



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Sammenligning av biotilgjengelighet av viktige næringsstoffer i melk og havredrikk – en *in vitro* studie

Comparison of bioavailability of important nutrients
in milk and oat drink– an *in vitro* study

Emilie Wærnes Engstrøm

Matvitenskap

FORORD

Denne oppgaven ble skrevet i forbindelse med en toårig masterutdannelse i matvitenskap, med retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven ble skrevet i samarbeid med TINE SA og laboratoriearbeid knyttet til oppgaven ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) våren 2023. To av analysene ble utført ved fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA) ved NMBU.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Forsker Tove G. Devold for gode, konstruktive tilbakemeldinger, og oppfølging gjennom hele skriveprosessen. Videre vil jeg takke biveileder Forsker Anne-Grethe Johansen og Kirsti Wettre Brønner (TINE) for nyttig kunnskapsdeling og gode råd. En stor takk til Solfrid Lohne (MINA) for utførelse av ICP-OES og ICP-MS og Førsteamanuensis Catrin Tyl for utførelse av K-PHYT. Takk til Irene Comi og Emilie Gullberg Jørgensen for opplæring av analysemetoder og god hjelp underveis. Tusen takk til Ahmed Abdelghani som har vært hjelpsom på laboratoriet og kommet med gode innspill. Jeg vil også takke TINE SA for økonomisk støtte til innkjøp av kommersielle produkter, gjennomføring av analysemetoder og for muligheten til å gjennomføre denne oppgaven.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all motivasjon, støtte og oppmuntrende ord under arbeidet med denne oppgaven.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2023

Emilie Wærnes Engstrøm

SAMMENDRAG

Per i dag finnes det et voksende utvalg melkeprodukter i dagligvarebutikken, som langtidsholdbar- og laktoseredusert melk, i tillegg til de mer tradisjonsrike melkeproduktene. Til tross for dette har det vært en nedgang i melkekonsumet, samtidig som det har vært en jevn økning i omsetning av plantebaserte drikker. Disse plantebaserte drikkene er ikke like næringsrike som melk, og blir derfor beriket med ulike næringsstoffer for å overkomme de ernæringsmessige begrensningene. En annen ulempe er tilstedeværelsen av antinæringsstoffer som potensielt sett kan redusere biotilgjengelighet av kalsium. For å kunne etterkomme ernæringsanbefalingene utviklet av Nordisk Ministerråd, er det avgjørende å forstå og utvikle kunnskap om hvordan mat påvirkes og endres under fordøyelsen. Simulert fordøyelse basert på *in vitro* fordøyelsesmodeller er nyttige verktøy i denne sammenheng. Denne studien omhandler hvordan biotilgjengelighet av kalsium og jod, og proteinfordøyelighet blir påvirket av produktets egenskaper og ulike prosesser som er inkludert i fremstillingen på *in vitro* fordøyelse. Totalt ble tre ulike melkeprodukter og én havrebasert plantedrikk undersøkt. Produktene hadde ulik produksjonshistorikk, i form av varmebehandling og enzymatisk hydrolyse av laktose. Produktene ble analysert for fytinsyreinnhold, pH og totalt innhold av kalsium og jod. Etter *in vitro* fordøyelse ble prøvene sentrifugert, etterfulgt av analyser for innhold av ionisk kalsium, totalt kalsium, jod og hydrolysegrad av proteiner. Lavmolekylær prøvefraksjon ble undersøkt ved bruk av sentrifugering med sentrifugerør, som så ble veid og analysert for innhold av totalt kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Høymolekylær prøvefraksjon ble analysert for innhold av jod.

Resultatene viste at Havredrikk hadde signifikant lavere kalsiuminnhold sammenlignet med melkeproduktene ($p < 0.01$), og havredrikk var eneste prøve med innhold av fytinsyre. Det ble benyttet to ulike metoder for totalt kalsiuminnhold i produktene før *in vitro* fordøyelse, og resultatene fra disse var signifikant forskjellige fra hverandre ($p < 0.05$), men den relative forskjellen mellom innhold av kalsium og de to metodene var derimot lik. F- og LM-Havredrikk hadde også signifikant lavere kalsiuminnhold etter *in vitro* sammenlignet med melkeprøvene ($p < 0.01$), foruten LM-UHT. De lavmolekylære prøvene hadde et signifikant

lavere kalsiuminnhold, sammenlignet med fordøyde prøvene ($p < 0.01$). Det var ingen signifikante forskjeller i innhold av jod i produktene, heller ikke mellom de høymolekylære prøvefraksjonene ($p > 0.05$). Ved analyse for ionisk kalsium ble det observert et høyere innhold i prøvene med uttak D120, sammenlignet med D60 og kontrollprøver (K60 og K120). F-Havredrikk var signifikant forskjellig fra F-HTST ($p < 0.05$) og F-Laktoseredusert ($p < 0.01$), og F-UHT var signifikant forskjellig fra F-Laktoseredusert ($p < 0.05$). Resultatene viste ingen signifikante forskjeller ($p > 0.05$) for proteinfordøyelighet av proteiner. Det var likevel en synlig økning i hydrolysegrad for prøver med uttak D120 i duodenal fasen, med unntak av havredrikk.

Denne oppgaven har vist at proteinfordøyeligheten øker desto lenger maten fordøyes. Det er også tydelig at fordøyelsen bidrar til å gjøre kalsium mer tilgjengelig ved økt tid under *in vitro* fordøyelse. I tillegg hadde alle melkeprøvene høyere innhold av totalt kalsium sammenlignet med havredrikk. Det var for øvrig ingen store forskjeller i mengden løselig kalsium mellom alle prøvene. Det var heller ingen forskjeller i innhold av jod, som tyder på at mineralet er av god biotilgjengelighet, men lavmolekylær prøvefraksjon bør undersøkes nærmere. Resultatene antydte ingen effekt av produksjonshistorikk, og viste relativt små forskjeller mellom melkeprøvene med ulik produksjonshistorikk. Til tross for lavt innhold av totalt kalsium i havredrikk, bør det utføres ytterligere undersøkelser for å konkludere om havredrikken kan utgjøre et fullverdig alternativ til melk- og meieriprodukter.

ABSTRACT

Most contemporary grocery stores offer a large variety of milk products, including long-life and lactose-reduced alternatives. Meanwhile, milk consumption is declining, alongside a steady increase in sales of plant-based drinks. These plant-based drinks are not as nutritious as milk and are therefore enriched with various nutrients to overcome the nutritional limitations. The presence of antinutrients, which may potentially reduce the bioavailability of calcium, presents another challenge with regards to these plant-based alternatives. In order to comply with the nutritional recommendations developed by the Nordic Council of Ministers, it is essential to understand and develop knowledge about how digestion is affected and changed. Simulated digestion based on *in vitro* digestion models are useful tools in this context. This thesis deals with how bioavailability of calcium and iodine, and digestibility of proteins are affected by the product's properties and various processes included in the production of *in vitro* digestion. In total, three different milk products and one oat-based plant drink were investigated. The products had variations in production histories, in terms of heat treatment and enzymatic hydrolysis of lactose. The products were analyzed for phytic acid content, pH and total content of calcium and iodine. After *in vitro* digestion, the samples were centrifuged, followed by analyses for ionic calcium, total calcium and iodine content and degree of hydrolysis of proteins. Low molecular weight sample fraction was weighed and examined using centrifuge tube centrifugation, which was then analyzed for total calcium content and degree of hydrolysis of proteins. The high molecular weight sample fraction was analyzed for iodine content.

The results indicated that oat drink had a significantly lower calcium content compared to that of milk products ($p < 0.01$), and oat drink was the only sample with a phytic acid content. Different methods were used for total calcium content in the products before *in vitro* digestion, and the results from these were significantly different from each other ($p = 0.0166$), but the relative difference between the content of calcium and the two methods was similar. F- and LM-Oat drinks also had significantly lower calcium content compared to the milk samples ($p < 0.01$), apart from LM-UHT. The low molecular weight samples had a significantly lower calcium content compared to the digested samples ($p < 0.01$). There were no significant

differences in the content of iodine in the products, nor between the high molecular weight sample fractions ($p>0.05$). In analyzes for ionic calcium, a higher content was observed in the samples with outlet D120, compared to D60 and control samples (K60 and K120). F-Oat drink was significantly different from F-HTST ($p=0.01444$), and F-Lactose reduced ($p<0.01$), and F-UHT was significantly different from F-Lactose reduced ($p=0.02636$). The results showed no significant differences ($p>0.05$) for protein digestibility of proteins. There was nevertheless an increase in the degree of hydrolysis for samples with extraction D120 in the duodenal phase, apart from oat drink.

This thesis demonstrated that protein digestibility increases the longer the food is digested. It is also clear that digestion aids calcium availability by increasing the time during *in vitro* digestion. In addition, all three milk samples displayed a higher content of total calcium compared to the oat drink. No major differences in the amount of soluble calcium could be observed across the samples. There were also no differences in the content of iodine, which suggests that the mineral is of good bioavailability, however the low molecular weight sample fraction should be examined. The results indicated no effect of process history due to relatively small differences between the milk samples with different process histories. Despite the low total calcium content in oat drink, further research should be conducted in order to draw further conclusions on whether oat drink may constitute a full-fledged alternative to milk and dairy products.

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	IV
1. BAKGRUNN FOR OPPGAVEN	1
1.1 Melkeprodukter	1
1.2 Utvikling av plantebaserte matvarer	2
1.3 Kosthold	4
1.4 Oppgavens formål	5
2. TEORI	8
2.1 Sammensetning av melk	8
2.1.1 Melkeproteiner	9
2.1.2 Laktose.....	12
2.1.3 Mineraler	13
2.1.3.1 Kalsium.....	14
2.1.3.2 Jod	15
2.2 Laktoseredusert melk	16
2.2.1 Laktoseintoleranse	17
2.3 Prosessering av melk	18
2.3.1 Varmebehandling	18
2.3.1.1 Lavpasteurisering.....	19
2.3.1.2 Ultra-høy temperatur	19
2.3.2 Homogenisering	19
2.3.3 Effekt av prosessering	20
2.4 Sammensetning av havrebasert plantedrikk	21
2.4.1 Berikning.....	23
2.5 Antinæringsstoffer	24
2.5.1 Fytinsyre	25
2.6 Prosessering av havrebasert plantedrikk	25
2.6.1 Effekt av prosessering	27
2.7 Human fordøyelse	27
2.7.1 Munn	29
2.7.2 Mage.....	29
2.7.3 Tarm	29
2.8 Måling og stimulering av fordøyelighet	30
3. MATERIALER OG METODER	32

3.1 Forsøksoppsett	32
3.2 Om prøvematerialet	34
3.3 pH	36
3.4 Analyse for fytinsyre	36
3.5 <i>In vitro</i> fordøyelse av ulike melke- og plantedrikker.....	37
3.6 Analyse av lav- og høymolekylær prøvefraksjon ved bruk av sentrifugerør	40
3.7 Analyse av kalsiuminnhold ved ICP-OES.....	41
3.8 Analyse av jodinnhold ved ICP-MS.....	41
3.9 Analyse av hydrolysegrad med OPA metoden.....	42
3.10 Analyse av kalsium ved kompleksimetrisk titrering med EDTA	44
3.10.1 Beregning av kalsiumkonsentrasjon	45
3.11 Analyse av ionisk kalsium med kalsiumsensitiv elektrode	45
3.12 Resultatbehandling og statistisk analyse.....	46
3.13 Oppsummert oversikt over forsøksoppsettet.....	47
4. RESULTATER	49
4.1 Analyser av produktene	49
4.1.1 pH	49
4.1.2 Kalsium	50
4.1.4 Jod	52
4.1.4 Fytinsyre	53
4.2 Analyser av fordøyde prøver	53
4.2.1 Hydrolysegrad av proteiner.....	54
4.2.2 Kalsiuminnhold i fordøyde prøver.....	55
4.2.3 Jodinnhold i fordøyde prøver	58
4.2.4 Ionisk kalsium	61
5. DISKUSJON	64
5.1 Næringsinnhold i produktene.....	65
5.2 Fordøyde prøver	69
5.3 Konklusjon	76
6. TIL ETTERTANKE OG VIDERE FORSKNING	78
7. LITTERATURLISTE	79
VEDLEGG	A

Vedlegg sendt til veiledere:

1. Samlet resultater: rådata
2. OPA: standardkurver og utregninger
3. Ionisk kalsium: standardkurver og utregninger
4. Jodinnhold: rådata og utregninger

FORKORTELSER

ANF	Antinæringsstoffer
ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk; Analysis of Variance)
BMN	B-mercaptoethanol
BSA	Blod serum albumin
CaCl ₂	Kalsiumklorid
Ca ²⁺	Ionisk kalsium
dL	Desiliter
dH ₂ O	Destillert vann
EDTA	Etylen-diamin-tetra-eddiksyre
F	Fordøyd prøve
FN	De forente nasjoner
g	Gram
<i>g</i>	Tyngdeakselerasjon (fra engelsk; gravitational force)
Havredrikk	Havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet
HCl	Saltsyre
HM	Høymolekylær prøve
HTST	Melkeprodukt, HTST-pasteurisert
HTST	Lav-pasteurisering (fra engelsk; high temperature, short time)
I ²	Jod
ICP-MS	Induktivt koblet massespektrometri (fra engelsk; inductively coupled plasma mass spectrometry)
ICP-OES	Induktivt koblet plasma optisk emisjonsspektroskopi (fra engelsk; inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)
Ig	Immunoglobuliner
InsP ₁	Myoinositolmonofosfat
InsP ₆	Fytinsyre
K	Kontrollprøve

KBM	Kjemi, bioteknologi og matvitenskap
KCl	Kaliumklorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LM	Lavmolekylær prøve
Laktoseredusert	Melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert
LDL	Lipoprotein med lav tetthet (fra engelsk; Low-density lipoprotein)
LTLT	Lav temperatur, lang tid (fra engelsk; low temperature, long time)
M	Molar
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mV	Millivolt
NaOH	Natriumhydroksid (fra engelsk; sodium Hydroxide)
NNR	Nordiske ernæringsanbefalinger
nm	Nanometer
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
OH	Hydroksylgruppe
OPA	<i>o</i> -phthaldialdehyde
PBD	Plantebasert drikker
pI	Isoelektrisk punkt
R ²	Korrelasjonskoeffisient
RPM	Omdreininger per minutt (fra engelsk; revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecyl sulfat (fra engelsk; sodium Dodecyl Sulfate)
SGF	Simulert spyttvæske (fra engelsk; simulated salivary fluid)
SIF	Simulert tarmvæske (fra engelsk; simulated intestinal fluid)
SSF	Simulert magevæske (fra engelsk; simulated gastric fluid)
T ₃	Tyrosin

T ₄	Trijodotyronin
Tukey	Post hoc parvis test
TRH	Tyreotropinfrigjørende hormon
TSH	Tyroidestimulerende hormon
UHT	Melkeprodukt, UHT-behandlet
UHT	Ultra-høy temperatur (fra engelsk; ultra-high temperature)
U	Units
µg	Mikrogram
µL	Mikrolite

1. BAKGRUNN FOR OPPGAVEN

Matindustrien står i dag ovenfor mange utfordringer og utvikling i spisevaner hos forbruker er stadig i endring. Til tross for dette har melk over lengre tid hatt en sentral rolle i det daglige kostholdet for befolkningen i Norden. Det er derimot en tydelig nedgang i melkekonsumet, og ifølge tall publisert av melk.no inntok nordmenn 79.81 liter (L) per person i 2021 sammenlignet med 93.55 L i 2011 (Melk.no, 2022). De Nordiske ernæringsanbefalingene (NNR) fra 2012, utarbeidet av Nordisk Ministerråd, er det vitenskapelige grunnlaget for Helsedirektoratets kostråd (Helsedirektoratet, 2016; Nordisk Ministerråd, 2012a). Nordisk Ministerråd (2012b) og (2012c) anbefaler et daglig inntak av 800 mg kalsium og 150 µg jod for voksne. På bakgrunn av at 60% av kalsium og jod i det norske kostholdet kommer fra melk- og meieriprodukter, anbefaler kostrådene inntak av magre melk- og meieriprodukter, som også råder til 3 porsjoner daglig (Helsedirektoratet, 2016). Tre porsjoner magre meieriprodukter, hvor minst 2 av 3 består av melk, syret melk eller yoghurt, kan bidra til å sikre det daglige inntaket av både kalsium og jod (Melk.no, 2020a). Nordisk Ministerråd har derimot nylig oppdatert de nordiske ernæringsanbefalingene, som nå er til høring. Utkastet for NNR 2023-rapporten råder til et daglig inntak av 250-500 g melk- og meieriprodukter for å sikre anbefalt inntak av kalsium og jod, men i tilfeller ved lavere inntak enn 250 g/d, anbefales inntak av berikede matekvivalenter (Nordisk Ministerråd, 2023). Samtidig understreker rapporten at melk- og meieriprodukter er viktige kilder til kalsium og jod.

1.1 Melkeprodukter

Kumelk er et velkjent råstoff og næringsmiddelet konsumeres ofte alene eller benyttes som hovedråstoff i produkter som yoghurt, ost og smør. Av total melkeproduksjon internasjonalt, utgjør produksjon av kumelk 81% (IDF, 2021). I Europa, spesielt i de skandinaviske landene (som Norge), er forbruket av konsummelk produkter høyt (Damodaran et al., 2017d). Både Norge, Finland, Sverige og Danmark lå på topp 10 over land med høyest melkekonsum per innbygger i 2014 (IDF, 2014). Det er ikke uten grunn, da melk har en nærmest komplett

næringsprofil bestående av viktige energigivende næringsstoffer som fett, proteiner og karbohydrater, i tillegg til vitaminer og mineraler som vitamin B2 (riboflavin), vitamin B12 (kobalamin), kalium, kalsium, jod og fosfor (Melk.no, 2020b; Vanga & Raghavan, 2018).

Det eksisterer et bredt spekter av ulike melkeprodukter som konkurrerer om plass i kjølehyllene i dagligvarebutikkene. Dette kan forklares ved at det nå, i det tjueførste århundre, er en stor økning i operasjonsskalaen med mer høyautomatiserte, kontinuerlige og energibesparende prosesser (Tamime, 2009). Som følge av dette øker produkttilgjengeligheten og det er en merkbar økning i meieribedrifters produktportefølje med ulike melkevarianter, for eksempel både langtidsholdbar- og laktoseredusert melk. Dessuten har til og med meieriindustrien begitt seg inn på markedet for plantebaserte alternativer. På bakgrunn av økningen i produkter, vil nye produkter inkluderes og andre utelukkes, noe som er av bekymring grunnet produkters ulikheter i sammensetning og biotilgjengelighet av næringsstoffer. Spesielt protein- og mineralinnholdet i plantebaserte drikker (PBD) (Chalupa-Krebzdak et al., 2018).

1.2 Utvikling av plantebaserte matvarer

Diskusjoner rundt bærekraft og animalske produkter, samt produktenes karbonfotavtrykk har blitt mer aktuelt i nyere tid, og oppmuntrer befolkningen til et mer plantebasert kosthold (Walther et al., 2022). I løpet av det siste tiåret har utviklingen av plantebaserte matvarer økt betraktelig, både basert på trender og ønsker fra forbrukere. Mulige årsaker til denne utviklingen er blant annet publikasjoner som De forente nasjoners (FN) bærekraftsmål og Eat-Lancet rapporten. FNs bærekraftsmål trådte i kraft i 2016, og utgjør en felles handlingsplan for hele verden med mål om å stoppe klimaendringene, utrydde fattigdom og bekjempe ulikheter innen 2030 (De forente nasjoner, 2022). Av de totalt 17 målene, er spesielt «2. Utrydde sult», «3. God helse og livskvalitet», «12. Ansvarlig forbruk og produksjon», samt «13. Stoppe klimaendringene» sentrale for fokus på utvikling av plantebaserte matvarer. Eat-Lancet ble publisert i 2019, hvor målet er et sunt kosthold og bærekraftig matproduksjon (Willett et al., 2019). Rapporten fremmer et kosthold bestående av plantebasert mat, med fokus på å oppnå et bærekraftig matsystem. Bærekraft er definert

som «en utvikling som imøtekommer dagens behov uten å ødelegge mulighetene for at kommende generasjoner skal få dekket sine behov» (Brundtland, 1987). Et bærekraftig matsystem handler i all hovedsak om å sikre matsikkerhet og ernæring for alle, slik at både miljømessige og økonomiske faktorer ivaretas for kommende generasjoner (FAO, 2018). Dette gjelder hele verdikjeden for mat: produksjon, bearbeiding, utnyttelse av restråstoff, distribusjon, handel og konsum, samt klima og miljø.

Salgsutvikling for nye plantebaserte produkter, publisert av Grimsby et al. (2021), viser at det har vært en jevn økning i omsetning av plantedrikker i Norge, med størst økning fra 2016 til 2020. Disse markedsføres ofte som alternativer til ikke-plantebaserte matvarer som allerede finnes på markedet. Spesielt PBD laget på ulike råvarer som havre, nøtter, soya og kokos har blitt mer attraktive (Smith et al., 2022). Dette er produkter som markedsføres som alternativer og erstatninger til melk, og PBD blir ofte valgt fremfor melk av noen grupper i befolkningen. Den økende etterspørselen for slike produkter er drevet av diverse faktorer, blant annet helserelaterte utfordringer som melkeallergier og laktoseintoleranse, etiske forhold angående dyrevelferd, livsstil og valg av dietter som vegansk og vegetarisk, miljøspørsmål, samt markedsføringen til disse produktene (Craig, 2010; Crittenden & Bennett, 2005; Hughes, 1995; Rotz et al., 2010).

Sett ut fra et helseperspektiv er dette produkter som egner seg godt for mennesker med laktoseintoleranse og melkeallergier, basert på ulike kostholdsmessige årsaker og dyrevelferd. Til tross for dette er ingrediensene i PBD langt fra like næringsrike som melk (Chalupa-Krebdak et al., 2018; Sethi et al., 2016). I tillegg er råvaren benyttet av betydning, da dette gir PBD med svært ulik sammensetning og smak (Tangyu et al., 2019). For å overkomme de ernæringsmessige og sensoriske begrensningene, blir PBD tilsatt ulike næringsstoffer som finnes i melk, hovedsakelig mineraler (kalsium, magnesium, sink og jern) og vitaminer (D, E, B12 og B2), samt stabilisatorer for konsistens (Sethi et al., 2016; Zhang et al., 2007). I tillegg kan PBD tilsettes søtningsmidler og kunstige smaksstoffer for å oppnå lignende smaksprofil som melk.

1.3 Kosthold

Sett ut fra et ernæringsperspektiv, er det nødvendig med et kosthold som inneholder tilstrekkelig med ulike næringsstoffer, både proteiner og mineraler (for eksempel kalsium og jod), grunnet deres viktige funksjoner i menneskekroppen (Pedersen, 2012). Det er derfor av stor betydning å sikre optimal utnyttelse av verdifulle næringsstoffer fra maten. For å tilfredsstille kroppens behov er kunnskap om biotilgjengelighet verdifull. Biotilgjengelighet kan defineres som *«andelen av et inntatt næringsstoff som er tilgjengelig for utnyttelse i en metabolsk prosess eller for avsetning i ulike organer i kroppen»*, og bestemmes av mengden som absorberes i tarmkanalen (Damodaran et al., 2017c; Tulbek et al., 2017). Både fysiologiske og kostholdsmessige faktorer, samt prosessering påvirker biotilgjengelighet (Alegría-Torán et al., 2015). Når det gjelder de kostholdsmessige faktorene er næringsstoffets kjemiske form, løselighet og interaksjon med andre forbindelser, som for eksempel fytinsyre, av betydning. Fysiologiske faktorer kan være alder, helsetilstand, graviditet og amming, samt pH i magen og tarmmikroflora, for å nevne noen. Prosessering av mat kan påvirke matmatriksen ved å inaktivere inhibitorer og dermed ha en positiv innvirkning, men også deaktivere enzymer som bryter ned inhibitorer. En matmatriks omhandler sammensetningen til mat og innholdets kjemiske bindinger til hverandre (Aguilera, 2019). Andre negative effekter er for eksempel protein denaturering og maillard-reaksjon forårsaket av varmebehandling, som fører til redusert næringsverdi (Fox et al., 2015f).

Det har blitt et større fokus på de helsemessige fordelene av næringsstoffer som er naturlig til stede i melk- og meieriprodukter. Dette er nyttige næringsstoffer som proteiner, jod, kalsium, vitamin B2 og vitamin B12, og forløpere til bioaktive proteiner som laktoferrin og laktoperoksidase (Geiselhart et al., 2021; Thorning et al., 2016; Verduci et al., 2019). På den andre siden har PBD likevel blitt svært populære og er foretrukket av flere forbrukere, til tross for at det lenge har vært allment akseptert at animalsk- og plantemat har næringsmessige forskjeller (Walther et al., 2022). Spesielt proteiner av vegetabilsk opprinnelse er ofte av lavere kvalitet på grunn av et begrenset innhold av essensielle aminosyrer og dårligere fordøyelighet (Millward, 1999). For å forstå innvirkningen av

plantebaserte produkter på forbrukernes kosthold, bør det brede utvalget av PBD sammenlignes for ernærings sammensetning og med tilsvarende melkeprodukter. Som nevnt, favoriseres PBD av personer som blant annet følger et strengt vegetarisk eller vegansk kosthold. Dette kan, ved fravær av animalske produkter, forårsake vitamin- og mineralmangel grunnet lave nivåer av vitamin D, vitamin B12, vitamin B2, jod, selen, sink og kalsium (Helsedirektoratet, 2021b; Pawlak et al., 2014). Ulike typer kosthold (vegansk og vegetarisk) klassifiseres basert på hvilke matvarer som inkluderes eller ekskluderes fra kosten (Helsedirektoratet, 2021a). Se Tabell 1 for oversikt over vegetarisk og vegansk kosthold, hvor grønn er matvarer som inkluderes, gul er matvarer som kan inkluderes og varierer fra person til person, og rød er matvarer som ekskluderes.

Tabell 1. Klassifisering av vegetarisk og vegansk kosthold, basert på Helsedirektoratet (2021a).

Kosthold	Definisjon	Kjøtt	Fjærkre	Fisk	Egg	Meieriprodukter
Ikke-vegetarianer /omnivor	Spiser kjøtt, fjærkre, fisk, egg og meieri-produkter oftere enn 1 gang i uken.					
Vegetarianer	Består hovedsakelig av plantebaserte kilder og ekskluderer kjøtt, fisk og fjærkre, men kan inkludere egg og meieriprodukter.					
Veganer	Inkluderer kun plantebaserte matvarer og ekskluderer matvarer fra animalske kilder, som kjøtt, fjærkre, fisk, egg og meieri-produkter.					

1.4 Oppgavens formål

Næringsstoffer som proteiner og mineraler er til stede i matvarer i varierende konsentrasjoner, samt i ulike kjemiske former (Damodaran et al., 2017a). Under ulike

forhold som prosessering, lagring og fordøyelse av mat vil disse gå gjennom komplekse endringer. For at kroppen skal kunne dra nytte av næringsstoffene, må makronæringsstoffer som proteiner brytes ned og mikronæringsstoffer som kalsium og jod må være i løselig form for å tas opp i tarmen (Pedersen, 2012). På bakgrunn av dette er det nødvendig å utvikle kunnskap om hvordan maten påvirkes og endres under fordøyelse, samt øke forståelse for hvordan prosessering påvirker biotilgjengelighet av næringsstoffer. Dette vil videre være avgjørende for å kunne produsere fremtidens mat basert på helsepåstander med vitenskapelig holdepunkt.

Til tross for nedgang i melkekonsum og betydelig stigning i produksjon og forbruk av PBD av varierende formulering, er forskningen på ulike varianter av PBD mangelfull. Det er derfor verdifullt å forstå viktigheten av disse produktene, samt besvare spørsmål relatert til næringsinnhold og biotilgjengelighet, og undersøke om PBD er fullverdige alternativer til den tradisjonelle melken. Denne oppgaven tar for seg spesifikt kumelk og havrebasert plantedrikk, og vil videre bli omtalt som 'melk' og 'havredrikk', med mindre annet er oppgitt.

Denne masteroppgaven er gjennomført i samarbeid med TINE SA. Oppgavens formål var å studere hvordan biotilgjengeligheten av næringsstoffer, henholdsvis proteiner, kalsium og jod i ulike produkter, blir påvirket av produktets egenskaper og ulike prosesser som er inkludert i fremstillingen på *in vitro* fordøyelse. Dette ble gjort ved å undersøke tre ulike melkeprodukter og én havredrikk: lettmelk HTST-pasteurisert (HTST), lettmelk UHT-behandlet (UHT), lettmelk UHT-behandlet og laktoseredusert (Laktoseredusert), og havrebasert plantedrikk UHT-behandlet (Havredrikk). For å undersøke om ulike prosessering og ulike råvare hadde effekt på proteinfordøyelighet og mineral biotilgjengelighet ble det benyttet en statistisk *in vitro* fordøyelsesmodell med prøveuttak ved to ulike tider (D60 og D120). D60 og D120 var uttak i tarmfasen (duodenal fasen) etter 60 min og 120 min. De utvalgte produktene er kommersielt tilgjengelige og ble kjøpt ved samme tidspunkt.

De utvalgte produktene ble først analysert for innhold av totalt kalsium ved kompleksimetri med etylen-diamin-tetra-eddiksyre (EDTA) og induktiv koblet

plasma optisk emisjonsspektroskopi (ICP-OES). Produktene ble også analysert for innhold av jod ved induktiv koblet plasma massespektrometri (ICP-MS), samt analyse av fytinsyreinnhold ved K-PHYT og måling av pH med pH-meter. *In vitro* fordøyelse ble utført med en statisk fordøyelsesmodell etter protokoll utviklet av nettverket COST INFOGEST (Brodkorb et al., 2019). I etterkant av fordøyelsesmodellen ble prøvene analysert for innhold av totalt kalsium (kompleksiometrisk titrering) og ionisk kalsium med kalsiumsensitiv elektrode. I tillegg ble hydrolysegrad av proteiner undersøkt med OPA-metoden. Videre ble de fordøyde prøvene separert i en høy- (HM, > 3 kDa) og en lavmolekylær fraksjon (LM, < 3 kDa). LM fraksjonen ble analysert for totalt kalsiuminnhold og hydrolysegrad av protein. HM-fraksjonen ble benyttet til analyse av kalsium og jod ved ICP-OES og ICP-MS.

2. TEORI

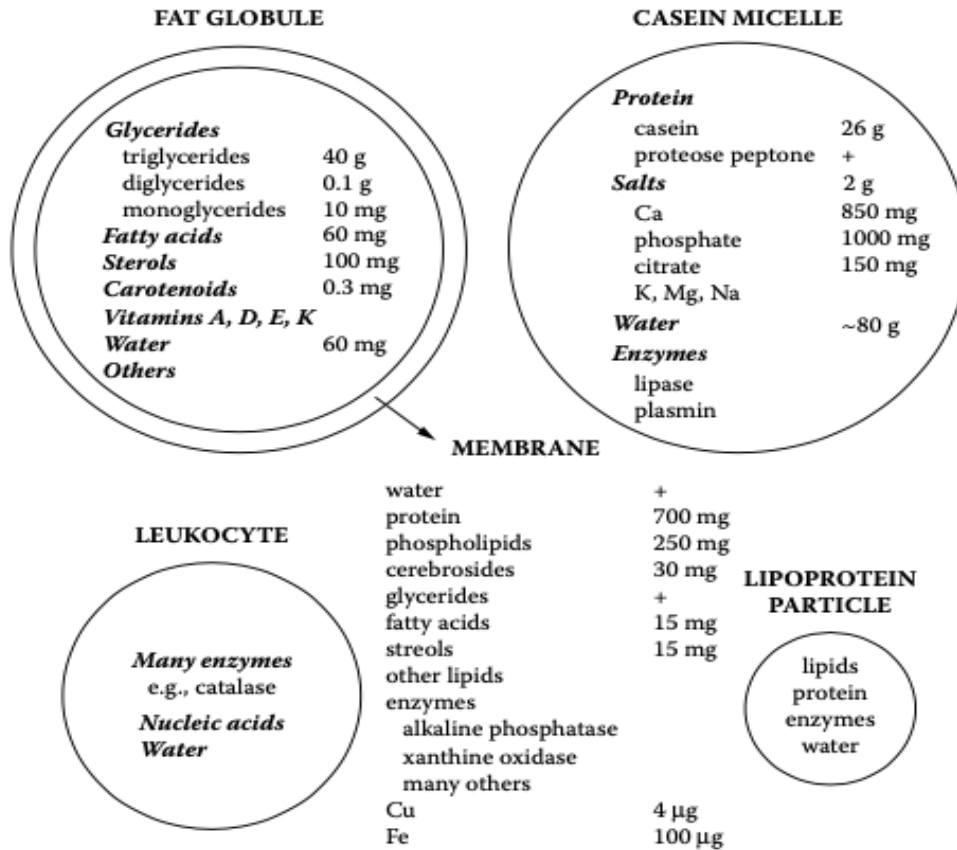
2.1 Sammensetning av melk

Melk fra kyr (videre omtalt som melk) er en kolloidal dispersjon og inneholder en komplett næringsprofil. Bestående av hovedsakelig fettkuler, ulike melkeproteiner som kaseiner og myseproteiner, karbohydrater, og essensielle vitaminer og mineraler (Walstra et al., 2006a). Generell sammensetning for melk er presentert som prosentvis vekt per vekt i Tabell 2.

Tabell 2. Melkens sammensetning med prosentvis gjennomsnittlig innhold og gjennomsnittlig innhold av tørrstoff for hver komponent (Walstra et al., 2006a).

Komponent	Gjennomsnittlig innhold (% v/v)	Gjennomsnittlig innhold TS (% v/v)
Vann	87.1	-
Laktose	4.6	36
Fett	4.0	31
Proteiner	3.3	25
Mineraler	0.7	5.4

Hovedkomponentene i melk er organisert i følgende tre faser; fettkuler, kaseinmiceller og serum (Walstra et al., 2006a). Sistnevnte består av vann og flere vannløselige stoffer, og de komponentene med høyest konsentrasjon er myseproteinene α -laktalbumin og β -laktoglobulin, enzymene lactoperoxidase og fosfatase, immunoglobuliner (Ig), laktose og løselige og kolloidale mineraler. De ikke-vannløselige komponentene består av fettkuler som inneholder hovedsakelig fettløselige vitaminer. Se Figur 1 for oversikt over melkens sammensetning og organisering av komponenter.



Figur 1. Organisering av melkens sammensetning. Innholdet er oppgitt for 1 kg melk (Walstra et al., 2006a).

2.1.1 Melkeproteiner

Melkeproteiner utgjør omtrent 3.3% av innholdet i melk, hovedsakelig kaseiner og myseproteiner. De kan for eksempel både danne interaksjoner med seg selv, makrokomponenter som karbohydrater og fett, eller mikrokomponenter som mineraler og vitaminer (Corredig et al., 2011; Forrest et al., 2005; Havea, 2006). Interaksjon med kalsium kan videre påvirke de fysiske-kjemiske egenskapene til proteinet, som videre kan ha betydning for prosessering, kvalitet og lagringsstabilitet (Philippe et al., 2003). Mesteparten av melkeproteinene består av kaseiner (om lag 2.6%), som har fire ulike primærstrukturer, henholdsvis α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein (Walstra et al., 2006b). Disse kan forekomme i forskjellige varianter og danne komplekser med kalsium og fosfat som utgjør store og stabile aggregater, såkalte kaseinmiceller (95% av kaseiner i melk). Myseproteinene, α -laktalbumin, β -laktoglobulin, blod serum albumin (BSA) og Ig utgjør en mindre mengde

(0.7%) og finnes i løselig form i serumfasen. Se Tabell 3 for oversikt over fordeling av de ulike proteinene i melk, oppgitt som g/100 g.

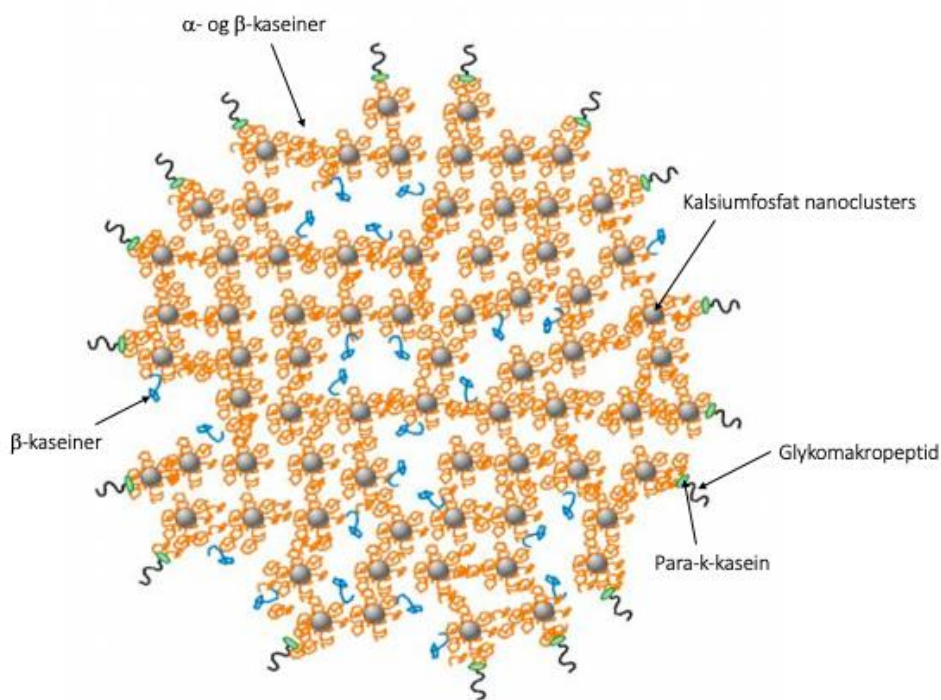
Tabell 3. Proteinene med høyest konsentrasjon i melk, kaseinere og myseproteiner, samt deres ulike varianter. Presentert som g/100 g protein (Walstra et al., 2006b).

Protein	g/100 g protein
Kaseiner	78,3
α_{s1} -kasein	32
α_{s2} -kasein	8,4
β -kasein	26
κ -kasein	9,3
Myseproteiner	19
β -laktoglobulin	9,8
α -laktalbumin	3,7
Blod serum albumin	1,2
Immunoglobuliner	2,4

Omtrent 80% av proteinene i melk består av fire typer kasein, som er en gruppe fosfoproteiner, hvor 95% av kaseinet finnes som kaseinmiceller (Walstra et al., 2006b). Kaseiner har en løs og fleksibel struktur og kjennetegnes ved at de er stabile mot høye temperaturer (140°C i opptil 20 min), og vil ikke denaturere ved nøytral pH (~ 7) (Dupont & Tome, 2014; Walstra et al., 2006b). De vil derimot felle ut ved pH 4.6 som er det isoelektriske punktet (pI) til kaseinmicellen (Pérez et al., 2008). Når pH nærmer seg pI vil netto negativ ladning reduseres og molekylene får en nøytral elektrisk ladning (like mange positive og negative aminosyresidekjeder) (Damodaran et al., 2017d). Kaseiner har en fordeling av hydrofobe og polare aminosyrer, i tillegg til at α - og β -kaseiner er i stand til å binde store mengder kalsiumioner grunnet fosforylering av noen av deres serin aminosyrer (Dalglish & Corredig, 2012). På grunn av ulikheter i fosforylering og antall estergrupper, avtar bindingskapasiteten for kationer i følgende rekkefølge: $\alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \beta > \kappa$ -kasein (Gaucheron, 2005; O'Mahony & Fox, 2013). Til tross for dette er de sensitive for høyere kalsiumkonsentrasjoner enn 6 mM (Dalglish & Corredig, 2012). På den andre siden

inneholder κ -kasein kun én fosfatgruppe og er mindre sensitiv mot kalsium. Det betyr at κ -kasein har en stabiliserende effekt på α - og β -kasein for utfelling av kalsium.

Kaseinmiceller og dens struktur har vært svært omdiskutert i lang tid, hvor det først var enighet om at den bestod av submiceller. Senere har derimot andre strukturer og modeller blitt foreslått, og det er størst enighet om modellen foreslått av Holt (1998). Denne har blitt videre utviklet i nyere tid hvor kaseinmiceller er 'svamplignende' strukturer som består av kalsiumfosfat og såkalte kaseinclusters (Dalglish & Corredig, 2012; de Kruif et al., 2012; Horne, 2006). Overflaten til kaseinmicellen består hovedsakelig av κ -kasein, med dens hydrofile del som også inneholder negative ladning, er orientert mot serumfasen. Glykomakropeptidet, en del av κ -kaseinet som vist i Figur 2, danner et beskyttende lag rundt partiklene som er negativt ladet, som bidrar til aggregering av miceller (Dalglish & Corredig, 2012). Kaseinmicellene består av titusenvís av kaseinmolekyler med en gjennomsnittlig diameter på 150-200 nanometer (nm). De tåler både moderat oppvarming og nedkjøling, men vil kunne destabiliseres av blant annet proteolytiske enzymer.



Figur 2. Kaseinmicellens struktur basert på modellen utviklet av Dalglish og Corredig (2012).

De resterende 20% av proteinene i melk består av myseproteiner som er globulære proteiner med kompakt, tredimensjonal struktur (Fox et al., 2015c). Myseproteinene finnes i løselig form i serum og de fire hovedproteinene, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, BSA og Ig. I motsetning til kaseiner vil de ikke felle ut ved pH 4.6, men er varmelabile og denaturerer ved varmebehandling (fullstendig denaturert ved oppvarming i 10 min ved 90°C). Myseproteinene er heller ikke fosforylerte og er ikke sensitive for kalsiumioner på samme måte som kasein, i den forstand at de ikke feller ut ved kalsiumkonsentrasjoner over 6 mM. α -lactalbumin kan også binde kalsium og danne kalsium-proteinkompleks (Hendrix et al., 2000). Melkeproteinenes ulike egenskaper er kort oppsummert i Tabell 4.

Tabell 4. Egenskaper til melkeproteinene (Walstra et al., 2006b).

Egenskap	Kasein	Myseproteiner
Til stede i	Kaseinmiceller*	Serum
Løselig ved pH 4.6**	Nei	Ja
Varmedenaturering	Nei	Ja

*I serum ved lave temperaturer.

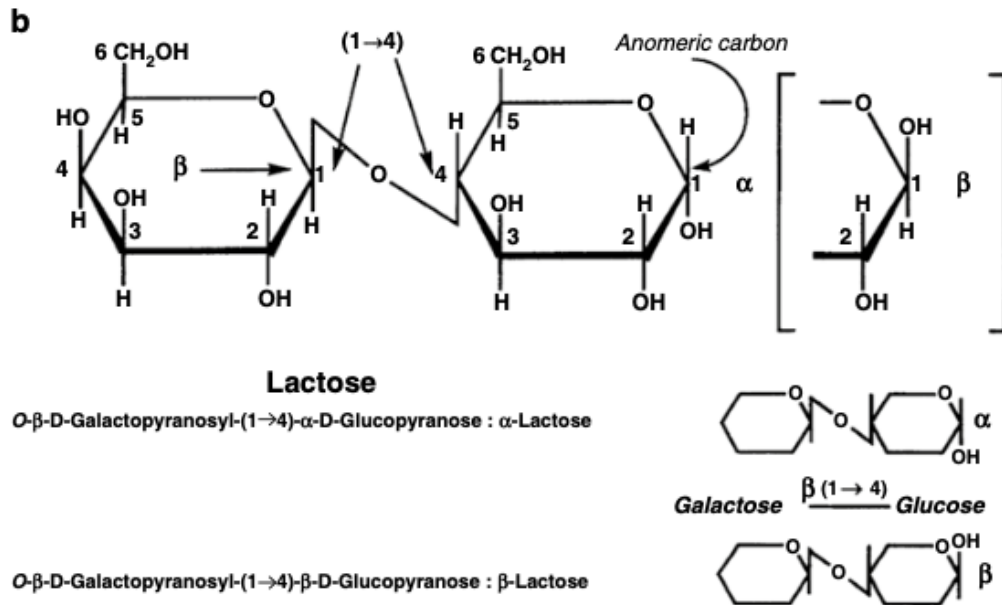
** I nativ tilstand.

De strukturelle forskjellene mellom kaseiner og myseproteiner påvirker følsomheten for hydrolyse av enzymer under fordøyelsen (Dupont & Tome, 2014). Kaseiner anses å være såkalte 'langsomme proteiner' fordi det sure miljøet i magesekken bidrar til dannelsen av et koagulum (Wang et al., 2018). Koagulumet har lenger oppholdstid i magesekken før gastrisk tømming, sammenlignet med myseproteinene (Lacroix et al., 2006). På den andre siden er kaseiner mer følsomme for hydrolyse grunnet deres løse struktur, i motsetning til myseproteiner som er kjent for å være motstandsdyktige mot proteolyse (Boirie et al., 1997). I tillegg blir kaseiner brutt ned av pepsin i magefasen (Dupont & Tome, 2014).

2.1.2 Laktose

Karbohydratet laktose er bygget opp av monomerene D-galaktose og D-glukose som er bundet via en β -1-4-glykosidbinding (Fox et al., 2015a). Laktose er klassifisert som 0- β - D-

Galaktopyranosyl- (1→4) – glukopyranose. Laktose finnes i to ulike former (α og β), hvor orienteringen av hydroksylgruppen (OH) på C1 på glukosedelen er avgjørende for hvilken form strukturen har. Ved α -laktose vil OH-gruppen peke nedover i forhold til C1 og for β -laktose vil den peke oppover. Se Figur 3 for oversikt over strukturen til laktose, samt dens to ulike former.



Figur 3. Kjemisk struktur til laktose ($O\text{-}\beta\text{-D-Galaktopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-glukopyranose}$) (Fox et al., 2015a).

Laktose forekommer hovedsakelig i melk fra pattedyr (Damodaran et al., 2017d). Melk inneholder ca. 46 g/L laktose, men nøyaktig konsentrasjon varierer i henhold til rase, laktasjonsstadium, helsetilstand og genetiske faktorer (Fox et al., 2015a). Normal fordøyelse av laktose hos mennesker krever tilstedeværelse av enzymet laktase i tarmen, som spalter laktose til galaktose og glukose (Helland-Kiegen, 2013; Lomer et al., 2008). På den måten klarer tarmen å ta opp endeproduktene.

2.1.3 Mineraler

Det er utarbeidet daglige anbefalinger for inntak av ulike næringsstoffer (Nordisk Ministerråd, 2012a). Hovedfokuset er på kalsium og jod fordi melk- og meieriprodukter er viktige kilder til disse mineralene. For voksne er anbefalingen 800 mg/d for kalsium og 150

µg/d for jod (Nordisk Ministerråd, 2012b; Nordisk Ministerråd, 2012c). Ett glass melk (type lettmelk) á 200 mL bidrar med henholdsvis 260/800 mg kalsium og 32/150 µg jod (Helsedirektoratet & Mattilsynet, 2022).

2.1.3.1 Kalsium

Kalsium fra kosten er avgjørende for å opprettholde en rekke funksjoner i kroppen, både vekst og vedlikehold av skjelett, nervesignalisering, muskelfunksjon og hormonsekresjon (Chalupa-Krebdak et al., 2018; Miller et al., 2001). Hovedmengden (99%) av kalsium i kroppen er lagret i skjelettet som en viktig byggestein (Blomhoff et al., 2007c). Mangel på kalsium kan føre til beinskjørhet fordi det vil gå på bekostning av kalsium lagret i skjelettet, som fører til nedbrytning av beinvevet. Derimot kan et tilstrekkelig inntak av mineralet redusere risikoen for en rekke lidelser som høyt blodtrykk og kreftsykdommer som bryst-, tykktarms- og eggstokkreft (Chung et al., 2009; Nicklas, 2003).

Absorpsjon av kalsium er avgjørende for at kroppen skal kunne dra nytte av mineralet, og det er om lag 20-30% av kalsium fra kosten som absorberes under fordøyelse (Theobald, 2005). Resterende kalsium skilles ut i feces. I mat basert på plantemateriale er mesteparten av kalsiumet i komplekser med andre komponenter, som fytinsyre, og må være i løselig form for å bli tatt opp av tarmslimhinnecellene. Løseligheten av disse kalsiumkompleksene i mage og tarm er derfor av betydning. På den andre siden vil ulike komponenter i melk fremme kalsiumbiotilgjengelighet, ved å holde mineralet i sin løselige form i tarmen (Alegría-Torán et al., 2015). Både fosfopeptider og laktose beskytter kalsium mot anioner og hemmere i tarmen, som fosfater. Fosfopeptider binder seg til kalsium og laktose konkurrerer mot fosfater (Alegría-Torán et al., 2015; Theobald, 2005). I tillegg har proteiner vist å fremme kalsiumabsorpsjonen, fordi aminosyrer forlenger det sure miljøet når maten går over i tarmen. Det fører til at kalsium forblir i løselig form over en lengre periode, noe som kan øke absorpsjonen.

I melk finnes kalsium i to faser, henholdsvis kolloidal fase og serumfase (Gaucheron, 2005). I serumfasen vil kalsium befinne seg kjemisk bundet til andre komponenter i matriksen, eller

som fritt ionisk kalsium (Ca^{2+}). I den kolloidale fasen vil kalsium hovedsakelig være assosiert med fosfat, såkalt kalsiumfosfat, som danner interaksjoner med fosforylert serin. Det er fosfatgruppen på disse fosfoserinrestene som utgjør de viktigste bindingsstedene til kationer (Gaucheron, 2005). Kalsium er et kation og dermed positivt ladd (Damodaran et al., 2017c). Om lag 66% av kalsiumet er bundet til kaseinmicellene og mindre enn 10% som ionisk kalsium (Gaucheron, 2005; Holt et al., 1981). Resterende er bundet til komplekser med sitrat i serum (Gaucheron, 2005). Forhold som påvirker kalsium i melk, er blant annet pH og varmebehandling. Melk har en pH ~ 6.7 som fører til at kalsium danner kompleks med hovedsakelig sitrat, og mindre mengder fosfat og klorid. En nedgang i pH øker mengden løselig kalsium fordi kalsiumfosfat oppløses ved lavere pH (5.25) og kaseiner feller ut ved proteinets pI (pH 4.6) (Walstra et al., 2006b).

2.1.3.2 Jod

Jod (I^2) er et mineral og absorpsjon av jod er nødvendig for skjoldbruskkjertelens funksjon. Der dannes tyroksin (T_4) og trijodotyronin (T_3), som er en del av tyroidhormonet (Pedersen, 2012). Disse hormonene inneholder henholdsvis 4 og 3 jodatomer og er viktige for normal energiomsetning, metabolisme og vekst i alle kroppens celler. I matvarer som melk finnes jod i uorganisk form, henholdsvis som jodid (van der Reijden et al., 2019). I tarmkanalen reduseres dette til frie jodidioner, som absorberes nesten fullstendig (95%) i hele tynntarmen (Blomhoff et al., 2007d). Jodid oksideres til jod som implementeres i T_4 og T_3 , og ved behov vil hormonene skilles ut bundet til tyroksinbindende globulin (Pedersen, 2012). Utskillelsen reguleres av to hormoner, tyrotropinfrigjørende hormon (TRH) og tyroideastimulerende hormon (TSH), som dannes i henholdsvis hypothalamus og hypofysen. Det selenavhengige enzymet dejodinase må aktivere T_4 til T_3 ved å spalte en jodgruppe. Mengden jod som skilles ut i feces vil være minimal grunnet evnen til å utnyttes på ny, i tillegg til at mesteparten av hormoner som omdannes i leveren og videre skilles ut med gallen, vil reabsorberes. Derimot vil overskudd av mineralet utskilles med urin, eller via morsmelk og svette.

Jod finnes hovedsakelig i uorganisk form i planter (Blomhoff et al., 2007d; Nordisk Ministerråd, 2012c). Innholdet er derimot høyere i planter fra havet, som tang, sammenlignet med planter på land. De viktigste kildene til jod i kosten er saltvannsfisk og skaldyr, bordsalt, melk- og meieriprodukter og egg. Dette forklares ved at bordsalt og dyrefôr er jodberiket. Mangel på jod er assosiert med forstørrelse av skjoldbruskkjertelen, og videre utvikling av struma som fremdeles er et stort helseproblem i utviklingsland. Mangelsykdommen er imidlertid sjelden i Norge den dag i dag grunnet jodberiket fôr og salt, samt bedre distribusjon av fisk over hele landet.

2.2 Laktoseredusert melk

Laktoseredusert melk er et produkt rettet mot den delen av befolkningen som lider av laktoseintoleranse. På den måten får de fremdeles full nytte av de viktigste næringsstoffene i melk (Damodaran et al., 2017d). I laktoseredusert melk vil innholdet av laktose reduseres ved ulike metoder som hydrolyse av laktose, bakteriell fermentering eller membranfiltrering (Jansson et al., 2014). Hydrolyse fører til at laktose spaltes til monosakkaridene galaktose og glukose, og kan utføres ved bruk av et enzym eller en kjemisk prosess. Enzymatisk hydrolyse foregår ved å tilsette enzymet β -galactosidase (laktase), som bryter bindingen mellom galaktose og glukose (Harju et al., 2012). Disse komponentene er søtere enn laktose og vil derfor gi slike produkter noe søtere smak sammenlignet med vanlig melk. Det finnes to ulike prosesser for tilsetning av enzymet under produksjon av laktoseredusert melk som gjennomgår ultra-høy temperatur (UHT), henholdsvis før eller etter varmebehandlingen (Jansson et al., 2014; Troise et al., 2016). Ved å tilsette laktase etter varmebehandling vil produktet fremdeles inneholde aktiv laktase, men ved tilsetning før varmebehandling vil laktase inaktiveres av UHT-behandlingen. Laktase kan inneholde proteaser som videre påvirker kvaliteten ved å utvikle bitter smak (Mittal et al., 1991). Proteaser er i tillegg varmebestandige.

For å kunne hevde at produkter er laktoseredusert, har myndighetene i de nordiske landene satt grenser for innhold av laktose (EFSA & NDA, 2010; Nordisk Ministerråd, 1993). Disse produktene vil naturlig inneholde laktose, men må være redusert til mindre enn 1 g laktose

per 100 g. Dette er som oftest tilstrekkelig fordi laktoseintolerante har noe laktaseproduksjon. Laktosefri melk må derimot reduseres til mindre enn 0.01 g laktose per 100 g.

2.2.1 Laktoseintoleranse

Ved laktoseintoleranse har kroppen nedsatt evne til å produsere enzymet laktase som bryter ned laktose, og er lokalisert i børstesømmen i tarmen (Lomer et al., 2008). Det fører til en redusert evne til å fordøye laktose (Melk.no). Inntak av større mengder laktose, som ufordøyd passerer tarmen, vil fermenteres av bakterier i tykktarmen (Lomer et al., 2008). Fermenteringen (omsetning av laktose) vil gi symptomer som oppblåsthet og diaré forårsaket av gassproduksjon (hydrogen, metan og karbondioksid), samt konsentrasjonsforskjeller (osmose) i tykktarmen hvor væske vil trekke inn.

Laktoseintoleranse kan deles inn i tre hovedtyper, basert på ulike grunner til redusert laktaseaktivitet, da primær-, sekundær- og genetisk laktoseintoleranse (Lomer et al., 2008). Sistnevnte er en sjelden, medfødt lidelse som varer livet ut og gir symptomer ved første eksponering. Hovedtypen med hyppigst forekomst er primær laktoseintoleranse, som skyldes gradvis reduksjon i laktaseaktivitet de første leveårene. Sekundær laktoseintoleranse er vanligvis en midlertidig tilstand og oppstår som følge av andre faktorer, som sykdom eller skade i tarmen.

Det er kun nødvendig med 50% laktaseaktivitet for effektiv utnyttelse av næringsstoffet (Lomer et al., 2008). På den andre siden vil laktoseintolerante kunne tåle små mengder laktose, 5-10 g daglig, som tilsvarer ett glass melk (ca. 200 mL). Hvor mye laktose personer med laktoseintoleranse tåler vil trolig variere mye fra person til person (Blomhoff et al., 2007a). Derimot kan en streng melkefri kost føre til mangel på både kalsium og fosfat, samt vitaminer. På bakgrunn av den unike genetiske tilpasningen hos befolkningen i deler av verden, spesielt Nord-Europa (Norge), som gjør at laktaseaktiviteten ikke avtar etter fødsel, er det kun 2-3% i den norske befolkningen som lider av tilstanden laktoseintoleranse (Melk.no).

2.3 Prosessering av melk

Produksjon av melkeprodukter involverer forskjellige prosesser avhengig av hva som produseres. Ulike trinn som benyttes er kjøling og kjølelagring, homogenisering, varmebehandling, pakking og lagring (Michalski & Januel, 2006). Hvert av disse trinnene kan indusere endringer i melkeproduktet som påvirker kvaliteten.

2.3.1 Varmebehandling

Varmebehandling er et viktig steg i prosessen som er avgjørende for sluttproduktet. Dette steget innebærer konservering for å utsette forringelse og øke holdbarheten på produktet, samt gjøre produktet trygt for konsum (Walstra et al., 2006c). Varmebehandlingens funksjon er hovedsakelig å drepe og inaktivere enzymer, samt ødelegge skadelige mikroorganismer. Melk er lett bederelig, og det krever streng kontroll under produksjon fra rå melk og frem til sluttproduktet. Rå melk kan potensielt sett inneholde sykdomsfremkallende bakterier, som *Campylobacter*, *Escherichia coli* og *Listeria*. Grad av intensitet på varmebehandlingen, da forskjeller i tid og temperatur, er avgjørende under varmebehandling. En oversikt over de ulike hovedkategoriene innenfor varmebehandling er presentert i Tabell 5.

Tabell 5. Ulike varmebehandlinger utført på melkeprodukter og deres grad av intensitet (Walstra et al., 2006c).

Varmebehandling		Grad av intensitet
Termisering		65°C i 15 sekunder
Pasteurisering	LTLT (low temperature, long time)	63°C i 30 minutter
	HTST (high temperature, short time)	72°C i 15 sekunder
Sterilisering	UHT (ultra-high temperature)	130-140°C i 3-5 sekunder
	'In-container'	110-115°C i 10-20 minutter

2.3.1.1 Lavpasteurisering

HTST (high temperature, short time) og LTLT (low temperature, long time) er to metoder for lavpasteurisering som foregår ved henholdsvis 72°C i 15 sek eller 63°C i 30 min (Walstra et al., 2006a). Denne formen for varmebehandling blir hyppig brukt og har som formål å inaktivere enzymet alkalisk fosfatase i melken, hvor mesteparten finnes i fettkulemembranen. Fosfataseaktivitetstesten benyttes som indikasjon på om varmebehandlingen har vært tilstrekkelig for å sikre at alle ikke-sporedannende patogene mikroorganismer er blitt drept. Metoden påvirker produkter i svært liten grad, ivaretar næringsverdien og gir ingen merkbar endring i smak.

2.3.1.2 Ultra-høy temperatur

Varmebehandlingsprosessen UHT (ultra-high temperature) foregår ved enten 130°C i 30 sek eller ved 145°C i 1 sek og forlenger holdbarheten av melk ved å drepe alle mikroorganismer og bakteriesporer (Walstra et al., 2006a). En slik type varmebehandling, etterfulgt av aseptisk pakking, resulterer i et lagringsstabil produkt med minimal kjemisk skade (Tamime, 2009). Melk behandlet på denne måten kan ha en holdbarhet på opptil 12 måneder. I motsetning til metodene for lavpasteurisering som kan gi proteindenaturering og kjemisk modifikasjon av produktet (maillard-reaksjon), vil derimot UHT gi lavere nivåer av dette (Geiselhart et al., 2021). UHT kan foregå ved enten direkte eller indirekte oppvarming. Direkte oppvarming er når overopphetet damp blandes direkte med melken. Indirekte er når melken varmes via en varmeveksler, hvor en pasteur bestående av en skillevegg, overfører varme fra oppvarmingsmediet (damp eller varmt vann) og til melken.

2.3.2 Homogenisering

Etter varmebehandling gjennomgår melken ofte homogenisering som foregår i en homogenisator som forstyrrer melkefettkulene ved bruk av trykk (Walstra et al., 2006d). Dette gir flere og mindre fettkuler som bidrar til å forbedre stabiliteten til produktet mot koalesens, motvirke kremdannelse, og for å oppnå ønskelige reologiske egenskaper (Geiselhart et al., 2021; Walstra et al., 2006d). Koalesens forekommer når fettet smelter sammen og skiller seg fra løsningen på grunn av grensesnittspenningen mellom olje- og

vannfasen (Fox et al., 2015b). I tillegg får melkefettkulene et større overflateareal, som gir økt plass til melkeproteiner, hovedsakelig kaseiner og noe myseprotein (Walstra et al., 2006d). Homogenisering kan utføres før og etter varmebehandling, men er avhengig av aseptisk prosess dersom melken homogeniseres etter.

2.3.3 Effekt av prosessering

De ulike trinnene under produksjon av melkeprodukter kan potensielt sett påvirke det endelige produktet. Under varmebehandling kan det forekomme endringer, som reduksjon i pH, denaturering av myseproteiner og interaksjoner med kaseiner, utfelling av kalsiumfosfat og Maillard-reaksjon (Walstra et al., 2006c). Teixeira et al. (2022) undersøkte effekten av prosessering på både geite- og kumelk og biotilgjengeligheten av blant annet kalsium, etterfulgt av statisk *in vitro* fordøyelse. Resultatene viste at prosessering av melk påvirket biotilgjengeligheten av mineralene som ble undersøkt (Teixeira et al., 2022). Til tross for dette var det ingen signifikant forskjell i kalsiuminnhold før og etter pasteurisering (85/65°C i 30 min). Videre vil en kraftig varmebehandling gi produkter kokt smak, samt fare for maillard-reaksjoner. Sistnevnte fører til kvalitetsforringelser som bruning av produktet, redusert næringsverdi (hovedsakelig vitaminer) og bismak. Kort UHT-behandling med direkte oppvarming begrenser dette. På den andre siden kan denne typen varmebehandling føre til dannelse av aggregater av kaseinmiceller, og dermed sedimentering under lagring. Myseproteiner vil derimot denaturere, men forblir i løsning og feller ut på kaseinmicellene.

Det er større fare for maillard-reaksjon i laktosereduserte produkter på grunn av tilsetning av laktase. Som nevnt, kan enzympreparater som laktase, inneholde uønsket proteolytisk aktivitet (Harju et al., 2012; Jansson et al., 2014; Troise et al., 2016). De proteolytiske enzymene vil denaturere under UHT-behandling. På den andre siden vil de derimot ikke inaktiveres ved tilsetning av laktase etter varmebehandlingen, da produktet lagres ved romtemperatur i flere måneder. Dette kan føre til uønskede effekter som dannelse av peptider og aminosyrer som fremmer maillard-reaksjonen og gir bismak til melken. Til tross for dette har Enright et al. (1999) observert at proteolytisk aktivitet kan forringe selv melk som har vært utsatt for UHT-behandling under langtidslagring. Flere studier har

sammenlignet laktosehydrolysert melk med UHT-behandlet melk, hvor både Jansson et al. (2014) og Tossavainen og Kallioinen (2007) viser til økt proteolytisk aktivitet i laktosehydrolysert melk.

Michalski og Januel (2006) viser til forskjeller mellom melkeproteiner på overflaten til melkefettkulene, avhengig av når homogenisering utføres. Dersom melken først varmes opp og deretter homogeniseres, vil komplekser av kaseiner adsorbere med varmedenatureerte myseproteiner på det økte overflatearealet på melkefettkulene (Michalski & Januel, 2006). Dersom melk homogeniseres og deretter varmebehandles, vil de varmedenatureerte myseproteinene bindes til proteinene som allerede finnes på det økte overflatearealet på melkefettkulene. De har også undersøkt effekten av homogenisering på helse, og melkens fordøyelighet ser ut til å forbedres av homogenisering.

Prosessering av melk og meieriprodukter har innvirkning på fordøyelse og absorpsjon av melkeproteiner (Dupont & Tome, 2014). Varmebehandling påvirker strukturen til myseproteinene, som går fra å være en kompakt struktur, til en mer åpen struktur. På den måten blir disse mer følsomme for fordøyelsesenzymmer (Barbé et al., 2013; Inglingstad et al., 2010). Kaseiner blir derimot ikke påvirket i like stor grad, men de kan få økt motstand mot fordøyelse, i form av termisk induserte aggregater. Homogenisering av melk har vist seg å tilgjengeliggjøre proteinene for pepsin i større grad, forårsaket av utfoldelsen av proteinene ved dråpeoverflaten (MacIerzanka et al., 2009; Sarkar et al., 2009). Spesielt β -kasein og β -laktoglobulin er mer utsatt for pepsin adsorbent til et olje-i-vann-grensesnitt, sammenlignet med når de er i løsning.

2.4 Sammensetning av havrebasert plantedrikk

Som nevnt, øker produksjonen av PBD med ulike råvarer, hvor havre (*Avena sativa*) er en av dem. Denne typen har fått mye oppmerksomhet på grunn av dens næringsverdi og mulige helsemessige fordeler, som blant annet evne til å senke innhold av kolesterol i blodet grunnet innholdet av det løselige fiberet β -glukan (Paul et al., 2020; Truswell, 2002). β -glukan, (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)- β -D-glukan er kjent for å ha en kolesterolsenkende effekt, både total- og LDL-

kolesterol (low- density lipoprotein) (Truswell, 2002). Kolesterol er et steroid som syntetiseres i alle kroppens celler (Mahan et al., 2012). Steroidet bidrar til å forsterke cellemembranen, da det holder fosfolipidene sammen og er derfor av betydning for membranfunksjonen (Blomhoff et al., 2007b). Havre inneholder 6-8% β -glukan, avhengig av den spesifikke sorten (Hughes & Grafenauer, 2021).

Tangyu et al. (2019) rapporterte at omtrent halvparten av kommersielt tilgjengelige PBD inneholder lite eller ingen proteiner (<0.5%). På den andre siden er det vist at havredrikk inneholder protein med god ernæringsmessig kvalitet på grunn av en god aminosyrebalanse, i tillegg til kostfiber og fytokjemikalier (Sethi et al., 2016). Til tross for en god aminosyrebalanse, viser næringsinnholdet i havredrikken til et svært lavt proteininnhold. Se Tabell 6 for oversikt over næringsinnhold i havre.

Tabell 6. Gjennomsnittlig næringsinnhold i havre basert på Rasane et al. (2015) presentert som %. I tillegg til næringsinnhold i havredrikk brukt i eksperimentet, presentert som g/100 g.

Komponent	Gjennomsnittlig innhold (%)	Gjennomsnittlig innhold havredrikk g/100 g
Stivelse	60	
Totalt protein	11-15	0.8
Lipider	5-9	1.5
Kostfiber	2.3-8.5	0.8
Kalsium	0.54	0.12

Stivelsesinnholdet i havre utgjør en stor utfordring når det gjelder fremstilling av havredrikk som en stabil emulsjon under varmebehandling (Sethi et al., 2016). Årsaken er at stivelse kan danne gel, som er tap av granulær og molekylær orden, og er omtalt senere i oppgaven (se kapittel [2.6.1 Effekt av prosessering](#)) (Damodaran et al., 2017b). En annen begrensning ved havredrikk er innhold av antinæringsstoffer (ANF) som kan redusere biotilgjengeligheten til ulike næringsstoffer, se kapittel [2.5 Antinæringsstoffer](#) (Sethi et al., 2016).

Til tross for næringsverdien og de helsemessige, miljømessige og etiske fordelene ved PBD, er det fremdeles stor bekymring rundt det ernæringsmessige perspektivet (Zhou et al., 2021). PBD mangler flere viktige mikronæringsstoffer og ved å ikke inkludere melk og melkeprodukter i kosten, er for eksempel personer som følger et vegansk kosthold i fare for å få mangel på både vitamin A, B2, B12, jern og jod (Scholz-Ahrens et al., 2020). Derfor er flere kommersielle PBD beriket med vitaminer, aminosyrer og mineraler (Sethi et al., 2016). Et annet omdiskutert aspekt ved PBD er bearbeidingsgraden til produktene. Prosessert mat (bearbeidet mat) er mat som kan ha høyt innhold av sukker, usunt fett og salt, og lavt innhold av kostfiber, proteiner, vitaminer og mineraler (Monteiro et al., 2019). NOVA klassifiseringen er et klassifiseringssystem utviklet av forskere ved Universitetet i Sao Paulo (Brasil) (Monteiro et al., 2010). Den viser til bearbeidingsgraden av PBD, som er tilhører gruppe 3 (bearbeidet mat) eller 4 (ultrabearbeidet mat). Pasteurisert melk tilhører derimot gruppe 1 fordi produktet er både naturlig og minimalt prosessert.

2.4.1 Berikning

Berikning av matvarer med mineraler og vitaminer i Norge skal gjøres i henhold til Forskrift om tilsetning av vitaminer, mineraler og visse andre stoffer til næringsmidler (Lovdata, 2010). Escobar-Sáez et al. (2022) analyserte nærings sammensetningen til ulike PBD sammenlignet med melk, og viste at kun 48% merket produktet med påstanden om berikning. Næringsstoffene som ble hyppigst tilsatt var vitamin A, D og B12, kalsium og proteiner. I tillegg var det hovedsakelig soya- og havredrikker som oftest ble beriket. Samme studie rapporterte at ingen av de totalt 179 kommersielle PBD (hvorav 48 stk. var basert på havre) var tilsatt jod, til tross for at melk- og meieriprodukter er en god kilde til dette mineralet (Escobar-Sáez et al., 2022; Melk.no, 2020b; Vanga & Raghavan, 2018).

Ulike former for kalsium som benyttes til berikning er kalsiumkarbonat (CaCO_3), trikalsiumfosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), kalsiumlaktat ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$), kalsium bisglycinat ($\text{Ca}(\text{COOCH}_2\text{NH}_2)_2$) og kalsium sitrat malat ($\text{Ca}_6(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5)_3$) (Lorieau et al., 2018; Silva et al., 2020; Silva et al., 2022). En av de mest brukte er kalsiumkarbonat, da den er en av de minst kostbare (Lorieau et al., 2018). Kalsiumets kjemiske form og matmatriksen

påvirker grad av biotilgjengelighet (Rafferty et al., 2007). En annen faktor som blir ansett som viktig for biotilgjengeligheten, er det sure miljøet i magesekken (Preedy, 2015). Lorieau et al. (2018) observerte at kalsiumet ble mer løselig under pH 3 i magefasen sammenlignet med nøytral pH i tarmfasen.

Silva et al. (2020) studerte *in vitro* fordøyelseeffekten på mineralbiotilgjengelighet, hvor kalsiumberiket havredrikk hadde et tilsvarende innhold som melk (1531.0 g/L). Til tross for dette er det observert store forskjeller ved ulike former for kalsium, råmaterialet brukt og prøvematriksen (sammensetningen av prøvene) (Heaney et al., 2005; Lorieau et al., 2018; Silva et al., 2022). Flere studier har ikke observert forskjeller i kalsiumabsorpsjon mellom melk og soyamelk beriket med kalsiumkarbonat (Heaney et al., 2000; Shkemi & Huppertz, 2022; Zhao et al., 2005). På den andre siden har kalsiumkarbonat vist uønskede effekter som såpesmak i matvarer, i tillegg til at det har en lavere løselighet i vann og kan føre til utfelling ved tilsetning i drikker (Alegría-Torán et al., 2015; Lorieau et al., 2018). En annen studie av Heaney et al. (2005) så på den fysiske tilstanden til ulike former for kalsium i kalsiumberikede drikker, hvor store deler av kalsiumet tilsatt i soyadrikk befant seg i bunnfallet.

2.5 Antinæringsstoffer

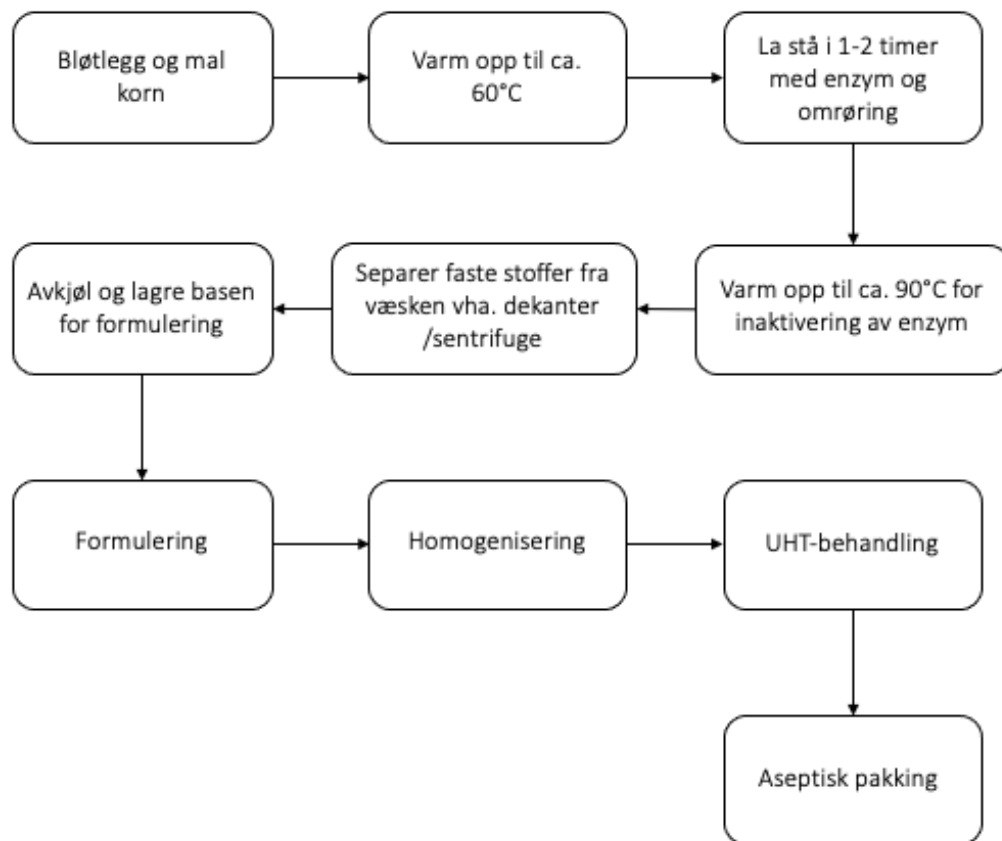
ANF er naturlig til stede i ulike matkilder som korn og belgfrukter, samtidig som det kan ha toksisk eller antiernæringsmessig virkning. ANF er en viktig faktor som reduserer biotilgjengeligheten til ulike næringsstoffer, og kan omtales som bioaktive stoffer fordi de ved inntak kan ha metabolske effekter i menneskekroppen (Samtiya et al., 2020; Singh et al., 2017). De anses som ANF, til tross for at noen kan gi positive helseeffekter som reduksjon i blodsukker og insulinrespons, samt plasmakolesterol og triglyserider (Singh et al., 2017; Udomkun et al., 2019). Havre inneholder blant annet fytinsyre (Dendougui & Schwedt, 2004).

2.5.1 Fytinsyre

Fytinsyre, myo-inositol-(1,2,3,4,5,6)- heksafosforsyre, er en viktig lagringsform for fosfor i form av fytat i planter (Sotelo et al., 2010). Fytater (myo-inositol-(1,2,3,4,5,6)-heksafosfat) er betegnelsen for salter av fytinsyre, også kalt inositolheksafosfat (InsP₆) (Kumar et al., 2010). Forbindelsen fungerer som en inhibitor og et ANF fordi det har evne til å binde mineraler (kalsium, kobber, sink og jern), stivelse og protein (Dendougui & Schwedt, 2004). Dette fører til endringer i løselighet, funksjonalitet, fordøyelighet og absorpsjon av næringsstoffene (Múzquiz et al., 2012; Popova & Mihaylova, 2019; Sandberg et al., 1989). I forhold til kalsium vil det danne uløselig kalsium-fytatkompleks som gjør mineralet utilgjengelig for absorpsjon, og dermed reduseres biotilgjengeligheten og løseligheten til mineralet. Fytat kan også påvirke enzymaktiviteten og redusere fordøyeligheten av næringsstoffer ved å hemme fordøyelsesenzymene pepsin, trypsin, og chymotrypsin (Deshpande & Damodaran, 1989; Inagawa et al., 1987) Tidligere studier har også rapportert at fytat danner komplekser med proteiner, som fører til komplekse endringer av proteinstrukturen (O'Dell & De Boland, 1976; Ravindran, 1995). Dette kan vider gi redusert proteinløselighet, enzymatisk aktivitet og proteolytisk fordøyelighet. Kilder til fytinsyre er korn og belgvekster, som havre, og kan analyseres ved å måle mengden fosfor frigjort av fytase og alkalisk fosfatase (Damodaran et al., 2017c; McKie & McCleary, 2016).

2.6 Prosessering av havrebasert plantedrikk

For at plantebaserte drikker kan etterligne melk i størst mulig grad, må de forvandles til kolloidale suspensjoner (Mäkinen et al., 2016). På bakgrunn av at eksakt prosessering og behandling for produktet brukt i denne oppgaven ikke er tilgjengelig, fremvises en generell, men representativ beskrivelse for produksjon av havredrikk i Figur 4.



Figur 4. Generell fremgangsmåte for prosessering av havredrikk, basert på informasjon fra TINE og Mäkinen et al. (2016).

Havredrikk gjennomgår homogenisering for å få et mer stabilt produkt som etterligner melk (Mäkinen et al., 2016). PBD inneholder uløselige partikler som er tettere enn vann, blant annet store partikler som protein, stivelsesgranulat og faste partikler fra råvarer (Durand et al., 2003; Sethi et al., 2016). Disse partiklene kan derfor sedimentere og danne bunnfall, som er en parameter relatert til produktets stabilitet. Bunnfall gir et ustabil produkt og er en utfordring for produkter som skal lagres (Frühauf et al., 2022). Avhengig av hvilket produkt som produseres, tilsettes ingredienser som sukker, smaksstoffer og olje under trinnet som omhandler formulering (Mäkinen et al., 2016).

På den andre siden gjennomgår plantebaserte produkter, som havre, ulike enhetsoperasjoner for å forbedre kvaliteten. Spesielt spiring, fermentering, eller bruk av chelateringsmidler og eksogen fytase kan forbedre spesielt biotilgjengeligheten av mineraler. Enzymet eksogen fytase, i kombinasjon med sitronsyre, har vist en god effekt på

jernbiotilgjengelighet i beriket havredrikk (Zhang et al., 2007). Dessuten er fytater svært motstandsdyktige mot økt temperatur, og ødelegges ikke helt selv ved varmebehandling opp til 100°C.

2.6.1 Effekt av prosessering

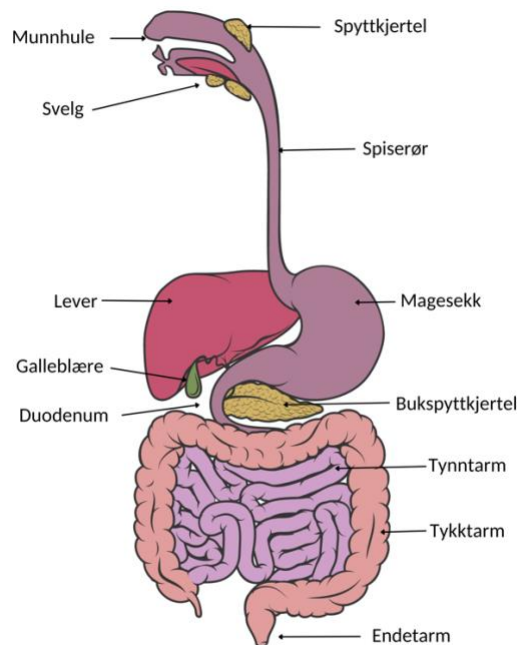
PBD som havredrikk inneholder stivelse som lett kan gelatinisere under prosessering (Sethi et al., 2016). Dette fører til at produktet får en gel-lignende konsistens med høy viskositet, og dermed lavere akseptbarhet. Det er derfor nødvendig med enzymatisk hydrolyse av stivelse under prosessering. Videre kan varmebehandling av PBD redusere proteinløseligheten (Rustom et al., 1991; Hinds et al., 1997). Proteinene utfolder seg ved økt temperatur, noe som fører til at de ikke-polare aminosyrerestene utsettes for vann og overflatehydrofobisiteten øker. Dette øker protein-protein-interaksjoner, som videre kan føre til aggregering og sedimentering av proteiner (Philips et al., 1994). I tillegg kan bløtlegging, 'wet-milling' og varmebehandling i form av sterilisering, påvirke mineralets biotilgjengelighet ved å forårsake tap av mineraler ved utvasking, kliseseparasjon eller maillard reaksjon. Homogenisering vil bidra til økt stabilitet for PBD, da det forstyrrer aggregater og reduserer partikkelstørrelsene (Malaki Nik et al., 2008). Både avskalling og bløtlegging er to prosesseringstrinn som bidrar til å redusere innholdet av ANF, som fytinsyre, samt forbedrer kvaliteten. Bruk av enzymet eksogen fytase reduserer innholdet av fytinsyre, da varmebehandling alene ofte ikke er tilstrekkelig.

2.7 Human fordøyelse

Human fordøyelse innebærer prosesser i fordøyelsessystemet hvor næringsstoffer, ofte i form av fast føde, blir brutt ned som følge av interaksjoner mellom kjemiske og mekaniske prosesser (Barrett, 2014; Pedersen, 2012). På den måten blir næringsstoffene kjemisk endret, noe som resulterer i molekyler som er i stand til å bli absorbert i tarmen. Molekyler bygget opp av mange identiske molekyler (monomerer) som karbohydrater (stivelse, sukrose og maltodekstriner) spaltes til monosakkarider (glukose og fruktose), proteiner til aminosyrer eller korte peptidkjeder og fett (triglycerider) til fettsyrer og monoglycerider (Pedersen, 2012; Sjaastad et al., 2010). Mineraler må være i løselig form for å være

tilgjengelig for opptak (Pedersen, 2012). Det er først når maten fordøyes og næringsstoffene absorberes i tynntarmen og tas opp i blodstrømmen, at cellene og organene i kroppen får nyttiggjort seg av næringsstoffene.

Fordøyelsessystemet inkluderer fordøyelseskanalen bestående av ulike organer og kjertler, som lever, spyttkjertel, bukspyttkjertel og kjertler i magesekk og tynntarm (Pedersen, 2012). Disse spiller en viktig rolle for både fordøyelse og absorpsjon av mat fordi de skiller ut gallsalter og fordøyelsessekret (væske) som inneholder syre eller enzymer for nedbrytning av næringsstoffer, også kalt kjemisk prosessering. I tillegg foregår mekanisk prosessering ved tygging og svelging i munnhulen, og blanding av materiale i magesekken. Fordøyelseskanalen går helt fra munnhulen, via magesekken, tynntarmen (duodenum, jejunum og ileum), tykktarmen (kolon), til endetarmsåpningen (anus). Se Figur 5 for skjematisk oversikt over fordøyelsessystemet.



Figur 5. Fordøyelsessystemet, fra munnhulen til endetarmsåpningen. Basert på (Brodkorb et al., 2019). Figuren er laget i Biorender.com.

2.7.1 Munn

Munnhulen bearbeider fast føde mekanisk i form av tygging, samt tilførsel av spytt fra spyttkjertlene som gir en jevn masse, slik at inntatt materiale kan passere gjennom spiserøret (øsofagus) (Barrett, 2014). Det er kun stivelse som spaltes av enzymet amylase fra spytt (Pedersen, 2012). I tillegg har spyttet en bakteriedrepende virkning og bidrar til regulering av pH, som fører til gunstige forhold for enzymene. Virkningen av fordøyelsesenzymene øker når den mekaniske bearbeidingen bryter ned strukturen til maten. Maten befinner seg i munnen i en relativt kort periode og det er begrenset hvor mye av nedbrytningen som skjer i denne fasen før det går gjennom spiserøret til magen.

2.7.2 Mage

Magesekken (ventrikkelen) vil primært bearbeide og blande maten mekanisk ved kraftig elting og består av sekretoriske celler i magesekkens slimhinne (mucosa), som produserer magesaft bestående av saltsyre (HCl) og pepsinogen (Pedersen, 2012; Sjaastad et al., 2010). Utskillelse av HCl gjør mageinnholdet svært surt med pH 1.5-3.0 som bidrar til aktivering av pepsinogen til pepsin, samt ødeleggelse av syreømfintlige mikroorganismer i maten. Enzymet pepsin starter hydrolyse av proteiner, og spalter protein til korte peptidkjeder og aminosyrer (Guerra et al., 2012). Det kan ta opptil 3-4 timer før magesekken tømmes, og maten føres videre til duodenum via den pyloriske lukkemuskelen (Boland, 2016).

2.7.3 Tarm

Tynntarmen består av tre deler; duodenum, ileum og jejunum (Pedersen, 2012). Duodenum er den første delen av tynntarmen, hvor absorpsjon av de fleste næringsstoffene finner sted. Mageinnholdet blandes med basiske fordøyelsessekret fra bukspyttkjertelen (pankreas), galleblæren og små kjertler i tynntarmen. Dette bidrar til en økning i pH (til ~7) fordi sekretet nøytraliserer det sure innholdet som kommer fra magesekken. Bikarbonat skilles ut fra pankreas og bidrar i pH-økningen (Boland, 2016). Videre vil enzymer fra bukspyttet: trypsinogen, kymotrypsinogen og prokarboksypeptidaser skilles ut fra slimhinnen i tarmepitelet, aktiveres og spalte peptidbindinger og korte peptidkjeder til frie aminosyrer

og små peptider (di- og tripeptider). Pepsin inaktiveres på grunn av økningen i pH fordi enzymet hovedsakelig er aktivt mellom pH 2 og 4 (Minekus et al., 2014).

Videre vil tykktarmen (kolon) tjene som et reservoar for lagring av avfall og ufordøyelige materialer, samt fermentering av det som ikke ble absorbert i tynntarmen (Pedersen, 2012). Tarminnholdet vil så fjernes med feces.

2.8 Måling og stimulering av fordøyelighet

Fordøyelighet er definert som mengde nedbrytbart materiale og bestemmes av hvor mye som faktisk blir tatt opp under fordøyelsen (Sjaastad et al., 2010). Et næringsmiddel kan ha økt fordøyelighet dersom en større andel av næringsstoffene blir brutt ned til mindre komponenter, som forenkler opptaket i tarmen for videre utnyttelse i ulike deler av kroppen. Videre vil fordøyelighet og absorpsjon av næringsstoffene avgjøre næringsmiddelets næringsverdi. Ulike faktorer som prosessering, type næringsstoff, måltidssammensetning og mengde ANF og konsumentens helse kan påvirke fordøyeligheten (Tulbek et al., 2017). Måling og stimulering av fordøyelsessystemet er viktige modeller og blir ofte benyttet innenfor forskning rettet mot mat og ernæring (Minekus et al., 2014).

Det finnes ulike metoder for å undersøke grad av fordøyelighet, som *in vivo* og *in vitro* metoder (Minekus et al., 2014). *In vivo* er metoder hvor fordøyelsesprosessen måles i dyr eller mennesker og betraktes som gullstandarden (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). På den andre siden kommer denne analysen med etiske restriksjoner og blir derfor mindre brukt. I tillegg er den både ressurskrevende, kostbar og teknisk vanskelig. *In vitro* modeller er derimot metoder som måler grad av fordøyelighet i laboratorium for kunstig simulering av fordøyelsesprosessen (Alegría-Torán et al., 2015; Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). *In vitro* modeller etterligner de fysiologiske forholdene i tre ulike faser; munn (oral prosessering), mage (gastrisk prosessering), tynntarm (intestinal prosessering) og tykktarm (fermentering), med hensyn til parametere som fordøyelsesenzymer, fordøyelsessekret, tid, saltkonsentrasjoner og pH.

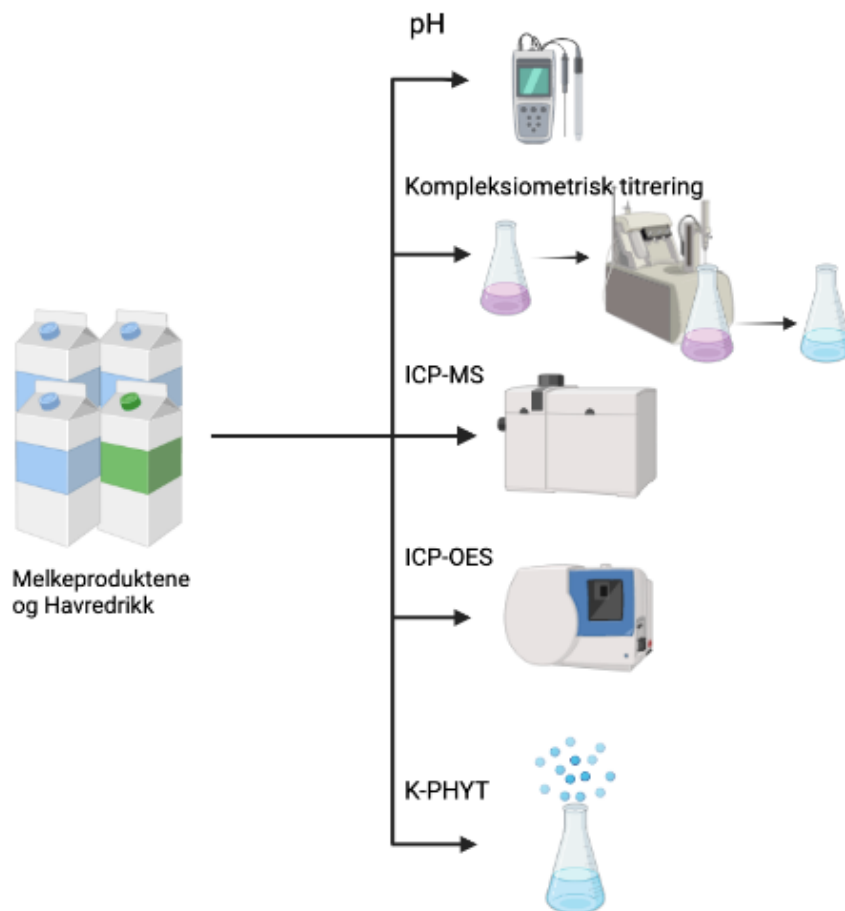
Det er to ulike hovedtyper *in vitro* metoder for å undersøke fordøyeligheten av mat, henholdsvis statiske og dynamiske metoder (Brodkorb et al., 2019). Sistnevnte er egnet for å stimulere fordøyelsen av ulike matvarer, men metoden er ikke like tilgjengelig og kan være svært kompleks, i tillegg til å medføre høye kostnader. Statiske metoder benytter både konstant pH og konstant mat til enzymer og elektrolytter under hver fordøyelsesfase. Slike analyser har flere fordeler da det er raske og rimelige analyser, enklere å kontrollere, økt reproduserbarhet og mindre arbeidskrevende, samt nyttige for å forutsi utfall av *in vivo* fordøyelse (Bohn et al., 2018; Brodkorb et al., 2019; Sousa et al., 2020). På den andre siden finnes det et bredt spekter av slike modeller, hvor det kan benyttes ulike enzymkilder fra blant annet gris og kanin (Switzar et al., 2013). Disse har ulik sammensetning og enzymaktivitet, og dermed forskjellig spesifisitet og aktivitet (Minekus et al., 2014). På bakgrunn av dette vil grunnlaget for sammenligning av slike metoder være vanskelig. Det har derimot i senere tid blitt laget en standardisert protokoll for statisk *in vitro* metode som et samarbeid mellom eksperter på fordøyelse i nettverket COST INFOGEST, da det finnes utallige slike statiske metoder med variasjoner i parameterne (Brodkorb et al., 2019). Det vil derfor i større grad være mulig å sammenligne slike forsøk i fremtiden ved å benytte én felles metode. Sluttproduktet fra *in vitro* fordøyelse må deretter analyseres for ulike komponenter, avhengig av formålet.

3. MATERIALER OG METODER

Hensikten med oppgaven var å bidra med kunnskap om hvordan biotilgjengeligheten av kalsium og jod, samt hydrolysegrad av proteiner, blir påvirket av produktets egenskaper og ulike prosesser som er inkludert i fremstillingen på *in vitro* fordøyelse. I forbindelse med denne masteroppgaven ble det utført statistisk *in vitro* fordøyelse av ulike melkeprodukter og én havrebasert plantedrikk. Det ble gjennomført måling av pH, samt analysemetoder relatert til fytinsyreinnhold, totalt kalsium- og jodinnhold, ionisk kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Statistisk analyse ble utført for å avdekke eventuelle signifikans i datasettet.

3.1 Forsøksoppsett

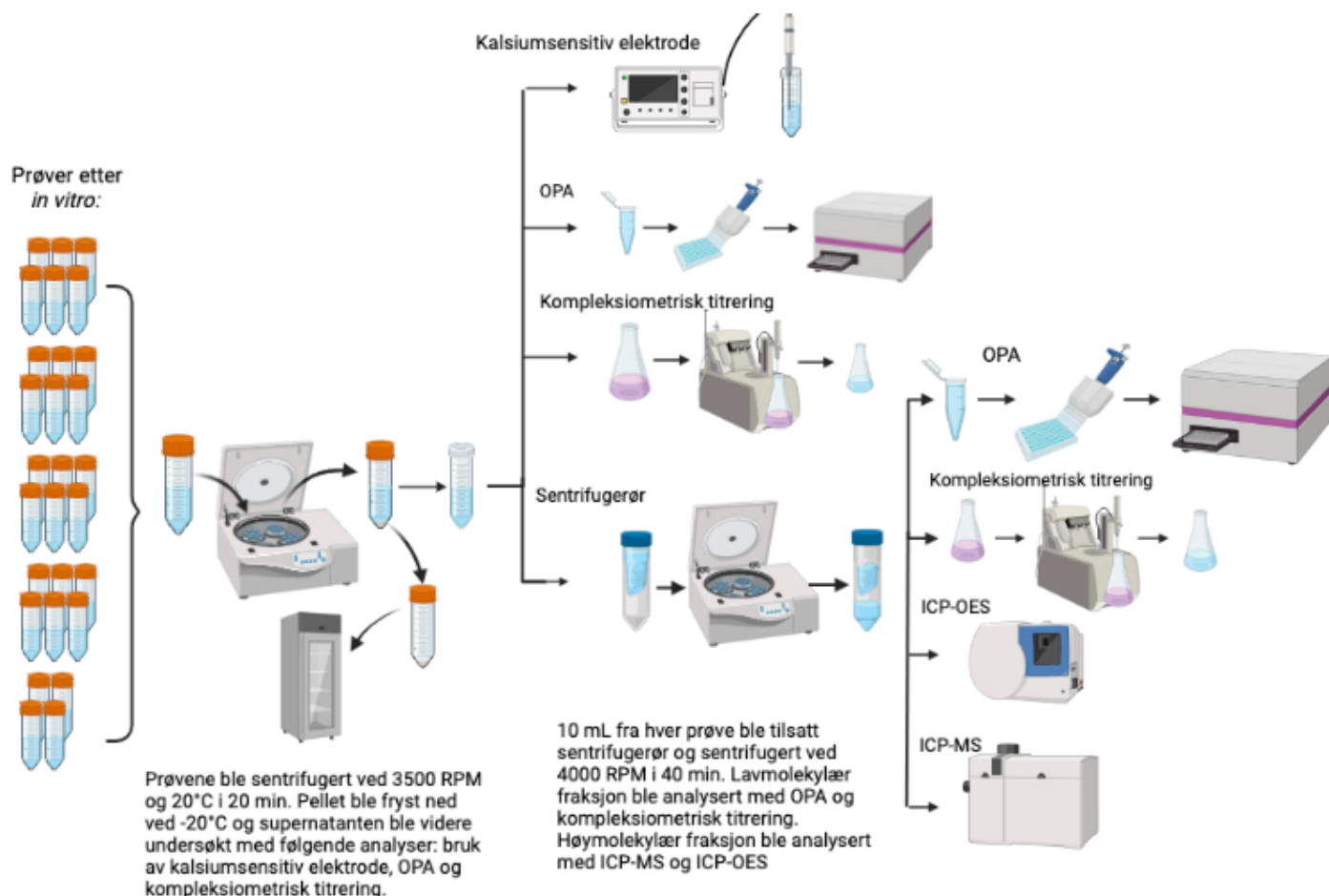
Prøvene inkludert i denne masteroppgaven gjennomgikk statistisk *in vitro* fordøyelse. I forkant av *in vitro* fordøyelse ble produktene analysert for pH (pH- meter), fytinsyreinnhold (K-PHYT) og totalt kalsiuminnhold (kompleksiometrisk titrering og ICP-OES). Forsøksoppsettet for analyser før *in vitro* fordøyelse er illustrert i Figur 6.



Figur 6. Analyser utført på de ulike produktene før *in vitro* fordøyelse. Hvor pH ble registrert, etterfulgt av kompleksiometrisk titrering og ICP-OES for innhold av totalt kalsium, ICP-MS for innhold av jod, og K-PHYT for innhold av fytinsyre. Figuren er laget i Biorender.com.

Etter *in vitro* fordøyelse ble de simulerte tarmprøvene, kontrollprøver (fordøyde prøver uten fordøyelsesenzymer) og blank- prøver (kun fordøyelsesvæsker og enzymer), alle med uttak etter 60 og 120 min i duodenal fase (henholdsvis D60 og D120), sentrifugert for å fjerne bunnfall. Videre ble prøvene analysert med kompleksiometrisk titrering og kalsiumsensitiv elektrode for å bestemme mengde totalt kalsium og ionisk kalsium, og hydrolysegrad av proteiner ved OPA-metoden. Resterende prøvemengder ble separert i høy- og lavmolekylære fraksjoner og overført til sentrifugerør (lav- og høymolekylære prøver), hvor lavmolekylær fraksjon ble analysert for totalt kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Høymolekylær fraksjon ble analysert for kalsium- og jodinnhold med ICP-OES og ICP-MS.

Forsøksoppsettet for analyser etter *in vitro* fordøyelse er illustrert i Figur 7.



Figur 7. Forsøksoppsettet etter *in vitro* fordøyelse med de ulike prøvefraksjonene og analysene. Prøver ble sentrifugert, etterfulgt av kompleksimetrisk titrering, kalsiumsensitiv elektrode og OPA. Resterende prøvemengder ble sentrifugert i sentrifugerør. Dette ga lav- og høymolekylære prøver, hvor lavmolekylære ble analysert med OPA og kompleksimetrisk titrering. Høymolekylære ble analysert med ICP-OES og ICP-MS. Figuren er laget i Biorender.com. RPM - revolutions per minute; OPA - o-phthaldialdehyde; ICP-OES - induktiv koblet plasma optisk emisjonsspektroskopi; ICP-MS - induktiv koblet plasma massespektrometri.

3.2 Om prøvematerialet

Prøver benyttet til de ulike analysene er produkter kommersielt tilgjengelig i butikk, og ble kjøpt i Ås vinteren 2023. De fire ulike prøvene som ble undersøkt hadde ulike produksjonshistorikk, inkludert ulike varmebehandling (HTST og UHT-behandling). En av prøvene (Laktoseredusert) er laktoseredusert og har gjennomgått enzymatisk hydrolyse av

laktose (Harju et al., 2012). Variasjoner i kalsium og proteiner mellom de ulike variantene av melkematriks og prosesser i fremstillingen på *in vitro* fordøyelse ble undersøkt. Prøvene og de ulike prøvefraksjonene benyttet i forsøket er presentert i Tabell 7.

Tabell 7. Prøver benyttet i forsøket. F - fordøyd prøve; LM - lavmolekylær prøve; HM – høymolekylær prøve; K - kontrollprøve; BLANK - vann fremfor prøve under *in vitro* fordøyelse.

Prøve	Forklaring
HTST	Melkeprodukt, HTST-pasteurisert.
UHT	Melkeprodukt, UHT-behandlet.
Laktoseredusert	Melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert.
Havredrikk	Havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet.
F	<i>In vitro</i> fordøyelse av prøve.
LM	Lavmolekylær prøvefraksjon etter sentrifugering, fordøyd.
HM	Høymolekylær prøvefraksjon etter sentrifugering, fordøyd.
K	Kontrollprøve, bestående av produkt og fordøyelsesvæsker (SSF, SGF og SIF), men uten fordøyelsesenzymer.
Blank	<i>In vitro</i> fordøyelsesenzymer og fordøyelsesvæsker, vann istedenfor produkt.

Videre er næringsinnholdet per 100 g oppgitt på varedeklarasjonen til produktene som ble inkludert i forsøket presentert i Tabell 8.

Tabell 8. Næringsinnhold per 100 g i produktene som ble inkludert i oppgaven (TINE).

	HTST	UHT	Laktoseredusert	Havredrikk
Fett	1.0 g	1.2 g	1.0 g	1.5 g
Karbohydrat	4.5 g	4.5 g	4.5 g	7.5 g
Protein	3.5 g	3.5 g	3.5 g	0.8 g
Kalsium	130 mg	130 mg	130 mg	120 mg
Jod	16 µg	16 µg	16 µg	16 µg

3.3 pH

pH er et mål på hvor sur en væske er, og bestemmes av konsentrasjonen av hydrogenioner (H^+) (Addy et al., 2004). For å måle pH i prøvene før og etter *in vitro* fordøyelse, ble det benyttet et pH- meter (Mettler Toledo InLab® Power Pro-ISM, Australia). Det ble først kalibrert med ulike bufferløsninger (Merck, Tyskland) ved pH 2, 4 og 7. Mellom hver måling stod pH-elektroden i en KCl- løsning (kaliumklorid) (Merck, Tyskland). Før *in vitro* fordøyelse ble pH målt i alle prøvene ved at en prøvemengde (10 mL) ble overført til et beger med en pipette, hvor hver prøve hadde tre paralleller. Etter *in vitro* fordøyelse ble pH målt direkte i prøvene, derav to paralleller. Alle målingene ble utført ved romtemperatur, men pH- meter ble ikke kalibrert med hensyn til temperatur.

3.4 Analyse for fytinsyre

Analyse for fytinsyre, i form av fosfor, har som hensikt å måle mengden fosfor frigjort av fytase og alkalisk fosfatase (McKie & McCleary, 2016). Megazyme har utviklet en enkel, kvantitativ metode (K-PHYT) som gir et mål på total mengde fosfor som er frigjort fra prøvene. Prinsippet for metoden involverer syreekstraksjon av inositolfosfater. Deretter behandling med en fytase som er spesifikk for fytinsyre ($InsP_6$) og de lavere myo-inositolfosfatformene: $InsP_2$, $InsP_3$, $InsP_4$ og $InsP_5$. Videre, for å sikre frigjøring av det endelige fosfatet fra myo-inositolmonofosfat ($InsP_1$) må prøvene behandles med alkalisk fosfatase. Til slutt måles totalt frigjort fosfat med en kolorimetrisk metode og resultatet beregnes som totalt fosfor- eller fytinsyreinnhold i prøvene. Analysen ble utført av ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved NMBU.

I forkant av *in vitro* fordøyelse ble prøvene (HTST, UHT, Laktose og Havre) analysert for fytinsyre i form av fosfor. Det ble benyttet et fosfor og fytinsyre assay (kat.nr. K-PHYT, Megazyme International, Bray, County Wicklow, Irland). Metoden ble utført i henhold til McKie og McCleary (2016) og hver prøve hadde fire replikater. Standard havremel fra Megazyme kit ble kjørt som kontroll (se rådata K-PHYT). Standarden oppnådde $P=0.4113\%$ (innenfor akseptabelt område som var 0.391-0.478%).

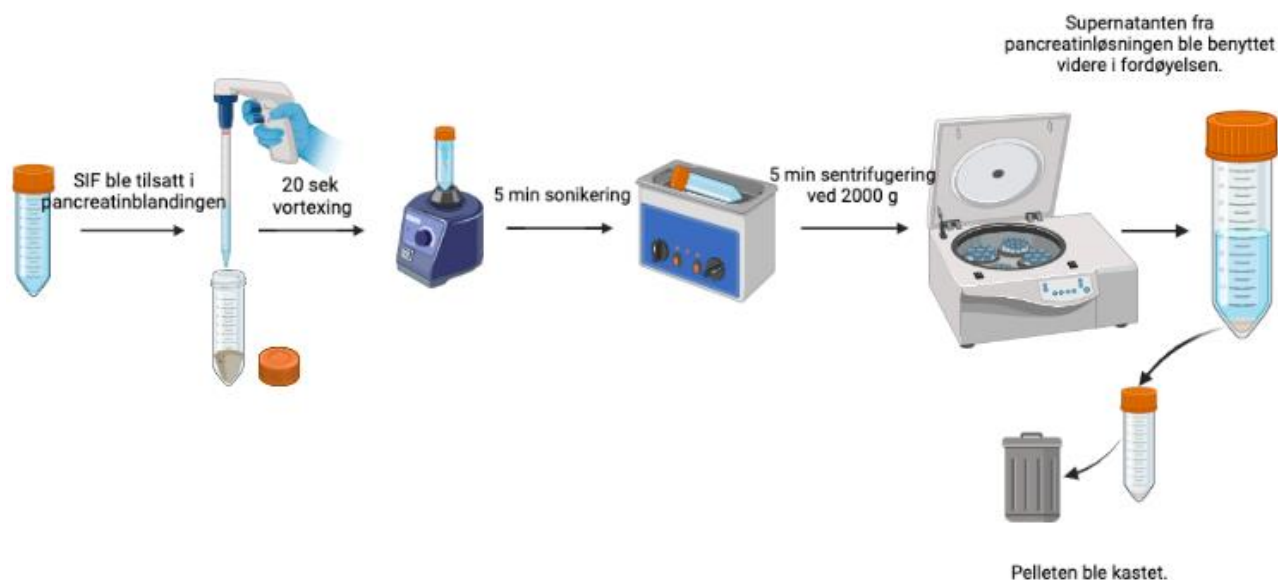
3.5 *In vitro* fordøyelse av ulike melke- og plantedrikker

In vitro fordøyelsesforsøk har som hensikt å stimulere de fysiologiske forholdene i øvre mage-tarmkanal, da munn-, mage- og tynntarmsfasen (Brodkorb et al., 2019). Metoden for *in vitro* fordøyelse ble utført i henhold til Brodkorb et al. (2019) med modifikasjoner. Det er en standardisert protokoll for statisk *in vitro* fordøyelse utarbeidet av COST INFOGEST nettverket. Modellen bruker konstant pH for hver fordøyelsesfase, samt konstant forhold mellom mat, enzymer og elektrolytter. Det henvises til protokollen for ytterligere beskrivelse av fremgangsmåten.

I forkant av selve *in vitro* fordøyelsesforsøket, ble det gjennomført et pilot fordøyelsesforsøk som inkluderte alle produktene. Hensikten var å finne nøyaktige mengder 1 M HCl (saltsyre, VWR Chemicals, Frankrike) og 1 M NaOH (Merck, Tyskland) som måtte tilsettes under fordøyelsesforsøkene for å oppnå ønsket pH i den stimulerede mage- og tarmfasen (pH 3 og 7), som et tidsbesparende tiltak. Prøvene ble, om nødvendig, justert med 1 M HCl/NaOH før inkubering under de senere *in vitro* fordøyelsesforsøkene. Videre ble det gjort enzymaktivitetstester (våren 2023) på nødvendige enzymer benyttet: pepsin (Pepsin from porcine gastric mucosa, P7012, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA) og blandingsprodukt av fordøyelsesenzymmer i form av pancreatin (Pancreatin from porcine pancreas, P7545-25G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA). Dette ble gjort for å vite hvilke mengder som måtte tilsettes av hvert enzym for å oppnå ønsket konsentrasjon (enzym:substrat forhold) under fordøyelsen, som er oppgitt i protokollen (Brodkorb et al., 2019). Enzymaktivitet for pepsin ble målt til 1670 U/mg og trypsinaktivitet i pancreatin ble målt til 3.6 U/mg. For å stimulere de fysiologiske forholdene i øvre mage-tarmkanal ble også galleekstrakt (Bile bovine, B3883, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA) tilsatt i tarmfasen. Det ble ikke tilsatt amylase i munnfasen eller lipase i magefasen, da prøvematerialet hadde lavt innhold av både stivelse og fett.

In vitro fordøyelse ble utført med 4 g prøve i 50 mL Falconrør med to paralleller. Det ble inkludert blank- prøver som kun bestod av vann istedenfor produkt, fordøyelsesenzymmer, fordøyelsesvæskene SSF (simulated salivary fluid), SGF (simulated gastric fluid) og SIF

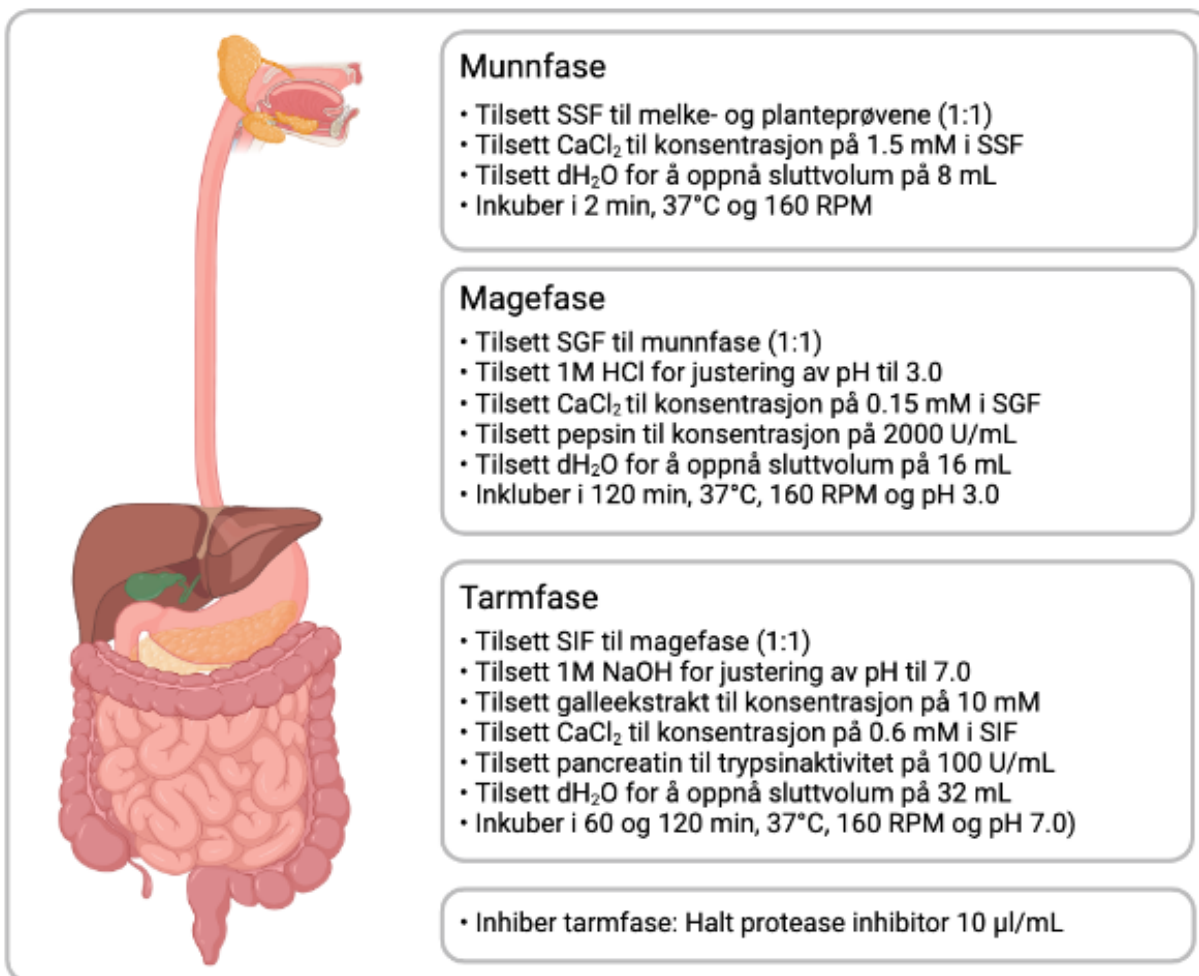
(simulated intestinal fluid). I tillegg ble det inkludert stabilitetsprøver, også kalt kontrollprøver, som bestod av produkt, fordøyelsesvæskene og vann istedenfor fordøyelsesenzymmer. Basert på protokollen og mengde prøve ble pepsin tilsatt til en konsentrasjon på 2000 U/mL i magefasen og pancreatin tilsatt til en konsentrasjon på 100 U/mL trypsinaktivitet i tarmfasen, i tillegg til galle som ble tilsatt til en konsentrasjon på 10 mmol/mL (Brodkorb et al., 2019). For å fjerne uløselig materiale i pancreatinløsningen, ble enzymblandingen tilsatt nødvendig mengde SIF (simulated intestinal fluid) ut fra oppveid mengde av enzymblandingen, etterfulgt av vortexing i 20 s og sonikering (Bransonic™ Ultrasonic Cleaner B200, Branson Ultrasonics™, USA) i 5 min. Løsningen ble deretter sentrifugert ved 2000 x g i 5 min (VWR Mega Star 3.0R, Tyskland). Supernatanten fra enzymblandingen ble videre benyttet og pelleten ble kastet. Se Figur 8 for oversikt over bearbeidelsen av pancreatinløsningen.



Figur 8. Fremgangsmetoden for å fjerne uløselig materiale i pancreatinløsningen. Pancreatinblanding ble tilsatt en mengde SIF (basert på utveid mengde pancreatin), etterfulgt av vortexing i 20 sek, sonikering i 5 min og sentrifugering i 5 min ved 2000 x g. Supernatanten ble tilsatt i prøvene, men pelleten ble kastet. Figuren er laget i Biorender.com. SIF - simulated intestinal fluid.

Løsninger av fordøyelsesenzymene, galleekstrakt, kalsiumklorid (CaCl₂) (Merck, Tyskland) og prøvene ble konstant holdt på is under prøvebearbeidelsen, med unntak av vortexing. Under de ulike stimulerte fasene (munn, mage og tarm) ble prøvene inkubert i varmeskap (Ecotron Incubator Shaker, INFORS HT, Sveits) ved 37°C og 160 RPM. Fordøyelsen ble

avsluttet i tarmfasen (D60 og D120). Etter tarmfasen ble enzymaktiviteten inhibert ved tilsetning av en protease inhibitor (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Scientific, USA). Dette var en ferdiglaget konsentrert stokkløsning av proteasehemmere, som ble tilsatt med 1:100 forhold (1 del inhibitor til 100 deler prøve) (10 µL/mL). Hele *in vitro* fordøyelsesprosessen er illustrert i Figur 9.



Figur 9. Oversikt over *in vitro* fordøyelse (INFOGEST 2.0) i henhold til Brodkorb et al. (2019) med de ulike fasene, samt de ulike komponentene og deres ønskede sluttkonsentrasjoner. Figuren er laget i Biorender.com. SSF - simulated salivary fluid; SGF - simulated gastric fluid; SIF - simulated intestinal fluid.

Prøvene ble så sentrifugert ved 3500 RPM og 20°C (VWR Mega Star 3.0R, Tyskland) før videre analyser av sluttproduktet. Resterende prøvemengder ble deretter fryst ved -20°C

før ytterligere analyser.

3.6 Analyse av lav- og høymolekylær prøvefraksjon ved bruk av sentrifugerør

En tidligere studie undersøkte totalt innhold av ulike former for jod med hensyn til ulike tilberedninger av en type snegle (Doh et al., 2019). Metoden benyttet var en *in vitro* fordøyelsesmodell, hvor det ble inkludert en dialysemembran med porestørrelse på 2 kDa. Absorpsjonseffektiviteten av jod ble så beregnet basert på prøve fra indre og ytre membran, henholdsvis lav- og høymolekylær fraksjon. En forutsetning for at jod skal være biotilgjengelig, er at det er i løselig form (frie jodidioner) (Blomhoff et al., 2007d). Membraner med en viss porestørrelse indikerer om komponenten er løselig eller bundet til andre komponenter. På bakgrunn av metoden til Doh et al. (2019), valgte vi å benytte sentrifugerør bestående av membraner med en kjent porestørrelse, etterfulgt av sentrifugering.

Sentrifugalfilterenheter (Amicon[®] Ultra-15 centrifugal filter devices, Millipore, Irland) er prøverør bestående av en membran med en bestemt porestørrelse (cut off). Bruk av denne separeringsmetoden i sentrifugerør er en rask prøvebehandling for separasjon av prøvematerialet i en høy- og en lavmolekylær fraksjon. Disse rørene tilsettes prøvemateriale (10-15 mL) og sentrifugeres slik at komponenter mindre enn en viss molekylstørrelse går gjennom filteret, såkalt filtrat, også kalt den lavmolekylære delen. Resterende komponenter som har en større molekylstørrelse utgjør det konsentratet, og vil bli værende på retentatsiden av membranen. Formålet ved bruk av denne metoden var å undersøke om kalsium var i kompleks med andre komponenter, samt undersøke grad av hydrolyse ved OPA metoden i de lavmolekylære prøvene.

I dette tilfellet ble det benyttet sentrifugerør med en cut off på 3 kDa (3000 Da). Prøvematerialet fra *in vitro* fordøyelse ble brukt, både fordøyde prøver (D60 og D120), kontrollprøver (K60 og K120) og blank- prøver, hvor 10 mL prøve ble overført til sentrifugerør, veid og sentrifugert ved 4000 RPM i 40 min (VWR Mega Star 3.0R, Tyskland).

Den lavmolekylære fraksjonen (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktose og LM-Havre) ble videre undersøkt for innhold av totalt kalsium, ionisk kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Høymolekylær fraksjon ble testet for kalsium- og jodinnhold. Basert på volum og konsentrasjon av en gitt komponent i høy- og lavmolekylær fraksjon kan biotilgjengeligheten av denne komponenten bestemmes. Det ble derfor registrert vekt før og etter sentrifugeringstrinnet.

3.7 Analyse av kalsiuminnhold ved ICP-OES

Induktiv koblet plasma optisk emisjonsspektroskopi (ICP-OES) er en metode for kvantifisering av mineraler i ulike matrikser, som kalsium, i melk- og meieriprodukter (Fernández-Sánchez, 2019; Manuelian et al., 2017). Analysene ble utført ved Fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltning (MINA) ved NMBU. Innhold av totalt kalsium ble analysert i de ulike produktene før *in vitro* fordøyelse og i høymolekylære prøvefraksjoner. Sistnevnte er ikke inkludert.

Prøvene ble dekomponentert i 1.5 mL Ultrapure konsentrert HNO₃ (salpetersyre) ved 260°C i en UltraClave (Milestone, Italia), og deretter fortynt med 15 mL deionisert H₂O (DiH₂O). Prøvene ble kvantifisert med Optima 5300 DV ICP-OES fra Perkin Elmer. Sertifisert referansemateriale av melkepulver (ERM-BD150) ble dekomponert og målt samtidig.

3.8 Analyse av jodinnhold ved ICP-MS

Induktiv koblet plasma massespektrometri (ICP-MS) er en metode for kvantifisering av jod (Fecher et al., 1998). Analysen ble utført ved Fakultet for Miljøvitenskap og Naturforvaltning (MINA) ved NMBU. Innhold av jod ble analysert i de ulike produktene og i de høymolekylære fraksjonene av alle prøvene etter *in vitro* fordøyelse ([3.1 Forsøksoppsett](#)).

Prøvene ble ekstrahert med TMAH (tetrametylammonium hydroksid) over natten ved 60°C og deretter ristet opp. Etterfulgt av en time ved 90°C før fortykning til 10 mL med DiH₂O. Prøvene ble sentrifugert og jod ble bestemt på en Agilent 8000 ICP-MS. Sertifisert referansemateriale av melkeprøver (ERM-BD150) ble ekstrahert og målt samtidig. De

kvantifiserte verdiene på referansematerialet viser godt samsvar med de sertifiserte verdiene.

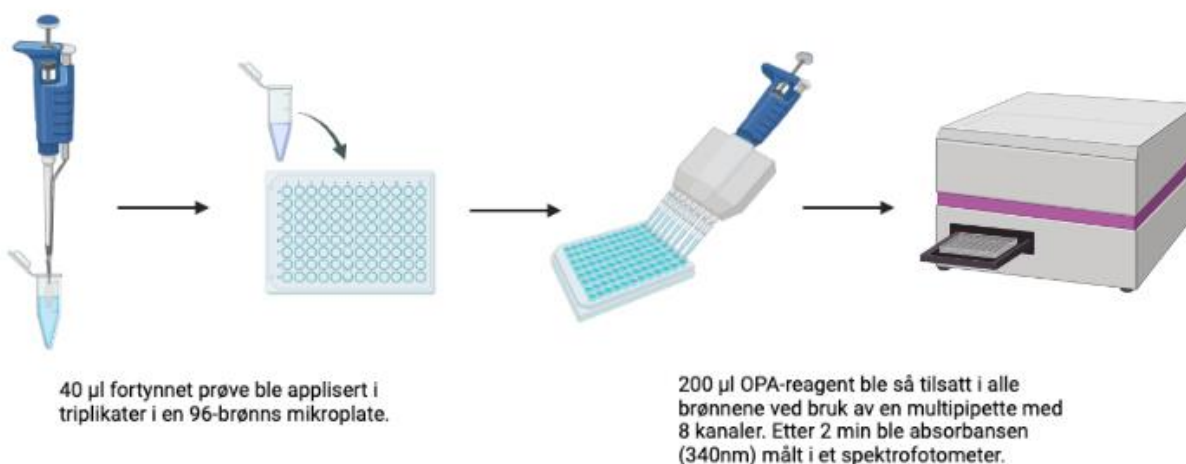
Innholdet av jod i den høymolekylære fraksjonen benyttes som et mål på den andelen av dette mineralet som ikke er tilgjengelig for absorpsjon under fordøyelse. Dette sammenlignes med den totale mengden jod i den delen av de fordøyde prøvene (ca. 10 g) som benyttet til å separere de to fraksjonene (høy- og lavmolekylær).

3.9 Analyse av hydrolysegrad med OPA metoden

OPA (*o*-phthaldialdehyde) er en spektrofotometrisk analysemetode ved bruk av *o*-phthaldialdehyde for å måle primære aminogrupeer som frigjøres ved hydrolyse av peptidbindinger i proteiner (Church et al., 1983). Metoden ble benyttet til å beregne hydrolysegraden i de simulerte tarmprøvene etter *in vitro* fordøyelse. OPA er en metode hvor primære aminogrupeer reagerer med OPA og B-mercaptoethanol (BMN) og danner et farget produkt, 1-alkyltio-2-alkylisoindol, som absorberer sterkt ved 340nm (A340) (Church et al., 1983). Metoden er både rask, følsom og enkel, og samtidig anvendelig på alle proteiner. Basert på dette kan metoden kvantifisere antall peptidbindinger som er brutt og beregne hydrolysegrad.

Til analysen ble en standardkurve og OPA-reagenset tillaget i henhold til Church et al. (1983) ved bruk av en serie prøver med en kjent mengde L-Leucin. Det ble forberedt en stokkløsning av 50 mM L-leucin (Merck, Tyskland) i 1 M HCl (VWR Chemicals, Frankrike). Standarden ble så fortynnet til konsentrasjoner mellom 0-3 mM (0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mM) med dH₂O ($R^2 = 0.9965, 0.9856, 0.9837$). Til OPA-løsningen ble først 40 mg OPA (*o*-phthaldialdehyde, Sigma-Aldrich, Tyskland) løst i 1 mL methanol (VWR Chemicals, USA) i et eppendorfrør. For å lage OPA-buffer ble følgende ingredienser blandet sammen: 25 mL 100 mM Na-tetra borate (Merck, Tyskland) og 5 mL 10% SDS (sodium dodecyl sulfat, Sigma-Aldrich, USA). Deretter ble 50 mL OPA-buffer målt opp i et beger og tilsatt både 1 mL OPA- methanol løsningen, samt 100 µL BME (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Tyskland). Dette ga en OPA-reagens med OPA-konsentrasjon på 6 mM. Prøvene som skulle undersøkes ble fortynnet 1:100 med OPA

buffer for å forsikre at absorbanen var innenfor målbart området på standardkurven, hvor 10 µL av hver prøve ble tilsatt 990 µL av OPA buffer (uten OPA og BME). Deretter ble 40 µL av de fortynnede prøvene applisert i triplikater i 96-brønns mikroplater (96-well Clear Flat Bottom UV-Transparent Microplate, Corning®, USA). Videre bearbeiding ble utført i avtrekkskap, hvor hver brønn ble tilsatt 200 µL OPA-reagens med en multipipette med 8 kanaler. Fremgangsmåten ved bruk av mikroplate er illustrert i Figur 10. Både OPA-blank (OPA buffer uten OPA og BME), blank- prøver og Leucin-standarder ble inkludert for hver mikroplate. Prøvene ble stående i 2 min før absorbanen ble målt automatisk ved A340 i et spektrofotometer (SpectraMax® M2, Molecular Devices, USA). Før avlesning ble mikroplaten ristet i 5 min.



Figur 10. Fremgangsmåte ved bruk av en 96-brønns mikroplate og multipipette under OPA-analysen. Figuren er laget i Biorender.com. OPA - o-phthaldialdehyde.

OPA-metoden ble utført på de simulerte tarmprøvene med uttak D60 og D120 etter *in vitro* fordøyelse (F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk), og de lavmolekylære prøvene (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk) etter sentrifugering i sentrifugerør. Det gir et mål på protein-nedbrytning både i fordøyde- og lavmolekylære prøver. Videre utregning av resultatet ble gjort ved bruk av formel fra standardkurvene som er presentert vedlegg 3 (Figur C). Det ble laget nye standardløsninger for hver mikroplate. Blank- og kontrollprøver ble inkludert og utarbeidet på samme måte som prøvene som ble

analysert. Disse ble identifisert og kvantifisert, og sammenlignet med resterende prøver. Resultatet ble oppgitt som leucin ekvivalenter mmol/mL prøve.

3.10 Analyse av kalsium ved kompleksimetrisk titrering med EDTA

Kompleksimetrisk titrering med EDTA (etylen-diamin-tetra-eddiksyre) er en metode for bestemmelse av totalt kalsiuminnhold i ulike løsninger, som melk- og meieriprodukter (Visser, 1976). Metoden benytter en kompleksimetrisk titrering med dinatriumhydrogensaltet av EDTA, hvor blanding bestående av prøvematerialet og bufferløsning (pH 10.2) tilsettes Eriochrome Svart T. Dette gir blandingen en lilla farge dersom kalsium er til stede i prøven. Titrering med EDTA-løsning vil føre til at kalsium og EDTA danner en chelatforbindelse. Denne forbindelsen gir en fargeendring og indikerer at alt kalsium er bundet når blandingen får en blå farge.

Til metoden ble bufferløsning og EDTA-løsning laget i henhold til Visser (1976). Bufferløsningen bestod av 1:6 blanding av 1 M NH_4Cl (ammoniumklorid, Emsure, Tyskland) og 1 M NH_4OH (ammoniumhydroksid, Emsure, Tyskland) til pH 10.2. EDTA-løsningen ble laget med 4 g di-sodium-dihydrogensalt (Emsure, Tyskland) av EDTA, løst i vann og blandet med 0.5 g NaOH (Emsure, Tyskland). Kalsium- standardløsningen ble laget av en medstudent ved å løse opp 1.000 g CaCO_3 (kalsiumkarbonat, Emsure, Tyskland) i minimal mengde med HCl (VWR Chemicals, Frankrike) til en svak alkalisk reaksjon, med totalt volum på 1000 mL. EDTA-løsningen ble så tilsatt 0.1 g MgCl_2 (magnesiumklorid, Emsure, Tyskland) blandet med dH_2O . Standardløsningen ble brukt til å sjekke EDTA-løsningen, hvor 1 mL av den ene tilsvare 1 mL av den andre.

Både prøver før *in vitro* fordøyelse (HTST, UHT, Laktose og Havre), etter (F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk) og lavmolekylære prøver (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk) ble analysert med to paralleller. Hvor 4 mL prøve ble blandet med 20 mL dH_2O og 5 mL bufferløsning. Unntaket var de lavmolekylære prøvene, hvor det ble benyttet 3 mL prøve grunnet lite gjenværende prøvemengder. Blandingene ble så tilsatt en liten mengde Eriochrom Svart T (Emsure, Tyskland), og deretter varmet i

vannbad til over kroppstemperatur i 3 min og titrert med EDTA titreringsløsningen (Metrohm, 876 Dosimat plus, Sveits) til fargeendringen fra lilla til blå oppstod.

Et unntak var for prøvene Havredrikk i forkant av *in vitro* fordøyelse. Disse prøvene reagerte annerledes på titrering med EDTA og fargeendringen fra lilla til blå skiftet tilbake ved små mengder EDTA. Prøven ble så justert til pH 3 med 1 M HCl før titrering, noe som gjorde fargeendringen fra lilla til blå endelig.

3.10.1 Beregning av kalsiumkonsentrasjon

Mengde mg kalsium per 100 g ble beregnet med Formel 1:

Formel 1:

$$\text{mg kalsium per 100g} = \frac{\text{mL forbruk EDTA} \times 0.4 \times 8}{\text{mL prøve}} \times 100$$

Hvor mL forbruk EDTA er mengden EDTA tilsatt ved titrering frem til fargeendring. Videre tilsvarer 1 mL EDTA 0.4 mg Ca²⁺. Alle prøvene var fortynnet 8 ganger under *in vitro* fordøyelse, noe som er tatt hensyn til ved beregning. Ved å multiplisere med 100 blir svaret oppgitt i mg per 100g.

3.11 Analyse av ionisk kalsium med kalsiumsensitiv elektrode

Bruk av kalsiumsensitiv elektrode er en enkel og nøyaktig metode for å måle ionekonsentrasjoner i en vandig løsning (Geerts et al., 1983). Elektroden (Orion 97-20 ionplus Calcium Electrode, Thermo Electron Corp., Beverly, MA) benyttet i forsøket måler kun fritt, ubundet kalsiumion og konsentrasjonen bestemmes ved sammenligning med tillagede standarder i form av en standardkurve. Metoden ble utført i henhold til brukerhåndboken for kalsiumselektiv elektrode (Thermo Fisher Scientific, Nederland).

Til analysen ble en lineær standardkurve utarbeidet ved bruk av en serie prøver som inneholdt en kjent mengde 0.1 M kalsiumstandard (Orion ionplus® application solution, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og dH₂O i 100 mL målekolber med fortynninger (10⁻² M, 10⁻³ M og 10⁻⁴ M). Hvor 22.5 mL av hver konsentrasjon ble overført til 50 mL Falconrør med

tre paralleller hver. Disse ble tilsatt 0.45 mL ISA (Orion ionplus[®] application solution, ionic strength adjuster, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og satt i vannbad ved 32°C i 20-30 min. Samtidig ble prøvene preparert, hvor 4.9 mL prøve ble overført til 50 mL Falconrør og deretter tilsatt 100 µL ISA (1:50 forhold) med to paralleller, etterfulgt av vortexing i 10 sek. Prøvene ble plassert i vannbad ved 20°C i 20-30 minutter. Grunnet fare for at enzymer fra *in vitro* fordøyelse skulle påvirke prøveresultatet i de simulerte tarmprøvene, ble det benyttet en lavere temperatur i vannbadet (20°C ± 1°C fremfor 32°C). Det ble sørget for at prøvene ble behandlet på en slik måte at prøvemateriale ikke kom til skade av temperaturen.

For å kontrollere at elektroden fungerte ble 100 mL dH₂O blandet med 2 mL ISA og tilsatt 1 mL 0.1 M kalsiumstandard, som så ble målt. Deretter ble blandingen tilsatt ytterligere 10 mL 0.1 M kalsiumstandard før ny måling. En differanse på 25-30 mV ble oppnådd før videre målinger. Standardene ble så målt fra lavest til høyest konsentrasjon ($R^2 = 0.987, 0.989, 0.9873, 0.9899$). Når melke- og planteprøvene hadde oppnådd stabil temperatur, ble også de målt, etterfulgt av ny måling av standardløsningene. Videre utregning av resultatet ble gjort ved bruk av formel fra standardkurvene som er presentert i vedlegg 4 (Figur C). Det ble laget nye standardløsninger for hver prøvedag. Ved behandling av resultatene ble ikke blank trukket fra resterende prøver på grunn av høyere mengde ionisk kalsium, sammenlignet med prøvene.

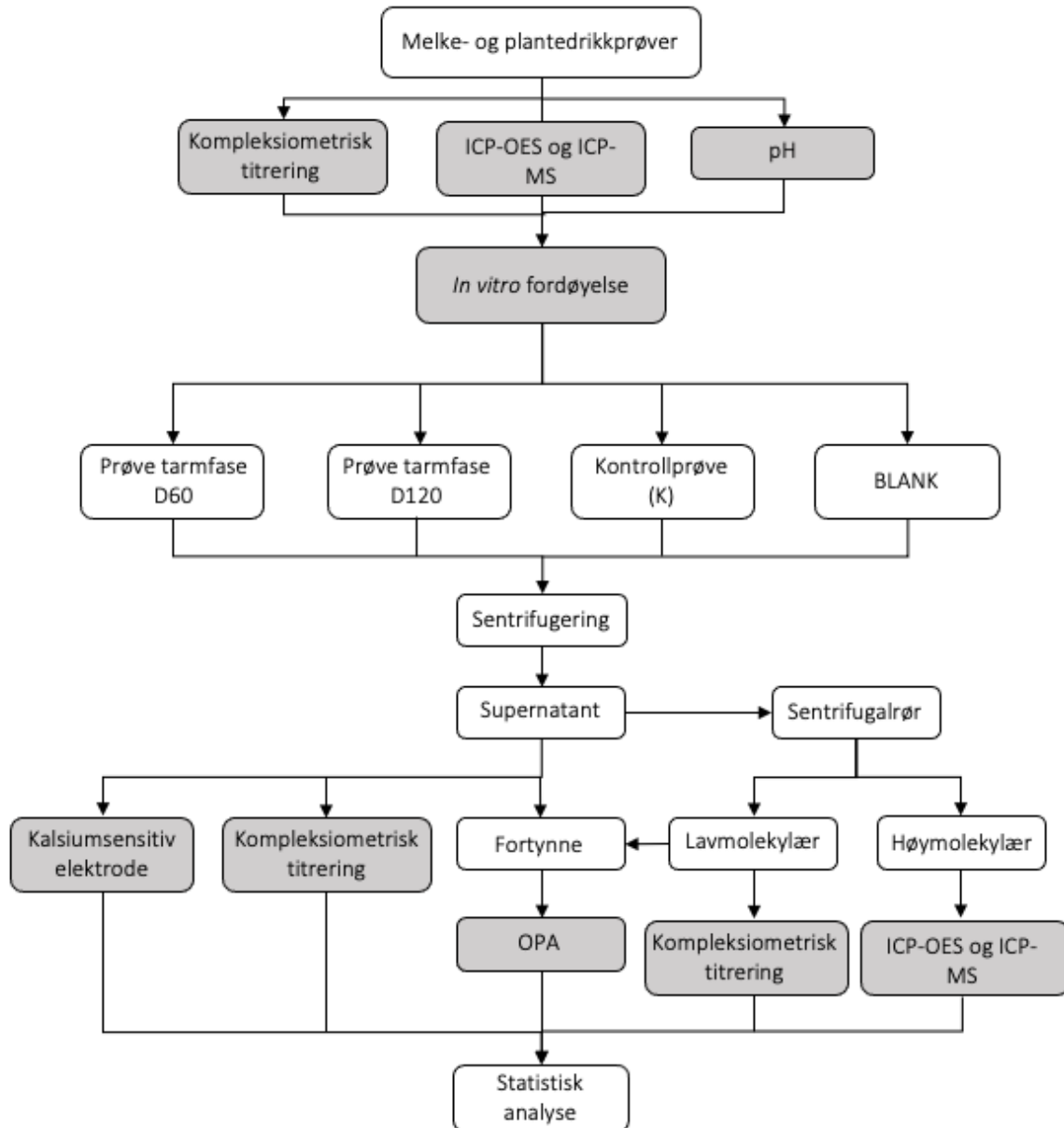
3.12 Resultatbehandling og statistisk analyse

I forkant av *in vitro* fordøyelse ble pH-måling og kompleksimetrisk titrering med EDTA utført i triplikater, etterfulgt av *in vitro* fordøyelse med prøveuttak i duodenalfasen (D60 og D120) som ble utført i duplikater. Etter *in vitro* fordøyelse ble både totalt kalsiuminnhold ved kompleksimetrisk titrering med EDTA og ICP-OES, og ionisk kalsium med kalsiumsensitiv elektrode gjennomført i duplikat grunnet begrenset prøvemengder. OPA ble utført i triplikater fordi analysen krevde små prøvemengder. Resultatene ble uttrykt som gjennomsnitt ± standardavvik.

Microsoft® Excel® versjon 16.72 for Mac (2023) ble benyttet for databehandling og fremstilling av resultater i figurer, samt beregninger for gjennomsnitt og standardavvik. Statistiske analyser for noen resultater ble utført i statistikkprogrammet RStudio versjon 2022.12.0+353 (2022) for å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i totalt kalsiuminnhold, ionisk kalsium, hydrolysegrad mellom prøvene som følge av *in vitro* fordøyelse. Det ble benyttet enveis variansanalyse (ANOVA) og post hoc parvis test (Tukey). Analysene ble utført på de ulike prøvene hver for seg (HTST, UHT, Laktoseredusert og Havre) med deres prøvefraksjoner (D60, D120, LM-D60, LM-D120, K60 og K120), og prøvene opp mot hverandre. Tukey test ble utført for å identifisere hvor eventuelle forskjeller eksisterte. Testen ble gjort med 5% signifikansnivå; hvor det med 95% sikkerhet kan avdekke signifikans dersom $p < 0.05$. Output fra statistiske analyser, hvor resultatet var statistisk signifikant, er vist i [vedlegg 5-14](#).

3.13 Oppsummert oversikt over forsøksoppsettet

Dette forsøket ble gjennomført med kommersielt tilgjengelige melke- og plantedrikker med både ulike produksjonshistorikk og matriks (HTST, UHT, Laktoseredusert og Havredrikk). Alle prøvene gjennomgikk *in vitro* fordøyelse, etterfulgt av analyser gjort på fordøyde prøver (F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk, uttak D60 og D120), kontrollprøver (K60 og K120) og blank (D60 og D120). Prøvene ble deretter sentrifugert i sentrifugerør, etterfulgt av analyser gjort på lavmolekylære prøver (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert, LM-Havredrikk, uttak LM-D60 og LM-D120). Analysene ble gjennomført for å eventuelt avdekke forskjeller mellom prøvene under *in vitro* fordøyelse. Se Figur 11 for en forenklet oversikt over forsøksoppsettet, de ulike prøvefraksjonene og analysene.



Figur 11. Forsøksoppsettet med de ulike prøvefraksjonene og analysene. Melke- og planteprøver ble analysert ved pH, kompleksiometrisk titrering, ICP-OES og K-PHYT. De simulerte tarmprøvene ble sentrifugert og deretter analysert ved kalsiumsensitiv elektrode, kompleksiometrisk titrering og OPA. Prøver ble sentrifugert i sentrifugerør og deretter analysert ved kompleksiometrisk titrering og OPA. BLÅ = analysemetoder. D60 - uttak 60 min; D120 - uttak 120 min; OPA - o-phthaldialdehyde.

4. RESULTATER

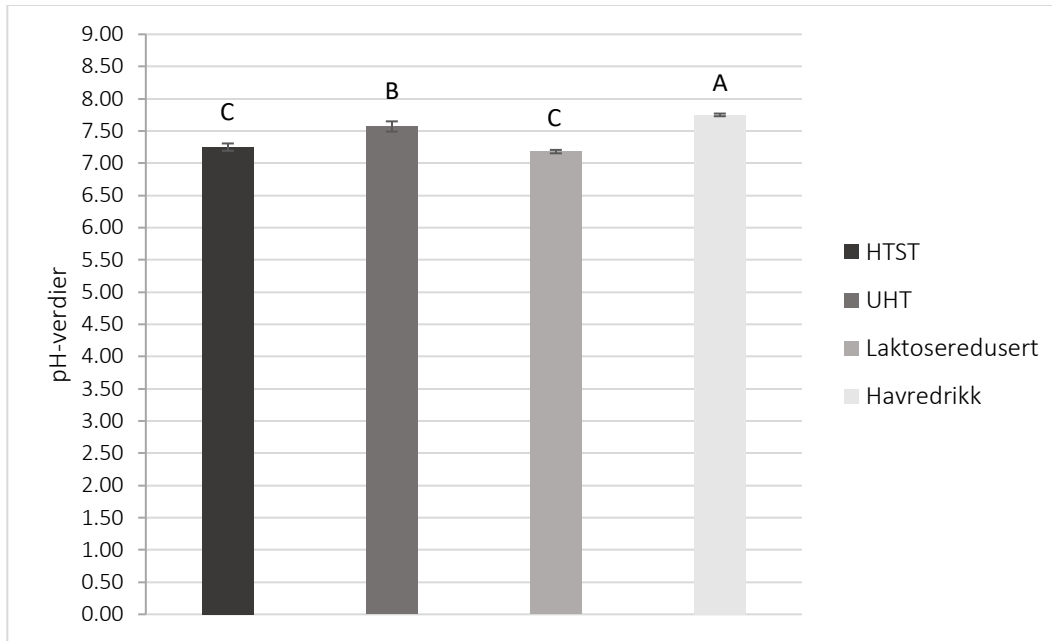
Presentasjon av resultatene er todelt: analyser av produktene og analyser av prøver etter *in vitro* fordøyelse. For resultatene av prøver etter *in vitro* fordøyelse presenteres de ulike prøvene hver for seg, men prøvefraksjonene innad hver prøve er presentert sammen. Alle resultatene fra de ulike analysene er korrigert for innhold av mineraler fra enzymer tilsatt under *in vitro* fordøyelse (blank- prøver).

4.1 Analyser av produktene

I forkant av *in vitro* fordøyelse ble pH registrert, og totalt innhold av kalsium, jod og fytinsyre ble analysert i alle produktene (HTST, UHT, Laktoseredusert og Havredrikk).

4.1.1 pH

Det ble foretatt pH-målinger i de ulike produktene og resultatet fra målingene er presentert i Figur 12. Resultatet fra pH-målingene etter *in vitro* fordøyelse er vist i [vedlegg 1](#).

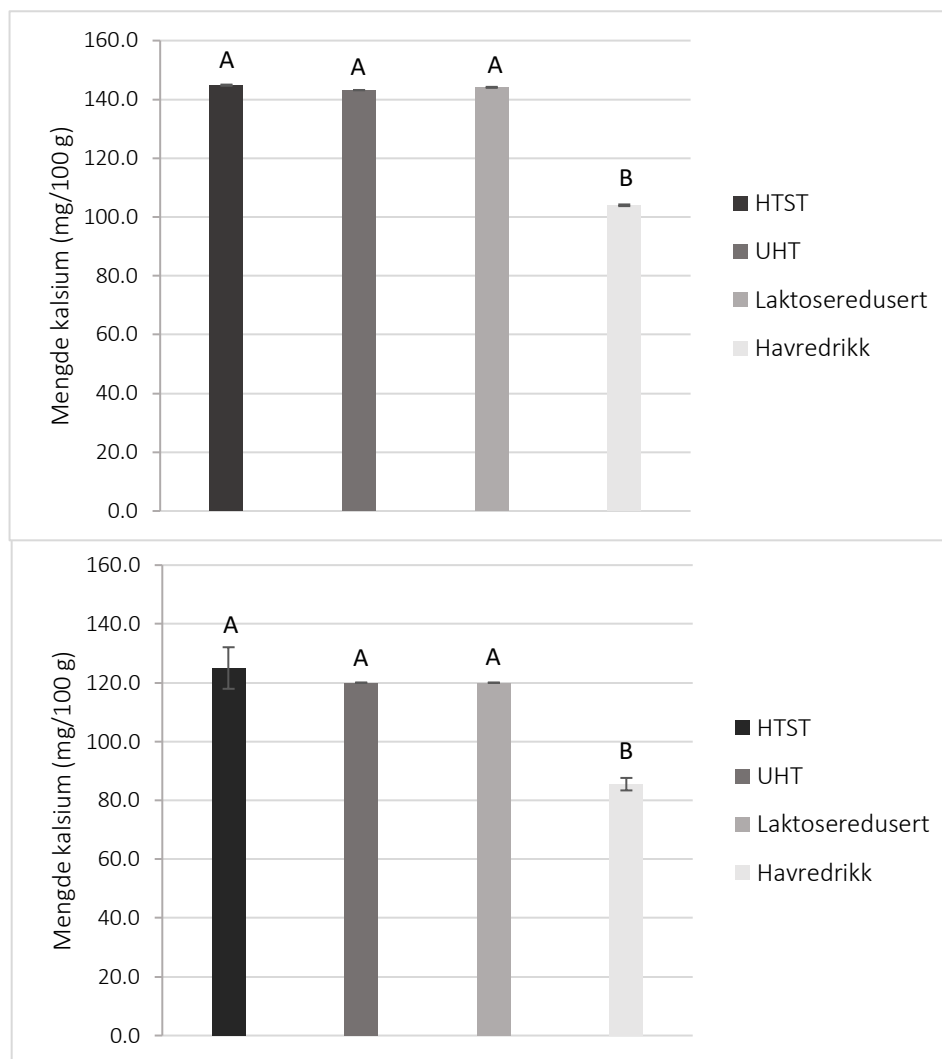


Figur 12. pH-verdier i de ulike melketyper (HTST - melkeprodukt, HTST-pasteurisert; UHT - melkeprodukt, UHT-behandlet; Laktoseredusert - melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert) - og Havredrikk - havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=3$) \pm standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p<0.05$) mellom produktene.

Figur 12 viser at Havredrikk hadde signifikant ($p<0.05$) høyere pH sammenlignet med melkeprøvene før *in vitro* fordøyelse. Videre hadde UHT signifikant høyere pH sammenlignet med HTST og Laktoseredusert.

4.1.2 Kalsium

Produktene ble analysert for totalt kalsiuminnhold før *in vitro* fordøyelse. Resultatet er oppgitt som mg/100 g og er beregnet i henhold til Formel 1 for Figur 13 a). Videre ble totalt kalsiuminnhold undersøkt ved metoden ICP-OES i Figur 13 b).



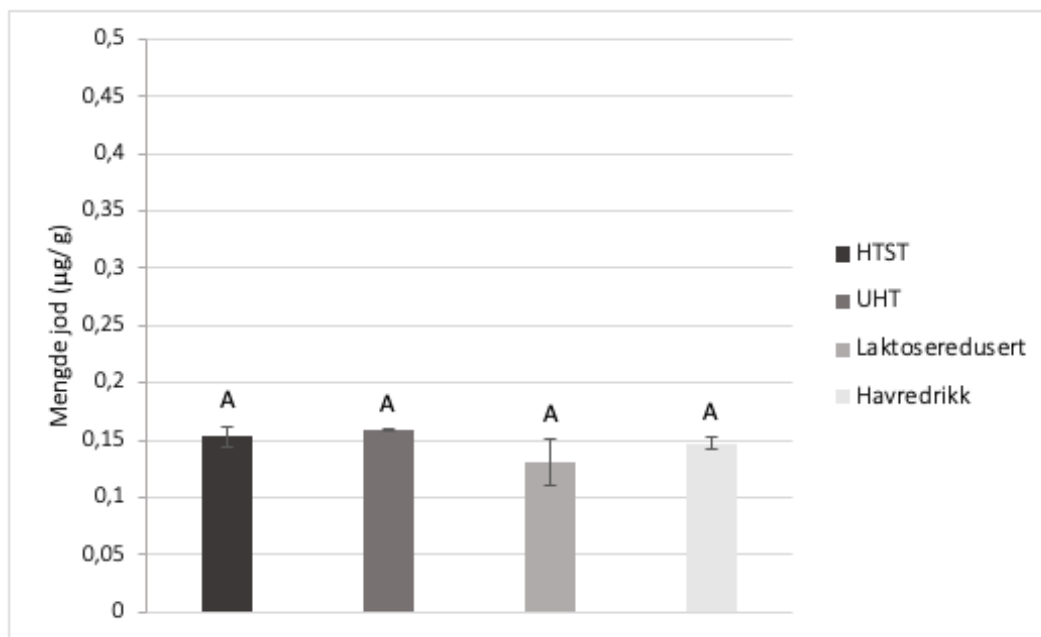
Figur 13. Total mengde kalsium (mg/100 g) i melketyperne (HTST - melkeprodukt, HTST-pasteurisert; UHT - melkeprodukt, UHT-behandlet; Laktoseredusert - melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert) og Havredrikk – havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet. a) Kalsiuminnhold ved kompleksimetrisk titrering (n=3), b) kalsiuminnhold ved ICP-OES (n=2). Resultatet er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom produktene for hver metode.

Figur 13 a) viser at havredrikken hadde et signifikant ($p < 0.01$) lavere totalt kalsiuminnhold før *in vitro*, sammenlignet med alle melkedrikkene i dette forsøket. Videre viser Figur 13 b) til samme trend ($p < 0.01$), hvor havredrikken hadde et signifikant lavere kalsiuminnhold før *in vitro* fordøyelse. Resultatet fra figur a) var signifikant forskjellig fra resultatene i kalsiuminnhold ved bruk av ICP-OES i Figur 13 b) ($p < 0.05$). Den relative forskjellen mellom det totale kalsiuminnholdet målt med de to metodene var derimot ikke signifikant forskjellig.

Den relative forskjellen var 19.84, 23.15 og 24.09 g/100g for melkeproduktene og 18.49 g/100 g for Havredrikk.

4.1.4 Jod

Innhold av jod før *in vitro* fordøyelse ble beregnet ut fra innhold av jod analysert i høymolekylær prøvefraksjon. Beregninger er gjort i henhold til fremgangsmåte i vedlegg 2. Resultatet er oppgitt som $\mu\text{g/g}$ og presentert i Figur 14.



Figur 14. Jodinnhold ($\mu\text{g/g}$) i melketyperne (HTST-melkeprodukt, HTST-pasteurisert; UHT-melkeprodukt, UHT-behandlet; Laktoseredusert-melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert) - og Havredrikk, havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik. Det var ingen signifikante forskjeller ($p>0.05$) mellom produktene.

Figur 14 viser at det ikke var noen signifikante forskjeller ($p>0.05$) i jodinnhold mellom produktene før *in vitro* fordøyelse.

4.1.4 Fytinsyre

Prøvene ble analysert for innhold av fosfor som videre ble brukt til å beregne innhold av fytinsyre. Resultatet er oppgitt som g/100 mL i Tabell 9.

Tabell 9. Innhold av fytinsyre (g/100 mL) i prøvene. HTST - melkeprodukt, HTST-pasteurisert; UHT - melkeprodukt, UHT-behandlet; Laktoseredusert - melkeprodukt, UHT-behandlet og laktoseredusert; Havredrikk - havrebasert plantedrikk, UHT-behandlet. Resultatet er presentert som gjennomsnitt (n=4) ± standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller (p<0.05) mellom produktene.

Prøver	Fytinsyre (g/100 mL)
HTST	0 ^A
UHT	0 ^A
Laktoseredusert	0 ^A
Havredrikk	0.0646 ± 0.0042 ^B

Som vist i Tabell 9 var det kun Havredrikk som hadde et målbart innhold av fytinsyre.

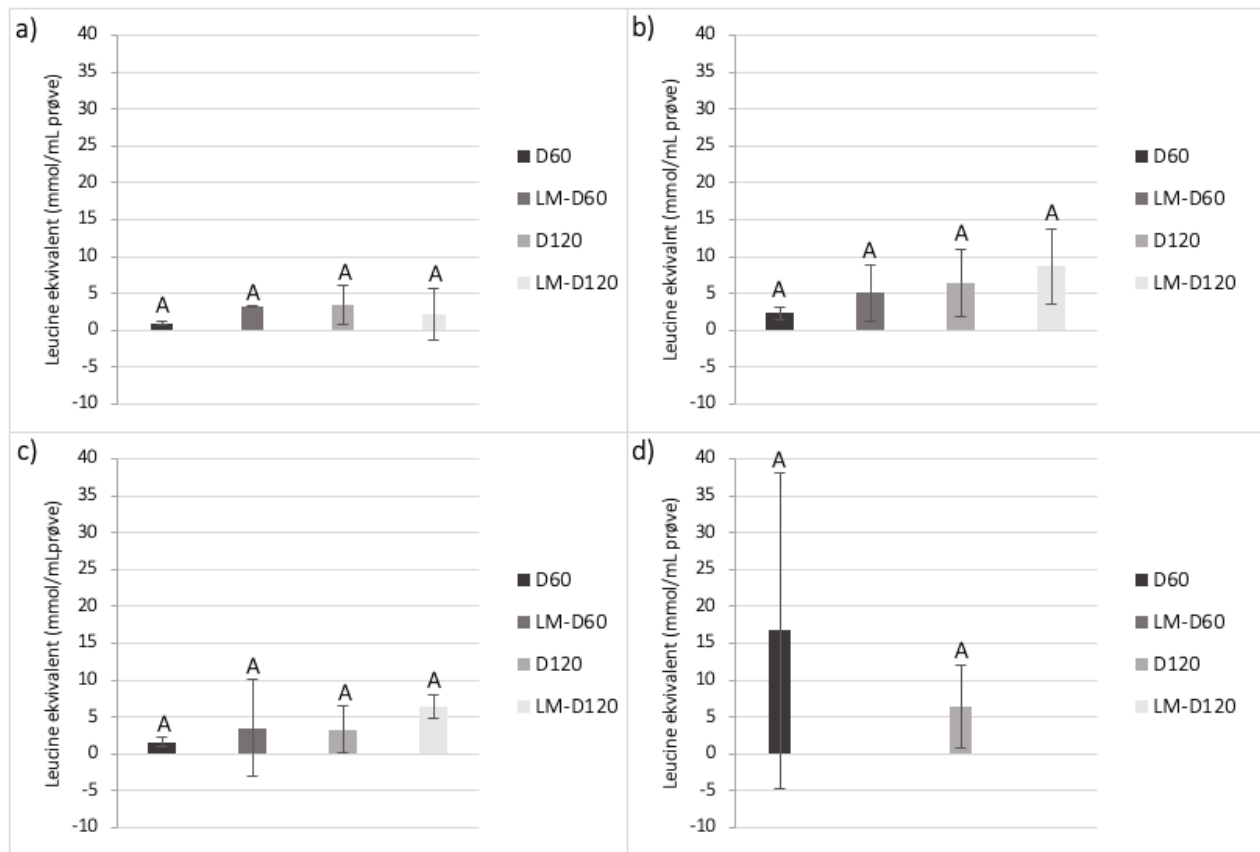
4.2 Analyser av fordøyde prøver

De fordøyde prøvene (F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk) med uttak i tarmfase (duodenal fase) etter 60 og 120 min (D60 og D120) ble analysert for innhold av totalt kalsium, ionisk kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Hensikten var å undersøke om type råvare (melk vs havredrikk) og type prosess (vanlig pasteurisering vs UHT-behandling vs UHT-behandling og laktosehydrolyse) påvirket grad av kalsiuminnhold og proteinhydrolyse (proteinfordøyelighet) under *in vitro* fordøyelse. Deretter ble resterende prøvemengder (10 mL) separert i en lav- (LM, < 3 kDa) og høymolekylær (HM, > 3 kDa) fraksjon ved hjelp av sentrifugering ved bruk av sentrifugerør. Prøvene fra den lavmolekylære fraksjonen (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk) ble analysert for innhold av totalt kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Prøvene fra den høymolekylære fraksjonen (HM-HTST, HM-UHT, HM-Laktoseredusert og HM-Havredrikk) ble analysert for innhold av totalt kalsium og jod. Resultatene for kalsium er ikke inkludert. De øvrige resultatene fra de to fraksjonene (LM og HM), er presentert i separate avsnitt. Alle resultatene fra de ulike analysene er korrigert for innhold av mineraler fra selve

fordøyelsesvæskene og enzymer tilsatt under *in vitro* fordøyelse ved bruk av blank- prøver og kontrollprøvene (K60 og K120). Prøvene er også sammenlignet med K60 og K120.

4.2.1 Hydrolysegrad av proteiner

Proteinenes hydrolysegrad ble analysert i de fordøyde prøvene med uttak 60 og 120 min (D60 og D120) og i lavmolekylære fraksjoner av disse prøvene (LM-D60 og LM-D120). Rådata fra den spektrofotometriske analysen og standardkurve er vist i vedlegg 3. Resultatet er presentert i Figur 15 og oppgitt som leucin ekvivalenter mmol/mL prøve. F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk er presentert i henholdsvis a), b), c) og d).

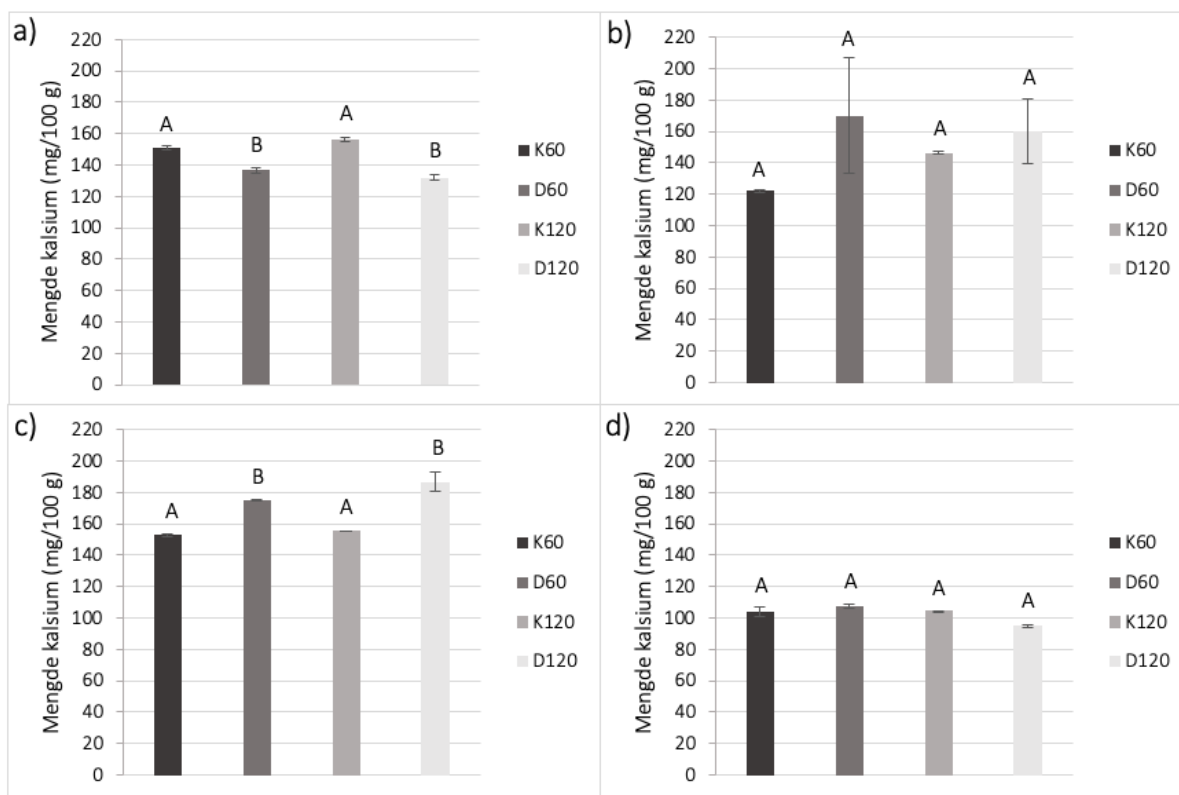


Figur 15. Leucin ekvivalenter mmol/mL prøve målt i fordøyde og lavmolekylære prøver etter *in vitro* fordøyelse. a) F-HTST, b) F-UHT, c) F-Laktoseredusert, d) F-Havredrikk. F-in *in vitro* fordøyd prøve; K- kontrollprøve; LM-lavmolekylær prøve; D-fordøyd prøve; 60- prøveuttak 60 min; 120- prøveuttak 120 min. Resultatet er presentert som gjennomsnitt (n=3) ± standardavvik. Det var ingen signifikante forskjeller (p>0.05) mellom prøvefraksjoner innad samme prøve.

Figur 15 viser ingen signifikante ($p > 0.05$) forskjeller mellom de ulike prøvefraksjonene innad for hver prøve. Resultatene er ikke signifikant forskjellige, men viser en trend med høyere hydrolysegrad av proteiner i D120 fremfor D60 for både HTST, UHT og Laktoseredusert. I tillegg viser de lavmolekylære fraksjonene (LM-D60 og LM-D120) fra meieriproduktene til noe høyere hydrolysegrad, sammenlignet med de fordøyde prøvene for de samme produktene. Kontrollprøvene inkludert i forsøket var ikke tilsatt fordøyelsesenzymmer og ble derfor ikke tatt hensyn til, fordi proteinet i prøvene ikke ble hydrolysert.

4.2.2 Kalsiuminnhold i fordøyde prøver

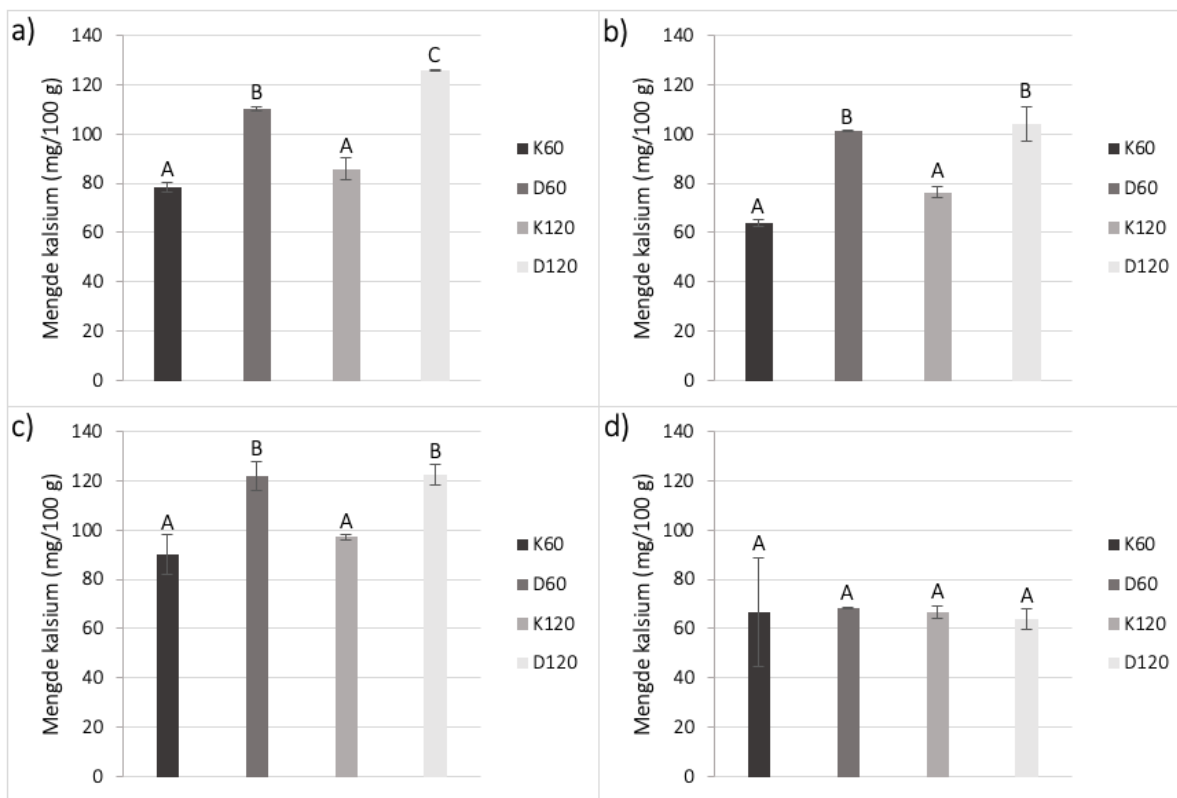
Totalt kalsiuminnhold ble analysert i de fordøyde prøvene med uttak 60 og 120 min (D60 og D120), lavmolekylære fraksjoner av disse (LM-D60 og LM-D120) og kontrollprøver (K60 og K120). Kalsiuminnholdet ble sammenlignet med K60 og K120 som var tilsvarende fordøyde prøver uten tilsatte fordøyelsesenzymmer. Resultatet for fordøyde prøver er presentert i Figur 16, oppgitt i mg per 100 g og beregnet i henhold til Formel 1. I figuren er F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk presentert i henholdsvis a), b), c) og d).



Figur 16. Total mengde kalsium (mg/100 g) i de fordøyde melke- og plantedrikkprøvene, samt kontrollprøver, beregnet etter formel 1. a) F-HTST, b) F-UHT, c) F-Laktoseredusert, d) F-Havredrikk. F - in vitro fordøyd prøve; K - kontrollprøve; D - fordøyd prøve; 60 - prøveuttak 60 min; 120 - prøveuttak 120 min. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p<0.05$) mellom ulike prøvefraksjoner innad for samme prøve.

Figur 16 b) og c) viser et høyere totalt kalsiuminnhold i fordøyde prøver av henholdsvis F-UHT og F-Laktoseredusert, D60 og D120, sammenlignet med kontrollprøvene (K60 og K120). Resultatet var kun signifikant ($p<0.01$) for Laktoseredusert. For F-HTST viser resultatene derimot et signifikant høyere totalt kalsiuminnhold i K60 og K120, sammenlignet med D60 og D120 ($p<0.01$). Havredrikk var prøven med lavest innhold av kalsium, og dette var signifikant forskjellig fra alle melkeprøvene omfattet av dette eksperimentet ($p<0.01$). Resultatene viser også at innhold av kalsium i F-HTST var signifikant forskjellig fra F-Laktoseredusert ($p<0.05$).

Totalt kalsiuminnhold i lavmolekylære prøver, både kontrollprøver (K60 og K120) og fordøyde prøver (D60 og D120), med uttak 60 og 120 min, er vist i Figur 17. Resultatene er oppgitt i mg per 100 g og ble beregnet i henhold til Formel 1. LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk er presentert i henholdsvis a), b), c) og d).



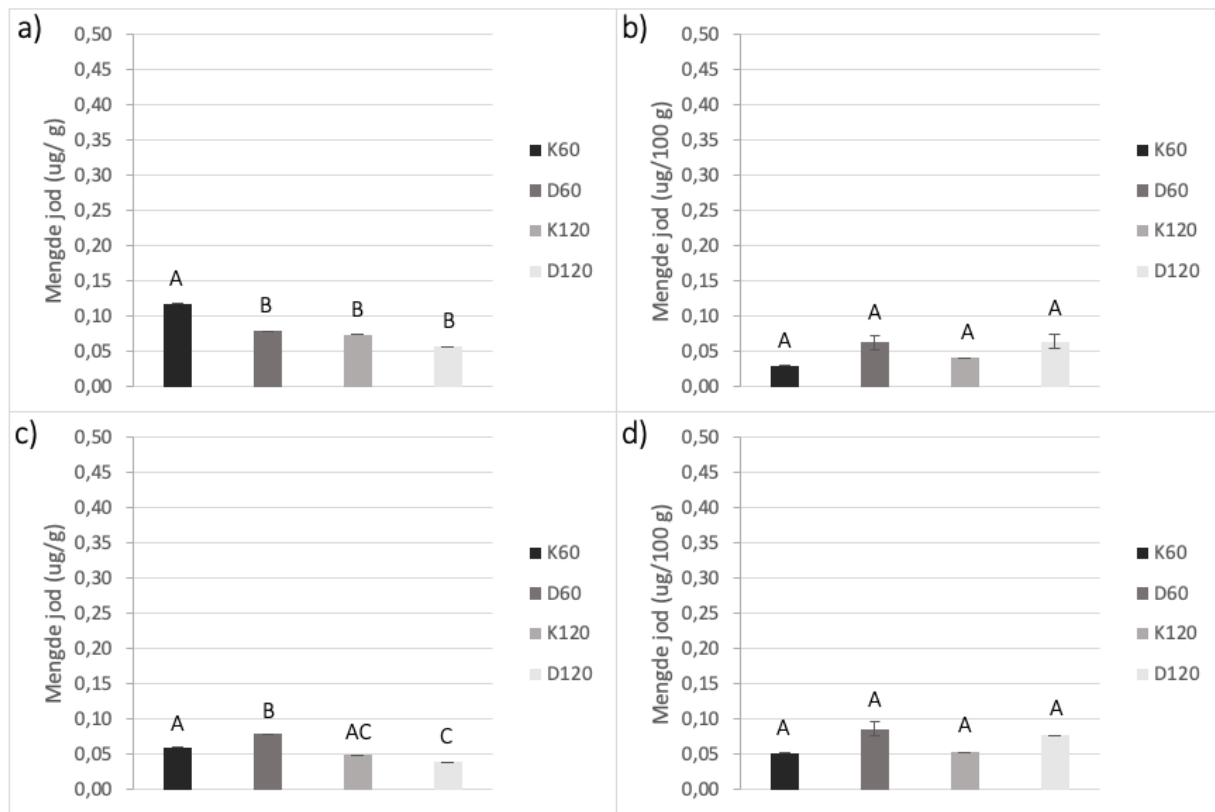
Figur 17. Total mengde kalsium (mg/100 g) i de lavmolekylære melke- og plantedrikkprøvene etter in vitro fordøyelse, beregnet etter formel 1. a) LM-HTST, b) LM-UHT, c) LM-Laktoseredusert, d) LM-Havre. LM - lavmolekylær prøvefraksjon; D - fordøyd prøve; 60 - prøveuttak 60 min; 120 - prøveuttak 120 min. Resultatet er presentert som gjennomsnitt (n=2) ± standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller (p<0.05) mellom ulike prøvefraksjoner innad samme prøve.

Figur 17 viser at de lavmolekylære prøvene (LM-D60 og LM-D120) LM-HTST, LM-UHT og LM-Laktoseredusert hadde signifikant (p<0.05) høyere innhold av totalt kalsium, sammenlignet med kontrollprøvene (K60 og K120). For disse prøvene var det LM-D120 som hadde et noe høyere kalsiuminnhold, sammenlignet med LM-D60. Denne forskjellen var kun signifikant for LM-HTST (p<0.01). Prøve LM-Havredrikk var derimot statistisk signifikant fra

alle melkeprøvene ($p < 0.01$), foruten LM-UHT som for øvrig ikke var signifikant forskjellig fra noen andre prøver ($p > 0.05$).

4.2.3 Jodinnhold i fordøyde prøver

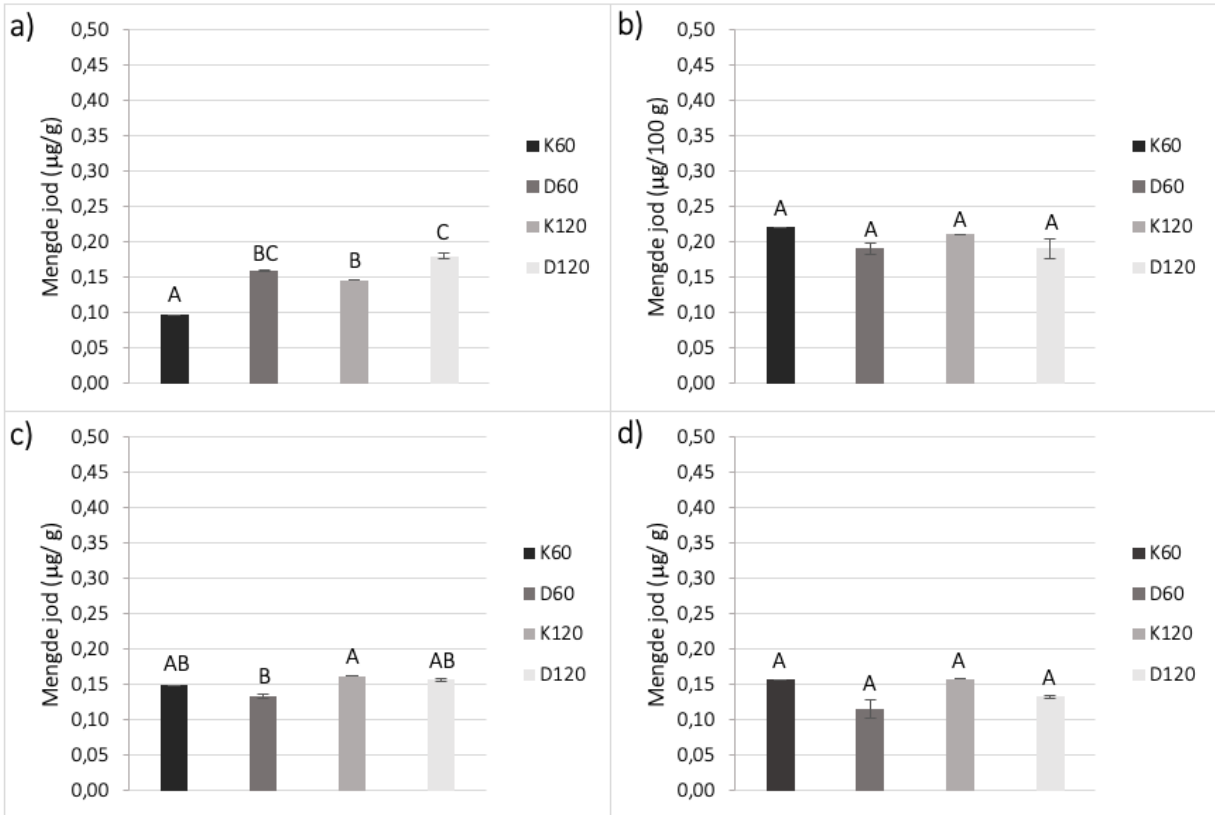
Innhold av jod ble analysert med ICP-MS i de fordøyde prøvene med uttak etter 60 og 120 min (D60 og D120) i høymolekylære prøver (HM-HTST, HM-UHT, HM-Laktoseredusert og HM-Havredrikk). Resultatene representerer den fraksjonen av jod som ikke passerte gjennom membranen med porestørrelse på 3 kDa under sentrifugering slik som beskrevet i delkapittel 3.6. Resultatet er oppgitt som $\mu\text{g/g}$ og presentert i Figur 18 og fremgangsmåte for utregning er vist i vedlegg 2 (Formel A). HM-HTST, HM-UHT, HM-Laktoseredusert og HM-Havredrikk er presentert i henholdsvis a), b), c) og d).



Figur 18. Innhold av jod ($\mu\text{g/g}$) i de høymolekylære prøvefraksjonene etter in vitro fordøyelse. a) HM-HTST, b) HM-UHT, c) HM-Laktoseredusert, d) HM-Havredrikk. HM- høymolekylær prøvefraksjon; D- fordøyd prøve; 60- prøveuttak 60 min; 120- prøveuttak 120 min. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom ulike prøvefraksjoner innad i samme prøve.

Figur 18 viser til en trend i de fordøyde prøvene, hovedsakelig D60, for HM-UHT, HM-Laktoseredusert og HM-Havredrikk, med økt innhold av jod. Resultatet var derimot ikke statistisk signifikant ($p > 0.05$). For HM-HTST hadde K60 signifikant høyere innhold av jod, sammenlignet med K120, D60 og D120 ($p < 0.05$). Det var ingen signifikante forskjeller i innhold av jod mellom verken HM-HTST, HM-UHT, HM-Laktoseredusert eller HM-Havredrikk ($p > 0.05$).

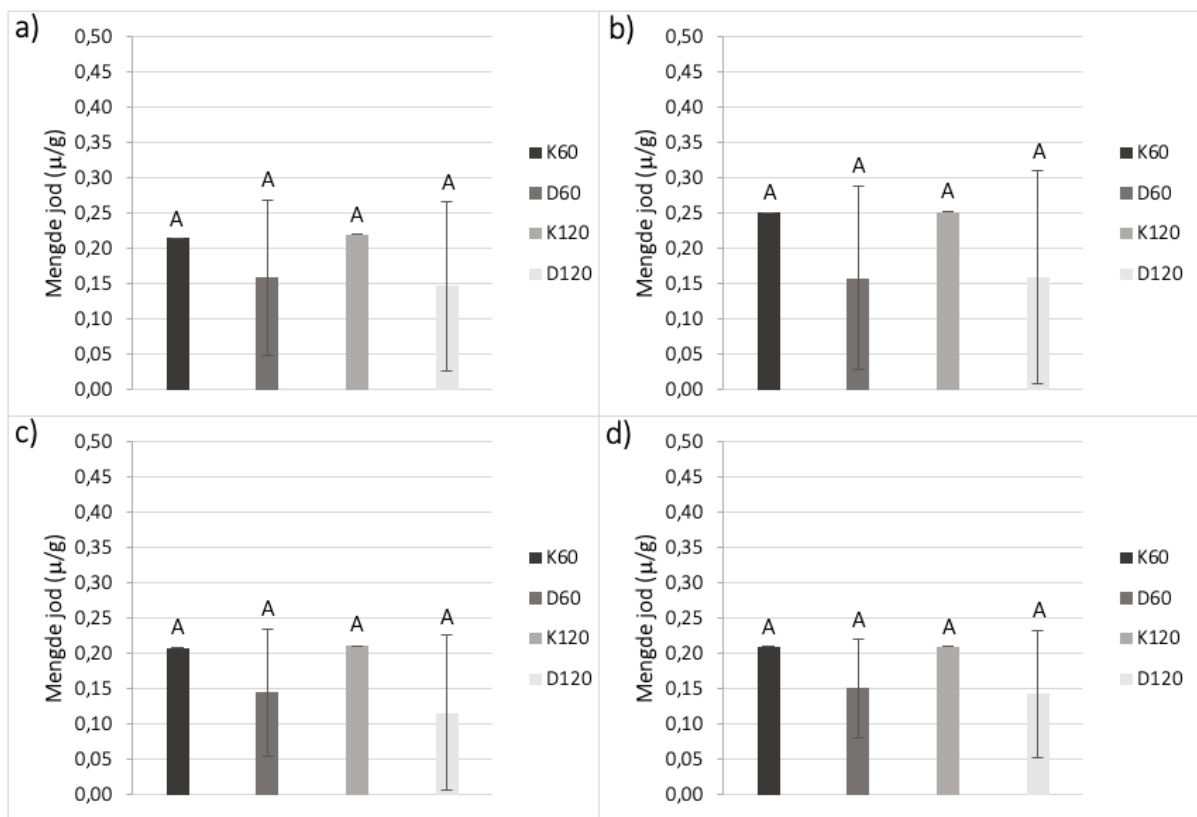
Deretter ble innhold av jod i lavmolekylære prøver (LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk) etter *in vitro* fordøyelse med uttak 60 og 120 min (D60 og D120), beregnet basert på innhold av jod i de høymolekylære prøvene og den totale mengden jod i de ulike produktene. Fremgangsmåten for utregning er vist i vedlegg 2 (Formel A). Resultatene er oppgitt som $\mu\text{g/g}$ og presentert i Figur 19. LM-HTST, LM-UHT, LM-Laktoseredusert og LM-Havredrikk er presentert i henholdsvis a), b), c) og d).



Figur 19. Innhold av jod ($\mu\text{g/g}$) i de lavmolekylære prøvefraksjonene etter in vitro fordøyelse. a) LM-HTST, b) LM-UHT, c) LM-Laktoseredusert, d) LM-Havredrikk. LM - lavmolekylær prøvefraksjon; D - fordøyd prøve; 60 - prøveuttak 60 min; 120 - prøveuttak 120 min. Resultater er presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p<0.05$) mellom ulike prøvefraksjoner innad i samme prøve.

Figur 19 viser til små forskjeller i innhold av jod i lavmolekylær fraksjon for de ulike prøvene. For LM-HTST viser resultatene et signifikant høyere innhold av jod i D120, sammenlignet med D60, samt K60 og K120 ($p<0.05$). Derimot LM-Laktoseredusert viste til signifikant lavere innhold av jod i D60, sammenlignet med K120 ($p<0.05$). Videre var LM-UHT signifikant forskjellig fra innhold av jod i de andre prøvene ($p<0.01$).

Basert på resultatene fra høy- og lavmolekylære prøver, ble totalt innhold av jod i fordøyde prøver beregnet. Fremgangsmåte for utregninger er vist i vedlegg 2 (Formel A). Resultatet er presentert i Figur 20 og oppgitt som $\mu\text{g/g}$.



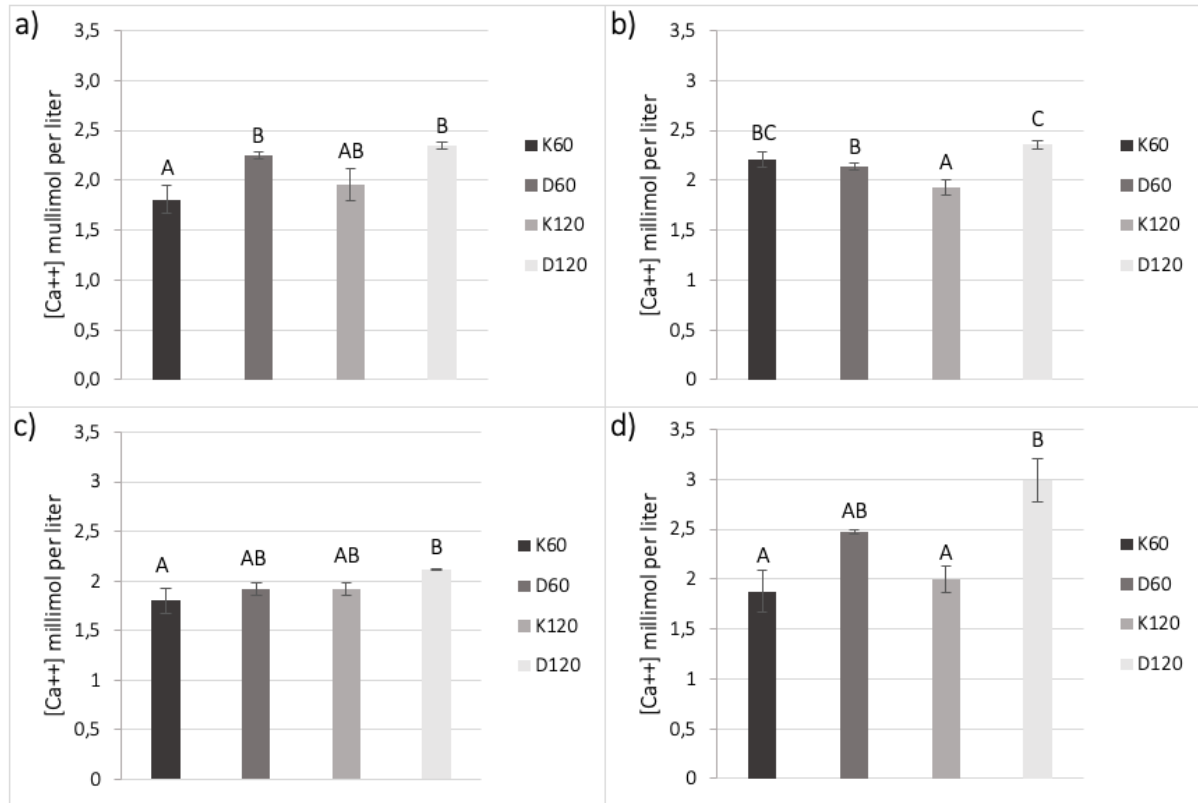
Figur 20. Innhold av jod ($\mu\text{g/g}$) i de fordøyde melke- og plantedrikkprøvene etter *in vitro* fordøyelse, basert på lav- og høymolekylære fraksjoner. a) F-HTST, b) F-UHT, c) F-Laktoseredusert, d) F-Havredrikk. F - *in vitro* fordøyde prøver; K - kontrollprøve; D - fordøyd prøve; 60 - prøveuttak 60 min; 120 - prøveuttak 120 min. Resultatet er presentert som gjennomsnitt ($n=2$) \pm standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p<0.05$) mellom ulike prøvefraksjoner innad i samme prøve.

Figur 20 viser at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom prøvefraksjoner innad de ulike prøvene. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom verken F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert eller F-Havredrikk.

4.2.4 Ionisk kalsium

Prøvene ble analysert for ionisk kalsium med kalsiumsensitiv elektrode i fordøyde prøver etter *in vitro* fordøyelse med prøveuttak 60 og 120 min (D60 og D120). Ionisk kalsium ble sammenlignet med kontrollprøver (K60 og K120) som var tilsvarende fordøyde prøver uten tilsatte fordøyelsesenzymmer. Resultatet for ionisk kalsium er presentert i Figur 21, oppgitt

som mM og beregnet ut fra standardkurvene fra vedlegg 4 (Figur C). F-HTST, F-UHT, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk er presentert i henholdsvis a), b), c) og d).



Figur 21. Mengde ionisk kalsium (mM) i fordøyde prøver og kontrollprøver etter in vitro fordøyelse. a) F-HTST, b) F-UHT, c) F-Laktoseredusert, d) F-Havre. F - in vitro fordøyd prøve; K - kontrollprøve; D - fordøyd prøve; 60 - prøveuttak 60 min; 120 - prøveuttak 120 min. Resultater er presentert som gjennomsnitt (n=2) ± standardavvik. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom ulike prøvefraksjoner innad samme prøve.

Resultatene illustrert i Figur 21 viser en trend for F-HTST, F-Laktoseredusert og F-Havredrikk, hvor de fordøyde prøvene (D60 og D120) hadde høyere mengde ionisk kalsium, sammenlignet med kontrollprøvene (K60 og K120). Til felles for alle prøvene var det D120 som hadde høyest ionisk kalsium. Til tross for dette var ikke resultatet signifikant forskjellig. Videre var F-Havredrikk signifikant forskjellig fra F-HTST ($p < 0.05$) og F-Laktoseredusert ($p < 0.01$), og F-UHT var signifikant forskjellig fra F-Laktoseredusert ($p < 0.05$). Det var ingen forskjeller mellom F-Havredrikk og F-UHT, eller F-HTST og F-Laktoseredusert. ($p > 0.05$)

5. DISKUSJON

Denne masteroppgaven tok for seg effekten av *in vitro* fordøyelse på biotilgjengelighet av kalsium og jod i melke- og plantedrikkprøver, som følge av variasjon i matmatriks og produksjonshistorikk. Studien har også kartlagt hydrolysegrad av proteiner. Prosesstrinnene som inngikk i studien er fra industriell produksjon, og omfatter ulik varmebehandling og hydrolyse av laktose. *In vitro* fordøyelse ble gjennomført med 2 min i oral fase (munnfase) og 60 min i gastrisk fase (magefase). Dette ble etterfulgt av duodenal fase (tarmfase) med to ulike prøveuttak, 60 og 120 min (D60 og D120), for å vise utviklingen etter henholdsvis 60 og 120 min. Hensikten med oppgaven var dermed todelt: 1) å undersøke om biotilgjengeligheten av viktige mineraler var like høy i PBD som i melk, og 2) utrede om melkens produksjonshistorikk er av betydning for grad av proteinhydrolyse og biotilgjengelighet av viktige mineraler under *in vitro* fordøyelse.

Det observeres i nyere tid en utvidelse i meieribedrifters produktportefølje, med blant annet laktoseredusert melk og ulike varianter for langtidsholdbar melk. Meieriindustrien har også begitt seg inn på marked for plantebaserte alternativer. Disse produktene berikes med ulike næringsstoffer, som for eksempel kalsium og jod, for å etterkomme kvalitetsprofilen til melk (Sethi et al., 2016). For at kroppen skal ha nytte av næringsstoffer fra mat, som kalsium, jod og proteiner, må mineralene være i løselig form for å bli absorbert i tarmen og proteiner må brytes ned til mindre peptider og aminosyrer (Pedersen, 2012; Sjaastad et al., 2010; Theobald, 2005). Mineralenes og proteinenes kjemiske form, deres løselighet og interaksjon med andre komponenter i næringsmiddelet, er faktorer som kan påvirke biotilgjengeligheten (Alegría-Torán et al., 2015). På bakgrunn av stigningen i produksjon av både melke- og plantebaserte produkter, er det nødvendig å undersøke hvordan biotilgjengeligheten av disse næringsstoffene påvirkes under fordøyelse (Alegría-Torán et al., 2015). *In vitro* fordøyelse er et nyttig verktøy for å få en forståelse av hvordan produkter med ulik sammensetning vil oppføre seg under fordøyelsen. Denne problemstillingen har fått økt aktualitet i forbindelse med publiseringen av utkastet for de nye nordiske ernæringsanbefalingene (Nordisk Ministerråd, 2023). NNR 2023-rapporten anbefaler inntak av berikede matekvivalenter dersom inntak av melk- og meieriprodukter er lavere

enn 250g/d. Dette vil videre gi en pekepinn om plantebaserte produkter kan utgjøre fullverdige alternativer til melkeprodukter.

5.1 Næringsinnhold i produktene

Næringsinnholdet i produktene inkludert i denne oppgaven ble undersøkt for å kunne sammenligne innhold av kalsium og jod før og etter *in vitro* fordøyelse, samt sammenligne innholdet med det som står på varedeklarasjonen. Melk- og meieriprodukter er gode kilder til både kalsium og jod. Derimot PBD som havredrikk må berikes med næringsstoffer, blant annet kalsium og jod, for å overkomme de ernæringsmessige begrensningene (Melk.no, 2020b; Vanga & Raghavan, 2018). Ut fra varedeklarasjonene hadde alle melkeproduktene et likt jod-, kalsium- og proteininnhold på henholdsvis 16 µg/100g, 130 mg/100 g og 3.5 g/100 g (TINE). Havredrikken var oppført med et likt innhold av jod på 16 µg/100 g, men kalsium- og proteininnholdet var derimot 120 mg/ 100 g og 0.8 g/ 100 g.

Produktene ble analysert for innhold av kalsium, jod og fytinsyre. For analyse av totalt kalsiuminnhold i produktene ble det benyttet to ulike metoder, kompleksimetrisk titrering med EDTA og ICP-OES. Resultatene ved bruk av titreringsmetoden viste et høyere kalsiuminnhold for HTST, UHT og Laktoseredusert på henholdsvis 144.84 ± 0.5 , 143.15 ± 0.7 og 144.09 ± 0.9 mg/100 g. Havredrikk ble derimot estimert til 103.99 ± 0.8 mg/100 g. Dette viser at kalsiuminnholdet i Havredrikk var lavere, sammenlignet med både varedeklarasjonen og de andre melkeprøvene. Videre viste resultatene fra ICP-OES metoden å stemme overens med varedeklarasjonen for melkeproduktene, sammenlignet med titreringsmetoden. I motsetning til resultatet for Havredrikk, som ble ytterligere redusert til 85.5 ± 2.1 mg/100 g. Dette tyder på at titreringsmetoden muligens overestimerte kalsiuminnholdet, sammenlignet med ICP-OES som viste et mer nøyaktig resultat for alle melkeproduktene. Det betyr at totalt kalsiuminnhold i Havredrikk var mye lavere enn først antatt. Havredrikk hadde signifikant lavere kalsiuminnhold ved begge metodene, sammenlignet med melkeproduktene. Dette resultatet var lavere enn forventet, uavhengig av hvilken metode som ble brukt.

Kalsiuminnholdet i produktene ble analysert med ICP-OES på et mye senere tidspunkt sammenlignet med titreringsmetoden, som kan ha påvirket resultatet for spesielt Havredrikk. Flere studier har vist dannelse av bunnfall i PBD laget på havre (Durand et al., 2003; Mäkinen et al., 2015; Zhou et al., 2023). Bunnfall gir et ustabil produkt og er en utfordring for produkter som skal lagres (Frühauf et al., 2022). En studie observerte at store deler av kalsium i ulike berikede drikker, som appelsinjuice og soyadrikk, befant seg i bunnfallet (Heaney et al., 2005). Teorien om tilstedeværelse av bunnfall kan være en mulig forklaring, da det også er vist at kalsiumkarbonat kan felle ut ved tilsetning i drikker på grunn av lav løselighet (Lorieau et al., 2018). Imidlertid ble alle gjentakene tatt ut fra samme kartong, som ble godt ristet og blandet før hver analyse. På den andre siden viste også studien til Heaney et al. (2005) at bunnfallet til stede i kartongen, ikke ble tilstrekkelig oppløst ved risting og krevde kraftig og langvarig omrøring for å få bunnfallet i løsning. En annen studie undersøkte de fysiske-kjemiske egenskapene til ulike UHT-behandlede PBD, hvor havredrikken sedimenterte etter kort tid (24 timer) og inneholdt større partikler, sammenlignet med melk (Mäkinen et al., 2015). Det er derfor tvilsomt om ristingen før prøveuttakene var tilstrekkelig for å få alt kalsiumet i løsning, og dermed grunn til å tro at dette kan ha påvirket resultatet for ICP-OES metoden. Mengde bunnfall ble ikke analysert i vår studie fordi resterende prøver ble tatt ut av produktet like etter innkjøp, og det var antatt at produktet var homogent. Det ville derimot nå vært interessant å analysere eventuelt bunnfall for kalsiuminnhold. På den andre siden var den relative forskjellen mellom totalt kalsiuminnhold og de to metodene tilnærmet lik, hvor avviket var på 15-18% mellom de to metodene.

Dessuten er det flere fordeler og ulemper knyttet til de to ulike analysene. Først og fremst er resultatene fra kompleksimetrisk titrering subjektivt fordi det er en manuell avlesning av operatør, i forhold til fargeendring fra lilla til blå som oppstår når alt kalsium er bundet (Barone et al., 2021). Det kan derfor oppstå ulikheter, og i verste fall over- eller underestimering av reelt kalsiuminnhold. På den andre siden er titreringsmetoder enkle og rimelige analyser å gjennomføre. Kompleksimetrisk titrering er en av de eldste metodene for bestemmelse av kalsiuminnhold i melk. Metoden krever minimalt med utstyr og er både enkel og rimelig (Masotti et al., 2020). Andre ulemper ved metoden er at det benyttes relativt

store prøvevolumer. I dette tilfellet var det begrenset med prøvemengder etter *in vitro* fordøyelse, og det ble derfor benyttet små prøvevolum med to gjentak. I tillegg kan metoden være mindre egnet til produkter som inneholder stoffer som danner chelatforbindelser med kalsium, slik som fytinsyre i havredrikken i dette tilfellet. ICP-OES er derimot en allsidig og analytisk metode, som er godt etablert for analyser av mineraler i melk og meieriprodukter (Fernández-Sánchez, 2019; Manuelian et al., 2017). Denne metoden har høy presisjon, selektivitet og følsomhet, men er mer kostbar og det tar lenger tid for å få resultater.

For å måle innhold av jod i produktene, ble de høymolekylære fraksjonene analysert ved ICP-MS. Deretter ble resultatet for produktene beregnet ut fra innhold av jod analysert i de høymolekylære fraksjonene. Relativt få PBD er beriket med jod, til tross for at melk- og meieriprodukter er en viktig kilde til dette mineralet (Melk.no, 2020b; Vanga & Raghavan, 2018). Studien til Clegg et al. (2021) samlet inn 136 PBD i England, hvor kun 6 av disse var beriket med jod. Videre evaluerte Escobar-Sáez et al. (2022) totalt 179 kommersielle PBD (48 stk. basert på havre), og uttrykte bekymring da ingen av produktene var beriket med jod. Videre var det ingen signifikante forskjeller mellom produktene. Dette resultatet var forventet fordi melkeproduktene og havredrikken hadde et likt innhold av jod oppført på varedeklarasjonen (TINE). Resultatene viste heller ingen store avvik. En annen studie analyserte innhold av jod i utvalgte PBD ved bruk av samme metode, ICP-MS (Bath et al., 2017). Studien inkluderte totalt 6 havredrikker, hvor kun 1 var beriket med jod i form av kaliumjodid. Produktene var på den andre siden beriket med andre mengder, men innhold av jod ble målt til 287 µg/kg. Til tross for dette samsvarte resultatet med varedeklarasjonen (289 µg/L), som er i likhet med våre resultater.

Produktene ble analysert for innhold av fytinsyre som potensielt sett kan ha en innvirkning på biotilgjengelighet av kalsium, spesielt mengde ionisk kalsium og totalt kalsiuminnhold i lavmolekylær prøvefraksjon. Årsaken er at fytinsyre påvirker biotilgjengeligheten av næringsstoffer, da det binder blant annet mineraler og proteiner (Damodaran et al., 2017c; Dendougui & Schwedt, 2004). Mekanismen er fremdeles ikke helt forstått, men flere studier tyder på at dannelsen av uløselige kalsium-fytatkompleks hindrer kalsiumabsorpsjon i

tarmkanalen for mennesker og dyr som ikke produserer enzymet fytase i fordøyelsessystemet (Dendougui & Schwedt, 2004; Múzquiz et al., 2012; Popova & Mihaylova, 2019; Sandberg et al., 1989). Resultatene viste som forventet at kun Havredrikk ble detektert for fytinsyre, både fordi havre er en kilde til fytinsyre og fordi melk ikke inneholder noen kjente ANF (Walstra et al., 2006a). Chan et al. (2017) rapporterte et fytinsyreinnhold på 0.03 til 0.10 g/100 g i havredrikk. Dette funnet stemmer overens med resultatet fra vår studie. Det er lite litteratur som har undersøkt hvilken mengde fytinsyre som påvirker kalsium i PBD, og det er derfor usikkert om denne mengden påvirker biotilgjengeligheten til kalsium.

Det var nødvendig å pH-justere Havredrikk for tilpassing av metoden kompleksimetrisk titrering med EDTA. Prinsippet er å titrere med EDTA-løsning til kalsium danner en chelatforbindelse, som videre gir fargeendring fra lilla til blå når alt kalsium i prøven er bundet (Visser, 1976). Havreprøvene ble justert til pH 3, som er lik den pH-verdien som ble benyttet under gastrisk fase (Brodkorb et al., 2019). Uten pH-justering var ikke fargeendringen fra lilla til blå stabil, noe som tyder på at kalsiumet var sterkt bundet til andre komplekser i prøven. Havredrikk var den eneste prøven som inneholdt fytinsyre (0.0646 g/100 mL). Som nevnt, kan komponenten påvirke kalsiumets løselighet og biotilgjengelighet ved kompleksdannelse (Múzquiz et al., 2012; Popova & Mihaylova, 2019; Sandberg et al., 1989). Det er derfor grunn til å tro at disse komponentene påvirket kalsium i Havredrikk før *in vitro* fordøyelse ved at kalsium ble bundet opp og gjort utilgjengelig. Grynspan og Cheryan (1983) undersøkte løselighetsegenskapene til kalsium-fytatkompleks og observerte en høy grad av løselighet under pH 4, uavhengig av kalsium: fytat molforhold. Dette kan forklare hvorfor Havredrikk måtte pH-justeres i forkant av *in vitro* fordøyelse. Løseligheten ved lav pH antyder at det sure miljøet i magesekken er nødvendig for å tilgjengeliggjøre kalsium i havredrikk, og øke biotilgjengeligheten (Grynspan & Cheryan, 1983; Lorieau et al., 2018; Pedersen, 2012).

Det ble foretatt pH-målinger i produktene før *in vitro* fordøyelse for å se etter forskjeller mellom dem. To av melkeprøvene, HTST og Laktoseredusert, hadde i utgangspunktet relativ lik pH. UHT og Havre hadde derimot signifikant høyere pH enn de andre prøvene, hvor Havre

hadde høyest pH av de to. Nøytral pH er 7 og vanligvis har melk en tilnærmet nøytral pH. Den reelle pH-verdien i melk er 6.7-6.9, på grunn av melkesyrebakterier som omdanner laktose til laktat (melkesyre) (Fox et al., 2015e; Walstra et al., 2006a). Havredrikk hadde en høyere pH enn melkeprøvene, noe som kan forklares ved at Havredrikk har en annen sammensetning. Det var forventet at denne prøven var mer basisk, sammenlignet med melkeprøvene. Likevel viste melkeprøvene til noe høyere verdier enn forventet, noe som trolig kan forklares av variasjoner innad prøvene. På den andre siden er forskjellene mellom melkeprøvene relativt liten og det er ikke forventet at dette har noen nevneverdig betydning. Prøvene ble tatt fra samme melkekartong.

5.2 Fordøyde prøver

De fordøyde prøvene etter *in vitro* fordøyelse ble videre analysert for innhold av totalt kalsium, ionisk kalsium og hydrolysegrad av proteiner. Hensikten var å undersøke om produktets egenskaper og ulike prosesser som er inkludert i fremstillingen på *in vitro* fordøyelse, påvirker proteinfordøyelighet og biotilgjengeligheten av kalsium og jod. Prøvene ble deretter separert i en høy- og lavmolekylær fraksjon ved sentrifugering i sentrifugerør med cut off på 3 kDa. De lavmolekylære prøvene (LM, < 3 kDa) ble analysert for innhold av kalsium og jod, samt hydrolysegrad av proteiner. Høymolekylær prøver (HM, > 3 kDa) ble analysert for innhold av jod. Kalsium- og jodinnhold ble målt for å undersøke om de nevnte mineralene var bundet til andre komplekser i prøvene, som kan påvirke biotilgjengeligheten.

For å avgjøre totalt kalsiuminnhold i fordøyde prøver, ble det kun benyttet kompleksimetrisk titrering. Det ble observert en økning i totalt kalsiuminnhold etter *in vitro* fordøyelse for både F-UHT og F-Laktoseredusert, sammenlignet med før *in vitro* fordøyelse. I tillegg økte kalsiuminnholdet for F-Laktoseredusert fra D60 til D120, som også hadde et signifikant høyere kalsiuminnhold sammenlignet med F-HTST. De samme prøveuttakene for F-HTST viste motsatt trend, med en nedgang i kalsiuminnhold fra D60 til D120. Det er ingen god forklaring på hvorfor kalsiuminnholdet økte under *in vitro* fordøyelse. Det finnes heller ingen støtte til disse funnene i litteraturen. Teixeira et al. (2022) observerte ingen forskjell i kalsiuminnhold før og etter pasteurisering ved to ulike

temperaturer (85/65°C i 30 min). Tre av produktene inkludert i vår studie er derimot UHT-behandlet, men en kort UHT-behandling og indirekte oppvarming vil gi minimalt kjemisk skade (Geiselhart et al., 2021). Basert på dette er det heller ingen grunn til å tro at produksjonshistorikken forårsaket disse endringene.

Det var ikke behov for pH-justering av F-Havredrikk etter *in vitro* fordøyelse ved analyse for totalt kalsiuminnhold. Dette styrker teorien om at det sure miljøet i gastrisk fase var tilstrekkelig for å øke løseligheten til kalsium i Havredrikk, og at kompleksdannelse med fytinsyre ikke skjer på samme måte i duodenal fase (Grynspan & Cheryan, 1983). Teorien støttes av funnene til Lorieau et al. (2018), som viste at kalsium ble mer løselig under sure forhold (pH 3) i gastrisk fase. I denne sammenhengen tyder det på at det sure miljøet i den stimulerte magefasen under *in vitro* fordøyelse gjorde kalsium målbart. På den andre siden har andre studier også rapportert økt mengde biotilgjengelig kalsium ved tilstedeværelse av fytinsyre omkring pH 2, sammenlignet med pH 8 (Dendougui & Schwedt, 2004). Allerede ved pH under 4-5 har kalsium vist økt løselighet (Nolan et al., 1987). Det kan forklares ved at kolloidalt kalsiumfosfat oppløses ved lavere pH og kaseiner feller ut ved proteinets pI (pH 4.6) (Walstra et al., 2006b). Torre et al. (1991) har også observert at fytinsyre, i form av fytater, var mer løselig ved lavere pH-verdier. På den andre siden viser disse studiene til redusert mengde biotilgjengelig kalsium ved økte pH-verdier tilsvarende pH 7 i duodenal fase. Innhold av totalt kalsium etter *in vitro* fordøyelse var omtrent lik mengden før *in vitro* fordøyelse, og det var heller ingen forskjell mellom kontroll og fordøyde prøver. Basert på disse resultatene er det vanskelig å si noe om i hvilken grad fytinsyre påvirket innhold av totalt kalsium etter *in vitro* fordøyelse. Kompleksiometrisk titrering viser total mengde kalsium (Barone et al., 2021; Masotti et al., 2020). Derfor bør kalsium være målbart, uavhengig om det er bundet til fytatkompleks eller ikke.

For lavmolekylær prøvefraksjon av Havredrikk (LM-Havredrikk) styrkes teorien om påvirkning av fytinsyreinnhold ved dannelse av kalsium-fytatkompleks, som dermed reduserte mengden kalsium ved å hindre at kalsium gikk gjennom membranen. Andre studier har derimot vist at komplekset har en gjennomsnittlig størrelse på 1.3 til 1.4 nm, noe

som indikerer at komplekset burde gått gjennom membranen på 3 kDa (Campbell & Reaney, 2004; Wedekind, 1989). På den andre siden avhenger det av ladning og eventuelle interaksjoner. Det er uvisst om fytinsyre dannet kompleks med kalsium, men resultatet tyder på at dette påvirket totalt kalsiuminnhold i de lavmolekylære prøvene. Innholdet var lavere enn antatt fordi det var forventet at kalsium skulle gå gjennom membranen, da et kalsiumion tilsvarer 40.1 Da og en cut off på 3 kDa tilsvarer 3000 Da (Walstra et al., 2006b). En annen mulig forklaring er at kalsiumet felte ut av løsning under sentrifugering med sentrifugerør. Heaney et al. (2005) viste at opptil 82-89% av kalsium til stede i soya- og risdrikk ble separert under sentrifugering ved 3740 x g, sammenlignet med 11% for melk.

De lavmolekylære melkeprøvene viste også til et lavere innhold av totalt kalsium, sammenlignet med de fordøyde prøvene. Dette tyder igjen på at noe kalsium ikke gikk gjennom membranens cut off, som muligens kan forklares ved at kalsium var bundet til andre komplekser. Dette stemmer overens med Lorieau et al. (2018) som gjennomførte *in vitro* fordøyelse etterfulgt av ultrafiltrering med samme cut off på 3 kDa på ulike former av kalsium for å undersøke biotilgjengeligheten. Generelt sett ble andelen kalsium i tarmen kraftig redusert sammenlignet med målingene gjort i magefasen. Resultatet ble sett på som forventet og begrunnet med utfelling av kalsium forårsaket av økningen i pH fra 3 i den stimulerede magefasen til pH 7 i den stimulerede tarmfasen (Lorieau et al., 2018). Utfelling av kalsium førte til dannelse av komplekser, større enn 3 kDa, som videre reduserte kalsiuminnholdet. Dette kan både forklare hvorfor LM-Havredrikk var signifikant forskjellig fra alle melkeprøvene (foruten LM-UHT), og den generelle reduksjonen i kalsiuminnhold for lavmolekylære prøver. På en andre siden viser resultatene et signifikant høyere innhold av totalt kalsium i de lavmolekylære prøvene sammenlignet med kontrollprøvene (K60 og K120). Et høyere innhold av totalt kalsium i lavmolekylære prøver etter *in vitro* fordøyelse indikerer at fordøyelsen gjør mineralet mer tilgjengelig for absorpsjon.

Prøvene ble så analysert for ionisk kalsium, hvor formålet var å måle mengden frie, ubundet kalsiumioner i fordøyde prøver og kontrollprøver etter *in vitro* fordøyelse. Hensikten var å undersøke mengden kalsium som var tilgjengelig for absorpsjon i duodenal fasen, da kalsium må være i ionisk form for å bli absorbert. Det er vist at gastrisk fase bidrar til økt mengde

ionisk kalsium (Kopic & Geibel, 2013; Lorieau et al., 2018). En økning i H⁺-ioner gir lavere pH, som videre vil øke løseligheten til både kalsium (i form av Ca²⁺) og kolloidalt kalsiumfosfat (Gaucheron, 2005; Walstra et al., 2006b). I dette eksperimentet ble det kun tatt ut prøver fra duodenal fase (D60 og D120), hvor pH-økningen fra 3 i gastrisk fase til pH 7 i duodenal fase derimot kan føre til utfelling av kalsium. Det fører som nevnt til dannelse av større komplekser, noe som reduserer mengden fritt kalsium. Det ble ikke inkludert pH-målinger etter *in vitro*, da disse ble manuelt justert til pH 7 (± 0.09) i forkant av duodenal fase. På den andre siden viser resultatene en tydelig trend med økt ionisk kalsium i D60 og D120, sammenlignet med K60 og K120. Det kan bety at *in vitro* fordøyelse bidrar til økt mengde frie kalsiumioner, og dermed økt biotilgjengelighet. Disse resultatene var derimot ikke signifikante. Årsaken til økningen i ionisk kalsium for de fordøyde prøvene kan være tilstedeværelsen av ulike komponenter som fosfopeptider og laktose. Disse vil beskytte kalsium mot anioner og andre hemmere i tarmen, som fosfater (Alegría-Torán et al., 2015) (Theobald, 2005). Anioner og kationer har motsatt ladning og vil tiltrekke hverandre (Damodaran et al., 2017c). Laktose og fosfopeptider virker beskyttende ved å forhindre eller forsinke kalsiumutfelling i tarmen, som fører til at kalsium holdes i løsning og dermed øke biotilgjengeligheten. F-Laktoseredusert, som inneholder mindre laktose enn de andre melkeprøvene, var signifikant forskjellig fra F-UHT, men ikke F-HTST. Imidlertid er det fremdeles uenighet rundt effekten av laktose og økt biotilgjengelighet av kalsium hos mennesker (Kwak et al., 2012).

Kontrollprøvene manglet fordøyelsesenzymer (pepsin og pancreatin), men ble derimot tilsatt galle, SSF, SGF og SIF. Fordøyelsesvæskene som benyttes i protokollen til Brodkorb et al. (2019) for *in vitro* fordøyelse, inneholder fosfat og karbonat. Dette kan bidra til å redusere mengden ionisk kalsium fordi de reassosieres med fosfat eller karbonat og feller ut i tarmen ved nøytral pH (Kopic & Geibel, 2013). Dette kan forklare hvorfor K60 og K120 hadde et lavere innhold av ionisk kalsium, sammenlignet med fordøyde prøver D60 og D120. Som nevnt tidligere, ble verken fordøyde prøver eller kontrollprøver korrigert for fordøyelsesvæskene, noe som kan forklare hvorfor kontrollprøvene hadde et lavere innhold av ionisk kalsium.

I motsetning til resultatene ved både kompleksimetrisk titrering og ICP-OES, som viser høyere totalt kalsiuminnhold for melkeprøvene sammenlignet med havredrikk, hadde sistnevnte et mer likt innhold av ionisk kalsium. Det betyr at kalsium tilgjengelig for absorpsjon i havredrikk er i ionisk form, uavhengig av mengde totalt kalsium i prøven. F-Havredrikk var signifikant forskjellig fra F-HTST og F-Laktoseredusert. Biotilgjengeligheten til kalsium i havredrikk er derfor like god eller bedre sammenlignet med melkeprøvene.

Det ble også nevnt at prøver fra *in vitro* fordøyelse består av et komplekst miljø med høy ionestyrke på grunn av tilstedeværelse av mange mineraler. Dette kan potensielt sett forstyrre målingene. På den andre siden stemmer resultatet i vår studie overens med Demott (1968), som viste til resultater fra 1.4 til 2.5 mM/L ved bruk av kalsiumsensitiv elektrode til å måle ionisk kalsium i melk. Resultatet var forventet fordi 2 til 3 mM av totalt kalsium eksisterer som ionisk kalsium (Fox et al., 2015d). Resultatet for blank var derimot ikke forventet, men en mulig årsak kan være at prøvematriksen til blank ikke inneholdt noe annet som kalsium kunne danne komplekser med, eller binde seg til. Dette var i motsetning ikke tilfellet ved de andre prøvene, hvor kalsium kan binde seg til komponenter i melke- og plantedrikkmatriksen, samt kontrollprøvene (Kopic & Geibel, 2013).

Videre ble både fordøyde prøver og lav- og høymolekylære prøver undersøkt for innhold av jod. Som nevnt, ble høymolekylær fraksjon analysert ved ICP-MS og deretter ble resultater for fordøyde og lavmolekylær prøver beregnet ut fra innhold jod analysert i de høymolekylære fraksjonene (se vedlegg 2, Formel A). Resultatene viser at hovedmengden av jod antageligvis befant seg i lavmolekylær prøvefraksjon for alle prøvene inkludert i eksperimentet. Det er derfor grunn til å tro at jod har god biotilgjengelighet under *in vitro* fordøyelse, både for melkeprodukter og beriket havredrikk. Derimot viste resultatet fra de fordøyde prøvene en tydelig trend, hvor fordøyde prøver muligens hadde lavere innhold av jod. Til tross for dette var ingen av resultatene statistisk signifikant ($p > 0.05$). Det var heller ingen signifikante forskjeller for innhold av jod mellom HM-HTST, HM-UHT, HM-Laktoseredusert og HM-Havredrikk i høymolekylær prøvefraksjon. Det er derfor ikke grunnlag til å konkludere at produksjonshistorikk påvirker biotilgjengelighet av jod, verken

i ulike melkevarianter eller havredrikk. Det var heller ingen store signifikante forskjeller innad hver prøve, som gjør det vanskelig å konkludere om *in vitro* fordøyelse hadde noen effekt på biotilgjengeligheten. En randomisert crossover-studie undersøkte biotilgjengeligheten av jod fra melk i friske mennesker (van der Reijden et al., 2019). Resultatene tydet på at biotilgjengeligheten fra melk er høy fordi store deler av jod til stede var i form av uorganisk jodid. I tarmkanalen reduseres uorganisk jodid til frie jodidioner som har høy biotilgjengelighet (absorberes nesten fullstendig, 95%) (Blomhoff et al., 2007d).

De fordøyde prøvene ble også analysert for hydrolysegrad av proteiner. Metoden gir et mål på innhold av frie, primære aminogruener under *in vitro* fordøyelse (Church et al., 1983). Et høyt utslag av hydrolysegrad indikerer at flere primære aminogruener er frigjort fra proteinstrukturen, og at proteinene i prøven er nedbrutt fra sin opprinnelige struktur. Dette kan videre si noe om proteinfordøyeligheten. Resultatene viser ingen signifikante forskjeller mellom de ulike prøvefraksjonene. Det kan forklares ved de store forskjellene mellom triplikatene og dermed relativt stort standardavvik for prøvene, spesielt F-Havredrikk, til tross for bruk av konstanter for utregning. Det var likevel en synlig økning i hydrolysegrad i prøver med uttak D120, sammenlignet med D60, som tyder på at proteinene ble ytterligere nedbrutt ved forlenget oppholdstid i den stimulerte tarmfasen. Dette var forventet fordi det ble tilsatt en protease inhibitor for å stoppe fordøyelsen ved de to ulike uttakene. Enzymene vil naturligvis hydrolysere proteinene frem til inhibitoren er tilsatt (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). Det betyr at *in vitro* fordøyelse øker proteinfordøyeligheten ved å bidra til kjemisk endring av proteinene. Pepsin spalter proteiner til korte peptidkjeder eller aminosyrer i den stimulerte magefasen (Brodkorb et al., 2019; Pedersen, 2012). Etterfulgt av pancreatin som spalter peptidbindinger og korte peptidkjeder til små peptider (di- og tripeptider) og frie aminosyrer i den stimulerte tarmfasen. Dette resulterer i molekyler som er i stand til å bli absorbert i tarmen.

Resultatene viste ingen signifikante forskjeller mellom verken ulike prøver, prøveuttak eller prøvefraksjoner innad samme prøve for hydrolysegrad av proteiner. Dette indikerer at produksjonshistorikken ikke påvirker proteinfordøyelighet under *in vitro* fordøyelse. På den andre siden kan både homogenisering og varmebehandling påvirke fordøyelse av

proteinene. Varmebehandling gir myseproteinene en mer åpen struktur som gjør de mer følsomme for fordøyelsesenzymer (Barbé et al., 2013; Inglingstad et al., 2010). På grunn av utfoldelsen av proteinene på det økte overflatearealet til melkefettkulene, blir proteinene mer tilgjengelig for pepsin (MacIerzanka et al., 2009; Sarkar et al., 2009). Dette førte derimot ikke til forskjeller mellom prøvene.

De lavmolekylære prøvene viser en høyere hydrolysegrad, sammenlignet med fordøyde prøver. Ved å analysere lavmolekylær prøvefraksjon med OPA, ble antall spaltede peptidbindinger kvantifisert på de frigjorte peptidene, mindre enn 3 kDa. Det var forventet et økt innhold av frie, primære aminogrupeer i lavmolekylær prøvefraksjon, da peptidene ellers ikke ville gått gjennom membranen. Dette bekrefter at proteinene ble hydrolysert under fordøyelsen. Resultatene var gjentagende for alle prøvene inkludert i eksperimentet, foruten F- og LM-Havredrikk. Resultatene for Havredrikk viste en mye høyere grad av nedbrytning for D60, sammenlignet med D120. Det var heller ingen nedbrytning i de lavmolekylære Havredrikkprøvene, uavhengig prøveuttak. Det kan undres på om planteproteinene felte ut under sentrifugeringstrinnet ved bruk av sentrifugerør, og at dette er årsaken til manglende resultat for lavmolekylære prøver.

Dessuten var standardavviket høyt for flere av prøvene. Siden resultatet for melkeprøvene viser til samme forventet trend, er det grunn til å tro at OPA-metoden ikke er like egnet for planteproteiner. På den andre siden skal OPA-metoden være anvendelig for alle type proteiner (Church et al., 1983). Kontrollprøvene ga negative verdier, som viste at ingen primære aminogrupeer ble frigjort, og ble derfor ikke inkludert i resultatene. Dette var forventet fordi kontrollprøvene ble tilsatt dH₂O fremfor pepsin i magefasen og pancreatin i tarmfasen under *in vitro* fordøyelse. Det betyr at det ikke var tilstedeværelse av fordøyelsesenzymer som kunne hydrolysert proteiner og brutt de ned til korte peptidkjeder og aminosyrer (Guerra et al., 2012).

5.3 Konklusjon

Formålet med denne oppgaven var å studere effekten av *in vitro* fordøyelse, produkters egenskaper og produksjonshistorikk på biotilgjengelighet av kalsium, jod og proteinfordøyelighet, ved å undersøke tre melkeprodukter og én havrebasert plantedrikk. Funnene i denne studien viser at innholdet oppført på varedeklarasjonen for havredrikk ikke nødvendigvis gjenspeiler produktets reelle innhold, som tyder på at havredrikk ikke er et fullverdig alternativ til den tradisjonelle melken. På den andre siden viste kalsiumkarbonat til likt innhold av ionisk kalsium, som kan bety at kalsium tilgjengelig i havredrikk er av god biotilgjengelighet i likhet med kalsium i melk. Melkeproduktene hadde et tilnærmet likt innhold av totalt kalsium sammenlignet med varedeklarasjonen.

Etter *in vitro* fordøyelse viste F-UHT og F-Laktoseredusert et økt kalsiuminnhold i fordøyde prøver, D60 og D120. I tillegg viste alle melkeprøvene et signifikant høyere kalsiuminnhold i lavmolekylære fraksjoner sammenlignet med kontrollprøvene, som tyder på at kalsium blir mer tilgjengelig under *in vitro* fordøyelse. Økte verdier for ionisk kalsium i de fordøyde prøvene styrker denne teorien. På den andre siden var innholdet av totalt kalsium noe lavere enn de fordøyde prøvene, som kan bety at kalsium binder seg til andre komponenter som hindrer mineralet å gå gjennom porestørrelsen på 3 kDa. Ut fra annen litteratur er det mulig kalsium felte ut ved pH økning fra 3 til 7 i duodenal fase, som kan gi dannelse av større komplekser. Til tross for et mye lavere innhold av totalt kalsium, hadde derimot F-Havredrikk et tilnærmet likt innhold av ionisk kalsium, som betyr at biotilgjengeligheten til kalsium fra de ulike prøvene er like gode. Videre viste resultatene at proteinfordøyeligheten øker desto lenger melkeprøvene fordøyes. Det var økt hydrolysegrad for lavmolekylære fraksjoner på grunn av antall spaltede peptidbindinger som går gjennom porestørrelsen på 3 kDa.

Videre legger resultatene grunnlag for å konkludere at verken produksjonshistorikk eller *in vitro* fordøyelse påvirker innholdet eller biotilgjengeligheten av jod i de ulike melkevariantene og havredrikk. Det ble antatt at mesteparten av jodinnholdet var i lavmolekylær fraksjon, som tyder på at biotilgjengeligheten er god. Det var heller ingen

tydelige forskjeller i innhold av totalt kalsium og jod mellom de ulike melkeprøvene som gjør det mulig å dra konklusjoner basert på forskjell i produksjonshistorikk.

6. TIL ETTERTANKE OG VIDERE FORSKNING

Oppsettet som ble benyttet i denne oppgaven inkluderte først og fremst ikke analyse for ionisk kalsium i produktene før *in vitro* fordøyelse. Det ville gitt et bedre grunnlag for sammenligning før og etter *in vitro* fordøyelse, og få et mer sammenhengende bilde av hvordan fordøyelsen påvirker biotilgjengeligheten til kalsium. Til ettertanke burde det blitt benyttet større prøvemengder under *in vitro* fordøyelse for å få økt prøvevolum. På den måten kunne begrensninger knyttet til analysene av prøvematerialet blitt unngått. Etter *in vitro* fordøyelse ble prøvene sentrifugert før videre analyser og nytt sentrifugeringstrinn. Pelleten fra første sentrifugeringstrinn ble tatt vare på, men ikke analysert i denne oppgaven. Det ville vært interessant å undersøke sammensetningen av denne pelleten for å se hvilke komponenter som felte ut og ble fjernet med pelleten.

Innhold av jod i lavmolekylære prøver ble beregnet, men ikke undersøkt. Det ville gitt et mer nøyaktig og reelt resultat for hva som gikk gjennom membranen, for å kunne fastslå om biotilgjengeligheten til jod er god. Videre ble metoden ICP-OES ikke benyttet til å analysere de lavmolekylære fraksjonene. Resultatene for de høymolekylære prøvene ble heller ikke inkludert i oppgaven. Mengden ionisk kalsium kan ha blitt overestimert fordi blank-prøvene ikke ble trukket fra. Siden OPA-metoden viser til hydrolysegrad av proteiner, var det vanskelig å si noe konkret om proteinene. Til videre forskning bør det inkluderes andre analyser, som gelelektroforese, for å kunne si noe mer spesifikt om de ulike proteinene. Spesielt i dette tilfellet hvor det ble utført analyser på produkter med ulike typer proteiner. Det bør vurderes på bakgrunn av det uforståelige resultatet for havredrikken.

Til videre forskning ville det vært ønskelig å undersøke PBD generelt, da de berikes med ulike kjemiske former for mineraler. Også aktuelt å undersøke havredrikken ytterligere, spesielt i forhold til dannelsen av bunnfall i havredrikk og teorien om utfelling av kalsiumkarbonat. I tillegg undersøke fytinsyre nærmere og se på hvilke mengder fytinsyre som faktisk påvirker biotilgjengeligheten av næringsstoffer.

7. LITTERATURLISTE

- Addy, K., Green, L. & Herron, E. (2004). pH and Alkalinity. *University of Rhode Island, Kingston*.
- Aguilera, J. M. (2019). The food matrix: implications in processing, nutrition and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (22): 3612-3629. doi: 10.1080/10408398.2018.1502743.
- Alegria-Torán, A., Barberá-Sáez, R. & Chilla-Tatay, A. (2015). *Handbook of Mineral Elements in Food. Chapter 3: Bioavailability of minerals in foods*. 1. utg utg. Valencia, Spania Wiley Blackwell
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D. & Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, 136 (3): 1203-1212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.022>.
- Barone, G., Yazdi, S. R., Lillevang, S. K. & Ahrné, L. (2021). Calcium: A comprehensive review on quantification, interaction with milk proteins and implications for processing of dairy products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 20 (6): 5616-5640. doi: 10.1111/1541-4337.12844.
- Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal Physiology. Chapter 1: Functional Anatomy of the GI Tract abd Organs Draining into It*. 2 utg. utg. USA: McGraw Hill.
- Bath, S. C., Hill, S., Infante, H. G., Elghul, S., Neziyanya, C. J. & Rayman, M. P. (2017). Iodine concentration of milk-alternative drinks available in the UK in comparison with cows' milk. *British Journal of Nutrition*, 118 (7): 525-532. doi: 10.1017/S0007114517002136.
- Blomhoff, R., Bjørneboe, G. A. & Drevon, C. A. (2007a). *Mat og medisin: nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring* 5. utg utg. Kristiansand, Norge: Høyskoleforlaget.
- Blomhoff, R., Bjørneboe, G. A. & Drevon, C. A. (2007b). *Mat og medisin: nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring. Kapittel 9: Fettstoffer*. 5. utg utg. Kristiansand, Norge: Høyskoleforlaget.
- Blomhoff, R., Bjørneboe, G. A. & Drevon, C. A. (2007c). *Mat og medisin: nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring. Kapittel 18: Kalsium*. 5. utg utg. Kristiansand, Norge: Høyskoleforlaget.
- Blomhoff, R., Bjørneboe, G. A. & Drevon, C. A. (2007d). *Mat og medisin: nordisk lærebok i generell og klinisk ernæring. Kapittel 19: Sporstoffer*. 5. utg utg. Kristiansand, Norge Høyskoleforlaget.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., et al. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (13): 2239-2261. doi: 10.1080/10408398.2017.1315362.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L. & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (26): 14930-14935. doi: 10.1073/pnas.94.26.14930.
- Boland, M. (2016). Human digestion – a processing perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (7): 2275-2283. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7601>.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M. & al., e. (2019). INFOGEST static in vitro stimulation of gastrointestinal food digestion *Nat Protoc*, 14: 991-1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- Brundtland, G. H. e. a. (1987). *Vår felles framtid/Brundtlandkommisjonen*
- Campbell, G. M. & Reaney, D. L. (2004). The structure of calcium phytate complexes in aqueous solutions: Implications for mineral bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4): 992-996.
- Chalupa-Krebzdak, S., Long, C. J. & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives - a review. *International Dairy Journal*, 87: 84-92. doi: 10.1016/j.idairyj.2018.07.018.
- Chan, H. W., Abdul-Manan, A. F., Abdul-Hamid, A. & Abdul-Rahman, R. (2017). Phytic acid content and mineral bioavailability of different oat varieties and oat milk. *Food Chemistry*, 208: 517-523.
- Chung, M., Balk, E. M., Brendel, M., Ip, S., Lau, J., Lee, J., Lichtenstein, A., Patel, K., Raman, G., Tatsioni, A., et al. (2009). Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* (183): 1-420.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J Dairy Sci*, 66: 1219-1227.
- Clegg, M. E., Tarrado Ribes, A., Reynolds, R., Kliem, K. & Stergiadis, S. (2021). A comparative assessment of the nutritional composition of dairy and plant-based dairy alternatives available for sale in the UK and the implications for consumers' dietary intakes. *Food Research International*, 148: 110586. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110586>.
- Corredig, M., Sharafbafi, N. & Kristo, E. (2011). Polysaccharide–protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocolloids*, 25 (8): 1833-1841. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.014>.
- Craig, W. J. (2010). Nutrition Concerns and Health Effects of Vegetarian Diets. *Nutrition in Clinical Practice*, 25 (6): 613-620. doi: <https://doi.org/10.1177/0884533610385707>.
- Crittenden, R. G. & Bennett, L. E. (2005). Cow's Milk Allergy: A Complex Disorder. *Journal of the American College of Nutrition*, 24 (sup6): 582S-591S. doi: 10.1080/07315724.2005.10719507.
- Dalgleish, D. G. & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. . *The Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 449-67.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2017a). *Fennema's Food Chemistry*. 5. utg. utg. Boca Raton, Florida CRC Press/Taylor & Francis
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2017b). *Fennema's Food Chemistry. Chapter 3: Carbohydrates*. 5. utg utg. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2017c). *Fennema's Food Chemistry. Chapter 9: Minerals* 5. utg utg. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis

- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2017d). *Fennema's Food Chemistry. Chapter 14: Characteristics of Milk*. 5. utg utg. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis.
- De forente nasjoner. (2022). *The Sustainable Development Goals Report* New York, USA: United Nations Publications.
- de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S. & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Adv Colloid Interface Sci*, 171-172: 36-52. doi: 10.1016/j.cis.2012.01.002.
- Demott, B. J. (1968). Ionic Calcium in Milk and Whey. *Journal of Dairy Science*, 51 (7): 1008-1012. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(68\)87114-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(68)87114-0).
- Dendougui, F. & Schwedt, G. (2004). In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples *European Food Research and Technology*, 219: 409-415. doi: 10.1007/s00217-004-0912-7.
- Deshpande, S. & Damodaran, S. (1989). Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *Journal of Food Science*, 54 (3): 695-699.
- Doh, H., Lee, H. M. & Park, J. H. (2019). Effect of different cooking methods on the content and bioaccessibility of iodine components in abalone (*Haliotis discus hannai*). *Food Chemistry*: 1-6. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125197.
- Dupont, D. & Tome, D. (2014). Chapter 20 - Milk Proteins: Digestion and Absorption in the Gastrointestinal Tract. I: Singh, H., Boland, M. & Thompson, A. (red.) *Milk Proteins (Second Edition)*, s. 557-569. San Diego: Academic Press.
- Durand, A., Franks, G. V. & Hosken, R. W. (2003). Particle sizes and stability of UHT bovine, cereal and grain milks. *Food Hydrocolloids*, 17 (5): 671-678. doi: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00012-2).
- EFSA & NDA. (2010). Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal*, 8 (9): 1777. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1777>.
- Enright, E., Patricia Bland, A., Needs, E. C. & Kelly, A. L. (1999). Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO₃ addition. *International Dairy Journal*, 9 (9): 581-591. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00128-4).
- Escobar-Sáez, D., Montero-Jiménez, L., García-Herrera, P. & Sánchez-Mata, M. C. (2022). Plant-based drinks for vegetarian or vegan toddlers: Nutritional evaluation of commercial products, and review of health benefits and potential concerns. *Food Research International*, 160: 111646. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111646>.
- FAO. (2018). *Sustainable food systems. Concept and framework*: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Fecher, P. A., Goldmann, I. & Nagengast, A. (1998). Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13: 977-982. doi: 10.1039/A801671B.
- Fernández-Sánchez, M. L. (2019). Atomic Emission Spectrometry | Inductively Coupled Plasma☆. I: Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A. & Miró, M. (red.) *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, s. 169-176. Oxford: Academic Press.

- Forrest, S. A., Yada, R. Y. & Rousseau, D. (2005). Interactions of Vitamin D3 with Bovine β -Lactoglobulin A and β -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20): 8003-8009. doi: 10.1021/jf050661l.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015a). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 2: Lactose*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015b). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 3: Milk Lipids*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015c). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 4: Milk Proteins*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015d). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 5: Salts of Milk*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015e). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 8: Physical Properties of Milk*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015f). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 9: Heat-Induced Changes In Milk*. 2. utg utg. Sveits: Springer.
- Frühauf, V., Egea, M., Hernandez, T. & Takeuchi, K. (2022). Relationship between Physicochemical and Sensory Characteristics of Commercial Plant-Based Beverages. *Journal of Culinary Science & Technology*: 1-17. doi: 10.1080/15428052.2021.2024470.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45 (4): 473-483.
- Geerts, J. P., Bekhof, J. J. & Scherjon, J. W. (1983). Determination of calcium ion activities in milk with an ion-selective electrode. A linear relationship between the logarithm of time and the recovery of the calcium ion activity after heat treatment. *Milk and Dairy Journal* 37: 197-211.
- Geiselhart, S., Podzhilkova, A. & Hoffmann-Sommergruber, K. (2021). Cow's Milk Processing—Friend or Foe in Food Allergy? *Foods*, 10 (3): 572.
- Grimby, G., S., Gonera, A. & Ueland, Ø. (2021). *Salgsutvikling for nye plantebaserte produkter*.
- Grynspan, F. & Cheryan, M. (1983). Calcium phytate: Effect of ph and molar ratio on in vitro solubility. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60 (10): 1761-1764. doi: 10.1007/BF02680350.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30 (11): 591-600. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.08.001.
- Harju, M., Kallioinen, H. & Tossavainen, O. (2012). Lactose Hydrolysis and Other Conversions in Dairy Products: Technological Aspects. *International Dairy Journal*, 22: 104-109.
- Havea, P. (2006). Protein interactions in milk protein concentrate powders. *International Dairy Journal*, 16 (5): 415-422. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.005>.
- Heaney, R. P., Dowell, M. S., Rafferty, K. & Bierman, J. (2000). Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. *The American journal of clinical nutrition*, 71 (5): 1166-1169.
- Heaney, R. P., Rafferty, K. & Bierman, J. (2005). Not All Calcium-fortified Beverages Are Equal. *Nutrition Today*, 40 (1): 39-44.

- Helland-Kiegen, K. (2013). *Hva er laktoseintoleranse?* Norge: Melk.no. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Kosthold-og-helse/Taaler-ikke-melk/Hva-er-laktoseintoleranse> (lest 14.02.2023).
- Helsedirektoratet. (2016). *Nasjonale anbefalinger, råd og pakkeforløp - kostrådene og næringsstoffer. Kap. 1: Kostrådene* Oslo: Helsedirektoratet. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/kostrad-for-befolkningen>.
- Helsedirektoratet. (2021a). *Vegetar- og vegankost - ekspertuttalelse fra Nasjonalt råd for ernæring. Kap. 1: Hva er vegetar- og vegankost?* Oslo: Helsedirektoratet. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/vegetar-og-vegankost-ekspertuttalelse-fra-nasjonalt-rad-for-ernaering>.
- Helsedirektoratet. (2021b). *Vegetar- og vegankost - ekspertuttalelse fra Nasjonalt råd for ernæring. Kap. 2: Hva slags kosttilskudd før voksne med et vegetarisk eller vegansk kosthold ta?* Oslo: Helsedirektoratet Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/vegetar-og-vegankost-ekspertuttalelse-fra-nasjonalt-rad-for-ernaering/hva-slags-kosttilskudd-bor-voksne-med-et-vegetarisk-eller-vegansk-kosthold-ta>
- Helsedirektoratet & Mattilsynet. (2022). *Kostholdsplanleggeren*: Helsedirektoratet & Mattilsynet Tilgjengelig fra: <https://www.kostholdsplanleggeren.no/>.
- Hendrix, T., Griko, Y. V. & Privalov, P. L. (2000). A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine α -lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, 84 (1): 27-34. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00140-4).
- Holt, C., Dalgleish, D. G. & Jenness, R. (1981). Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. *Analytical Biochemistry*, 113 (1): 154-163. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90059-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90059-2).
- Holt, C. (1998). Casein Micelle Substructure and Calcium Phosphate Interactions Studied by Sephacryl Column Chromatography *Journal of Dairy Science*, 81: 2994-3003.
- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11 (2): 148-153. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
- Hughes, D. (1995). Animal welfare. *British Food Journal*, 97 (10): 3-7. doi: 10.1108/00070709510104529.
- Hughes, J. & Grafenauer, S. (2021). Oat and Barley in the Food Supply and Use of Beta Glucan Health Claims. *Nutrients*, 13 (8). doi: 10.3390/nu13082556.
- IDF. (2014). *World Dairy Situation Report. Bulletin of the IDF NO. 476*.
- IDF. (2021). *World Dairy Situation Report. Bulletin of the IDF NO. 512*.
- Inagawa, J. i., Kiyosawa, I. & nagasawa, T. (1987). Effects of phytic acid on the digestion of casein and soybean protein with trypsin, pancreatin or pepsin. *日本栄養・食糧学会誌*, 40 (5): 367-373.
- Inglingstad, R. A., Devold, T. G., Eriksen, E. K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K. H., Rukke, E. O. & Vegarud, G. E. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science & Technology*, 90 (5): 549-563. doi: 10.1051/dst/2010018.
- Jansson, T., Jensen, H. B., Sundekilde, U. K., Clausen, M. R., Eggers, N., Larsen, L. B., Ray, C., Andersen, H. J. & Bertram, H. C. (2014). Chemical and Proteolysis-Derived Changes

- during Long-Term Storage of Lactose-Hydrolyzed Ultrahigh-Temperature (UHT) Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (46): 11270-11278. doi: 10.1021/jf504104q.
- Kopic, S. & Geibel, J. P. (2013). Gastric Acid, Calcium Absorption, and Their Impact on Bone Health. *Physiological Reviews*, 93 (1): 189-268. doi: 10.1152/physrev.00015.2012.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120 (4): 945-959. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>.
- Kwak, H.-S., Lee, W.-J. & Lee, M.-R. (2012). Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*, 22 (2): 147-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.002>.
- Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., Benamouzig, R., Fouillet, H., Fauquant, J., Tomé, D., et al. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement^{2, 3}. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (5): 1070-1079. doi: <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>.
- Lomer, M. C., Parkes, G. C. & Sanderson, J. D. (2008). Review article: Lactose Intolerance in Clinical Practice - Myths and Realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27 (2): 93-103. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x.
- Lorieau, L., Le Roux, L., Gaucheron, F., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D. & Floury, J. (2018). Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by in vitro digestion. *Food Chemistry*, 245: 454-462. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.108>.
- Lovdata. (2010). *Forskrift om tilsetning av vitaminer, mineraler og visse andre stoffer til næringsmidler*.
- Maclerzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E. N. C., Rigby, N. M. & MacKie, A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 5 (3): 538-550. doi: 10.1039/b811233a.
- Mahan, K. L., Escott-Stump, S. & Raymond, J. L. (2012). *Krause's: Food and the Nutrition Care Process*. 13 utg. USA: Elsevier
- Manuelian, C. L., Currò, S., Penasa, M., Cassandro, M. & De Marchi, M. (2017). Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses. *Journal of Dairy Science*, 100 (5): 3384-3395. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12059>.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytè, M., Pica, V. & De Noni, I. (2020). Analytical advances in the determination of calcium in bovine milk, dairy products and milk-based infant formulas. *Trends in Food Science & Technology*, 103: 348-360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.013>.
- McKie, V. A. & McCleary, B. V. (2016). A Novel and Rapid Colorimetric Method for Measuring Total Phosphorus and Phytic Acid in Foods and Animal Feeds. *J. AOAC Int.*, 99 (3): 738-743. doi: 10.5740/jaoacint.16-0029.
- Melk.no. (2020a). *3 om dagen: Derfor trenger du 3 om dagen* Opplysningskontoret for Meieriprodukter. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Kosthold-og-helse/3-om-dagen/Derfor-tenger-du-3-om-dagen>.

- Melk.no. (2020b). *Disse næringsstoffene får du fra melk*. Melk.no: Opplysningskontoret for Meieriprodukter. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Kosthold-og-helse/Melk-og-helse/Disse-naeringsstoffene-faar-du-fra-melk>.
- Melk.no. (2022). *Statistikk*. Melk.no: Opplysningskontoret for Meieriprodukter. Tilgjengelig fra: <https://www.melk.no/Statistikk>
- Michalski, M.-C. & Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology*, 17 (8): 423-437. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.004>.
- Miller, G. D., Jarvis, J. K. & McBean, L. D. (2001). The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr*, 20 (2 Suppl): 168s-185s. doi: 10.1080/07315724.2001.10719029.
- Millward, J. D. (1999). The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements *Proc Nutr Soc*, 58 (2): 249-260.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5: 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.
- Mittal, S., Newell, G., Hourigan, J. & Zadow, J. (1991). The effect of protease contamination in lactase on the flavour of lactose-hydrolyzed milks. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46 (1): 46.
- Monteiro, C. A., Levy, R. B., Claro, R. M., Castro, I. R. R. & Cannon, G. (2010). A new classification of foods based on the extent and purpose of food processing. *Cadernos de Saúde Pública*, 26 (11): 2039-2049.
- Monteiro, C. A., Cannon, G., Levy, R. B., Moubarac, J.-C., Louzada, M. L. C., Rauber, F., Khandpur, N., Cediel, G., Neri, D., Martinez-Steele, E., et al. (2019). Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutrition*, 22 (5): 936-941. doi: 10.1017/S1368980018003762.
- Múzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E. & Pedrosa, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11: 227 - 244.
- Mäkinen, O. E., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J. A. & Arendt, E. K. (2015). Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chemistry*, 168: 630-638. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.036>.
- Mäkinen, O. E., Wanhalinna, V., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2016). Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (3): 339-349. doi: 10.1080/10408398.2012.761950.
- Nicklas, T. A. (2003). Calcium intake trends and health consequences from childhood through adulthood. *J Am Coll Nutr*, 22 (5): 340-56. doi: 10.1080/07315724.2003.10719317.
- Nolan, K. B., Duffin, P. A. & McWeeny, D. J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. in vitro studies on Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ (also Cd²⁺) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40: 79-85.

- Nordisk Ministerråd. (1993). *Dietetiske næringsmidler: Forslag til nordiske retningslinjer for vurdering og regulering*. København, Danmark Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter.
- Nordisk Ministerråd. (2012a). *Nordic Nutrition Recommendations 2012: Integrating nutrition and physical activity*. 5. utg utg. København: Nordisk Ministerråd.
- Nordisk Ministerråd. (2012b). *Nordic Nutrition Recommendations 2012: Integrating nutrition and physical activity. Chapter 28: Calcium* 5. utg utg. København: Nordisk Ministerråd
- Nordisk Ministerråd. (2012c). *Nordic Nutrition Recommendations 2012: Integrating nutrition and physical activity. Chapter 35: Iodine*. 5. utg utg. København: Nordisk Ministerråd
- Nordisk Ministerråd. (2023). *Draft: Nordic Nutrition Recommendations 2023*. København: Nordisk Ministerråd
- O'Dell, B. L. & De Boland, A. (1976). Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oil seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (4): 804-808.
- O'Mahony, J. A. & Fox, P. F. (2013). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. I: McSweeney, P. L. H. & Fox, P. F. (red.) *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition*, s. 43-85. Boston, MA: Springer US.
- Paul, A. A., Kumar, S., Kumar, V. & Sharma, R. (2020). Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60 (18): 3005-3023. doi: 10.1080/10408398.2019.1674243.
- Pawlak, R., Lester, S. E. & Babatunde, T. (2014). The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. *Eur J Clin Nutr*, 68 (5): 541-8. doi: 10.1038/ejcn.2014.46.
- Pedersen, J. I. (2012). *Grunnleggende ernæringslære 2* utg. utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
- Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A. R., Rivoira, M. A., López, M. E. P. & Talamoni, N. G. T. (2008). Minireview on Regulation of Intestinal Calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. 77 (1): 22-34. doi: 10.1159/000116623.
- Philippe, M., Gaucheron, F., Graet, Y. L., Michel, F. & Garem, A. (2003). Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83 (1): 45-59.
- Popova, A. & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. *The Open Biotechnology Journal*.
- Preedy, V. R. (2015). *Calcium: chemistry, analysis, function and effects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Rafferty, K., Walters, G. & Heaney, R. P. (2007). Calcium Fortificants: Overview and Strategies for Improving Calcium Nutriture of the U.S. Population. *Journal of Food Science*, 72 (9): R152-R158. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00521.x>.
- Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A. & Unnikrishnan, V. S. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J Food Sci Technol*, 52 (2): 662-75. doi: 10.1007/s13197-013-1072-1.
- Ravindran, V. (1995). Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 6: 125-143.

- Rotz, C. A., Montes, F. & Chianese, D. S. (2010). The carbon footprint of dairy production systems through partial life cycle assessment. *Journal of Dairy Science*, 93 (3): 1266-1282. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2162>.
- Samtiya, M., Aluko, R. E. & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Prod Process and Nutr*, 2 (6). doi: 10.1186/s43014-020-0020-5.
- Sandberg, A.-S., Carlsson, N.-G. & Svanberg, U. (1989). Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. *Journal of Food Science*, 54 (1): 159-161. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb08591.x>.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, R. P. & Singh, H. (2009). Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23 (6): 1563-1569. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.014>.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ahrens, F. & Barth, C. A. (2020). Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *Eur J Nutr*, 59 (1): 19-34. doi: 10.1007/s00394-019-01936-3.
- Sethi, S., Tyagi, S. K. & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (9): 3408-3423. doi: 10.1007/s13197-016-2328-3.
- Shkemi, B. & Huppertz, T. (2022). Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects *Nutrients* 14 (1). doi: 10.3390/nu14010180.
- Silva, J. G. S., Rebellato, A. P., Caramês, E., Greiner, R. & Pallone, J. A. L. (2020). In vitro digestion effect on mineral bioaccessibility and antioxidant bioactive compounds of plant-based beverages. *Food Res Int*, 130: 108993. doi: 10.1016/j.foodres.2020.108993.
- Silva, J. G. S., Rebellato, A. P., Abreu, J. S. d., Greiner, R. & Pallone, J. A. L. (2022). Impact of the fortification of a rice beverage with different calcium and iron sources on calcium and iron bioaccessibility. *Food Research International*, 161: 111830. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111830>.
- Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N. & Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *J. Food Sci Technol*, 54 (4): 858-870. doi: 10.1007/s13197-016-2391-9.
- Sjaastad, O. V., Hove, K. & Sand, O. (2010). *Physiology of Domestic Animals: Scandinavian Veterinary Press*.
- Smith, N. W., Dave, A. C., Hill, J. P. & McNabb, W. C. (2022). Nutritional assessment of plant-based beverages in comparison to bovine milk. *Front Nutr*, 8 (9). doi: 10.3389/fnut.2022.957486.
- Sotelo, A., González-Osnaya, L., Sánchez-Chinchillas, A. & Trejo, A. (2010). Role of oxate, phytate, tannins and cooking on iron bioavailability from foods commonly consumed in Mexico. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 61: 29-39. doi: 10.3109/09637480903213649.
- Sousa, R., Portmann, R., Dubois, S., Recio, I. & Egger, L. (2020). Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*, 130: 108996. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>.

- Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W. M. A. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments *J Proteome Res*, 1 (3). doi: 10.1021/pr301201x.
- Tamime, A. Y. (2009). *Milk Processing and Quality Management*. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C. J. & Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (23): 9263-9275. doi: 10.1007/s00253-019-10175-9.
- Teixeira, J. L. d. P., Baptista, D. P., Orlando, E. A., Gigante, M. L. & Pallone, J. A. L. (2022). Effect of processing on the bioaccessibility of essential minerals in goat and cow milk and dairy products assessed by different static in vitro digestion models. *Food Chemistry*, 374: 131739. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131739>.
- Theobald, H. E. (2005). Dietary calcium and health. *Nutrition Bulletin*, 30 (3): 237-277. doi: 10.1111/j.1467-3010.2005.00514.x.
- Thorning, T. K., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S. S., Givens, I. & Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food Nutr Res*, 60: 32527. doi: 10.3402/fnr.v60.32527.
- TINE. *TINE produkter, melk*. Tilgjengelig fra: <https://www.tine.no/produkter/melk/melk>.
- Torre, M., Rodriguez, A. R. & Saura-Calixto, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 (1): 1-22. doi: 10.1080/10408399109527539.
- Tossavainen, O. & Kallioinen, H. (2007). Proteolytic changes in lactose hydrolysed UHT milks during storage. *Milk Science International* 62 (4): 410-415.
- Troise, A. D., Bandini, E., De Donno, R., Meijer, G., Trezzi, M. & Fogliano, V. (2016). The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Res Int*, 89 (Pt 1): 514-525. doi: 10.1016/j.foodres.2016.08.021.
- Truswell, A. S. (2002). Cereal grains and coronary heart disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (1): 1-14. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601283.
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y. C., Asavajaru, P. & Lam, A. (2017). *Chapter 9 - Pea: A sustainable Vegetable Protein Crop* Sustainable Protein Sources. Canada: Academic Press
- Udomkun, P., Tirawattanawanich, C., Ilukor, J., Sridonpai, P., Njukwe, E., Nimbona, P. & Vanlauwe, B. (2019). Promoting the use of locally produced crops in making cereal-legume-based composite flours: An assessment of nutrient, antinutrient, mineral molar ratios, and aflatoxin content. *Food Chemistry*, 286: 651-658. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.055.
- van der Reijden, O. L., Galetti, V., Bürki, S., Zeder, C., Krzystek, A., Haldimann, M., Berard, J., Zimmermann, M. B. & Herter-Aeberli, I. (2019). Iodine bioavailability from cow milk: a randomized, crossover balance study in healthy iodine-replete adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110 (1): 102-110. doi: 10.1093/ajcn/nqz092.
- Vanga, S. K. & Raghavan, V. (2018). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology*, 55 (1): 10-20. doi: 10.1007/s13197-017-2915-y.

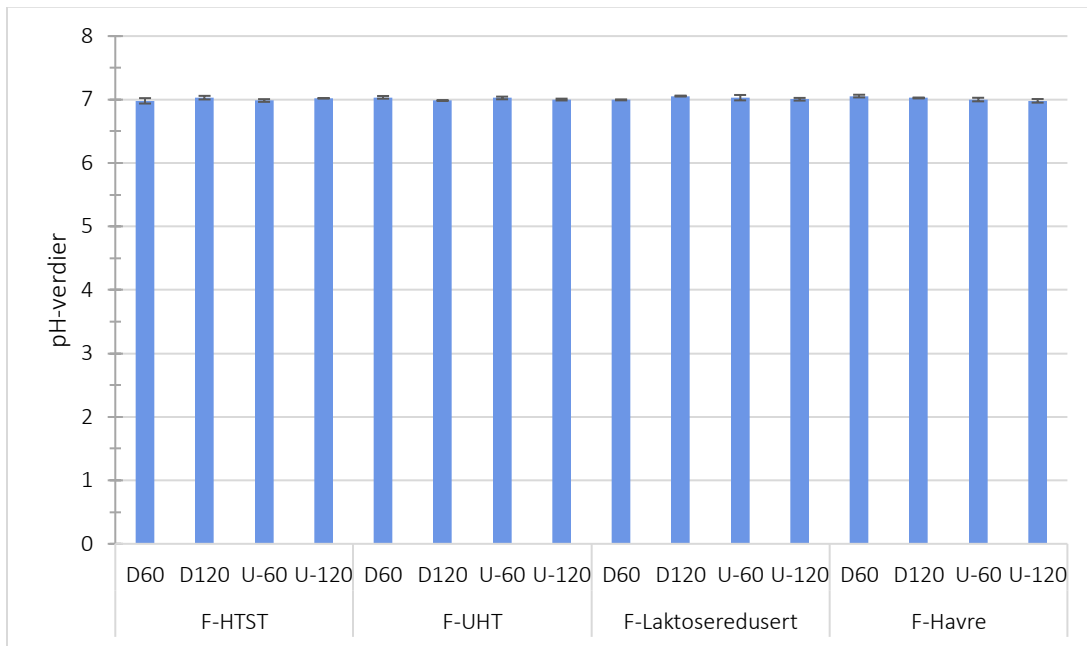
- Verduci, E., D'Elia, S., Cerrato, L., Comberiati, P., Calvani, M., Palazzo, S., Martelli, A., Landi, M., Trikamjee, T. & Peroni, D. G. (2019). Cow's Milk Substitutes for Children: Nutritional Aspects of Milk from Different Mammalian Species, Special Formula and Plant-Based Beverages. *Nutrients*, 11 (8). doi: 10.3390/nu11081739.
- Visser, F. M. W. (1976). Method for the manufacture of rennet-free cheese. *Neth. Milk. Dairy J*, 30: 41-54.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006a). *Dairy Science and Technology. Chapter 1: Milk: Main Characteristics* 2. utg utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006b). *Dairy Science and Technology. Chapter 2: Milk components*. 2. utg utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006c). *Dairy Science and Technology. Chapter 7: Heat Treatment*. 2. utg utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006d). *Dairy Science and Technology. Chapter 9: Homogenization*. 2. utg utg. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group
- Walther, B., Guggisberg, D., Badertscher, R., Egger, L., Portmann, R., Dubois, S., Haldimann, M., Kopf-Bolan, K., Rhyn, P., Zoller, O., et al. (2022). Comparison of nutritional composition between plant-based drinks and cow's milk. *Frontiers in Nutrition*, 9. doi: 10.3389/fnut.2022.988707.
- Wang, X., Ye, A., Lin, Q., Han, J. & Singh, H. (2018). Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *Journal of Dairy Science*, 101 (8): 6842-6852. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14284>.
- Wedekind, J. E. (1989). Characterization of the calcium-phytate complex. *Journal of Dairy Science*, 72 (11): 3003-3011.
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S. & al., e. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet Commissions*, 393 (10170): 447-492.
- Zhang, H., Önnings, G., Triantafyllou, A. Ö. & Öste, R. (2007). Nutritional properties of oat-based beverages as affected by processing and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (12): 2294-2301. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2987>.
- Zhao, Y., Martin, B. R. & Weaver, C. M. (2005). Calcium bioavailability of calcium carbonate fortified soymilk is equivalent to cow's milk in young women. *The Journal of nutrition*, 135 (10): 2379-2382.
- Zhou, H., Zheng, B., Zhang, Z., Zhang, R., He, L. & McClements, D. J. (2021). Fortification of Plant-Based Milk with Calcium May Reduce Vitamin D Bioaccessibility: An In Vitro Digestion Study. *J Agric Food Chem*, 69 (14): 4223-4233. doi: 10.1021/acs.jafc.1c01525.
- Zhou, S., Jia, Q., Cui, L., Dai, Y., Li, R., Tang, J. & Lu, J. (2023). Physical–Chemical and Sensory Quality of Oat Milk Produced Using Different Cultivars. *Foods*, 12 (6): 1165.

VEDLEGG

Oversikt over vedlegg

- Vedlegg 1:** pH etter *in vitro* fordøyelse
- Vedlegg 2:** Utregning av jodinnhold
- Vedlegg 3:** Standardkurve for hydrolysegrad av proteiner
- Vedlegg 4:** Standardkurve for ionisk kalsium
- Vedlegg 5:** Enveis ANOVA: Fytinsyre ~ PrøveID
- Vedlegg 6:** Enveis ANOVA: Totalt kalsiuminnhold ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 7:** Enveis ANOVA: Totalt kalsiuminnhold ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 8:** Enveis ANOVA: Totalt jodinnhold ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 9:** Enveis ANOVA: Totalt kalsiuminnhold ~ Analysemetode
- Vedlegg 10:** Enveis ANOVA: Totalt kalsiuminnhold ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 11:** Enveis ANOVA: Ionisk kalsium ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 12:** Enveis ANOVA: Totalt kalsiuminnhold LM ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 13:** Enveis ANOVA: Jodinnhold HM ~ Prøvefraksjon
- Vedlegg 14:** Enveis ANOVA: Ionisk kalsium LM ~ Prøvefraksjon

Vedlegg 1. pH målinger etter *in vitro* fordøyelse.



Figur A. pH-målinger etter *in vitro* fordøyelse.

Vedlegg 2. Beregning av høy- og lavmolekylær fraksjon og fordøyde prøver for innhold av jod

Formel A:

Jodinnhold i høymolekylær prøve = Resultat fra ICP – MS × vekt av konsentratet (g)

$$\text{HTST D60} = 0.05 \times 1.55 = 0.0760 \mu\text{g/g}$$

Jodinnhold i lavmolekylær prøve

= mengde prøve innveid til sentrifugering × jod i $\mu\text{g/g}$ i fordøyd prøve

jod i $\mu\text{g per g}$ i fordøyd prøve – jod i konsentratet ($\mu\text{g/g}$)

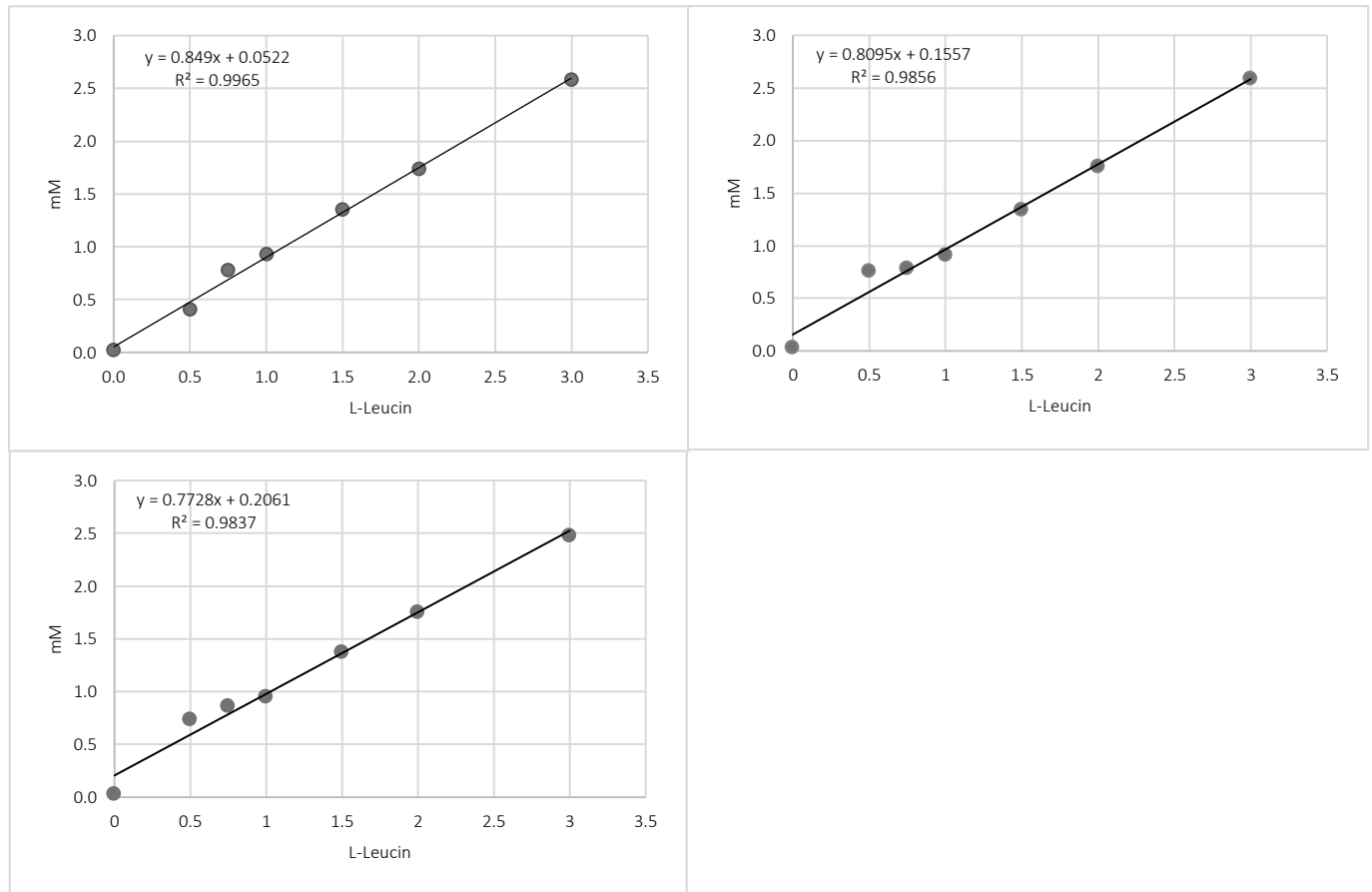
$$\text{HTST D60} = 9.70 \text{ g} \times 0.024375 = 0.2365 \mu\text{g/g}$$

$$0.2365 \mu\text{g/g} - 0.0760 \mu\text{g/g} = 0.161 \mu\text{g/g}$$

Totalt jodinnhold etter fordøyelse = høymolekylær + lavmolekylær

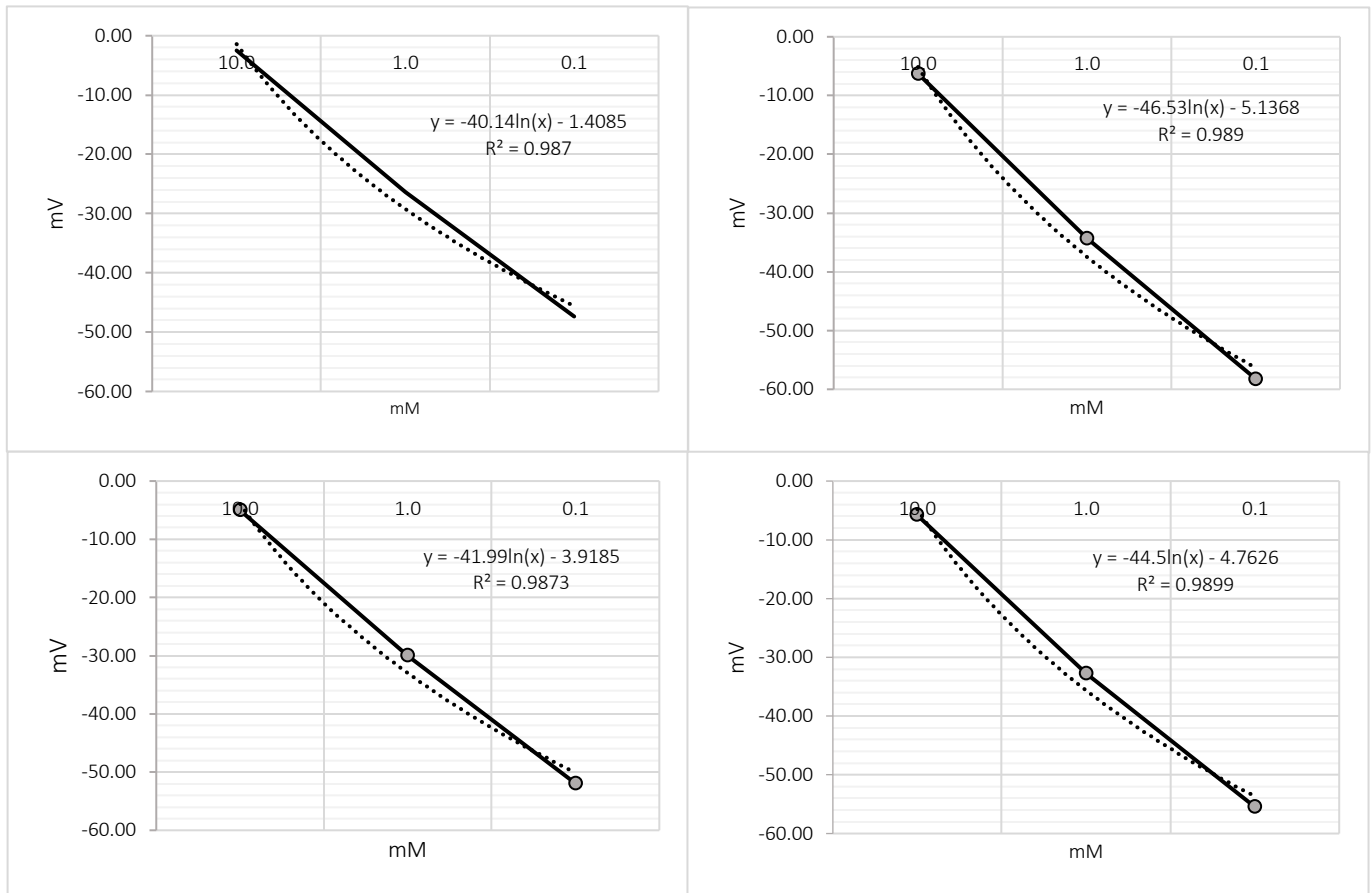
$$0.0760 \mu\text{g/g} + 0.161 \mu\text{g/g} = 0.237 \mu\text{g/g}$$

Vedlegg 3. Standardkurver for hydrolysegrad av proteiner



Figur B. Standardkurve med formel for beregning av hydrolysegrad som mM leucin ekvivalenter/mL prøve.

Vedlegg 4. Standardkurver for ionisk kalsium



Figur C. Standardkurve med formel for beregning av mengde ionisk kalsium som mM.

Vedlegg 5. Enveis ANOVA: Fytinsyre ~ PrøveID

```

> AnovaModel.01 <- aov(Fytinsyre ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.01)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID  3 0.010028 0.003343  374.5 3.27e-07 ***
Residuals 6 0.000054 0.000009
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Fytinsyre, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+           statistics = c("mean",
+                         "sd"))
      mean      sd data:n
Havre 0.0646407 0.004224943    4
HTST  0.0000000 0.000000000    2
Laktose 0.0000000 0.000000000    2
UHT    0.0000000 0.000000000    2
> print(simple.glht(AnovaModel.01, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Fytinsyre ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 3.4617
Minimum significant difference = 0.0097
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value      P(>t)
Havre-HTST  0.054967  0.064641  0.074315  0.002795  23.13 1.88e-06 ***
Havre-Laktose 0.054967  0.064641  0.074315  0.002795  23.13 1.88e-06 ***
Havre-UHT    0.054967  0.064641  0.074315  0.002795  23.13 1.88e-06 ***
HTST-Laktose -0.009674  0.000000  0.009674  0.002795   0.00      1
HTST-UHT    -0.009674  0.000000  0.009674  0.002795   0.00      1
Laktose-UHT -0.009674  0.000000  0.009674  0.002795   0.00      1
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
> TukeyHSD(AnovaModel.01)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Fytinsyre ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havre -6.464070e-02 -0.07359697 -0.05568443 1.4e-06
Laktose-Havre -6.464070e-02 -0.07359697 -0.05568443 1.4e-06
UHT-Havre -6.464070e-02 -0.07359697 -0.05568443 1.4e-06
Laktose-HTST 6.938894e-18 -0.01034181 0.01034181 1.0e+00
UHT-HTST 1.561251e-17 -0.01034181 0.01034181 1.0e+00
UHT-Laktose 8.673617e-18 -0.01034181 0.01034181 1.0e+00

> cld(simple.glht(AnovaModel.01, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Havre 0.0646407 B
UHT 0.0000000 A
Laktose 0.0000000 A
HTST 0.0000000 A

```

Figur D. Output fra enveis ANOVA i RStudio, Fytinsyre ~ PrøveID, samt fra påfølgende Tukey test.

Vedlegg 6. Enveis ANOVA: Kalsium ~ PrøveID

```
> AnovaModel.35 <- aov(Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
>
>
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Kalsium, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+           statistics = c("mean",
+                         "sd"))
+
      mean      sd data:n
Havredrikk 103.9867 0.7655935    3
HTST       144.8400 0.5381450    3
Laktoseredusert 144.0933 0.8857389    3
UHT        143.1500 0.7196527    3
> print(simple.glht(AnovaModel.35, 'PrøveID', level = 0.95))
```

Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 3.2024

Minimum significant difference = 1.9295

95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
Havredrikk-HTST	-42.7828	-40.8533	-38.9239	0.6025	-67.804	4.53e-13 ***
Havredrikk-Laktoseredusert	-42.0361	-40.1067	-38.1772	0.6025	-66.565	6.86e-13 ***
Havredrikk-UHT	-41.0928	-39.1633	-37.2339	0.6025	-64.999	1.17e-12 ***
HTST-Laktoseredusert	-1.1828	0.7467	2.6761	0.6025	1.239	0.6216
HTST-UHT	-0.2395	1.6900	3.6195	0.6025	2.805	0.0876 .
Laktoseredusert-UHT	-0.9861	0.9433	2.8728	0.6025	1.566	0.4468

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> TukeyHSD(AnovaModel.05)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

\$PrøveID

	diff	lwr	upr	p adj
HTST-Havre	40.8533333	38.925528	42.7811386	0.0000000
Laktose-Havre	40.1066667	38.178861	42.0344719	0.0000000
UHT-Havre	39.1600000	37.232195	41.0878053	0.0000000
Laktose-HTST	-0.7466667	-2.674472	1.1811386	0.6210397
UHT-HTST	-1.6933333	-3.621139	0.2344719	0.0866417
UHT-Laktose	-0.9466667	-2.874472	0.9811386	0.4433898

```
> cld(simple.glht(AnovaModel.05, 'PrøveID', level = 0.95))
```

Tukey's HSD

Alpha: 0.05

	Mean	G1	G2
HTST	144.8400	A	
Laktose	144.0933	A	
UHT	143.1467	A	
Havre	103.9867	B	

Figur E. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Kalsium ~ PrøveID, samt påfølgende Tukey test.

Vedlegg 7. Enveis ANOVA: Kalsiuminnhold ~ PrøveID

```

> AnovaModel.02 <- aov(Kalsiuminnhold ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.02)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID    3 1995.4   665.1   48.82 0.00131 **
Residuals  4   54.5    13.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Kalsiuminnhold, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Havre   85.5 2.121320     2
HTST   125.0 7.071068     2
Laktoseredusert 120.0 0.000000     2
UHT    120.0 0.000000     2
> print(simple.glht(AnovaModel.02, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Kalsiuminnhold ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 15.0264
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
Havre-HTST      -54.526 -39.500 -24.474  3.691 -10.701 0.00151 **
Havre-Laktoseredusert -49.526 -34.500 -19.474  3.691 -9.347 0.00254 **
Havre-UHT        -49.526 -34.500 -19.474  3.691 -9.347 0.00254 **
HTST-Laktoseredusert  -10.026  5.000  20.026  3.691  1.355 0.58145
HTST-UHT         -10.026  5.000  20.026  3.691  1.355 0.58145
Laktoseredusert-UHT  -15.026  0.000  15.026  3.691  0.000 1.00000
---
> TukeyHSD(AnovaModel.02)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Kalsiuminnhold ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havre      39.5 24.47364 54.52636 0.0015101
Laktoseredusert-Havre 34.5 19.47364 49.52636 0.0025436
UHT-Havre        34.5 19.47364 49.52636 0.0025436
Laktoseredusert-HTST  -5.0 -20.02636 10.02636 0.5814470
UHT-HTST         -5.0 -20.02636 10.02636 0.5814470
UHT-Laktoseredusert  0.0 -15.02636 15.02636 1.0000000

> cld(simple.glht(AnovaModel.02, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
HTST   125.0 A
UHT    120.0 A
Laktoseredusert 120.0 A
Havre   85.5 B

```

Figur F. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Kalsiuminnhold ~ PrøveID, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 8. Enveis ANOVA: Jod ~ PrøveID

```

> AnovaModel.20 <- aov(Jod ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.20)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID   3 0.0008917 0.0002972  2.277 0.222
Residuals 4 0.0005221 0.0001305
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Havredrikk 0.14745 0.0058689863  2
HTST       0.15320 0.0084852814  2
Laktoseredusert 0.13080 0.0203646753  2
UHT        0.15910 0.0009899495  2
> print(simple.glht(AnovaModel.20, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 0.0465
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
Havredrikk-HTST      -0.05226 -0.00575  0.04076  0.01142  -0.503 0.954
Havredrikk-Laktoseredusert -0.02986  0.01665  0.06316  0.01142   1.457 0.533
Havredrikk-UHT        -0.05816 -0.01165  0.03486  0.01142  -1.020 0.749
HTST-Laktoseredusert  -0.02411  0.02240  0.06891  0.01142   1.961 0.334
HTST-UHT              -0.05241 -0.00590  0.04061  0.01142  -0.516 0.951
Laktoseredusert-UHT   -0.07481 -0.02830  0.01821  0.01142  -2.477 0.203
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.20)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
          diff          lwr          upr          p adj
HTST-Havredrikk      0.00575 -0.04076052  0.05226052  0.9541086
Laktoseredusert-Havredrikk -0.01665 -0.06316052  0.02986052  0.5326872
UHT-Havredrikk       0.01165 -0.03486052  0.05816052  0.7488426
Laktoseredusert-HTST -0.02240 -0.06891052  0.02411052  0.3343504
UHT-HTST             0.00590 -0.04061052  0.05241052  0.9508184
UHT-Laktoseredusert  0.02830 -0.01821052  0.07481052  0.2032057

> cld(simple.glht(AnovaModel.20, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1
UHT      0.15910 A
HTST     0.15320 A
Havredrikk 0.14745 A
Laktoseredusert 0.13080 A

```

Figur G. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod ~ PrøveID, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 9. Enveis ANOVA: Kalsiuminnhold ~ Analyse

```
> AnovaModel.03 <- aov(Kalsiuminnhold ~ Analyse, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.03)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Analyse    1  2196   2196.5   6.978 0.0166 *
Residuals 18  5666   314.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Kalsiuminnhold, groups = Samlet_resultater_MVIT$Analyse,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Analyse 1 134.0167 18.13052   12
Analyse 2 112.6250 17.11255    8
>
> print(simple.glt(AnovaModel.03, 'Analyse', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Kalsiuminnhold ~ Analyse, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 2.1009
Minimum significant difference = 17.013
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
Analyse 1-Analyse 2  4.379 21.392 38.405   8.098  2.642 0.0166 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

WARNING: Unbalanced data may lead to poor estimates
> TukeyHSD(AnovaModel.03)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Kalsiuminnhold ~ Analyse, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Analyse
          diff      lwr      upr      p adj
Analyse 2-Analyse 1 -21.39167 -38.4047 -4.378636 0.0165793

> cld(simple.glt(AnovaModel.03, 'Analyse', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Analyse 1 134.0167 B
Analyse 2 112.6250 A
```

Figur H. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Kalsiuminnhold ~ Analyse, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 10. Enveis ANOVA: TotaltCa ~ Prøvefraksjon

10.1 HTST

```
> AnovaModel.2 <- aov(TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.2)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Prøvefraksjon  3  825.1   275.02   162.7 0.000124 ***
Residuals     4    6.8     1.69
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$TotalCa, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120  132.04 1.5839192     2     0
D60   136.68 1.4707821     2     0
K120  156.56 1.2445079     2     0
K60   151.64 0.7353911     2     0
LM-D120  NaN      NA      0     2
LM-D60   NaN      NA      0     2
> print(simple.glht(AnovaModel.2, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709

Minimum significant difference = 5.2927

95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
D120-D60	-9.9327	-4.6400	0.6527	1.3002	-3.569	0.075390 .
D120-K120	-29.8127	-24.5200	-19.2273	1.3002	-18.859	0.000177 ***
D120-K60	-24.8927	-19.6000	-14.3073	1.3002	-15.075	0.000394 ***
D60-K120	-25.1727	-19.8800	-14.5873	1.3002	-15.290	0.000373 ***
D60-K60	-20.2527	-14.9600	-9.6673	1.3002	-11.506	0.001139 **
K120-K60	-0.3727	4.9200	10.2127	1.3002	3.784	0.062983 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> TukeyHSD(AnovaModel.2)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

```
$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr    p adj
D60-D120  4.64 -0.6527378  9.9327378 0.0753899
K120-D120 24.52 19.2272622 29.8127378 0.0001771
K60-D120  19.60 14.3072622 24.8927378 0.0003936
K120-D60  19.88 14.5872622 25.1727378 0.0003726
K60-D60   14.96  9.6672622 20.2527378 0.0011387
K60-K120  -4.92 -10.2127378  0.3727378 0.0629831
```

```
> cld(simple.glht(AnovaModel.2, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Tukey's HSD

Alpha: 0.05

	Mean	G1	G2
K120	156.56	A	
K60	151.64	A	
D60	136.68	B	
D120	132.04	B	

Figur 1. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. TotaltCa ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

10.2 Laktoseredusert

```
> AnovaModel.10 <- aov(TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.10)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 1577.7   525.9   57.42 0.000958 ***
Residuals     4   36.6    9.2
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$TotalCa, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                            "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120  186.72 5.9396970      2      0
D60   175.08 0.5656854      2      0
K120  155.52 0.0000000      2      0
K60   152.72 1.0182338      2      0
LM-D120  NaN      NA      0      2
LM-D60   NaN      NA      0      2
> print(simple.gLht(AnovaModel.10, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 12.3201
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.6801 11.6400 23.9601 3.0264 3.846 0.05987 .
D120-K120 18.8799 31.2000 43.5201 3.0264 10.309 0.00174 **
D120-K60  21.6799 34.0000 46.3201 3.0264 11.234 0.00125 **
D60-K120  7.2399 19.5600 31.8801 3.0264 6.463 0.01013 *
D60-K60  10.0399 22.3600 34.6801 3.0264 7.388 0.00619 **
K120-K60 -9.5201 2.8000 15.1201 3.0264 0.925 0.79487
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.10)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -11.64 -23.96011  0.680105 0.0598686
K120-D120 -31.20 -43.52011 -18.879895 0.0017447
K60-D120  -34.00 -46.32011 -21.679895 0.0012500
K120-D60  -19.56 -31.88011  -7.239895 0.0101311
K60-D60   -22.36 -34.68011 -10.039895 0.0061855
K60-K120  -2.80 -15.12011  9.520105 0.7948670

> cld(simple.gLht(AnovaModel.10, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
D120 186.72  B
D60  175.08  B
K120 155.52  A
K60  152.72  A
```

Figur J. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. TotalCa ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

10.3 Havredrikk

```
> AnovaModel.14 <- aov(TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.14)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon 3 177.37   59.12   55.57 0.00102 **
Residuals     4   4.26    1.06
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$TotalCa, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                            "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120  95.04 0.9616652      2      0
D60   107.52 1.0748023      2      0
K120  104.40 0.1131371      2      0
K60   104.72 1.4707821      2      0
LM-D120  NaN      NA      0      2
LM-D60   NaN      NA      0      2
> print(simple.gLht(AnovaModel.14, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 4.1991
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -16.679 -12.480 -8.281  1.032 -12.099 0.000935 ***
D120-K120 -13.559 -9.360 -5.161  1.032 -9.074 0.002848 **
D120-K60  -13.879 -9.680 -5.481  1.032 -9.384 0.002505 **
D60-K120  -1.079  3.120  7.319  1.032  3.025 0.121664
D60-K60   -1.399  2.800  6.999  1.032  2.714 0.162160
K120-K60  -4.519 -0.320  3.879  1.032 -0.310 0.988158
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.14)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = TotalCa ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 12.48  8.280898 16.679102 0.0009354
K120-D120  9.36  5.160898 13.559102 0.0028481
K60-D120  9.68  5.480898 13.879102 0.0025046
K120-D60  -3.12 -7.319102  1.079102 0.1216639
K60-D60   -2.80 -6.999102  1.399102 0.1621599
K60-K120  0.32 -3.879102  4.519102 0.9881581

> cld(simple.gLht(AnovaModel.14, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
      Tukey's HSD
      Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
D60  107.52 A
K60  104.72 A
K120 104.40 A
D120  95.04 B
```

Figur K. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. TotalCa ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

10.4 Forskjell mellom prøver

```

> AnovaModel.17 <- aov(Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.17)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
PrøveID   3  18029    6010    24.04 6.67e-08 ***
Residuals 28   6999     250
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Kalsium, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+           statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Havre 102.68 5.110974     8
HTST  144.10 10.813008     8
Laktose 167.51 15.186005     8
UHT   149.53 25.024475     8
> print(simple.glt(AnovaModel.17, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 2.7303
Minimum significant difference = 21.5837
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center Upper Std.Err t value  P(>t)
Havre-HTST  -63.004 -41.420 -19.836  7.905  -5.240 8.12e-05 ***
Havre-Laktose -86.414 -64.830 -43.246  7.905  -8.201 3.69e-08 ***
Havre-UHT    -68.434 -46.850 -25.266  7.905  -5.926 1.28e-05 ***
HTST-Laktose -44.994 -23.410  -1.826  7.905  -2.961 0.0297 *
HTST-UHT     -27.014  -5.430  16.154  7.905  -0.687 0.9012
Laktose-UHT  -3.604  17.980  39.564  7.905   2.274 0.1284
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.17)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havre  41.42 19.836262 63.003738 0.0000812
Laktose-Havre 64.83 43.246262 86.413738 0.0000000
UHT-Havre    46.85 25.266262 68.433738 0.0000128
Laktose-HTST 23.41  1.826262 44.993738 0.0296909
UHT-HTST     5.43 -16.153738 27.013738 0.9012256
UHT-Laktose -17.98 -39.563738  3.603738 0.1284352

> cld(simple.glt(AnovaModel.17, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
Laktose 167.51 A
UHT     149.53 A B
HTST    144.10 B
Havre   102.68 C

```

Figur L. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Kalsium ~ PrøveID, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 11. Enveis ANOVA: Ionisk kalsium ~ Prøvefraksjon

11.1 HTST

```
> AnovaModel.13 <- aov(Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.13)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 0.3770  0.12565   10.97 0.0212 *
Residuals     4 0.0458  0.01145
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Resultat, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
D120 2.35 0.02828427      2
D60  2.25 0.02828427      2
K120 1.96 0.15556349      2
K60  1.81 0.14142136      2
> print(simple.glht(AnovaModel.13, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 0.4356
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper  Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.335601  0.100000  0.535601  0.107005  0.935 0.7904
D120-K120 -0.045601  0.390000  0.825601  0.107005  3.645 0.0707 .
D120-K60  0.104399  0.540000  0.975601  0.107005  5.047 0.0244 *
D60-K120 -0.145601  0.290000  0.725601  0.107005  2.710 0.1628
D60-K60  0.004399  0.440000  0.875601  0.107005  4.112 0.0484 *
K120-K60 -0.285601  0.150000  0.585601  0.107005  1.402 0.5588
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukeyHSD(AnovaModel.13)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -0.10 -0.5356005  0.335600512 0.7904037
K120-D120 -0.39 -0.8256005  0.045600512 0.0707165
K60-D120 -0.54 -0.9756005 -0.104399488 0.0244172
K120-D60 -0.29 -0.7256005  0.145600512 0.1628207
K60-D60 -0.44 -0.8756005 -0.004399488 0.0484099
K60-K120 -0.15 -0.5856005  0.285600512 0.5587524

> cld(simple.glht(AnovaModel.13, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
D120 2.35  B
D60  2.25  B
K120 1.96  A B
K60  1.81  A
```

Figur M. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Resultat ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

11.2 UHT

```

> AnovaModel.14 <- aov(Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.14)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3  0.3796  0.12655   30.04 0.00334 **
Residuals      4  0.0168  0.00421
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary(AnovaModel.14)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3  0.3796  0.12655   30.04 0.00334 **
Residuals      4  0.0168  0.00421
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Resultat, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
D120 2.360 0.04242641      2
D60  2.140 0.04242641      2
K120 2.360 0.08485281      2
K60  2.745 0.07778175      2
> print(simple.glt(AnovaModel.14, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 0.2642
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -4.421e-02  2.200e-01  4.842e-01  6.490e-02  3.390 0.08792 .
D120-K120 -2.642e-01  4.441e-16  2.642e-01  6.490e-02  0.000 1.00000
D120-K60  -6.492e-01 -3.850e-01 -1.208e-01  6.490e-02 -5.932 0.01382 *
D60-K120  -4.842e-01 -2.200e-01  4.421e-02  6.490e-02 -3.390 0.08792 .
D60-K60   -8.692e-01 -6.050e-01 -3.408e-01  6.490e-02 -9.321 0.00257 **
K120-K60  -6.492e-01 -3.850e-01 -1.208e-01  6.490e-02 -5.932 0.01382 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.14)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Resultat ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -2.200000e-01 -0.48421386  0.04421386  0.0879242
K120-D120 -4.440892e-16 -0.26421386  0.26421386  1.0000000
K60-D120  3.850000e-01  0.12078614  0.64921386  0.0138180
K120-D60  2.200000e-01 -0.04421386  0.48421386  0.0879242
K60-D60   6.050000e-01  0.34078614  0.86921386  0.0025699
K60-K120  3.850000e-01  0.12078614  0.64921386  0.0138180

> cld(simple.glt(AnovaModel.14, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
K60  2.745  A
D120 2.360  B
K120 2.360  B
D60  2.140  B

```

Figur N. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Resultat~Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

11.3 Havredrikk

```
> AnovaModel.16 <- aov(Ionisk ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.16)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 1.5082  0.5027  22.71 0.00566 **
Residuals     4 0.0885  0.0221
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Ionisk, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                            "sd"))
+
      mean      sd data:n data:NA
D120  2.985 0.2192031     2      0
D60   2.465 0.0212132     2      0
K120  2.000 0.1697056     2      0
K60   1.885 0.1060660     2      0
LM-D120 NaN      NA     0      2
LM-D60  NaN      NA     0      2
> print(simple.glht(AnovaModel.16, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Ionisk ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709

Minimum significant difference = 0.6057

95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
D120-D60	-0.08569	0.52000	1.12569	0.14879	3.495	0.00029 .
D120-K120	0.37931	0.98500	1.59069	0.14879	6.620	0.00028 **
D120-K60	0.49431	1.10000	1.70569	0.14879	7.393	0.00017 **
D60-K120	-0.14069	0.46500	1.07069	0.14879	3.125	0.01108
D60-K60	-0.02569	0.58000	1.18569	0.14879	3.898	0.00073 .
K120-K60	-0.49069	0.11500	0.72069	0.14879	0.773	0.86327

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> TukeyHSD(AnovaModel.16)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Ionisk ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

\$Prøvefraksjon

	diff	lwr	upr	p adj
D60-D120	-0.520	-1.1256893	0.08568933	0.0002883
K120-D120	-0.985	-1.5906893	-0.37931067	0.0002795
K60-D120	-1.100	-1.7056893	-0.49431067	0.0001704
K120-D60	-0.465	-1.0706893	0.14068933	0.1110803
K60-D60	-0.580	-1.1856893	0.02568933	0.0573913
K60-K120	-0.115	-0.7206893	0.49068933	0.8632682

```
> cld(simple.glht(AnovaModel.16, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Tukey's HSD
Alpha: 0.05

	Mean	G1	G2
D120	2.985		B
D60	2.465	A	B
K120	2.000	A	
K60	1.885	A	

Figur O. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Ionisk ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

11.4 Forskjell mellom prøver

```

> AnovaModel.19 <- aov(Ionisk ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.19)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID   3  1.258   0.4192   6.854 0.00132 **
Residuals 28  1.712   0.0612
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Ionisk, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+           statistics = c("mean",
+                          "sd"))
      mean      sd data:n
Havre  2.49625 0.3425925    8
HTST   2.09250 0.2457496    8
Laktose 2.02875 0.1010569    8
UHT    2.40125 0.2379938    8
> print(simple.glht(AnovaModel.19, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Ionisk ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 2.7303
Minimum significant difference = 0.3376
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower   Center   Upper  Std.Err t value  P(>t)
Havre-HTST  0.06616  0.40375  0.74134  0.12365  3.265 0.01444 *
Havre-Laktose 0.12991  0.46750  0.80509  0.12365  3.781 0.00397 **
Havre-UHT   -0.24259  0.09500  0.43259  0.12365  0.768 0.86800
HTST-Laktose -0.27384  0.06375  0.40134  0.12365  0.516 0.95467
HTST-UHT   -0.64634 -0.30875  0.02884  0.12365 -2.497 0.08230 .
Laktose-UHT -0.71009 -0.37250 -0.03491  0.12365 -3.013 0.02636 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukeyHSD(AnovaModel.19)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Ionisk ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havre -0.40375 -0.74134399 -0.06615601 0.0144380
Laktose-Havre -0.46750 -0.80509399 -0.12990601 0.0039654
UHT-Havre    -0.09500 -0.43259399  0.24259399 0.8679987
Laktose-HTST -0.06375 -0.40134399  0.27384399 0.9546688
UHT-HTST     0.30875 -0.02884399  0.64634399 0.0822966
UHT-Laktose   0.37250  0.03490601  0.71009399 0.0263594

> cld(simple.glht(AnovaModel.19, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
Havre  2.49625      C
UHT    2.40125  A   C
HTST   2.09250  A  B
Laktose 2.02875      B

```

Figur P. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Ionisk ~ PrøveID, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 12. Enveis ANOVA: Totalt kalsium, lavmolekylær ~ Prøvefraksjon

12.1 HTST

```
> AnovaModel.3 <- aov(Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.3)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)    
Prøvefraksjon 3 2898.2   966.1    163 0.000123 ***
Residuals    4    23.7     5.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Lavmolekylær, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+           statistics = c("mean",
+                          "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120 125.9200 0.3775950      2      0
D60  110.0800 0.7537758      2      0
K120  85.8650 4.3769910      2      0
K60   78.1865 1.9608071      2      0
LM-D120      NA      NA      0      2
LM-D60      NA      NA      0      2
> print(simple.gIht(AnovaModel.3, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 9.9118
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value    P(>t)
D120-D60  5.928 15.840 25.752  2.435  6.506 0.009892 **
D120-K120 30.143 40.055 49.967  2.435 16.451 0.000283 ***
D120-K60  37.822 47.734 57.645  2.435 19.604 0.000157 ***
D60-K120  14.303 24.215 34.127  2.435  9.945 0.002004 **
D60-K60   21.982 31.894 41.805  2.435 13.099 0.000684 ***
K120-K60  -2.233  7.678 17.590  2.435  3.154 0.108290
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.3)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr    p adj
D60-D120 -15.8400 -25.75184 -5.928164 0.0098916
K120-D120 -40.0550 -49.96684 -30.143164 0.0002826
K60-D120  -47.7335 -57.64534 -37.821664 0.0001571
K120-D60  -24.2150 -34.12684 -14.303164 0.0020042
K60-D60   -31.8935 -41.80534 -21.981664 0.0006842
K60-K120  -7.6785 -17.59034  2.233336 0.1082904

> cld(simple.gIht(AnovaModel.3, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
D120 125.9200      C
D60  110.0800      B
K120  85.8650      A
K60   78.1865      A
```

Figur Q. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

12.2 UHT

```
> AnovaModel.7 <- aov(Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.7)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon 3 2284.4   761.5    53.1 0.00112 **
Residuals     4   57.4    14.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Lavmolekylær, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+           statistics = c("mean",
+                         "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120 104.0530 7.0144993      2      0
D60  101.2800 0.5275017      2      0
K120  76.2700 2.2627417      2      0
K60   63.8935 1.6595796      2      0
LM-D120      NA      NA      0      2
LM-D60      NA      NA      0      2
> print(simple.glht(AnovaModel.7, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 15.415
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -12.642  2.773 18.188  3.787  0.732 0.87979
D120-K120 12.368 27.783 43.198  3.787  7.337 0.00635 **
D120-K60  24.744 40.160 55.575  3.787 10.605 0.00156 **
D60-K120  9.595 25.010 40.425  3.787  6.605 0.00936 **
D60-K60  21.971 37.387 52.802  3.787  9.873 0.00206 **
K120-K60 -3.039 12.377 27.792  3.787  3.268 0.09777 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.7)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -2.7730 -18.18801 12.642009 0.8797867
K120-D120 -27.7830 -43.19801 -12.367991 0.0063478
K60-D120  -40.1595 -55.57451 -24.744491 0.0015636
K120-D60  -25.0100 -40.42501  -9.594991 0.0093594
K60-D60   -37.3865 -52.80151 -21.971491 0.0020611
K60-K120  -12.3765 -27.79151  3.038509 0.0977737

> cld(simple.glht(AnovaModel.7, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
D120 104.0530 B
D60  101.2800 B
K120  76.2700 A
K60   63.8935 A
```

Figur R. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

12.3 Laktoseredusert

```
> AnovaModel.11 <- aov(Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.11)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 1676.7   558.9   18.66 0.00815 **
Residuals      4  119.8    29.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
4 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Lavmolekylær, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("Mean",
+                            "sd"))
              sd n NA
D120    4.449823 2  0
D60     5.883128 2  0
K120    1.202082 2  0
K60     7.995256 2  0
LM-D120      NA 0  2
LM-D60       NA 0  2
> print(simple.glht(AnovaModel.11, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 22.2767
95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
D120-D60	-21.6902	0.5865	22.8632	5.4722	0.107	0.9995
D120-K120	2.9498	25.2265	47.5032	5.4722	4.610	0.0332 *
D120-K60	10.0963	32.3730	54.6497	5.4722	5.916	0.0140 *
D60-K120	2.3633	24.6400	46.9167	5.4722	4.503	0.0359 *
D60-K60	9.5098	31.7865	54.0632	5.4722	5.809	0.0149 *
K120-K60	-15.1302	7.1465	29.4232	5.4722	1.306	0.6052

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```
> TukeyHSD(AnovaModel.11)
```

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

\$Prøvefraksjon

	diff	lwr	upr	p adj
D60-D120	-0.5865	-22.86316	21.690159	0.9994843
K120-D120	-25.2265	-47.50316	-2.949841	0.0332288
K60-D120	-32.3730	-54.64966	-10.096341	0.0139524
K120-D60	-24.6400	-46.91666	-2.363341	0.0359490
K60-D60	-31.7865	-54.06316	-9.509841	0.0148959
K60-K120	-7.1465	-29.42316	15.130159	0.6052207

```
> cld(simple.glht(AnovaModel.11, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
```

Tukey's HSD
Alpha: 0.05

	Mean	G1	G2
D120	122.5065		B
D60	121.9200		B
K120	97.2800	A	
K60	90.1335	A	

Figur 5. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Lavmolekylær ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

12.4 Forskjell mellom prøvene

```
> AnovaModel.18 <- aov(Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.18)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID  3  7832  2610.8   9.297 0.000198 ***
Residuals 28  7863   280.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Kalsium, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+           statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Havre  66.38712  8.665401    8
HTST   99.26250 21.376905    8
Laktose 107.95913 16.020564    8
UHT    86.37325 18.291501    8
> print(simple.glt(AnovaModel.18, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 2.7303
Minimum significant difference = 22.877
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
Havre-HTST -55.752 -32.875 -9.998  8.379 -3.924 0.002741 **
Havre-Laktose -64.449 -41.572 -18.695  8.379 -4.962 0.000172 ***
Havre-UHT -42.863 -19.986  2.891  8.379 -2.385 0.103312
HTST-Laktose -31.574 -8.697 14.180  8.379 -1.038 0.728943
HTST-UHT -9.988 12.889 35.766  8.379  1.538 0.429086
Laktose-UHT -1.291 21.586 44.463  8.379  2.576 0.069729 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
> TukeyHSD(AnovaModel.18)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Kalsium ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havre  32.875375  9.998334 55.752416 0.0027414
Laktose-Havre 41.572000 18.694959 64.449041 0.0001723
UHT-Havre  19.986125 -2.890916 42.863166 0.1033119
Laktose-HTST  8.696625 -14.180416 31.573666 0.7289425
UHT-HTST -12.889250 -35.766291  9.987791 0.4290864
UHT-Laktose -21.585875 -44.462916  1.291166 0.0697291

> cld(simple.glt(AnovaModel.18, 'PrøveID', level = 0.95))
      Tukey's HSD
      Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Laktose 107.95913 A
HTST    99.26250 A
UHT     86.37325 A B
Havre   66.38712 B
```

Figur T. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Kalsium ~ PrøveID, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 13. Enveis ANOVA: Jodinnhold, høymolekylær ~ Prøvefraksjon

13.1 HTST

```
> AnovaModel.21 <- aov(Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.21)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 0.002502 0.000834  49.11  0.02 *
Residuals     2 0.000034 0.000017
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
10 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod1, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120 0.05700 0.003394113      2      0
D60  0.07935 0.004737615      2      0
K120 0.07370      NA      1      1
K60  0.11800      NA      1      1
> print(simple.glt(AnovaModel.21, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 6.9289
Minimum significant difference = 0.035
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.057321 -0.022350  0.012621  0.005047 -4.428 0.1153
D120-K120 -0.051671 -0.016700  0.018271  0.005047 -3.309 0.1915
D120-K60  -0.095971 -0.061000 -0.026029  0.005047 -12.086 0.0170 *
D60-K120  -0.029321  0.005650  0.040621  0.005047  1.119 0.7168
D60-K60   -0.073621 -0.038650 -0.003679  0.005047 -7.658 0.0413 *
K120-K60  -0.079271 -0.044300 -0.009329  0.005047 -8.777 0.0317 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
> TukeyHSD(AnovaModel.21)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120  0.02235 -0.006204071  0.05090407  0.0794637
K120-D120  0.01670 -0.018271453  0.05167145  0.1914890
K60-D120   0.06100  0.026028547  0.09597145  0.0169907
K120-D60  -0.00565 -0.040621453  0.02932145  0.7167598
K60-D60    0.03865  0.003678547  0.07362145  0.0412583
K60-K120   0.04430  0.003918445  0.08468156  0.0418513

> cld(simple.glt(AnovaModel.21, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
K60  0.11800 A
D60  0.07935 B
K120 0.07370 B
D120 0.05700 B
```

Figur U. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod1 ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

13.2 Laktoseredusert

```

> AnovaModel.23 <- aov(Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.23)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 0.001708 0.0005693   142 0.007 **
Residuals    2 0.000008 0.0000040
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
6 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod1, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+           statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120 0.0388 0.0001414214      2      0
D60  0.0790 0.0028284271      2      0
K120 0.0488          NA      1      1
K60  0.0604          NA      1      1
LM-D120  NaN          NA      0      2
LM-D60  NaN          NA      0      2
> print(simple.gLht(AnovaModel.23, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 6.9289
Minimum significant difference = 0.017
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.057194 -0.040200 -0.023206 0.002453 -16.391 0.00951 **
D120-K120 -0.026994 -0.010000 0.006994 0.002453 -4.077 0.13361
D120-K60  -0.038594 -0.021600 -0.004606 0.002453 -8.807 0.03147 *
D60-K120  0.013206 0.030200 0.047194 0.002453 12.314 0.01639 *
D60-K60   0.001606 0.018600 0.035594 0.002453 7.584 0.04204 *
K120-K60 -0.028594 -0.011600 0.005394 0.002453 -4.730 0.10230
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
> TukeyHSD(AnovaModel.23)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod1 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 0.0402 0.026324795 0.054075205 0.0063659
K120-D120 0.0100 -0.006993586 0.026993586 0.1336085
K60-D120  0.0216 0.004606414 0.038593586 0.0314723
K120-D60 -0.0302 -0.047193586 -0.013206414 0.0163866
K60-D60  -0.0186 -0.035593586 -0.001606414 0.0420361
K60-K120 0.0116 -0.008022503 0.031222503 0.1325288

> cld(simple.gLht(AnovaModel.23, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
D60 0.0790 B
K60 0.0604 A
K120 0.0488 A C
D120 0.0388 C

```

Figur V. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod1 ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

Vedlegg 14. Enveis ANOVA: Jodinnhold, lavmolekylær ~ Prøvefraksjon

14.1 HTST

```
> AnovaModel.25 <- aov(Jod2 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)
> summary(AnovaModel.25)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon  3 0.004789 0.0015965   220.2 0.00452 **
Residuals      2 0.000014 0.0000072
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
10 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod2, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
+
      mean      sd data:n data:NA
D120 0.1805 0.003535534      2      0
D60  0.1600 0.001414214      2      0
K120 0.1460          NA      1      1
K60  0.0970          NA      1      1
> print(simple.glt(AnovaModel.25, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod2 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 6.9289
Minimum significant difference = 0.0228
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.002350 0.020500 0.043350 0.003298  6.216 0.06148 .
D120-K120 0.011650 0.034500 0.057350 0.003298 10.462 0.02251 *
D120-K60  0.060650 0.083500 0.106350 0.003298 25.320 0.00342 **
D60-K120 -0.008850 0.014000 0.036850 0.003298  4.245 0.12435
D60-K60   0.040150 0.063000 0.085850 0.003298 19.104 0.00706 **
K120-K60  0.026150 0.049000 0.071850 0.003298 14.859 0.01143 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.25)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod2 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -0.0205 -0.03915676 -0.001843240 0.0417221
K120-D120 -0.0345 -0.05734977 -0.011650228 0.0225054
K60-D120  -0.0835 -0.10634977 -0.060650228 0.0034215
K120-D60  -0.0140 -0.03684977  0.008849772 0.1243493
K60-D60   -0.0630 -0.08584977 -0.040150228 0.0070646
K60-K120  -0.0490 -0.07538464 -0.022615356 0.0150488

> cld(simple.glt(AnovaModel.25, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
D120 0.1805      C
D60  0.1600      B C
K120 0.1460      B
K60  0.0970      A
```

Figur W. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod2 ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

14.2 Laktoseredusert

```
> summary(AnovaModel.26)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prøvefraksjon 3 0.0007883 0.0002628  30.91 0.0315 *
Residuals    2 0.0000170 0.0000085
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
6 observations deleted due to missingness
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod2, groups = Samlet_resultater_MVIT$Prøvefraksjon,
+           statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n data:NA
D120 0.1555 0.002121320      2      0
D60  0.1325 0.003535534      2      0
K120 0.1620      NA      1      1
K60  0.1480      NA      1      1
LM-D120  NaN      NA      0      2
LM-D60  NaN      NA      0      2
> print(simple.glt(AnovaModel.26, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod2 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 6.9289
Minimum significant difference = 0.0247
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value P(>t)
D120-D60 -0.001741 0.023000 0.047741 0.003571 6.441 0.0575 .
D120-K120 -0.031241 -0.006500 0.018241 0.003571 -1.820 0.4562
D120-K60 -0.017241 0.007500 0.032241 0.003571 2.100 0.3810
D60-K120 -0.054241 -0.029500 -0.004759 0.003571 -8.262 0.0356 *
D60-K60 -0.040241 -0.015500 0.009241 0.003571 -4.341 0.1195
K120-K60 -0.010741 0.014000 0.038741 0.003571 3.921 0.1432
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
> TukeyHSD(AnovaModel.26)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod2 ~ Prøvefraksjon, data = Samlet_resultater_MVIT)

$Prøvefraksjon
      diff      lwr      upr      p adj
D60-D120 -0.0230 -0.043201178 -0.002798822 0.0389568
K120-D120 0.0065 -0.018241289 0.031241289 0.4562284
K60-D120 -0.0075 -0.032241289 0.017241289 0.3809755
K120-D60  0.0295 0.004758711 0.054241289 0.0356287
K60-D60   0.0155 -0.009241289 0.040241289 0.1194905
K60-K120 -0.0140 -0.042568780 0.014568780 0.1833597

> cld(simple.glt(AnovaModel.26, 'Prøvefraksjon', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
K120 0.1620 A
D120 0.1555 A B
K60  0.1480 A B
D60  0.1325 B
```

Figur X. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod2 ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.

14.3 Forskjell mellom prøvene

```
> summary(AnovaModel.28)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PrøveID  3 0.014170 0.004723  10.89 0.000186 ***
Residuals 20 0.008672 0.000434
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> numSummary(Samlet_resultater_MVIT$Jod2, groups = Samlet_resultater_MVIT$PrøveID,
+            statistics = c("mean",
+                           "sd"))
      mean      sd data:n
Havredrikk 0.1351667 0.01967147 6
HTST       0.1540000 0.03099677 6
Laktoseredusert 0.1476667 0.01269120 6
UHT        0.1995000 0.01501666 6
> print(simple.glht(AnovaModel.28, 'PrøveID', level = 0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Jod2 ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

Quantile = 2.7989
Minimum significant difference = 0.0336
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value      P(>t)
Havredrikk-HTST      -0.052482 -0.018833  0.014815  0.012022 -1.567 0.419036
Havredrikk-Laktoseredusert -0.046149 -0.012500  0.021149  0.012022 -1.040 0.728612
Havredrikk-UHT      -0.097982 -0.064333 -0.030685  0.012022 -5.351 0.000168 ***
HTST-Laktoseredusert -0.027315  0.006333  0.039982  0.012022  0.527 0.951578
HTST-UHT      -0.079149 -0.045500 -0.011851  0.012022 -3.785 0.005886 **
Laktoseredusert-UHT -0.085482 -0.051833 -0.018185  0.012022 -4.312 0.001778 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> TukeyHSD(AnovaModel.28)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Jod2 ~ PrøveID, data = Samlet_resultater_MVIT)

$PrøveID
      diff      lwr      upr      p adj
HTST-Havredrikk      0.018833333 -0.01481539 0.05248206 0.4190361
Laktoseredusert-Havredrikk 0.012500000 -0.02114873 0.04614873 0.7286117
UHT-Havredrikk      0.064333333  0.03068461 0.09798206 0.0001680
Laktoseredusert-HTST -0.006333333 -0.03998206 0.02731539 0.9515783
UHT-HTST      0.045500000  0.01185127 0.07914873 0.0058859
UHT-Laktoseredusert  0.051833333  0.01818461 0.08548206 0.0017779

> cld(simple.glht(AnovaModel.28, 'PrøveID', level = 0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
UHT      0.1995000 A
HTST     0.1540000 B
Laktoseredusert 0.1476667 B
Havredrikk 0.1351667 B
```

Figur Y. Output fra enveis ANOVA i Rstudio. Jod1 ~ Prøvefraksjon, samt påfølgende Tukeys test.



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway