketid. Bløtlegging og koking 15 minutter gav en byggris på 105 g, som inneholdt totalt 103 mg GAE fenoler. Kokingen hadde sterkest effekt på frie fenoler, og den kokte byggrisen hadde bevarte 39 % av frie fenoler. Ved koking dras fenolene ut i kokevannet, såkalt "utlekkning", og i dette forsøket ble det funnet igjen 28 mg GAE i kokevann. Det var langt mindre tap av bundne fenoler i både byggris og vann. Totalt var 49 % av fenolene igjen etter koking. Bløtlegging og koking 15 minutter gav en økning av frie FA, mens et tap av 7,1 mg bundne FA. Da frie FA utgjorde kun 0,2 % av bundne FA, vil ikke økningen i frie syrer veie opp for det store tapet av bundne syrer.

Koking av avskallet bygg i 45 minutter gav en større porsjon ris (128 g) enn ved 15 minutter, og risen inneholdt 127 mg GAE. Dette tilsvarer 24 mg GAE mer enn ved koking 15 minutter. Den kokte risen hadde bevart 48 % av de frie fenolene, og 48,7 mg GAE hadde lekket ut i vannet. Det var kun en liten prosentandel som ble tapt av bundne fenoler, og totalt bevarte risen 61 % av fenolene.

Koking av byggmel til grøt hadde en større effekt på de bundne fenolene, enn de andre kokemetodene. Grøten hadde bevart 25 % av frie fenoler og 43 % av bundne fenoler. Det var ikke utført analyser på bundne syrer, men 50 % av frie FA ble tapt. Det totale fenolinnholdet som ble bevart i grøten var 31 %, som var langt mindre enn ved koking av avskallet bygg.

Antioksidantkapasiteten var høyest i frie fenoler og ubehandlet korn, og ble svekket som følge av behandling.

#### ***4.3 Et sammensatt måltid «Double Fresh» - forsøk.***

Det ble utført analyse av brokkoli og bygg satt sammen med laks til et helt måltid. Hensikten med dette forsøket var å studere effekten av komponentene satt sammen, holdbarheten til måltidet og hvilken effekt oppvarmingen av måltidet hadde på komponentene i råvarene. Resultatene viste ingen signifikant effekt av verken lagring eller varming i mikrobølgeovn på frie flavonoler i brokkoli eller frie syrer i bygg. Det var kun bundne syrer i brokkoli som økte signifikant ved varming, og tilsvarer en økning på 25-35 %. Antioksidantkapasiteten til bundne fenoler i bygg økte signifikant ved oppvarming, og reduserte som følge av lagring over 6 dager. Resultatene viste god stabilitet av komponentene ved lagring over ni dager, og et lavt bakterienivå ble observert gjennom hele lagringen.

## 5 Diskusjon

Enkle fenoler og polyfenoler er helsefremmende komponenter som finnes i nesten all mat. Maten vi spiser blir som oftest behandlet for å danne et smakfullt og spiselig produkt. I oppgaven har prosesseringsprosesser som avskalling, maling, og koking av bygg blitt studert, mens i brokkoli ble varmebehandling og kjølelagring studert. Komponentene ble også satt sammen, med laks, til et helt måltid, for å se hvor stor andel som blir bevart etter industriprosessering og tilberedning i hjemmet, samt hvor holdbart måltidet er med tanke på komponentene. En viktig del ved oppgaven var å sammenligne de ulike behandlingene, for å finne den mest skånsomme behandlingen.

### ***5.1 Innhold av fenoler i brokkoli og bygg***

Det går ikke å angi et generelt gyldig tall på det totale innholdet av fenoler i brokkoli eller bygg, fordi dette varierer avhengig av blant annet sort, vekstforhold og hvordan råvaren blir lagret og prosessert. Samtidig vil biologisk utviklingsgrad ved høsting være en viktig faktor, og en studie viser at det totale innholdet av flavonoider, sinapinsyre og ferulsyrederivater økte med modningsgrad av brokkoli [Vallejo<sup>b</sup> et al., 2003].

Variasjonen i innholdet av flavonoler og syrer varierte mellom 596- 920 µg/g ts hel brokkolibukett, hvor totale syrer utgjorde omtrent halve mengden av totale flavonoler, stemmer overens med Price et al., 1998, som fant det totale innholdet av quercetin og kaempferol aglykoner til mellom 43- 94 µg/g ferskvare. I likhet med dette forsøket, ble flavonolene syrehydrolysert. Vallejo<sup>b</sup> et al., 2003 viser i sin studie et varierende innhold av totale syrer i 3 sorter av brokkoli ved flere utviklingsstadier, og i fasen som tilsvarte minimal prosessering var det totale innholdet i en av sortene 95,2 mg/kg ferskvare. Det totale syreinnholdet inkluderte 6 derivater av sinapin og ferulsyre. Sinapinsyre og ferulsyre var de to dominerende syrene i dette forsøket, men det totale innholdet av de to syrene varierte mellom 165- 295 µg/g ts.

I denne oppgaven ble mesteparten av fenolene funnet i blomsterknoppene av en brokkoli. Dette kan forklares ved at blomsterknoppene har større overflateareal, og de er mer eksponert for sollys som induserer dannelse av fenolene. Siden stilkene er skjermet for lys danner de derfor et lavere fenolinnhold. Fordelingen av fenolene er i samsvar med den som ble funnet av Bengtsson et al. (2006), dvs. 10-15 ganger høyere flavonoidinnhold i knoppene. Det ble funnet høyere innhold av syrer i halve buketter. Planten kan øke dannelse av syrene ved stress som kutting [Ascensao og



Dubery, 2003; Dixon og Paiva, 1995]. Siden brokkolien var dyrket på samme sted og ellers behandlet likt, kan dette være en forklaring på det høyere innholdet i halve buketter.

Offentlige kostråd anbefaler å øke inntaket av helkorn, og det totale fenolinnholdet i helkorn var i dette forsøket 621 mg GAE/ 100g. Det var høyest innhold av frie fenoler som viste sterkest antioksidantkapasitet. Det bør nevnes at ved bruk av Folin Ciocalteus metode til å måle totale fenoler, inngår også måling av blant annet karotenoider og aminosyrer. Slik at det totale reelle innholdet av fenoler, kan bli noe overdrevent. Helkorn blir imidlertid avskallet eller malt til mel for å danne et spiselig korn. I forsøket hadde avskalling og maling lik effekt på det totale fenolinnholdet, og kun bundne fenoler ble signifikant redusert etter prosessering. Etter avskalling og maling var 75 % av totale fenoler bevart. Effekten av avskalling var større for belgvekster, hvor Towo et al., 2003 viser i sin studie at 31-48 % av totale fenoler ble bevart etter avskalling av belgvekster. De frie syrene ble signifikant redusert, men det ble ikke utført analyse av bundne syrer i avskallet bygg og byggmel slik at det ikke var mulig å se effekten på det totale syreinnholdet. Hernanz et al., 2001 viste at så mye som 77–87 % av det totale innholdet av syrene befinner seg i de ytre lagene. De ytre lagene fjernes under avskalling og kan forklare det store tapet av bundne fenoler som følge av prosesseringene. Dette vil si at mesteparten av syrene forsvinner allerede før tilberedning av kornet, og det næringsrike avfallet blir kastet. En mulighet til å utnytte innholdsstoffene i skallet, kan være å bruke skallet som et tilskudd i andre matvarer. Imidlertid vil varmebehandling øke frie syreinnholdet, og kompenserer for de tapte frie syrene ved avskalling (vil bli diskutert senere).

Ved å sammenligne innholdet av fenoliske syrer i bygg og brokkoli, vil 45 g bygg gi et inntak av 28 mg bundne syrer, mens 200g brokkolibuketter inneholder 5 mg. Det vil si at 6 porsjoner av 200 g brokkoli, som nesten er det totale anbefalte inntaket av grønnsaker per dag (250 g), har det samme innholdet av bundne syrer. Dette er imidlertid sett bort ifra varmebehandling av råvarene som har en stor effekt.

## ***5.2 Varmebehandling av brokkoli***

I denne oppgaven ble brokkoli kokt ved hjelp av to ulike metode, kok – og kjøll og sous vide. Det viste seg at koking i vann hadde størst effekt på flavonolene. Etter 1.5 minutter koking var 61 % og 54 % av quercetin og kaempferol mengden bevart, og ved lenger koketid tapte brokkolien ytterligere flavonoler. Dette kan forklares ved at cellenes integritet og cellevegger blir ødelagt av varmebehandlingen, slik at komponenter lekker ut i kokevann og fenolinnholdet reduseres i brokkolien. Prosessen er en funksjon av temperatur, tid og volum på kokevannet[ Vallejo<sup>a</sup> et al.,

2003]. I likhet med dette forsøket, viste studien at koking i vann hadde størst effekt på innholdet av flavonoider. Price et al.(1998), viser i sin studie at kun 14- 28 % av flavonol glykosidene var igjen etter 15 min. koking av brokkoli. Dette var noe lavere enn i vårt forsøk, og kan skyldes at vår koketid var kortere (1,5 og 5 min.)

Sous vide- koking hadde derimot ingen signifikant effekt på flavonoler og bundne syrer, som kan forklares av mindre lekkasje av komponentene ut i kokevann, og at vakuumpakningen beskytter komponentene mot oksidering. Mikrovarming («Double Fresh» - forsøket) hadde en signifikant økning av både bundne syrer, som økte med henholdsvis 35 % og 27 %. Dette kan delvis være på grunn av forskjeller i fordelingen av stilker og knopper i hvert måltid, og et av måltidene kan ha innholdt større andel stilker eller knopper enn det andre. En annen forklaring kan være at varmingen brøt cellulære bindinger, slik at de bundne syrene ble mer tilgjengelige for ekstraksjon. Funnene stemmer overens med Turkmen et al.(2005), men var motstridene med Vallejo<sup>a</sup> et al.(2003), som viste et tap av 97 % flavonoider og 74 % sinapinsyrederivater ved mikrovarming. De forklarte dette med at komponenter ble nedbrutt i vanndamp. En studie viser også at ved bruk av mindre vann og lavere energi, gir mikrovarming best bevaring av fenoler [Lopez – Berenguer et al., 2007]. Ved sammenligning av metodene tyder det på at koking med mindre kontakt med vannet, vil øke andelen av fenoler som bevares i brokkoli.

### ***5.3 Varmebehandling av bygg***

Bygg tar lang tid å koke, og kan være en av grunnene til et lavt forbruk i mange hjem. Bygg ble kokt i både 15 og 45 minutter, og det viste seg at lenger koketid gir større porsjon bygggris og inntak av fenolene. Unntaket var koking av byggmel, som gav større porsjon grøt, men lavere andel fenoler bevart. I følge Towo et al., 2003, ble 86 % av totale fenoler bevart etter bløtlegging av korn, og etter koking ble kun 21 % av fenolene bevart. I dette forsøket var tallene høyere, og 49 % av totale fenoler ble bevart etter både bløtlegging og koking. Det ble imidlertid benyttet en annen metode til måling av totale fenoler, og kan være en forklaring. Kokingen økte også tilgjengeligheten av frie syrer, mens bundne syrer gikk tapt. En årsak til tapet av bundne syrer kan være kjemisk og enzymatisk nedbrytning, som dekarboksylering, og som igjen kan gjøre syrene mer tilgjengelige for hydrolyse i tarmen. Funnene i dette forsøket er motstridende til Gallegos-Infante et al.(2009) som viser i sin studie at både det totale fenolinnholdet og antioksidantkapasitet økte som følge av koking, og forklarte økningen med degradering av fenolene. Etter koking ble det funnet store mengder fenoler i kokevannet, og analysen av vannet viste at komponentene hadde generelt lekket ut uendret fra bygggrisen.

Varming i mikrobølgeovn («Double Fresh») hadde ingen signifikant effekt på frie og bundne syrer, mens antioksidantkapasiteten økte som følge av varmebehandling. Forklaring kan være den raske oppvarmingen, og at byggrisen ikke var i kontakt med vann.

Helseeffekten forbundet med fenoliske komponenter gjelder ikke bare mengden som inntas, men også hvordan komponentene fordøyes, absorberes og metaboliseres i kroppen. Selv om flere studier viser den totale mengden av komponentene i en råvare, kan mengden av de "tilgjengelige komponentene" variere i samme råvare. Det ble vist i denne oppgaven at varmebehandling frigjorde komponentene fra matriksen, og de ble enten vasket ut i kokevann eller oppkonsentrert i byggrisen. Frigjøringen av komponentene skjedde sannsynlig på grunn av nedbrytning av celleveggen i materialet eller at de ble omdannet til mer aktive molekylære molekyler, som kan være en del av forklaringen til både økningen av frie syrer og det store tapet av bundne syrer i bygg. Dette viste at den totale mengden av fenoler ble enten fysisk tapt som følge av avskalling og maling eller kjemisk nedbrutt ved varmebehandling, men samtidig ble komponentene trolig mer tilgjengelige for absorpsjon dvs. økt biotilgjengelighet.

#### ***5.4 Effekt av lagring på flavonoler og fenoliske syrer***

Kjølelagring er en mye brukt metode i industrien til å forlenge holdbarheten til produktet, og i denne oppgaven ble det vist at metoden gav god bevaring av både flavonoler og fenoliske syrer. Lagring av måltidet («Double Fresh») over ni dager viste ingen tegn til endring av fenolinnholdet, og det ble vist et stabilt bakterienivå i både brokkoli og bygg det, og tyder på at ved slik innpakning kan lagringstiden til råvarene forlenges. Stabiliteten av komponentene kan delvis forklares ved at innpakning og kjølelagring har redusert lufttilgang, og begrenser oksidasjon og mikrobiologisk aktivitet. Da det ikke ble studert komponenter i laks i denne oppgaven, kan det ikke konkluderes med forlenget holdbarhet av hele måltidet.

#### ***5.5 Kjemisk analysemetode***

For analyse av fenoliske komponenter i brokkoli og bygg, ble det benyttet to tidligere utarbeidete metoder på Nofima [Rybarczyk, 2011; Hole et al., 2009]. Basert på disse to metodene ble det utviklet en ny metode for analyse av frie flavonoler og bundne fenoliske syrer i brokkoli. I begge metoder ble fenolene ekstrahert, isolert og oppkonsentrert og deretter analysert på HPLC.

Før ekstraksjon ble både brokkoli og bygg frysetørket, og malt til pulver. Frysetørring var et kritisk punkt i prøveprepareringen, og det var viktig at materialet var nedfrost helt til tørkingen ble satt i gang. Opptining av materialet øker enzymaktivitet og degradering av fenolene. Dette kan være årsaken til det lave innholdet fenoler i andre analyserunde i « Double Fresh» - forsøket, hvor det tok lang tid før frysetørkeren ble startet og byggprøvene begynte å tine (kapittel 3.9.2., og vedlegg for tallverdier 3.18-3.21).

Det ble ikke detektert sinapinsyre i rå avskallet bygg, men kun etter varmebehandling. Dette stemmer overens med Hernanz et al., 2001, som i sin studie av 11 byggsorter ikke detekterte sinapinsyre. Samme studie viser at innholdet av ferulsyre og p- kumarinsyre varierte mellom henholdsvis 359- 624 og 79- 260  $\mu\text{g/g}$  ts, og det ble funnet liknende mengder i dette forsøket.

Det er lite studier publisert på bundne fenoliske syrer i brokkoli. Dette gjør det vanskelig å sammenligne utbyttet av metoden som ble brukt i oppgaven med andre studier. I følge Vallejo<sup>b</sup> et al., 2003 varierte syreinnholdet mellom 5,6- 14,4 mg/kg ferskvare i brokkoli, og liknende mengder ble funnet i dette forsøket. Hvorvidt metoden gav et optimalt utbytte, trengs det mer studier på.

I resultatene ble det fremstilt store avvik i prøvene, og kan tolkes på flere måter. Store avvik kan antyde biologisk variasjon og ulik effekt av varmebehandling, eller de kan ha oppstått som et resultat av for eksempel feil ved innveiling, ulikheter i pipetteringsvolum og lignende. Enkeltverdier som skilte seg ut med for alt lave eller høye verdier i forhold gjennomsnittsverdiene, "såkalte uteliggere", ble fjernet fra beregningene.

## **5.6 Videre arbeid**

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt som handler om å få en bedre forståelse av samspillet mellom måltid, fordøyelsessystemet og immunforsvaret. Resultatene fra oppgaven er verdifull for videre arbeid i prosjektet.

Fenoliske komponentene som finnes i størst mengde i maten, behøver nødvendigvis ikke å være de mest aktive i kroppen. Ved videre arbeid ville det vært interessant å studere effekten av komponentene i en simulert fordøyelse (in vitro), både på mengden fenoler og profil. Dette fordi prosessering kan påvirke biotilgjengeligheten til komponentene. I tillegg ville det være interessant å

studere fenolenes antioksidantkapasitet under fordøyelsen, og samspill med andre komponenter i maten.

## 6 Konklusjon

I dette arbeidet ble det vist at ulike varmebehandlingsmetoder har ulik effekt på innholdet av fenoler. Kokemetoder som benyttet mindre vann og kortere koketid bevarte størst andel av fenolene. Etter varmebehandling viste fenolene god stabilitet ved kjølelagring, og det kan konkluderes at brokkoli og bygg er gode kilder til fenoler selv etter varmebehandling og lagring.

- Industriprosessering som avskalling og maling, hadde en signifikant effekt på frie fenoliske syrer og totale bundne fenoler.
- Industriprosesseringsmetoder som sous vide og kok – kjøøl hadde ulik effekt på fenolene, og sous vide var den mest skånsomme metoden.
- Kjølelagring av prosessert brokkoli hadde ingen signifikant effekt på frie flavonoler og bundne fenoliske syrer, og komponentene var stabile over 18 dager.
- Oppvarming av måltidet bestående av laks, brokkoli og bygg hadde kun en signifikant effekt på bundne syrer i brokkoli. Lagring av måltidet over ni dager hadde ingen effekt på flavonoler og fenoliske syrer, og lagringstiden til måltidet kan forlenges med tanke på disse to råvarene.
- Ved sammenligning av bundne fenoliske syrer i rå brokkoli og bygg, var bygg en mye større kilde til komponentene.

## Referanseliste

Andersen, Ø.M., Markham, K.R., 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Taylor and Francis Group. s143- 263

Andlauer, W., Stumpf, C., Hubert, M., Rings, A. and Furst, P., 2003. Influence of cooking process on phenolic marker compounds of vegetables. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**(2), 152–159.

Ascensao, A. R.F.D.C., Duber, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry*. Vol 63. 679-686

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., Aruoma, O.I., 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **84**: 1553-1561

Bavoll, G. 1995. Grønnsaksdyrking på friland. 5utg. Landbruksforlaget. s167-169  
Beckett, S.T., 1995. *Physico- chemical aspects of food processing*. Chapman& Hall, UK.

Bengtsson, G.B., Schøner, R., Lombardo, E., Schøner, J., Borge, G.I., Bilger, W., 2006. Chlorophyll fluorescence for non-destructive measurement of flavonoids in broccoli. *Postharvest Bio. Tech.* **39**: 291-298

Benzie, I.F.F, Strain, J.J., 1999 Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 633-636

Blomhoff, R., Sahlstrøm, S., 2009. Activation and inhibition of nuclear faktor kappa B activity by cereal extracts: Role of dietary phenolic acids. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 9481-9488.

Boateng, J., Verghese, M., Walker, L.T., Ogotu, S. 2008. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Sci. And Tech.* **41**: 1541-1547

Bunzel, M., Ralph, J., Steinhart, H., 2004. Phenolic compounds as cross-links of plant derived polysaccharides. *Czech J. Food Sci.* Vol. 22; Waldron, K.W., Smith A.C., Parr, A.J, Ng, A.,

Cermak, R., Durazzo, A., Maiani, G., Bøhm, V., Kammerer, D.R., Carle, R., Wiczowski, W., Piskula, M.K., Galensa, R., 2009. The influence of postharvest processing and storage of foodstuff on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**: 184-193

Cheynier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**: 223-229

Clifford, M.N., 2004. Diet -derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Plant Med* **70**: 1103-1114

Dixon, R.A., Palva, N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*. Vol 7. 1085-1097

D'Archivio M, Filesi C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* 2007; **43**:348-61.

Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Pietrafesa, A., Natella, A.S., 2007. The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. *J. Food Sci.* **vol 72, nr 2**: 130.135

Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Pulido-Alonso, J., 2010. Effect of processing on the antioxidant properties of extracts from Mexican barley (*Hordeum vulgare*) cultivar. *Food Chem.* **119**: 903-906

Gliszczyn-Swiglo, A., Ciska, E., Pawlak-Lemanska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T., Tyrakowska, B., 2006. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Add. and Contaminants.* **23**: 1088-1098

Hernanz, D., Nunez, V., Sancho, A.I., Faulds, C.B., Williamson, G., Bartolome, B., Gomez-Cordove, C., 2001. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4884-4888.

Hole, A.S., Grimmer, S., Naterstad, K., Jensen, M.R., Paur, I., Johansen, S.G., Balstad, T.R., Blomhoff, R., Sahlstrøm, S., 2009. Activation and inhibition of nuclear factor kappa B activity by cereal extracts: Role of dietary phenolic acids. *J. Agric Food Chem.* **57**: 9481-9488

Hollman, P. CH., Arts, I.CW., 2000. Flavonols, flavones and flavanols- nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric* **80**: 1081-1093

Holtekjølen, A.K., Kinitz, C., Knutsen, S.H., 2006. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. *J. Agric Food Chem.* **54**: 2253-2260

Parker M.L., 1997. *Trends Food Sci. And Tech.* **8**: 213.; Grabber, J.H., Hatfield R.D., Ralph, J., 1998. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 193

Jongen, W., Fruit and vegetable processing: improving quality. 2002. Woodhead Publishing Ltd.

Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T., 1997. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuff by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett* **114**: 165-167

Kaur, C., Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables, the millenniums health. *J. Food Sci. & Tech.* **36**: 703-725

Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., Lee, C.Y., 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* **51**:6509-6515

Knøchel, S., Vangsgaard, R., Johansen, L.S., 1997. Quality changes during storage of sous vide cooked green beans (*Phaseolus vulgaris*). *Springer-Verlag, Z. Lebensm Unters Forsch A.* **205**: 370.374



Kong, K.W., Mat-Junit, S., Aminudin, N., Ismail, A., Abdul- Aziz, A., 2012. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chem.*

Lafay, S., Gil- Izquierdo, A., 2007. Bioavailability of phenolic acids. *Springer Sci. Phytochem. Rev.* **7**: 301-311

Lopez-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, D.A., Garcia-Viguera, C., 2007. Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 10001-10007

Lule, S.U., Xia, W., 2005. Food phenolics, pros. and cons: A review. *Food Rev.Int.* **21**: 367-388

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *J. Clin. Nutr.* **79**: 727-747.

Natella, F., Belelli, F., Ramberti, A., Scaccini, C., 2010. Microwave and traditional cooking methods: Effect of cooking on antioxidant capacity and phenolic compounds content of seven vegetables. *J. Food Biochem.* **34**: 796-810

Nettside: <http://www.brodogkorn.no/fakta/bygg/>

Newman, R.K., Newman, C.W., 2008. Barley for food and health. Science technology products. Inc.Publication. s 81-120

Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **vol. 2. Nr 5**: 270.278

Podsdek, A., Sosnowska, D., Redzynia, M., Koziolkiewicz, M., 2008. Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *J. Food Sci. Tech.* **43**: 1770- 1777

Price, K.R., Casascelli, F., Colquhoun, I.J, Rhodes, M.J.C, 1998. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 468-472.

Radtke, J., Linseisen, J., Wolfram, G., 1998. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food composition survey. *Z.Ernahrungswiss* **37**:190-197

Rawson, A., Koidis, A., Rai, D.K., Tuohy, M., Brunton, N., 2010. Influence of sous vide and water immersion processing on polyacetylene content and instrumental color of parsnip (*Pastinaca sativa*) disks. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7740-7747

Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric Food Chem.* **51**: 2866-2887

Robichaud, J. L. and Noble, A. C.1990, Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **53**: 343–353.

Rodriguez- Arcos, R.C., Smith, A.C., Waldron, K.W. 2002. Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *J. Agric. Food Chem.* **50**:3197-3203

Rybarczk, A., 2011. HPLC analysis of flavonols in broccoli after acidic hydrolysis. *Nofima AS*.

Santos Buelga, C., Williamson, G. 2003. *Methods in polyphenol analysis*. The Royal Society of Chemistry, UK.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P., Rice-Evans, C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain breaking antioxidants. *Archive of biochemistry and biophysics*. Vol.322 nr 2. s339-346

Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**: 2073-2085

Schmidt, B.M., Erdman, J.W., JR, Lila, M.A., 2005. Effects of food processing on blueberry antiproliferation and antioxidant activity. *J. Food Sci.* vol. **70**. Nr 6: 389-394

Shahidi, F., 1997. *Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications*. AOCS Press, USA, s 36

Shahidi, F., Naczk, M., 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press LLC, USA.

Singleton VL and Rossi JA .1965. *Am J Enol Vitic* **16**: 144-158

Slavin, J.L., Jacobs, D., Marquart, I., 2000. Grain processing and nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**:309–326

Spencer, J.P. E., Mohseni M M. A. E., Minihane, A.M., Mathers, J.C., 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J.Nutr.* **99**: 12-22

Towo, E.E., Svanberg, U., Ndossi, N.G., 2003. Effect of grain pre-treatment on extractable phenolics group in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *J. Sci of Food and Agric.* **83**:980–986

Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, S., 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* **93**: 713-718

<sup>a</sup> Vallejo, F., Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C. 2003. Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking. *J. Sci. Food Agric.* **83**: 1511-1516

<sup>b</sup> Vallejo, F., Garciaa-Viguera, C., Tomaas-Barberaan, F.A., 2003. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *J. Agric Food Chem.* **51**: 3776-3782

Vallejo, F., Tomas-Barberan, F., Garcia-Viguera, C., 2003. Health promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J. Agric Food Chem.* **51**: 3029-3034

Volden, J., Borge, G.I., Bengtsson, G.B., Hansen, M., Thygesen, I.E., Wicklund, T., 2008. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *Capitata* f. *rubra*). *Sci. Dir. Food Chem.* **109**: 595-605

Volden, J., Bengtsson, G.B., Wicklund, T., 2009. Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*): Effects of long-term freezer storage. *J. Food Chem.* **112**: 967-976

Waterman, G.P., Mole, S., 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell scientific publications. s 1-104

Werlein, H.D., 1998. Comparison of the quality of sous vide and conventionally processed carrots. *Springer-Verlag, Z.Lebensm Unters Forsch A.* **207**: 311-315

Wink, M., 1997. Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Avd. Bot. Res.* Volum **25**: 141-169

Yuan, G.F., Sun, B., Yuan, J., Wang, Q.M., 2009. Effects on different cooking methods on health - promoting compounds of broccoli. *Univ.Sci B.* **10**:580-588

## **Vedleggsliste**

- 1. Eksempel på utregnet mengde fenoliske komponenter i prøve.**
- 2. Tallmaterialer som ligger til grunn for figurer.**
- 3. Oppskrift på varmebehandling av bygg.**
- 4. Totalkim i bygg og brokkoli fra «Double Fresh»- forsøk.**

### **1. Eksempel på utregnet mengde fenoliske komponenter i prøve.**

Hver komponent i prøven blir identifisert og kvantifisert ved å sammenligne retensjonstid, toppsymmetri og UV- spekter med en kjent standardrekke. Mengde av komponentene i prøven, blir uttrykt som mg/L.

I dette regneeksempelet brukes ferulsyre, 50mg/L. Det ble veid inn 0,200g byggprøve og som ble ekstrahert med etylacetat. Ekstraktet ble deretter inndampet ved bruk av en speed vac og reløst i 2mL 25 % MeOH.

Mengde ferulsyre blir videre omgjort til mg/kg ved hjelp av likning 1.

$$\text{mg/kg} = \frac{\text{mg/L} \times \text{fortynningsvolum(mL)} \times 10^3}{\text{vekt(g)}}$$
$$\text{mg/kg} = \frac{50 \times 2 \times 1000}{200} = 500$$

Hvor,

**mg/L** er resultat fra HPLC, 50mg/L

**Fortynningsvolum**, 2mL

**Vekt**, innveid materialet 0,200g

Tørrstoff prosenten i byggmaterialet ble bestemt i forkant, og mengden ferulsyre blir omgjort til µg/g tørrvekt ved hjelp av likning 2.

$$\mu\text{g/g tv} = \frac{\text{mg/kg} \times 100}{\text{tørrstoffprosent}} \quad \mu\text{g/g tv} = \frac{500 \times 100}{90} = 556$$

Prøven inneholdt 556µg/g tørrvekt.

## 2. Tallmaterialer til grunn for figurer

Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.2

Brokkoliprøve	Del	µg/g tørrstoff				Antall paralleller
		Quercetin	SE	Kaempferol	SE	
Hele	Stilker	19,3	2,40	30	12,0	4
	Knopper	172	33,6	975	165	5
	Hel bukett	86,4	16,6	449	74,4	4
Halve	Stilker	29,5	1,63	67,8	19,1	2
	Knopper	184	41,9	977	95,0	2
	Hel bukett	94	18,6	450	28,60	2
Knopper+stilker	Knopper + stilker	179	45,0	874	141	3

Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.3

Brokkoliprøve	Del	µg/g ts								Antall paralleller
		p- CA	Stdav	CA	Stdav	FA	Stdav	SA	Stdav	
Hel bukett	Stilker	2,11	1,44	8,50	2,96	13,4	5,08	90,4	18,4	4
	Knopper	14,9	2,62	21,0	7,50	174	40,7	307	79,6	5
	Hel bukett	7,41	1,76	13,1	5,01	80	19,7	150	45	4
Halv bukett	Stilker	4.64, 4.59	0,00	7.60, 11.0	0,00	18.64, 20.0	0,00	93.7, 103	0,00	2
	Knopper	21.1, 22.31	0,00	36.0, 22.0	0,00	219	0,0	357	0,0	2
	Hel bukett	11.6, 12.0	0,00	19.5, 15.6	0,00	103	0,0	204,3	0,0	2
Knopper+stilker	Knopper + stilker	14,0	0,60	25,2	1,98	150	18,6	283	38,4	3

Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.4

Brokkoliprøve	µg/g tørrvekt				Antall analyse-paralleller
	Quercetin	Std	Kaempferol	Std	
Hel bukett rå	86,4	16,6	449	74,4	4
Hel bukett blansjert (1.5)	53,0	14,4	242	33,1	4
Hel bukett blansjert (5)	36,2	7,74	95,9	0,48	2

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.5**

Brokkoliprøve	µg/g tv								Antall analyse- paralleller
	p- CA	Std	CA	Std	FA	Std	SA	Std	
Hel bukett rå	7,41	1,76	13	5,0	80	19,7	150	45	4
Hel bukett blansjert (1.5)	10,7	1,41	14,1	3,49	71,5	22,3	148	65,1	3
Hel bukett blansjert (5)	11,9	0,06	4,88	1,39	49,9	5,39	125	21,0	2

\* Gjennomsnittlig verdi

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.6.****Begge analyseverdier er gitt ved n=2**

Brokkoliprøve	µg/g tørrstoff				Antall paralleller
	Quercetin	Std	Kaempferol	Std	
Rå bukett	107, 81.1	0	470,430	0	2
Sous vide (8)	134	18,4	571	90,0	3
Rå kn.+ st.	179	45,0	874	141	3
Sous vide (3)	178, 217	0	761,918	111	2

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.7. Begge analyseverdiene er vist ved n=2**

Brokkoliprøve	µg/g tørrstoff								Antall paralleller
	p- CA	Std	CA	Std	FA	Std	SA	Std	
Rå bukett	11.6,12.04	0	19.5,5.60	0	103,118	0	204,258	0	2
Sous vide (8)	11,8	0,35	19,17	9,51	115	39,1	258	78,8	3
Rå kn.+ st.	14,0	0,60	25,2	1,98	150	18,6	283	38,4	3
Sous vide (3)	14.9,18.9	0	17.0,6.87	0	147,209	0	276,408	0	2

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.8**

Brokkoli	µg/g tv				Antall analyse- paralleller
	Quercetin	Stdav	Kaempferol	Stdav	
<b>dag 0</b> (1.5)	53,0	14,4	242	33,1	4
<b>dag 7</b> (1.5)	56,8	9,28	257	25,3	3
<b>dag 0</b> (5)	36,2	7,74	95,9	0,48	2
<b>dag 7</b> (5)	39,6	6,31	115	9,83	3

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.9**

$\mu\text{g/g tv}$									
Brokkoliprøve	p- CA	Stdav	CA	Stdav	FA	Stdav	SA	Stdav	Antall analyse- paralleller
dag 0 (1.5)	10,0	1,68	11,1	6,58	62,13	26,2	148	65,14	3
dag 7 (1.5)	13,3	1,87	12,5	8,04	82,4	22,0	213	59,1	3
dag 0 (5)	11,9	0,06	4,88	1,39	49,89	5,39	125	21,0	2
dag 7 (5)	14,4	4,46	4,82	8,34	67,2	8,36	189	42,9	2

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.10. Begge analyseverdiene er vist ved n=2**

$\mu\text{g/g}$ tørrstoff					
Brokkoliprøve	Quercetin	Stdav	Kaempferol	Stdav	Antall paralleller
Dag 0 (8)	134	18,4	571	90,0	3
Dag 7 (8)	109	12,3	559	34,9	5
Dag 14 (8)	135	27,3	614	81,9	3
Dag 18 (8)	94,1	5,76	524	27,9	3
Dag 0 (3)	180,217	0,0	761,218	0	2
Dag 7 (3)	157	15,2	774	97,2	5
Dag 14 (3)	162	14,5	875	12,6	3
Dag 18 (3)	193	60,7	937	134	3

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.11**

$\mu\text{g/g}$ tørrstoff									
Brokkoliprøve	p- CA	stdav	CA	stdav	FA	stdav	SA	stdav	Antall paralleller
Dag 0 (8)	12,8	3,29	19,67	9,51	115	39,1	258	78,8	3
Dag 7 (8)	11,38	2,241	16,44	4,101	110,00	18,39	254,51	40,77	5
Dag 14 (8)	10,89	1,021	0,00	0	96,18	4,679	211,00	13,115	3
Dag 18 (8)	12,03	1,4773	0,00	0	111,86	27,15	252,00	51,64	3

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.12**

$\mu\text{g/g}$ tv									
Brokkoliprøve	p- CA	Stdav	CA	Stdav	FA	Stdav	SA	Stdav	Antall analyse- paralleller
Dag 0 (3)	16,9	2,86	11,9	7,16	178	43,6	342	93,2	2
Dag 7 (3)	15,418	2,1006	18,71	5,707	164	26,99	328	39,335	5
Dag 14 (3)	16,07	0,504	9,83	5,685	168	7,481	322,67	15,5	3
Dag 18 (3)	19,27	0,4277	15,34	5,35	225	4,874	422	10,883	3



Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.16

Brokkoliprøve	µg/g tv			Stdav	Antall analyseparalleller
	Quercetin	Stdav	Kaempferol		
Dag 0	85,7	7,77	480	47,9	5
Dag 6 U.	71,5	11,1	394	66,7	5
Dag 6 B.	78,2	15,5	436	64,1	5
Dag 9 U.	61,3	15,4	403	61,8	5
Dag 9 B.	70,9	22,2	385	51,2	5

Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.17

Brokkoliprøve	µg/g tv								Antall analyseparalleller	
	p- CA	Stdav	CA	Stdav	FA	Stdav	SA	Stdav		
Dag 0	17,6	3,11	14,3	5,91	16	44,1	27	5	69,4	5
Dag 6 U.	17,3	2,27	23,0	6,99	15	31,7	27	5	51,2	5
Dag 6 B.	21,5	2,99	25,2	7,04	21	29,7	42	5	29,8	5
Dag 9 U.	18,0	1,99	23,1	7,85	15	26,0	25	5	50,7	5
Dag 9 B.	17,4	1,84	15,1	5,95	16	21,5	34	5	51,1	5

Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.18

Byggprøve	µg/g tørrvekt								Antall analyseparalleller
	CA		SA		p- CA		FA		
	Frie	std av	Frie	std av	Frie	std av	Frie	std av	
Rå bygg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,06	0,78	0,06	2
Dag 0 (1)	0,79	0,13	1,36	0,20	1,76	0,27	8,44	0,95	6
Dag 6 U.(1)	0,84	0,09	1,35	0,01	1,70	0,16	8,35	1,05	2
Dag 6 B.(1)	0,93	0,02	1,41	0,10	1,82	0,05	8,97	0,34	2
Dag 9 U.(1)	1,00	0,18	1,51	0,06	1,39	0,33	9,59	2,09	2
Dag 9 B.(1)	0,94	0,06	1,39	0,04	1,75	0,16	8,96	0,79	2
Dag 6 U.(2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,09	3,94	0,24	2
Dag 6 B.(2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,08	4,26	0,46	2
Dag 9 U.(2)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,78	4,40	0,70	2
Dag 9 B.(2)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	0,08	4,48	0,26	2

Tallmaterialet som ligger til grunn for  
figur 3.19

Byggprøve	Totale fenoler(mg GAE/100g tv)		FRAP(mmol FE/100g tv)		Antall analyse-parallell
	Frie	std avvik	Frie	std avvik	
Rå bygg	307	65,9	4,08	0,20	4
Dag 0 (1)	194	23,0	1,69	0,26	6
Dag 6 U.(1)	206	0,00	1,67	0,00	2
Dag 6 B.(1)	224	5,66	1,87	0,14	2
Dag 9 U.(1)	201	21,9	1,57	0,19	2
Dag 9 B.(1)	196	12,0	1,56	0,03	2
Dag 6 U.(2)	163	6,79	1,5	0,20	2
Dag 6 B.(2)	162	2,73	2,1	0,90	2
Dag 9 U.(2)	178	0,24	1,1	0,10	2
Dag 9 B.(2)	187	6,62	1,6	0,10	2

Tallmaterialet som ligger til grunn for  
figur 3.20

Byggprøve	µg/g tørrvekt								Antall analyse-paralleller
	CA		SA		p- CA		FA		
	Bundne	std avvik	Bundne	std avvik	Bundne	std avvik	Bundne	std avvik	
Rå bygg	20,0	0,00	0	0	94,6	5,85	519	0,90	2
Dag 0(1)	4,82	3,84	0	0	57,1	5,50	547	24,8	6
Dag 6 U.(1)	4,90	6,92	0	0	55,8	0,57	543	13,4	2
Dag 6 B.(1)	6,62	0,33	0	0	49,3	0,14	527	14,1	2
Dag 9 U.(1)	0,00	0,00	0	0	50,2	10,3	531	17,0	2
Dag 9 B.(1)	8,31	3,24	0	0	56,4	0,64	542	2,83	2
Dag 6 U.(2)	6,70	0,00	0,00	0,00	49,3	4,20	495	9,57	2
Dag 6 B.(2)	6,28	0,17	0,00	0,00	52,6	1,81	488	9,57	2
Dag 9 U.(2)	6,80	0,00	0,00	0,00	48,4	2,73	492	10,9	2
Dag 9 B.(2)	6,08	0,22	0,00	0,00	56,2	8,79	500	0,94	2

**Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.21**

Byggprøve	Totale fenoler(mg GAE/100g tv)		FRAP		Antall analyse- parallell
	Bundne	std avvik	Bundne	std avvik	
Rå bygg	158	1,74	1,98	0,00	4
Dag 0(1)	203	7,39	2,10	0,06	6
Dag 6 U.(1)	181	26,2	1,81	0,06	2
Dag 6 B.(1)	196	4,20	2,06	0,01	2
Dag 9 U.(1)	197	7,77	1,99	0,08	2
Dag 9 B.(1)	196	4,95	2,11	0,16	2
Dag 6 U.(2)	192	10,6	2,44	0,10	2
Dag 6 B.(2)	197	3,16	2,47	0,00	2
Dag 9 U.(2)	209	1,48	2,64	0,00	2
Dag 9 B.(2)	173	20,7	2,24	0,20	2

**3. Oppskrift på varmebehandling av bygg****Oppskrift på varmebehandling av bygg**

Kornstype:	Prosessering	Blandingsforhold
Avskallet bygg	<u>Bløtlegging + koking</u> Bygg blandet med vann stod i romtemperatur i ca 18-24 timer. Bløtlagt bygg ble kokt i 15 minutter Kokevann fryst ned	45g bygg +300ml vann
Avskallet bygg	<u>Koking</u> Bygg ble kokt i 45 minutter Kokevann fryst ned	45g bygg +300ml vann
Byggmel	<u>Koking</u> Bygg ble kokt i 20 minutter	45g byggmel +300ml vann

#### 4. Totalkim i bygg og brokkoli fra «Double Fresh»- forsøk

<b>Total kim i bygg fra «Double Fresh»- forsøk</b>				
Total antall bakterie(PCA)				
Dag	Byggryn	CFU, pr g	Log CFU, pr g	Stdav.
<b>Dag 0</b>				
Før	1	180	2,26	0,50
	2	280	2,45	
	3	40	1,60	
	4	20	1,30	
	5	200	2,30	
<b>Dag 6</b>				
Før	1	20	1,30	0,84
	2	20	1,30	
	3	1320	3,12	
	4	240	2,38	
	5	20	1,30	
Etter	6	20	1,30	0,00
	7	20	1,30	
	8	20	1,30	
	9	20	1,30	
	10	20	1,30	
<b>Dag 9</b>				
Før	1	2200	3,34	0,76
	2	40	1,60	
	3	40	1,60	
	4	40	1,60	
	5	80	1,90	
Etter	6	40	1,60	0,14
	7	20	1,30	
	8	20	1,30	
	9	20	1,30	
	10	20	1,30	

<b>Totalkim i brokkoli fra «Double Fresh»- forsøk</b>				
Total antall bakterier (PCA)				
Dag	Brokkoli	CFU, pr g	Log CFU, pr g	Stdav.
<b>Dag 0</b>				
Før	1	140000	5,15	0,54
	2	26000	4,41	
	3	820000	5,91	
	4	110000	5,04	
	5	94000	4,97	
<b>Dag 6</b>				
Før	1	1700000	6,23	0,66
	2	3900000	6,59	

	3	13000000	7,11	
	4	280000	5,45	
	5	580000	5,76	
Etter	6	20	1,30	0,00
	7	20	1,30	
	8	20	1,30	
	9	20	1,30	
	10	20	1,30	
<b>Dag 9</b>				
Før	1	700000	5,85	0,97
	2	360000	5,56	
	3	260000	5,41	
	4	420000	5,62	
	5	55000000	7,74	
Etter	6	20	1,30	0,30
	7	20	1,30	
	8	60	1,78	
	9	40	1,60	
	10	100	2,00	