



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2024 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Effekt av homogenisering og pasteurisering på fordøyelse av lipider i melk, ved bruk av GC-FID – en *in vitro* studie

Effect of homogenization and pasteurization on
digestion of lipids in milk, using GC-FID
– an *in vitro* study

Emilie Therese Eriksen

Matvitenskap

Forord:

Denne masteroppgaven markerer slutten på min studietid ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Oppgaven utgjør 30 studiepoeng, og ble levert som avsluttende arbeid på en toårig masterutdannelse i matvitenskap, med retning ernæring, biomedisin og helse. Produksjon av melk og laboratoriearbeid knyttet til oppgaven ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) våren 2024. Arbeidet med oppgaven har gitt meg et lærerikt og givende semester.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder, Siv Skeie, for hjelp med utforming av en spennende og viktig oppgave, og for god veiledning og råd underveis. Jeg vil også takke min biveileder Tove G. Devold for nyttige innspill, samt gode faglige samtaler på laboratoriet innimellom arbeidet.

Videre ønsker jeg å takke Marius Normann og Ola Tjøland for opplæring av nødvendig utstyr i pilotanlegget, som var til stor hjelp under produksjonen av melk. Jeg vil også benytte muligheten til å takke Hanne Devle for opplæring og lån av SPE-robot, Kari Olsen for uvurderlig hjelp under lipidanalysene og Irene Comi for opplæring av *in vitro* fordøyelsesmodell.

I tillegg vil jeg gjerne takke alle flotte damene på laboratoriene i meieribygningen for imøtekommende varme smil hver dag, hyggelige samtaler og endeløse mengder kaffe, som har bidratt til et veldig koselig arbeidsmiljø jeg kommer til å savne.

Sist men ikke minst vil jeg takke studievenninner, familie og samboer for motivasjon og oppmuntring gjennom arbeidet med denne masteroppgaven.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Ås, mai 2024

Emilie Therese Eriksen

Sammendrag:

Melk er en god kilde til essensielle næringsstoffer, og har i mange århundre vært en del av det humane kostholdet i den vestlige verden, spesielt i Norge. Strengere krav til mattrygghet, kvalitet og forbrukeraksept har ført til blant annet innføringen av lovpålagt pasteurisering av melk (Animaliehygieneforskriften, 2009, §21), og gjort homogenisering til fast inventar i produksjonen konsummelk. Dette er to av de vanligste enhetsoperasjonene innen meieriproduksjon, og som oftest vil en, eller begge, benyttes som prosesseringstrinn i framstillingen av konsummelk. Deres påvirkning på melkekomponenter, slik som lipider, har blitt godt studert og dokumentert, og hvordan denne effekten igjen påvirker fordøyelse av melkekomponentene er svært nyttig og viktig kunnskap innenfor human ernæring og helse. Hensikten med denne oppgaven har derfor vært å undersøke hvordan pasteurisering og homogenisering påvirker fordøyelse av melkefett, og eventuelt til hvilken grad. Dette ble gjort ved å *in vitro* fordøye ulike melkeprodukter behandlet med ulike temperaturer, og homogeniseringstrykk. Analyse av partikkelstørrelse og lipider ble gjort på melkeprøvene før og etter fordøyelse. I tillegg ble det gjennomført en simpel sensorisk undersøkelse for å kartlegge forbrukeraksept av homogenisert og ultrahøytemperatur-behandlet (UHT) melk.

Resultatene viste at homogenisering reduserer partikkelstørrelse, og behandlingen hadde signifikant ($p < 0.05$) effekt ved alle trykk (0, 180 og 280 bar) på gjennomsnittlig størrelse til fettkulene i UHT-behandlede melkeprodukter, men upasteurisert og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter hadde kun signifikante ($p < 0.05$) forskjeller mellom 0 bar og 180 bar. I tillegg hadde de UHT-behandlede melkeproduktene alltid størst gjennomsnittlig partikkelstørrelse. Fordøyelse hadde signifikant ($p < 0.05$) økende effekt på partikkelstørrelse til UP0 og LTLT0.

Av homogenisering og pasteurisering hadde sistnevnte størst signifikant ($p < 0.05$) effekt på individuelle endringer i mengden fettsyrer i de ulike ekstraherte fraksjonene (nøytrale lipider og frie fettsyrer) i de ulike melkeproduktene før og etter fordøyelse. Det var minst signifikant ($p < 0.05$) effekt av homogenisering og pasteurisering i individuelle frie fettsyrer etter fordøyelse. Homogenisering og samspill mellom forsøksfaktorene har også hatt signifikant ($p < 0.05$) effekt på individuell fettsyrekonsentrasjon etter fordøyelse, men i mindre grad. Hverken av produktene hadde signifikante forskjeller i lipolyse. Sensorisk analyse viste at homogenisering påvirker smak mer enn UHT-behandling.

Abstract:

Milk is a good source for essential nutrients, and have throughout decades been a part of the human diet in the western world. Stricter requirements for food safety, quality and consumer acceptance has resulted in pasteurization being legally mandated (Animaliehygieneforskriften, 2009, §21), and made homogenization fixed inventory for the production of all milk sold in stores. These are two of the most common processes in dairy technology, and usually one of them, or even both, are used as processing steps in the manufacture of milk. The effect they have on components in milk, such as lipids, are well studied and documented, and how this effect influences the digestion of the components are useful and important knowledge when it comes to human nutrition and health. This studies intention has been to research how pasteurization and homogenization affects the digestion of milk lipids, and if so to what extent. This has been done by in vitro digesting different milkproducts treated with different temperatures and homogenization pressure. Particle size analysis and lipid analysis was done of the milkproducts before and after digestion. In addition to that, a simple sensoric analysis was done to map out consumer acceptance of homogenized and UHT-treated milk.

The results showed that homogenization reduced particlesize, and that the treatment had significant ($p < 0.05$) effect for all pressures (0, 180, 280) in UHT-treated milk, while unpasteurized and LTLT-pasteurized only had significant ($p < 0.05$) differences between 0 bar and 180 bar. The UHT-treated milkproducts always had the biggest average particlesize. Digestion had significant ($p < 0.05$) increasing effect on particlesize for UP0 and LTLT0.

Of homogenization and pasteurization, the latter had the most significant ($p < 0.05$) effect on individual changes in fatty acid concentration in the various extracted fractions (neutral lipids and free fatty acids) in the different milk product before and after digestion. There was the least significant ($p < 0.05$) effect of homogenization and pasteurization on individual concentration of free fatty acids after digestion. Homogenization and the interaction between the experimental factors also had a significant ($p < 0.05$) effect on individual fatty acid concentration after digestion, but to a lesser extent. Neither of the products showed significant differences in lipolysis. Sensory analysis showed that homogenization affects taste more than UHT-treatment.

Innholdsfortegnelse:

Forord:	I
Sammendrag:	II
Abstract:	III
1 Innledning:	I
2 Litteraturoversikt:	1
2.1 Melk:	1
2.2 Melkens komponent sammensetning:.....	1
2.3 Proteiner:.....	1
2.3.1 Kasein:	2
2.3.2 Kaseinmicellen:.....	2
2.3.3 Myseproteiner:	3
2.4 Lipider:	3
2.5 Melkefett:	4
2.5.1 Fettsyrer:	5
2.5.2 Acylglyseroler:.....	6
2.5.3 Kolesterol:	7
2.5.4 Fosfolipider:	7
2.5.5 Sphingolipider:	8
2.6 Melk som emulsjon – melkefettkulemembran:	8
2.6.1 Kremdannelse og koalesens:.....	9
2.7 Prosessering av melk:	10
2.7.1 Separering:	10
2.7.2 Homogenisering:	10
2.7.3 Varmebehandling:	11
2.7.4 Effekt av varmebehandling og homogenisering på melk:	13
2.7.5 Effekt av varmebehandling og homogenisering på smak og fordøyelse:	16
2.8 Human fordøyelse og dets enzymer:	17
2.8.1 Munn:	18
2.8.2 Magesekk:	20
2.8.3 Tynntarmen:	22
2.8.4 Tykktarmen:	24
2.9 Fordøyelse og absorpsjon av fett:	24
2.9.1 Magesekk	24
2.9.2 Tynntarm.....	25
2.9.3 Absorpsjon:	26
2.10 Sammenhengen mellom kjemisk struktur til mat og fordøyelse:.....	29
2.11 Fordøyelsesmodeller:	30
3 Materialer og metoder:	32
3.1 Produksjon av melk benyttet i oppgaven:.....	33
3.1.1 Produksjon av upasteurisert og LTLT pasteurisert melk:	35
3.1.2 Produksjon av ultrapasteurisert melk:	36
3.2 Forsøksoppsett.....	37

3.3 <i>In vitro</i> fordøyelse:.....	38
3.3.1 Forarbeid:.....	38
3.3.2 <i>In vitro</i> fordøyelse:.....	41
3.4 Analyse av partikkelstørrelse:.....	44
3.5 Forarbeid til lipidanalyser:.....	46
3.5.1 Internstandarder og kalibreringsløsninger:.....	48
3.5.2 0.1 M NaCl i vann:.....	48
3.5.3 Folch løsning:.....	48
3.5.4 Dietyleter:eddiksyre (98:2):.....	48
3.5.5 Natriummetanolat (NaOCH ₃):.....	48
3.6 Analyse av frie fettsyrer og nøytrale lipider:.....	50
3.6.1 Ekstraksjon av lipider med Folch metode:.....	50
3.6.2 Fast-fase fraksjonering med SPE-robot:.....	51
3.6.3 Metylering:.....	51
3.6.4 Analyse av frie fettsyrer med gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor (GC-FID):.....	52
3.7 Sensorisk analyse:.....	53
3.8 Databehandling:.....	54
3.9 KI (Kunstig Intelligens):.....	54
4 Resultater:.....	55
4.1 Partikkelstørrelse:.....	55
4.1.1 Partikkelstørrelsefordeling til fordøyde og ufordøyde prøver:.....	55
4.1.2 Partikkelstørrelse i ufordøyd materiale:.....	59
4.2 Lipidanalyser:.....	63
4.2.1 Ufordøyde prøver:.....	63
4.3 Fordøyde prøver:.....	69
4.4 Fordøyde og ufordøyde prøver:.....	71
4.5 Sensorisk analyse:.....	75
5 Diskusjon:.....	76
5.1 Partikkelstørrelse:.....	76
5.2 Lipidanalyse:.....	79
5.3 Sensorisk analyse:.....	81
5.4 Studiens funn i lys av dagens debatt om melkeprosessering:.....	82
6 Konklusjon:.....	87
7 Til ettertanke og videre forskning:.....	88
8 Litteraturliste:.....	90
9 Vedlegg.....	A

Forkortelser benyttet i oppgaven

ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk Analysis of Variance)
BF ₃	Boron triflourid metanol
Ca ²⁺	Ionisk kalsium
CaCl ₂	Kalsiumklorid
CCP	Kolloidalt kalsium fosfat (fra engelsk colloidal calcium phosphate)
CMP	Kaseinmakropeptid (fra engelsk caseinmacropeptide)
DAG	Diglyserider
FAME	Fettsyremetylester (fra engelsk Fatty Acid Methyl Esters)
FFA	Frie fettsyrer
FID	Flammeionisasjonsdetektor (fra engelsk flame ionization detector)
g	Gram
g	Tyngdeakselerasjon
GC	Gasskromatografi (fra engelsk gas chromatography)
HCl	Saltsyre
HPLC	Høytrykksvæskekromatografi (fra engelsk high performance liquid chromatography)
HTST	Høy temperatur-kort tid (fra engelsk high temperature-short time)
ISTD	Internstandard
L	Liter
LCFA	Langkjedete fettsyrer (fra engelsk long chain fatty acids)
LOD	Deteksjonsgrense (fra engelsk limit of detection)
LOQ	Kvantifiseringsgrense (fra engelsk limit of quantification)
LTLT	Lav temperatur-lang tid (Fra engelsk long temperature-long time)
M	Molar
MCFA	Mediumkjedete fettsyrer (fra engelsk medium chain fatty acids)
ME	Metylester (fra engelsk Methyl
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mMol	Millimol
Mpa	Megapascal
MUFA	Enumettede fettsyrer (fra engelsk monounsaturated fatty acids)
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NL	Nøytrale lipider
OH	Hydroksylgruppe
pH	Potens hydrogen (fra dansk potens hydrogen)
pI	Isoelektrisk punkt
PUFA	Flerumettede fettsyrer (fra engelsk polyunsaturated fatty acids)
RPM	Omdreininger per minutt (fra engelsk revolutions per minute)
SCFA	Kortkjedete fettsyrer (fra engelsk short chain fatty acids)
SGF	Simulerende magevæske (fra engelsk simulated Gastric Fluid)
SIF	Simulerende tarmvæske (fra engelsk simulated intestinal fluid)
SPE	Fast fase ekstraksjon (fra engelsk solid phase extraction)
SSF	Simulerende spyttvæske (fra engelsk simulated salivary fluid)
TAG	Triglyserider
Tukey	Post hoc parvis test
UHT	Ultra-høy-temperatur (fra engelsk Ultra-high-temperature)

U	Units
UP	Upasteurisiert
XO	Xanthine Oxidase
μg	Mikrogram
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Innledning:

I Norge den dag i dag er de ulike prosesseringene av melk tilpasset dagens moderne samfunn, og dets krav til mattrygghet og kvalitet. To vanlige prosesseringstrinn som gjøres på melk er homogenisering, og pasteurisering. Homogenisering sørger for en jevn fordeling av melkefett, som hindrer at det dannes fløtelag på melkens overflate, mens pasteurisering er en form for varmebehandling som reduserer fordervelsesbakterier og fjerner skadelige bakterier. Patogene bakterier vil føre til alvorlige symptomer hos smittede mennesker, og prosessen er derfor en lovpålagt prosess i Norge, som gjelder for all konsummelk som selges i butikk.

Pasteurisering og homogenisering anses ikke som ultraprosessering, men sett i lys av dagens motstridende debatt om prosessering, diskuteres det mye om mindre behandlet mat har flere fordeler enn behandlede, både sensoriske, men også helsemessige. Slike hypotetiske fordeler kan være at maten er sunnere, lettere å fordøye, og smaker bedre. I tillegg hevdes det at prosessering kan påvirke komponentene i melken, slik at den under fordøyelse kan ha negativ helseeffekt, og potensielt føre til helseplager (Oster, 1973). Samtidig som debatten pågår, ønsker fler og fler forbrukere produkter med mindre grad av bearbeiding og prosesserte ingredienser, og melk er ikke et unntak, men for å oppnå målet om en trygg melk av høy kvalitet må melkens sammensetting endres (Smith, 2010). Det blir derfor stadig mer aktuelt å utforske ikke bare de tekniske aspektene ved melkebehandling, men også hvordan prosessene vil påvirke melken på et ernæringsmessig og biologisk nivå.

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke hvordan ulike typer varmebehandling og homogeniseringstrykk påvirker fordøyelsen, og fordøyeligheten av lipider i melk. Dette i håp om å bidra med å fylle kunnskapshullene knyttet til temaet. Med dypere innsikt kan produksjonsmetoder, behandlinger og prosesseringer tilpasses for å imøtekomme forbrukernes ønsker, samtidig som det oppfyller industriens krav om mattrygghet. Observasjoner, informasjon og resultater fra denne oppgaven kan på sikt legge grunnlag for en mer helhetlig forståelse av sammenhengen mellom matbehandling og fordøyelse.

2 Litteraturoversikt:

2.1 Melk:

Melk er en fellesbetegnelse for det gul-hvite sekretet produsert i kjertelen til et hunnpattedyr for å fø sine nyfødte avkom (Walstra et al., 2006b). Den inneholder makronæringsstoffer som protein, karbohydrat og fett, og mikronæringsstoffer slik som kalsium, vitamin D og jod.

Melkens sammensetting og mengde av de ulike makro- og mikronæringsstoffene kan variere mellom dyr, slekter og arter, men felles for melken er at den inneholder alle stoffene i de mengdene som er essensielle for normal utvikling i neonatalperioden til den nyfødte (Fox et al., 2015.a). I tillegg til å være avkommets første næring, har melk takket være dens ernæringsmessige egenskaper også vært en grunnleggende bestanddel i menneskets kosthold gjennom tidene, i store deler av verden. I Norge er det kun kumelk som omtales som melk, og videre i oppgaven menes kumelk der melk står skrevet (FAO, 1999).

2.2 Melkens komponent sammensetning:

Melk er en kompleks væske, hovedsakelig bestående av vann, proteiner (3-4%), fett (3-4%), karbohydrater (4-5 %), vitaminer (0.1%) og mineraler (0.8%) (Fox et al., 2015.e). Disse bestanddelene befinner seg i melken i tre ulike faser. Løselige molekyler, slik som laktose, vitaminer, salter og andre små substanser vil være løst i vannfasen, kalt den ekte løsningen. Spredt i den ekte løsningen vil det finnes proteinaggregater i varierende størrelser. De minste vil være myseproteiner, mens de største kolloidale aggregatene er kaseiner. Fettet befinner seg finfordelt i den ekte løsningen i fettkuler (Fox et al., 2015.a).

2.3 Proteiner:

Melkeprotein deles inn i to definerte grupper basert på proteinets evne til å være løselig ved proteinets isoelektriske punkt (pI). Isoelektrisk punkt er den pH-verdien der proteinet har netto nøytralt ζ -potensial (zeta), det vil si netto ladning, og for kasein er dette (ved 30 °C) pH 4.6. Isoelektrisk punkt er viktig for proteinenes løselighet, og av melkeproteiner kalles de som er løselig ved disse betingelsene for myseproteiner, mens kasein vil felle ut. Av melkens 3.5% protein, utgjør myseproteiner 20%, mens kasein utgjør resterende 80% (Fox et al., 2015.d).

2.3.1 Kasein:

Kasein er en gruppe melkeproteiner som overordnet deles inn i 4 genprodukter; α_{S1} -, α_{S2} -, β - og κ -kasein. Disse forekommer i henholdsvis 37, 10, 35 og 12%, men det finnes flere genetiske varianter av hver av disse (Fox et al., 2015.c; Walstra et al., 2006b). α - og β -kasein er såkalte fosfoproteiner, som betyr at fosfatgrupper er esterifisert til serinfosfatgrupper i proteinet (Walstra et al., 2006b). α_{S1} -kasein inneholder 8-9 fosfatgrupper, α_{S2} -kasein inneholder 10-13, β -kasein inneholder 5, mens κ -kasein er glykoproteiner og har kun en fosfatgruppe (Fox et al., 2015.c). Fosfoproteinene er sensitive for kalsiumioner (Ca^{2+}), og vil felle ved høye konsentrasjoner ($> 6\text{mM}$) (McSweeney & Fox, 2013). Kaseiner har høyt innhold av apolare aminosyrer (35-45%), slik som prolin, hvor β -kasein har høyest innhold. Høyt innhold prolin resulterer i lite sekundærstruktur som følge av at dannelse av α -helix og β -sheets hindres, som gir en åpen og fleksibel tertiærstruktur. Fraværet av sekundærstruktur gjør molekylene varmeresistente (Fox et al., 2015.d). I tillegg har kaseiner eksponerte hydrofobe grupper, som gjør at det dannes hydrofobe interaksjoner med andre kaseinmolekyler. Dette gjør at det lett dannes store aggregater kalt kaseinmiceller, og i melk befinner 95% av kaseiner seg som kaseinmiceller. Selve oppbyggingen av kaseinmicellen avhenger av kaseinets sensitivitet til kalsiumioner (Ca^{2+}).

2.3.2 Kaseinmicellen:

Kaseinmiceller kan være mellom 30 til 300 nm i diameter, og består av opptil tusenvis av kaseinmolekyler. Det finnes flere teorier om strukturen, og detaljer om dets kompliserte oppbygging er omdiskutert (Walstra et al., 2006c). Det er likevel generell enighet om at en andel av micellens overflate er dekket av κ -kasein (som ikke er Ca^{2+} sensitivt) med hydrofil C-terminal ende, kalt kasein-makropeptid (CMP), vendt utover mot serumfasen. Den hydrofobe N-terminale enden, kalt para- κ -kasein er vendt innover i micellen, hvor den danner interaksjoner med andre kaseinmolekyler (Fox et al., 2015.d). I micellens indre befinner de kalsium-sensitive α - og β -kaseinproteinene seg, sammen med kalsium bundet til fosfat (CCP), eller direkte bundet til kasein gjennom serinfosfat. Ved å organisere seg på denne måten blir micellen stabilisert.

Omtrent 8 g per 100 g kasein er kalsiumfosfat (Walstra et al., 2006c). Mesteparten av kalsium (67%) og fosfat (57%) befinner seg den kolloidale fasen, i klynger (nanoclusters) av kolloidalt kalsiumfosfat (CCP) (Fox et al., 2015.d; Walstra et al., 2006c). CCP binder kaseinmolekyler sammen med deres fosfatgrupper, ved å danne interaksjoner med proteinets serinfosfat, som beskytter CCP og hindrer det fra å felle ut, som gjør micellen mindre sensitiv for varme (Fox et al., 2015.c, 2015.d).

2.3.3 Myseproteiner:

Det finnes mange ulike myseproteiner, også kalt serumproteiner, men de 4 det finnes mest av i melk er β -laktoglobulin (50%), α -laktalbumin (20%), blodserum albumin (10%) og immunoglobulin (20%). Myseproteiners egenskaper er forskjellig fra kaseiner, ved at de befinner seg løst i serumfasen, ikke er fosforylert og sensitive for kalsiumioner, og har en kompakt tertiærstruktur (Fox et al., 2015.c). Det vil si at de er varmelabile, og denatureres fullstendig under oppvarming ved 90 °C i 10 minutter (Fox et al., 2015.e). Den største gruppen av myseproteinene, β -laktoglobulin, inneholder en fri sulfhydryl-gruppe (SH/thiolgruppe), ved temperaturer over 75 °C danner sulfhydryl-disulfidbindinger med κ -kasein (McSweeney & Fox, 2013).

2.4 Lipider:

Lipider er en bred kategori som omfatter, men er ikke begrenset til, molekyler som fettsyrer, fosfolipider, triglyserider og steroler. Generelt befinner lipider i matvarer seg som triglyserider eller fosfolipider, men det kan også befinne seg i en eller flere andre lipidforbindelser, slik som kolesterol (sterol) (Barrett, 2014f). Lipider er en svært viktig del i kostholdet, da de er strukturelle bestanddeler i biologiske membraner, opprettholder normal hormonproduksjon og bidrar med opptak og transport av fettløselige vitaminer (Grundy & Wilde, 2021). I tillegg medvirker lipider til regulering av metthetsfølelse, kan påvirke smak i en matrett og matvarers sensoriske egenskaper, spesielt for meieriprodukter (Barrett, 2014f; Fox et al., 2015.e).

Det finnes ikke én universell definisjon av lipider, men heller flere ulike definisjoner som hver har sine respektive fordeler og ulemper (Akoh, 2017a). Som oftest baserer definisjonene seg på løselighetsegenskaper, og sier at lipider er en gruppe heterogene forbindelser, som er uløselige i vann, men løselig i upolare løsningsmidler slik som kloroform, hydrokarboner og alkoholer (Gurr et al., 2016). Klassifisering av lipider kan også gjøres på flere måter basert på egenskaper ved romtemperatur (oljer er flytende, mens fett er fast), polaritet (polare og nøytrale), om de er essensielle for mennesker (essensielle og ikke essensielle fettsyrer) eller struktur (enkle og komplekse) (Akoh, 2017a). I denne masteroppgaven vil lipider klassifiseres slik; polare (fosfolipider, glykolipider kolesterol), nøytrale lipider (triglyserider, diglyserider og monoglyserider), fettsyrer og frie fettsyrer.

2.5 Melkefett:

Melk inneholder 3.3 - 4.7% fett, men prosentandelen, og til en viss grad fettkulenes sammensetting og størrelse, varierer avhengig av mange faktorer. De viktigste faktorene er rase, laktasjonsstadiet, fôr, sesong, intervaller mellom melking og på hvilket punkt i melkingen fettmålingen ble gjort, kuas helse og andre individuelle aspekter (Fox et al., 2015.b). Blant de europeiske rasene har melk fra Jersey kyr det høyeste fettinnholdet, på rundt 5,3% fett (Walstra et al., 2006b), mens Norsk Rødt Fe (NRF), som er rasen som benyttes i norsk melk – og kjøttproduksjon, produserer en melk med omtrent 4,35% fett (Vangen, 2022).

Lipidsammensetting i melk er vist i tabell 1 (Fox et al., 2015.b).

Tabell 1: *Sammensetting av individuelle enkle lipider, og fosfolipider i melk (% vekt av totale lipider) basert på informasjon fra Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015). Dairy Chemistry and Biochemistry (2. utg). Springer. S. 73.*

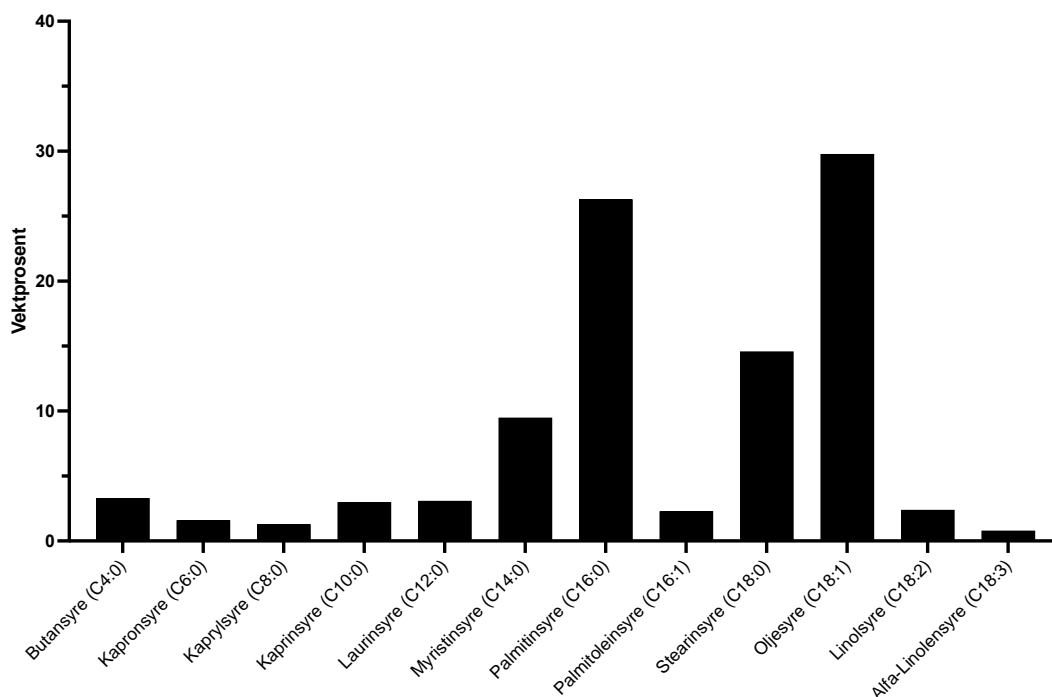
Lipidklasse	% vekt av totale lipider
Triglyserider	97.5
Fosfolipider	0.6
Diglyserider	0.36
Kolesterol	0.31
Monoglyserider	0.027
Frie fettsyrer	0.027
Kolesterol estere	S

S = spornivåer

2.5.1 Fettsyrer:

Fettsyrer er en gruppe organiske molekyler som utgjør en stor klasse av lipider, og de kan forekomme både i fri form, eller innlemmet i større lipidkomplekser. Fettsyrer er essensielle byggesteiner i nesten alle større lipider, med unntak av kolesterol (Walstra et al., 2006b). De består av en hydrofob hydrokarbonkjede med en ladet karboksylgruppe (-COOH). Antall karboner og lengden på hydrokarbonkjeden er svært varierende. Kortkjedete fettsyrer (SCFA) er fettsyrer med 4 til 6 karbonatomer, mediumkjedete fettsyrer (MCFA) har 6 til 12 karbonatomer og langkjedete har over 12 karbonatomer. Fettsyrer med kun enkeltbindinger kalles mettede fettsyrer (SFA), mens fettsyrer med en eller flere dobbeltbindinger i karbonkjeden kalles umettede fettsyrer (UFA). Fettsyrer med kun én dobbeltbinding blir kalt enumettede fettsyrer (MUFA), mens fettsyrer med to eller flere dobbeltbindinger kalles flerumettede fettsyrer (PUFA). Avhengig av konfigurasjonen til dobbeltbindingen kan fettsyren være enten cis eller trans (Akoh, 2017a).

Melkefett fra drøvtyggere inneholder en mangfoldig kombinasjon av fettsyrer, med tilnærmet 400 ulike, hvorav 184 er detektert i kumelk. En god andel av fettsyrene finnes dog kun i spormengder (Fox et al., 2015.b). Vanlige fettsyreprofil i melkefett deres vektprosent er vist i figur 1.

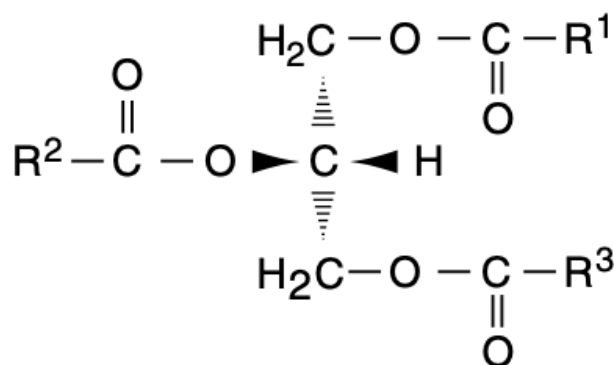


Figur 1: Fettsyrer (vektprosent av total) i triglyserider eller totale lipider i melk basert på informasjon fra Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry* (2. utg). Springer. S. 77.

Som figuren viser inneholder de fleste fettsyrene i melk 4 til 18 karbonatomer hvor partallsfettsyrer dominerer, og generelt har melk lite flerumettede fettsyrer, men en stor andel medium kjedete fettsyrer. Måten det er presentert på i figuren (vektprosent) under-representerer andelen kortkjedete fettsyrer. Dersom benevnningen regnes om til mol % utgjør de kortkjedete fettsyrene mellom 15 til 20 mol % (~10% C4:0) transfettsyrer omtrent 3 mol %, og 70 mol % er C16:0 (Fox et al., 2015.b; Walstra et al., 2006b). Fettsyreprofilen til melkefettet er en viktig faktor i å avgjøre smeltepunkter og næringsinnhold. Melkefettets smeltepunkt er en viktig faktor for blant annet homogeniseringstemperatur og separeringstemperatur.

2.5.2 Acylglyseroler:

Acylglyseroler (acylglyserider) er en gruppe nøytrale lipider som dannes gjennom esterifisering av glyserol og fettsyrer. Glyserolmolekylet stammer delvis fra hydrolyserte blodlipider (fritt glyserol og monoglyserider), delvis fra glukose og litt fra fritt blodglyserol (Fox et al., 2015.b). Acylglyseroler deles i 3 mindre grupper avhengig av hvor mange fettsyrer som er esterifisert til glyserolmolekylet; monoglyserider (MAG), diglyserider (DAG), og triglyserider (TAG). I Fisher projeksjon av triglyseridets glyserolstamme vil det øverste karbonatomene nummereres 1 (*sn*-1), det midterste blir 2 (*sn*-2), og det nederste blir 3 (*sn*-3). Prefikset «*sn*» indikerer den stereospesifikke nummereringen. Hydrokarbonkjedene til fettsyrene blir referert til som henholdsvis R₁, R₂ og R₃. Som oftest plasseres fettsyren i *sn*-2 posisjon på venstre side av det sentrale, kirale karbonatomet i Fisher projeksjon. Strukturen til et triglyserid er vist i figur 2.



Figur 2: Triglyserolmolekyl hentet fra Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (2. utg.). Taylor & Francis Group. S. 44.

Ulike fettsyrer har ulike preferanser for posisjonene i glyserolmolekylet, slik som vist i tabell 2. De kortkjedete fettsyrene (C4:0 og C6:0) befinner seg i *sn*-3, mens de langkjedete befinner seg i *sn*-1 posisjon. Av det totale fettinnholdet i melk utgjør triglyserider hele 97.5%, mens diglyserider utgjør kun 0.36%. Innholdet diglyserider skyldes sannsynligvis ufullstendig syntetiserte fettsyrer (Fox et al., 2015.b).

Tabell 2: Sammensetting av fettsyrer (mol % av total) esterifisert til hver posisjon i triglyserider i melk basert på informasjon fra Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H. & O'Mahony, J, A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry* (2. utg). Springer. S. 89.

Fettsyre	sn-1	sn-2	sn-3
C4:0	-	-	35.4
C6:0	-	0.9	12.9
C8:0	1.4	0.7	3.6
C10:0	1.9	3.0	6.2
C12:0	4.9	6.2	0.6
C14:0	9.7	17.5	6.4
C16:0	34.0	32.3	5.4
C16:1	2.8	3.6	1.4
C18:0	10.3	9.5	1.2
C18:1	30.0	18.9	23.1
C18:2	1.7	3.5	2.3

2.5.3 Kolesterol:

Kolesterol er nøytrale lipider, og er den dominerende sterolen hos dyr (Akoh, 2017a), hvor de utgjør en stor bestanddel i eukaryote plasmamembraner (Mouritsen & Zuckermann, 2004). ~0.3% (w/w) av totale lipider i melk er kolesterol, som er lite i forhold til annen mat, men kolesterol utgjør >95% av total mengde sterol i melk (Fox et al., 2015.b). I melk finnes det fettkulmembranen og i komplekser med melkeproteiner (Kolarič & Šimko, 2022).

2.5.4 Fosfolipider:

Fosfolipider er polare lipider bestående av glyserol, fettsyrer, fosfat og vanligvis en organisk base eller polyhydroksyforbindelse, det vil si en forbindelse med flere hydroksylgrupper (-OH) i molekylet. Selv om fosfolipider utgjør mindre enn 1% av totale lipider i melk, er de viktige i bestanddeler i membraner i melk, spesielt i membranen rundt fettkulene (Fox et al., 2015.b).

2.5.5 Sphingolipider:

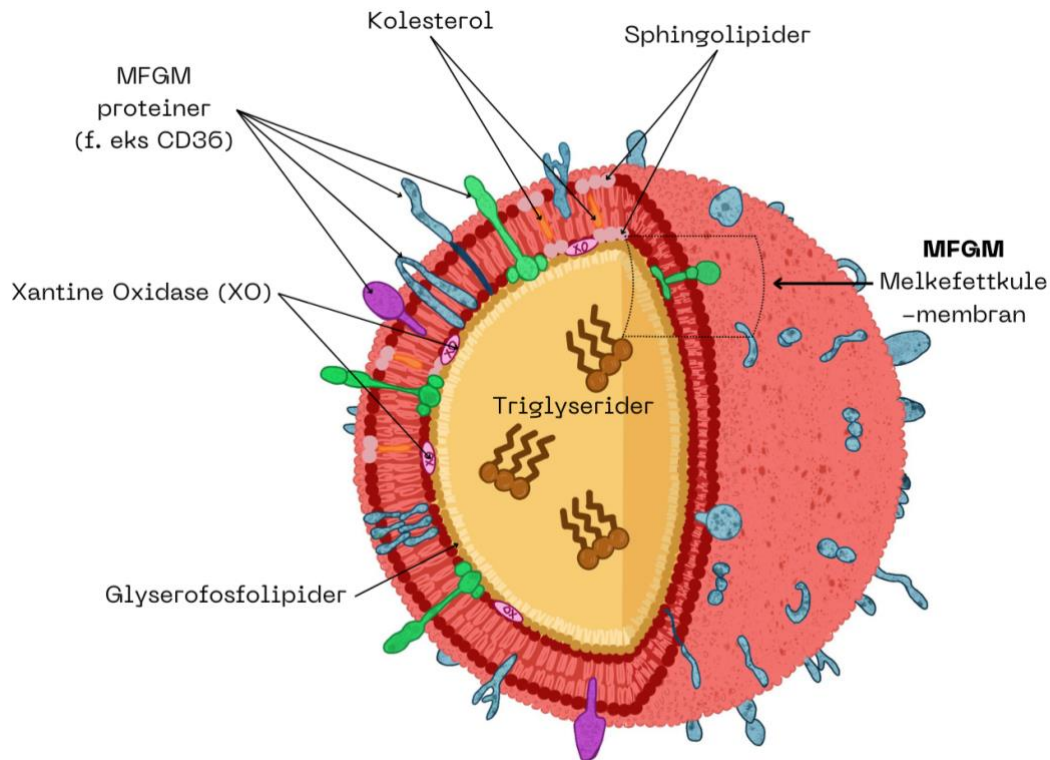
I motsetning til de andre nevnte lipidene er sphingolipider bygget opp av aminoalkoholet sphingosin istedenfor glyserol. Sammen med en fettsyre danner dette den grunnleggende strukturen til sphingofosfolipider slik som sphingomyelin, som utgjør opp til en tredjedel av membranen til fettkuler i melk (Dewettinck et al., 2008).

2.6 Melk som emulsjon – melkefettkulemembran:

Melk er en naturlig olje-i-vann emulsjon, som betyr at omtrent alt melkefett befinner seg som små dråper (fettkuler) fordelt i den ekte løsningen (serumfasen). Størrelsen på fettkulene kan variere fra ~0.1 til ~20 μm , med et gjennomsnitt på ~3.5 μm , og det antas at 75% av fettkulene er under 1 μm (Walstra et al., 2006c)

De nøytrale lipidene i melk, det vil si triglyserider og noe diglyserider, befinner i kjernen av fettkulene. Fettkulene er omsluttet av en kompleks fettkulemembran, som i uprosessert melk hjelper med å holde fettkulene fordelt i serumfasen, og beskytter mot koalesens (Walstra et al., 2006c). 0.5-1.0% av den totale mengden lipider i melk befinner seg i MFGM, og av dette utgjør forholdet fosfolipider mot nøytrale lipider 2:1. Fosfolipidene består av en høy andel av flerumettede fettsyrer, og de viktigste fettsyrene i fosfolipidene er (i synkende rekkefølge) C16:0, C18:1, C18:0, C18:2, C14:0, C22:0, og C24:0. Andelen umettede fettsyrer er større i MFGM enn i melkefett generelt, som gjør den mer fleksibel, men også mer utsatt for oksidasjon.

Selv om lipider er svært viktig i MFGM, utgjør proteiner mesteparten av membranen, med hele 70%. Hovedsakelig er dette membranspesifikke glykoproteiner, men også flere mindre proteinforbindelser, slik som enzymer, derav blant annet Xantine Oxidase (XO) (Walstra et al., 2006c). Proteiner som kun er løst bundet til membranoverflaten (perifere proteiner) fjernes lett, mens proteiner som er bundet tett til lipidene kan kun fjernes med kraftig behandling. Fettkulens stabilitet avhenger av MFGM, og fettkulenes størrelse og organisering i melken kan endres med prosessering (Fox et al., 2015.b). Forenklet figur av fettkulemembranen er vist i figur 3.



Figur 3: Forenklet illustrasjon av melkefettkulemembran (MFGM), og et utvalg av dets hovedkomponenter. Egen illustrasjon basert på informasjon fra Michalski, M. C., Michel, F., Sainmont, D., & Briard, V. (2002). Apparent ζ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23(1), 23-30. S. 24.

2.6.1 Kremdannelse og koalesens:

Oppfløting (creaming) i melk vil si at fett flyter opp mot melkens overflate og danner et fløtelag. Fenomenet skyldes migrering av den dispergerte fasen i emulsjonen, (lipider) fordi fettkulene har lavere tetthet enn den kontinuerlige serumfasen, og flyter opp til overflaten av melken (Walstra et al., 2006c). Større fettkuler vil flyte raskere enn mindre fettkuler, da hastigheten er proporsjonal med fettkulens radius (r^2). Oppfløtingens hastighet og fløtelagets tykkelse kan derfor variere i melk (Fox et al., 2015.b).

Oppfløtingen vil øke muligheten for koalesens, da det fører til at fettdråpene kommer nærmere hverandre (Walstra et al., 2006c). Koalesens ligner kremdannelse, og vil skje når to eller flere fettdråper smelter sammen, og danner en større partikkel som skilles fra løsningen (Goff, 1997). Om koalesens foregår over lang tid kan det resultere i fase-separasjon, og selv om slik sjeldent skjer i melkeprodukter vil det kunne hindre melken i å separeres til fløte og skummetmelk (Walstra et al., 2006c). Ved tilfeller der det ikke lenger er mulig å re-suspendere fett ved risting vil det også bli en holdbarhetsbegrensende faktor (Rauh & Xiao, 2022), og det er derfor ønskelig å hindre både koalesens og kremdannelse i industrielle meieriprodukter for konsum, noe som er oppnåelig ved prosessering av melken.

2.7 Prosessering av melk:

Industrielt produserte meieriprodukter vil vanligvis utsettes for en eller flere enhetsoperasjoner. De vanligste er separering, pasteurisering og homogenisering (Pereda et al., 2007).

2.7.1 Separering:

Separering refererer til prosessen der melken deles inn i to hovedkomponenter, og baserer seg på at fett er har lavere vekt enn proteiner og vannmolekyler. Ved hjelp av en sentrifuge, vil kreftene samle fløten i sentrum av separatoren, mens skummetmelken presses til utsiden. På denne måten kan fløte tappes adskilt fra skummetmelk, som gir muligheten til å standardisere fettprosent i melk (Walstra et al., 2006a).

2.7.2 Homogenisering:

Homogenisering gjøres for å hindre oppfløting og øke stabilitet mot koalesens (Walstra et al., 2006f). Målet med homogenisering er å redusere gjennomsnittlig fettkulediameter til $<1\ \mu\text{m}$ (i praksis er gjennomsnittlig diameter på fettkuler i homogenisert melk $<2\ \mu\text{m}$) (Fox et al., 2015.b) . Homogenisering vil bryte opp fettkulene til mindre dråper, ved at melken tvinges gjennom en svært smal åpning, kalt en dyse, under høyt trykk, normalt mellom 13 og 20 MN/m^2 (meganewton/ m^2) (Fox et al., 2015.b), hvor $10\ \text{MN}/\text{m}^2$ tilsvarer 1 MPa (megapascal), som igjen tilsvarer 100 B (bar). Videre i oppgaven vil homogeniseringstrykk oppgis i bar.

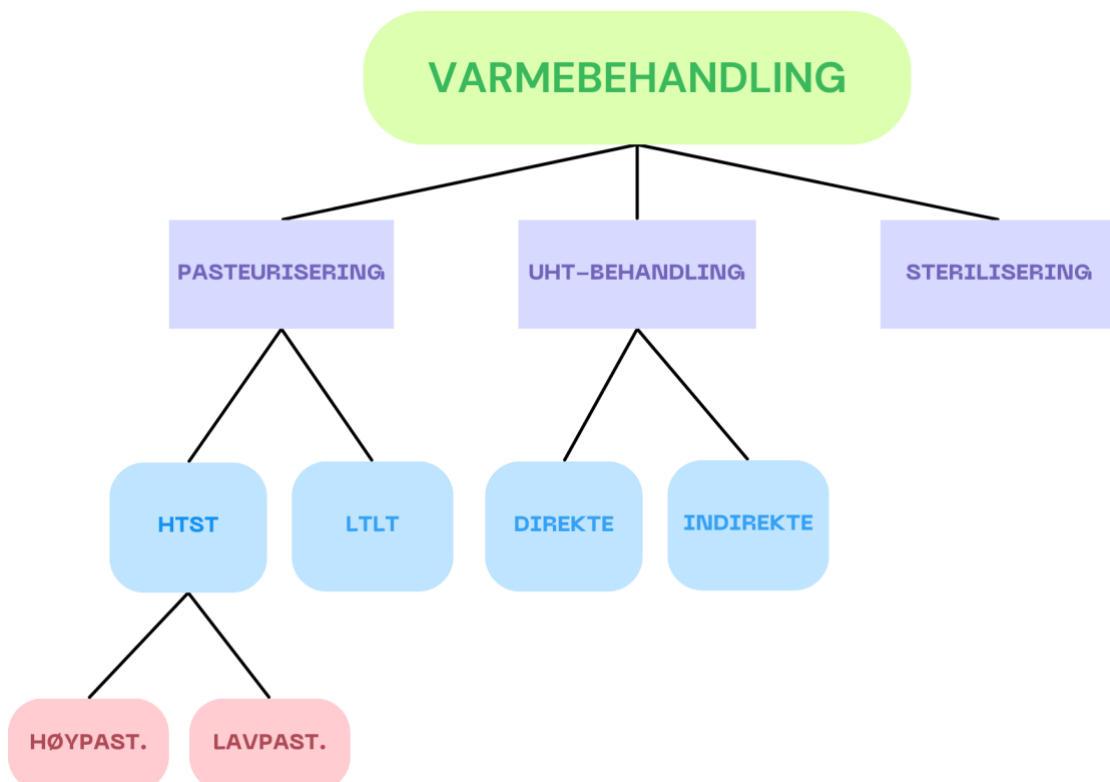
Tiden det tar for melken å passere gjennom dysen er vanligvis under 1 ms, som under et høyt trykk vil føre til intens turbulens. Turbulent flyt karakteriseres av roterende og virvlende strømminger av ulike størrelser som stadig dannes og forsvinner. Dette vil føre til lokale forskjeller eller svingninger, som kan deformere dråper (Walstra et al., 2006f).

Overflatearealet til de nye, mindre fettkulene er 5 til 10 ganger større etter homogenisering (Walstra et al., 2006f). Faktorer som påvirker fettkulestørrelse er; type homogenisator, homogeniseringstrykk, homogeniseringstemperatur, fettinnhold og ratio mellom mengde protein og fett samt riktig bruk av homogenisatoren (Walstra et al., 2006f). I industrien brukes vanligvis totrinns-homogenisering, som vil si at melken passerer to dyser. Dette gjøres for å bryte opp eventuelle klaser som ble dannet under første homogeniseringstrinn. Ved bruk av totrinns-homogenisator bør ikke trykket i andre trinn overstige 30 til 50 bar, da overskridelse kan føre til motsatt effekt.

2.7.3 Varmebehandling:

Varmebehandling er en av de mest fundamentale prosesseringsteknologiene innenfor meieriindustrien (Rauh & Xiao, 2022), og innen moderne teknologi vil en form for varmebehandling nærmest alltid benyttes innen melkebehandling (Walstra et al., 2006e). Den primære hensikten er å enten drepe, hemme eller inaktivere kvalitetssforringende, patogene og skadelige bakterier i rå melk, slik at melken blir trygg for konsum, og holdbarheten økes til minimum en uke ved kjølelagring (Walstra et al., 2006g). Varmebehandling kan også forårsake kjemiske endringer, slik som denaturering av mypeproteiner og inaktivering av enzymer, avhengig av temperatur og holdertid. Dette kan videre påvirke blant annet reologiske og sensoriske egenskaper ved ulike prosesserte meieriprodukter (Walstra et al., 2006e).

Varmebehandling av melk kan deles inn i ulike underkategorier, som vist i figur 4. To vanlige og hyppige brukte varianter av varmebehandling er pasteurisering og UHT-behandling. Disse to typene kan igjen deles inn i flere grupper; pasteurisering kan deles inn i lav temperatur-lang tid (LTLT) og høy temperatur-kort tid (HTST), og UHT-behandling kan deles inn i direkte og indirekte. UHT-behandling refereres som oftest til som ultrapasteurisering på norsk.



Figur 4: Oversikt over underkategoriene av varmebehandling. HTST = Høy temperatur – kort tid, LTLT = Lav temperatur – lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. Figuren er laget i Canva.no basert på informasjon fra Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (2. utg.). Taylor & Francis Group. S. 14.

2.7.3.1 Høy temperatur-kort tid (HTST):

Høy temperatur-kort tid-pasteurisering kan gjøres på to måter; lavpasteurisering og høypasteurisering, hvor temperatur og holdetid er henholdsvis 72°C i 15 sekunder, og 87 °C i 15 sekunder, men eksakt temperatur kan variere (Walstra et al., 2006a). For konsummelk benyttes vanligvis lavpasteurisering, da det er en relativt mild behandling som hemmer alle vegetative patogene bakterier og inaktiverer noen enzymer, uten å endre for mye på smak og næringsverdi ved melken (Walstra et al., 2006a). I Norge er pasteurisering lovpålagt for all konsummelk i butikk, og HTST er minimumskravet regulert av lov (Animaliehygieneforskriften, 2009, §21). Høypasteurisering er mer intens ved at den forsikrer at alle vegetative mikroorganismer elimineres, samt at de fleste enzymer inaktiveres, og deler av serumproteiner denatureres (Walstra et al., 2006a).

2.7.3.2 Lav temperatur-lang tid (LTLT):

Lav temperatur-lang tid-pasteurisering av melk skjer ved minst 63 °C i 30 minutter (Fox et al., 2015.e). Temperaturen ved LTLT-pasteurisering er den laveste av de vanligste varmebehandlingene, men reduserer likevel uønskede mikroorganismer tilstrekkelig for trygt konsum (Myer et al., 2016). Selv om LTLT-pasteurisering har liten påvirkning på proteiner, kan det ødelegge enkelte vitaminer i melk, slik som vitamin C og B₆ (Van Zoeren-Grobbe et al., 1987).

2.7.3.3 Ultrapasteurisering:

Ultrapasteurisering skjer ved minst 130-145 °C, i 3-5 sekunder (Fox et al., 2015.e), og har som hensikt å gi melken kommersiell sterilitet, det vil si drepe alle bakterier, med minimale kjemiske endringer (Walstra et al., 2006a). Enkelte ultrapasteuriserte melkeprodukter vil dog likevel være utsatt for geldannelse, og smaksendringer under lagring på grunn av varmeresistente proteaser og lipaser fra psykotrofe bakterier (Fox et al., 2015.e). Enkelte varmestabile sporer kan også overleve UHT-behandling (Lorenzo et al., 2018).

Ultrapasteurisering kan foregå ved direkte- eller indirekte oppvarming. Ved indirekte oppvarming vil melken varmes uten direkte kontakt med varmekilden, som enten kan være en platevarmeveksler eller en rørvarmeveksler. Ved direkte oppvarming vil damp injiseres inn i melken, eller omvendt, som sørger for umiddelbar oppvarming. Etter noen sekunder ved ønsket oppvarmingstemperatur, vil vann i melken fordampes umiddelbart under vakuum, som sørger for rask nedkjøling (Walstra et al., 2006e).

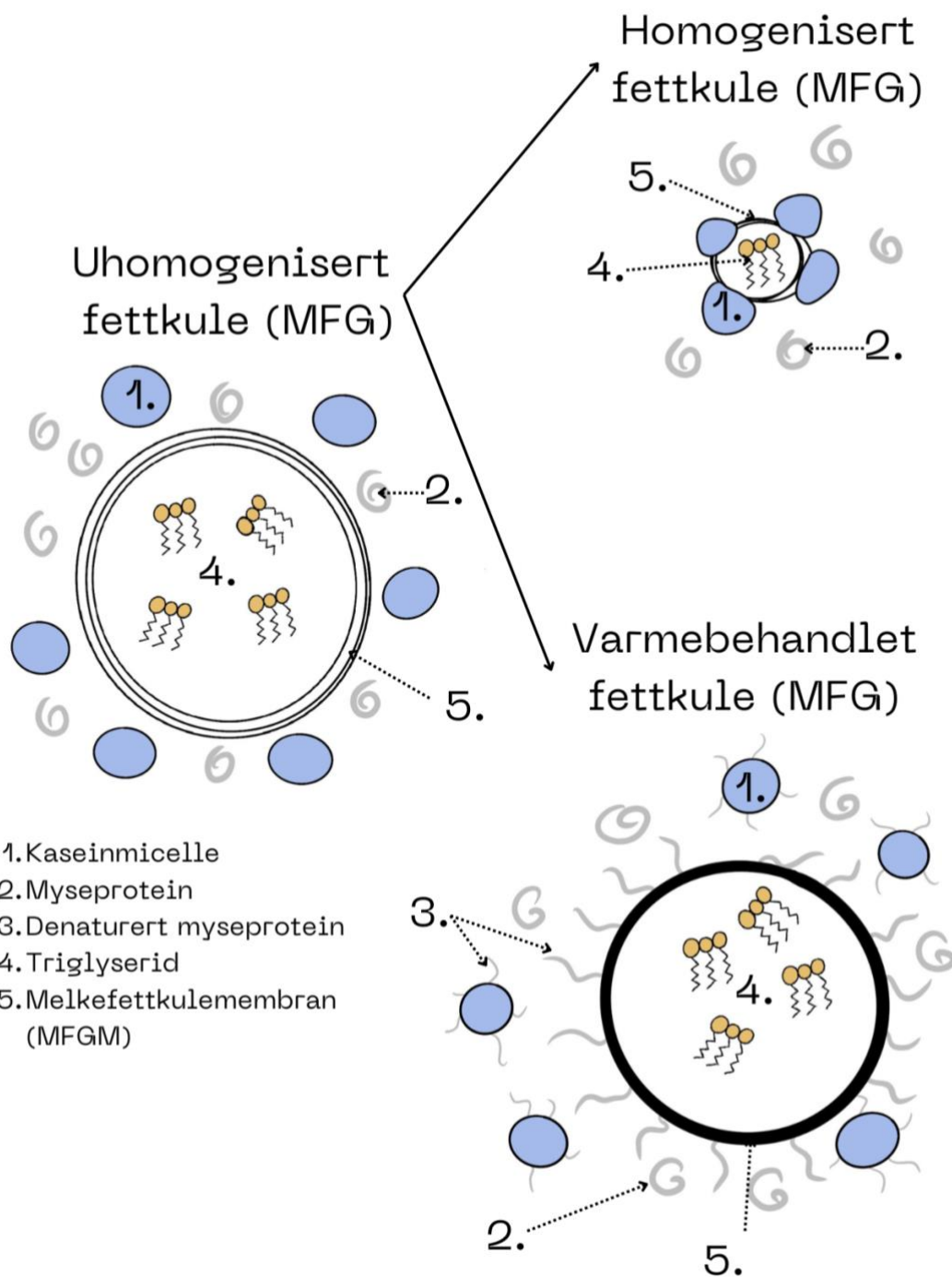
2.7.3.4 Sterilisering:

Autoklaving er en form for sterilisering som foregår ved at produktet steriliseres i beholder, som oftest hermetikk eller flaske. Metoden bruker høy temperatur (120 °C i 15 minutter), kombinert med trykk for å oppnå produkter fri for bakterier, også sporer (Walstra et al., 2006h)

2.7 4 Effekt av varmebehandling og homogenisering på melk:

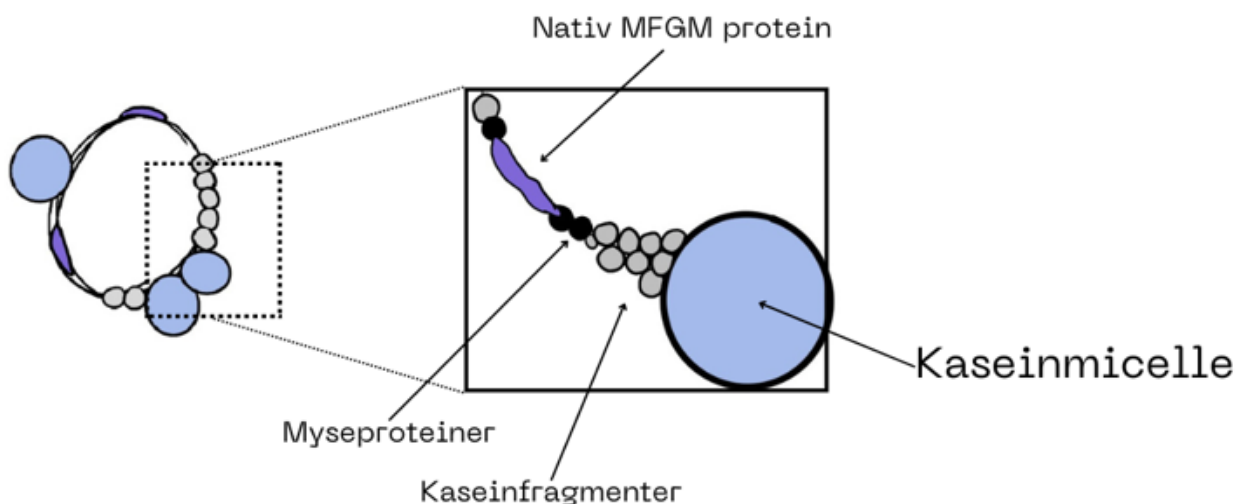
Homogenisering fører til reduksjon i fettkullestørrelse, og økt overflateareal. Den opprinnelige membranen, som nå må dekke de nye mindre fettkulene, er ikke tilstrekkelig til å dekke alt, som gjør at områder med manglende membran må erstattes med proteiner. Dette er hovedsakelig kaseinmiceller (93%), og kaseinmicellefragmenter bestående av κ -, og β -kasein, men også noen serumproteiner (Fox et al., 2015.b). Resterende vil være små bruddstykker av den opprinnelige membranen, som utgjør omtrent 10-30% av overflatearealet. Etter homogenisering reduseres kaseininnholdet i serumfasen med omtrent 6-8%, og kasein vil dekke 75% av overflatearealet til fettkulene, som gjør at disse til en viss grad oppfører som kaseinmiceller (Fox et al., 2015.b).

I tillegg til å hemme bakterier og inaktivere enzymer, vil varmebehandling av melk denaturere de varmesensitive myseproteinene α -laktalbumin, β -laktoglobulin og blodserum albumin, da de har mye sekundær- og tertiærstruktur. Denatureringen fører til endring i konfigurasjon til myseproteinene, som gjør at de kan samhandle med andre melkekomponenter. Dette betyr at denaturert β -laktoglobulin vil binde seg til nativ fettkulemembran. En tidligere studie gjort av Lee og Sherbon (2001) undersøkte kjemiske endringer i fettkulemembranen som følge av varmebehandling og homogenisering, og observerte at membranglykoproteiner forsvant som følge av varmebehandling. De fant også at økte mengden frie sulfhydrylgrupper sank, og mengden disulfidbindinger økte, som tydet på at β -laktoglobulin ble bundet til native membranproteiner i fettkulemembranen. En forenklet illustrasjon som oppsummerer effekten av homogenisering og varmebehandling på fettkuler og dets membran er vist i figur 5.



Figur 5: oversikt over påvirkning av homogenisering og varmebehandling (moderat temp.) hver for seg på melkefettkule og dets membran (MFGM). Egen illustrasjon basert på informasjon fra McSweeney, P. L., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (Eds.). (2020). *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*. Springer International Publishing. S. 150.

Varmebehandling utført alene vil ikke påvirke fettkulestørrelse, men assosiert med homogenisering (uavhengig av rekkefølge) vil fettkulene bli mindre enn i kun homogenisert melk ((Lee & Sherbon, 2002; Sharma & Dalgleish, 1994). Homogenisering (alene eller i kombinasjon med varmebehandling) øker proteininnholdet i fettkulemembranen sammenlignet med ubehandlet melk og varmebehandlet melk (Lee & Sherbon, 2002). For kommersielle melkeprodukter er som oftest begge prosessene benyttet, men rekkefølgen på disse er helt avgjørende for melkens kjemiske struktur. I tilfeller der melk blir homogenisert før varmebehandling vil kasein, enten som miceller eller fragmenter, dekke den nye overflaten til fettkulene, men ingen serumproteiner er til stede i membranen. Dersom melk blir varmebehandlet før homogenisering er serumproteinene denaturert, og samhandler både med κ -kasein på kaseinmiceller og nativ fettkulemembran. Varmebehandlingen av melk fører til kompleksdannelse mellom serumproteiner og absorbert kasein på overflaten til fettkulen, og under homogeniseringen vil komplekset med kasein og serumproteiner absorberes på den nye membranen. Det totale proteininnholdet i fettkulemembranen er derfor størst ved homogenisering etter varmebehandling, fordi det i tillegg til å være direkte interaksjoner mellom myseproteiner og fettkulemembranen, vil danne komplekser av myseproteiner og kaseinmiceller/fragmenter som binder seg til membranen. En forenklet illustrasjon som oppsummerer effekten av kombinasjonen av varmebehandling etterfulgt av homogenisering på fettkuler og dets membran er vist i figur 6.



Figur 6: Forenklet illustrasjon av melkefettkule og dets membran (MFGM) som følge av varmebehandling etterfulgt av homogenisering. Egen illustrasjon basert på informasjon fra Michalski, M. C., Michel, F., Sainmont, D., & Briard, V. (2002). Apparent ζ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23(1), 23-30. S. 24.

Grad av pasteurisering vil påvirke hvor mye av myseproteinene som denatureres.

Ultrapasteurisering fører til at 98 til 100% av β -laktoglobulin, og 74% α -laktalbumin denatureres, mens kun 5 til 15% β -laktoglobulin denatureres ved HTST pasteurisering (Griffiths, 2010; Li et al., 2018; Tran et al., 2008).

2.7.5 Effekt av varmebehandling og homogenisering på smak og fordøyelse:

Fersk melk har ingen karakteristiske sterke smaker, og det som er av søthet og salthet skyldes laktose og mineraler, mens kremaktigheten i helmelk skyldes fett (Walstra et al., 2006a). For oppfattelse av væsker er ofte ettersmak og munnfølelse etter svelging viktig, da maten er i munnen i kort tid sammenlignet med fast føde (Engelen & de Wijk, 2012). Astringens er en ettersmak som er knyttet til en følelse av tørrhet i munnen, og skyldes en endring i melkeproteiner, noe som skjer under både homogenisering, og varmebehandling av melk (Li et al., 2018). Det er observert at astringens i melk kan skyldes både økende partikkelstørrelse, og endringer av myseproteiner (Josephson et al., 1967), i tillegg til at det kan være knyttet til tilstedeværelse av γ -kasein, produktet av protolytisk degradering av β -kasein (Harwalkar et al., 1993; Withers et al., 2014; Withers et al., 2013). Astringens kan også være forårsaket av aggregering og oppfattelse av proteiner i spytt, som fører til redusert smøreevne, men fett kan motvirke dette ved å smøre overflaten i munnen (De Wijk & Prinz, 2005, 2006; Des Gachons et al., 2012; Jöbstl et al., 2004).

I 2018 ble det gjennomført et studie på effekten av fettinnhold, pasteuriseringsmetode, homogeniseringstrykk, og lagringstid på mekaniske og sensoriske egenskaper i melk (Li et al., 2018). Studien viste at økt fettinnhold hadde totalt sett størst signifikant effekt på sensoriske og mekaniske egenskaper, ved øking av sensorisk viskositet, samt redusert astringens. I en annen studie ble det funnet at homogenisert melk er mer utsatt for uønskede bismaker, da lipidene er mer utsatt for lipolyse og er mer sensitiv for fotokjemiske endringer følge av homogenisering (Humbert et al., 1980).

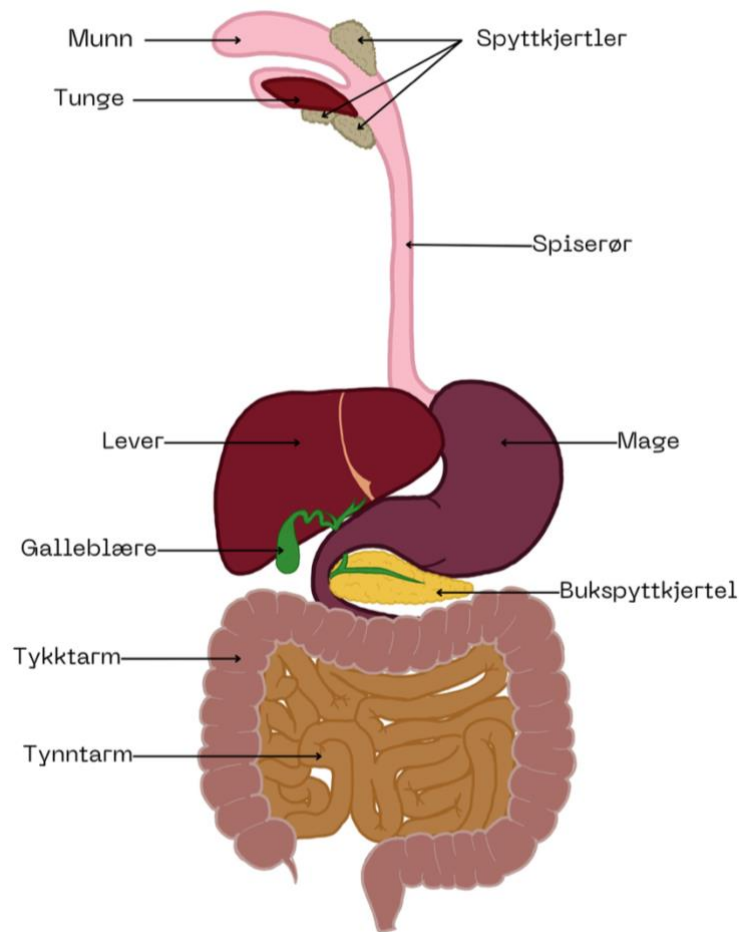
2.8 Human fordøyelse og dets enzymer:

Det humane fordøyelsessystemet er et komplekst fysiologisk system som består av mage-tarmkanalen og følgende tilhørende kroppsdelar og organer; munnhule med tenner og tunge, spyttkjertler, spiserør, bukspyttkjertel, lever og galleblære. Systemet er en 7 meter lang kanal som strekker seg fra munnen, gjennom magesekken og tarmen, og slutter ved endetarmsåpning (Lee, 2019). Fordøyelsessystemet har 3 hovedoppgaver; 1. fordøye mat, og absorbere næringsstoffer, 2. skille ut avfallsstoffer gjennom avføring eller gallesystemet, og 3. beskytte og håndtere uønskede mikroorganismer som virus, parasitter, gift og bakterier (Barrett, 2014a).

Fordøyelse skjer gjennom mekanisk og kjemisk nedbrytning (Barrett, 2014a). Mekanisk nedbrytning foregår ved at munn, magesekk, og tarmene fysisk reduserer størrelsen på maten og dets partikler, ved hjelp av frivillig (tygging og svelging) og ufrivillig motilitet (peristaltiske kontraksjoner og segmentale bevegelser). Bevegelsene sørger for nedbryting av maten, som bidrar til økt overflateareal slik at enzymer lettere kan hydrolysere stoffene i maten (Barrett, 2014d).

Hensikten med nedbrytningen er at makronæringsstoffene karbohydrat, protein og fett brytes ned til deres enkleste form, slik som D-glukose, aminosyrer og fettsyrer. Gjennom absorpsjon transporteres de nedbrutte næringsstoffene fra tarmen, over tarmslimhinnen og inn til blodet eller lymfesystemet, og fraktes videre til celler som bygger opp kroppen (Lee, 2019).

Oversiktsfigur over fordøyelsessystemet, og dets tilhørende organer og kroppsdelar er vist i figur 7.



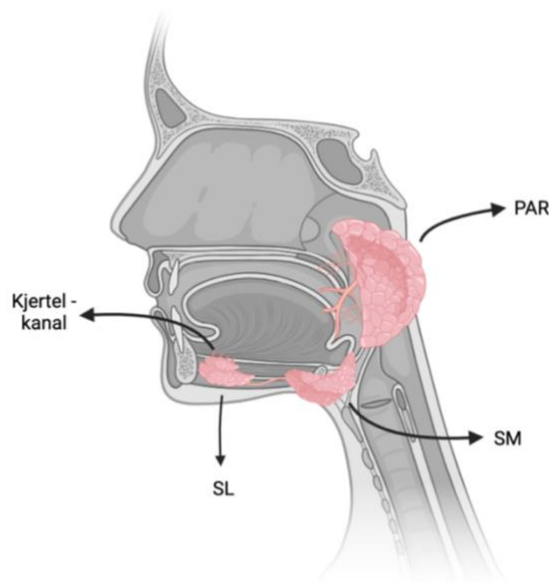
Figur 7: Illustrasjon av fordøyelsessystemet og dets tilhørende organer og kroppsdeler i fordøyelsessystemet munnen til endetarm. Egen illustrasjon med inspirasjon fra *Gastrointestinal Physiology* (s. 8), av K. E. Barrett, 2014, McGraw-Hill Education. CC BY McGraw-Hill Education.

2.8.1 Munn:

Munnen er den første kroppsdelen i fordøyelsessystemet som maten kommer i kontakt med, og markerer starten på fordøyelsesprosessen. Her foregår mekanisk bearbeiding av maten gjennom tygging og svelging, samtidig som maten blandes med spytt, som starter den kjemiske nedbrytningen av næringsstoffer, samt gjør det lettere for massen (oral bolus) å beveges nedover spiserøret (øsofagus). I tillegg vil spytt forsikre riktig mikrobielt miljø for å opprettholde god tannhelse, og spille en rolle i oppfattelsen av mat (Barrett, 2014c). Spyttet holder en relativt nøytral pH på mellom 6.2 – 7.6, og inneholder hovedsakelig vann, men også proteiner og mineraler som gir spyttet dets allsidige rolle (Baliga et al., 2013).

2.8.1.1 Oral sekresjon:

Det finnes tre hovedgrupper av spyttkjertler knyttet til munnhulen; parotidkjertler (PAR), submandibulære kjertler (SM) og sublinguale kjertler (SL), som sitter symmetrisk på hver sin side av henholdsvis ørene, under kjeven og under tungen (se figur 8). I tillegg finnes det flere mindre kjertler rundt om i munnhulen (innsiden av lepper, kinn og gane). De submandibulære og sublinguale kjertlene skiller ut mye spytt i sovende (72%) og ustimulert tilstand (70%), og står for produksjonen av et viskøst og mukus-rikt spytt, mens parotidkjertlene produserer et tynt, men amylase-rikt spytt. Disse kjertlene produserer lite spytt når de ikke er stimulert (21%), men ved mekanisk (58%) eller smaksansrelatert (45%) aktivering står de for over halvparten av volumet spytt (Heinzerling, 2013).



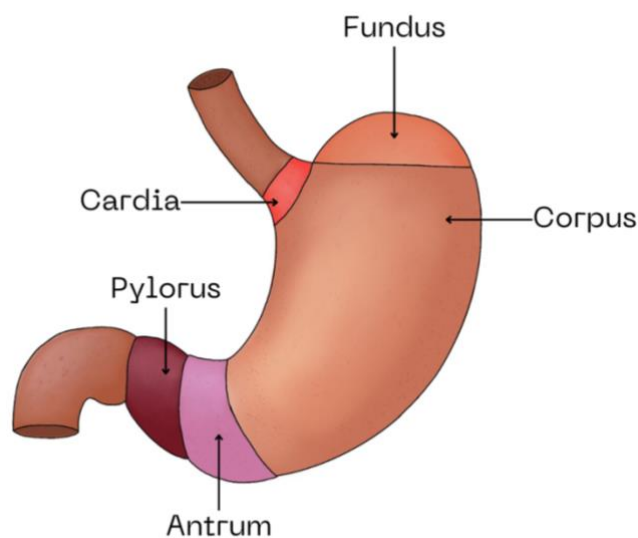
Figur 8: Illustrasjon av de 3 hovedtypene spyttkjertler; parotidkjertlene (PAR), submandibulærkjertlene (SM) og de sublinguale kjertlene (SL). Figuren er laget i Biorender.com, basert på informasjon fra Heinzerling, C. I. (2013). *Saliva and sensory perception: Interplay between the person and the food stimuli*. Wageningen University and Research. S.4.

Parotidkjertlene er gruppen spyttkjertler som er viktigst for fordøyelse, og omtrent 30% av proteinkonsentrasjonen i spyttet er amylase, resten (60%) er prolin-rike proteiner og glykoproteiner (Van Nieuw Amerongen et al., 2004). Amylase som skiller ut i munn kalles enten spyttamylase, ptyalin eller α -amylase. Det er i stand til å spalte amylose, en av de to polysakkarider som stivelse er bygget opp av, men kroppen er ikke avhengig av dette enzymet for normal fordøyelse (Barrett, 2014e). Det er vist at lipase i spytt (lingual lipase) eksisterer hos flere dyr, blant annet mus og rotter (Docherty et al., 1985). Enn så lenge er det ikke bevist at det finnes noe annet enn spyttamylase av enzymer i munnen til mennesker (Grundy & Wilde, 2021), og temaet forblir kontroversielt.

2.8.2 Magesekk:

Magesekken er en utvidelse av fordøyelseskanalen mellom spiserøret og tynntarmen, og fungerer som et midlertidig reservoar for maten (Barrett, 2014a). Langsgående anatomiske folder av slimhinnevevet (rugae) gjør at magesekken kan utvide seg fra å romme omtrent 100 mL til 1500 mL, avhengig av faktorer som alder og kjønn (Karnul et al., 2022). I tillegg til rugae forstørres magesekkens overflateareal med rørkjertler, hvor det befinner seg spesialiserte celler som er ansvarlig for sekresjon av fordøyelsesenzymer (Barrett, 2014a). Magesekken har kontraksjoner med jevne mellomrom, som er viktig for oppdeling av maten, og blanding med den sure magesaften. I tillegg sørger magen for kontrollert videreføring av chyme (blanding av magesaft og mat) til tynntarmen, ved hjelp av pylorusmuskelen, en lukkemekanisme (sfinkter) mellom magesekken og duodenum (Barrett, 2014d).

Magesekken deles inn i 4 deler (fra toppen); Cardia, Fundus, Corpus og Antrum (Barrett, 2014a). Muskulaturen er best utviklet nederst i magesekken med spesialisert muskelvev, som betyr at kontraksjonene er sterkest der, og hvor miksing og fysisk bearbeiding av maten skjer. Cardia er den delen av magesekken som tar imot maten fra spiserøret, og sender det videre til Fundus. Corpus, og til en viss grad Fundus, spiller en sentral rolle i utskillelse av saltsyre (HCl) på grunn av høy konsentrasjon av parietalceller i det området (Barrett, 2014a). Parietalceller en av de primære celletypene, rørkjertlene, i slimhinnen i magesekken er bygget opp av. Andre viktige typer celler er; mukøse celler, som står for produksjon av syrebeskyttende slim samt bikarbonat, og hovedceller som produserer pepsinogen og gastrisk lipase og endokrine celler som produserer fordøyelsesregulerende hormoner (Barrett, 2014b).

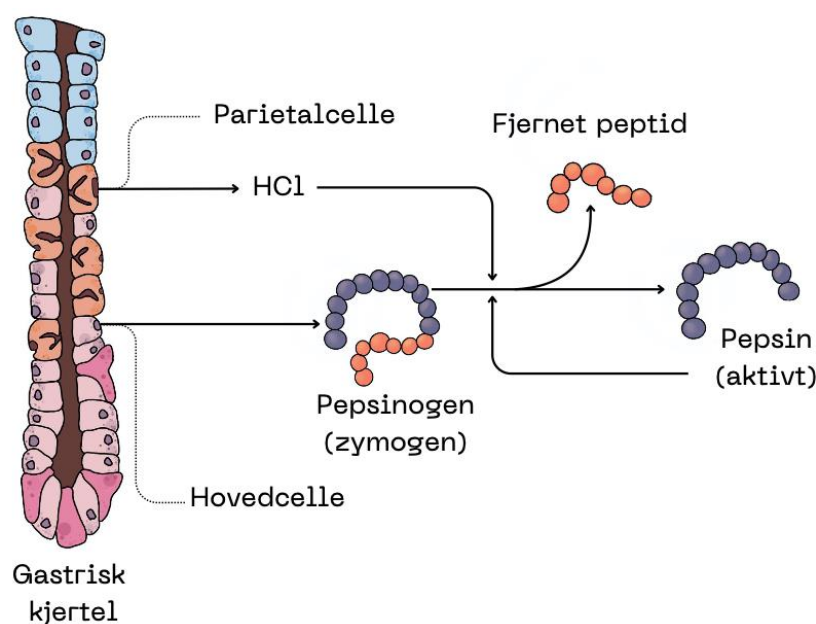


Figur 9: Illustrasjon som viser de 4 inndelingene av magesekken; Cardia, Fundus, Corpus og Antrum, samt pylorusmuskelen. Egen illustrasjon basert

2.8.2.1 Gastrisk sekresjon - Magesyre:

Sekretet i magesekken er magesyre, også kalt gastrisk syre. Magesyre inneholder hovedsakelig saltsyre (HCl) og vann, men også elektrolytter, nukleinsyrer, glykoproteiner og enzymer (Lu et al., 2010). Parietalcellene produserer HCl, en sterk syre, som i kombinasjon med andre substanser i magesyren gjør at pH-en til magesyre ender på rundt 1.5 til 4.5, avhengig av hvor i fordøyelsesprosessen maten er. Rett etter inntak av mat vil pH ligge på rundt 4.5, og returnere til rundt pH 1, 3 til 4 timer etter konsumert måltid (Gardner et al., 2001). Magesyre er viktig for fordøyelsen, fordi det blander seg med den delvis nedbrutte maten og fortynner den (chyme), samt at parietalcellene produserer glykoproteiner som skilles ut i magesyren, og som er helt nødvendige for absorpsjon av for eksempel vitaminet B₁₂. I tillegg er aktivering av gastriske enzymer, slik som pepsin og gastrisk lipase, helt avhengige av det sure miljøet i magesyren (Barrett, 2014b)

Enzymet pepsin står ansvarlig for nedbrytning av proteiner, og det skilles ut av hovedceller som pepsinogen, en inaktiv forløper (zymogen) av pepsin (Barrett, 2014b). Dette er for å hindre uønsket selvfordøyelse av vevet i magen, da enzymet er en relativt aggressiv protease, og har potensiale til å forårsake skade (Barrett, 2014e). Aktiveringen av enzymet skjer ved en pH mellom 1.5 til 2 (Heda et al., 2019). Ved denne lave pHen skjer det en auto-katalytisk kløyving av det N-terminale peptidet fra pepsinogen som frigir pepsin (Barrett, 2014b).



Figur 10: Produksjon og aktivering av zymogenet pepsinogen til pepsin. Egen rekonstruksjon av figur 25.15. fra Saladin, K. S. (2014). *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function (7 ed.)*. McGraw-Hill Education. I tillegg til nedbrytning av proteiner i magesekken, vil det også foregå lipidfordøyelse.

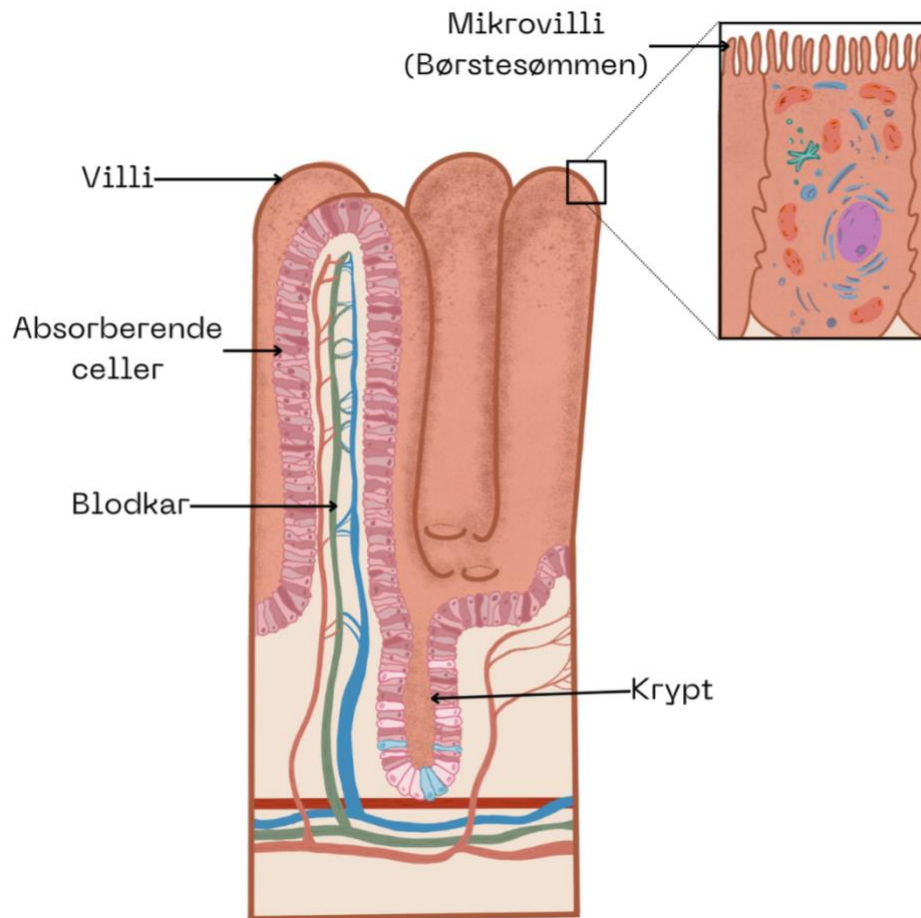
Omtrent 10-30% av nedbrytningen av lipider foregår i magesekken, av enzymet gastrisk lipase. Enzymet skilles ikke ut som et zymogen, men blir i likhet med pepsinogen produsert av hovedceller i de gastriske rørkjertlene i Fundus/Corpus. Gastrisk lipase har optimal aktivitet ved samme pH som innholdet i magesekken, 4.5-5.5 etter et måltid, og blir lite påvirket av pepsin, men hemmes av gallesyrer (Barrett, 2014f). Utskillelse av gastrisk lipase stimuleres av flere faktorer, slik som bevegelse i magen, cholinergisk stimuli fra vagusnerven og gastrin (Grundy & Wilde, 2021), mye i likhet med produksjon av HCl.

2.8.3 Tynntarmen:

Tynntarmen er fordøyelsessystemets lengste organ, og selv om eksakt lengde er vanskelig å måle, antas den å være mellom 6-6.5 meter hos voksne individer (Skandalakis et al., 2000). Tarmen ligger oppkveilet i bukhulen, og deles i 3 deler (fra toppen); duodenum, jejunum og ileum. Første del av tynntarmen, duodenum, blir også kalt tolvfingertarmen. Det er den delen av tynntarmen som kommer direkte etter magesekken, og er en c-formet forlengelse av pylorysmuskelen (Barrett, 2014a). Duodenum er den korteste av de 3 delene, og måler omtrent 25-30 cm (Collins et al., 2024), men på tross av sin lille størrelse har den en viktig funksjon; det er her pankreatiske enzymer, bukspytt og galle skilles ut, som sørger for fortsettelsen av nedbrytningen av maten som startet i magesekken (Barrett, 2014a). Bukspyttkjertelen og galleblæren er koblet sammen til duodenum (Duodenal Cluster Unit) gjennom en biologisk struktur kalt Ampulla Vateri, som fungerer som en felles kanal for overnevnte organer (Pea et al., 2018), som lukkes og åpnes av Oddisfinkeren (Barrett, 2014a).

Videre til jejunum, som utgjør rundt 1/3 del av tynntarmens totale lengde, omtrent 2.5 meter (Collins et al., 2024). Det er i denne delen hvor alt vesentlig opptak av næringsstoffer skjer. På grunn av dets hovedansvar for absorpsjon har jejunum et stort overflateareal, som skyldes overflatefolder (Kerckring folder), krypter og villi, samt mikrovilli på overflaten til villi. Det er ved de aller minste foldene, altså på mikrovilli på overflaten til villi, absorpsjonen foregår, og barrieren kalles ofte for børstesømmen. Næringsstoffene som ikke absorberes i jejunum eller i duodenum vil bli absorbert i siste delen av tynntarmen; ileum. Som resultat av at denne delen er mindre delaktig i absorpsjon, har ileum færre folder og kortere villi. Mesteparten av

nedbrytningsproduktene av proteiner, karbohydrater og fett vil være absorbert før ileum, så majoriteten av det som absorberes er B₁₂, eller gallesyrer (Barrett, 2014a).



Figur 11: Illustrasjon av oppbygging av det absorberende vevet i jejunum (tolvfangertarmen). Egen illustrasjon basert på informasjon fra *Gastrointestinal Physiology* (s. 8), av K. E. Barrett, 2014, McGraw-Hill Education. CC BY McGraw-Hill Education. S.5 og 294.

2.8.3.1 Duodenal sekresjon:

Selv om enzymer i spytt og magesaft bidrar til fordøyelse av næringsstoffer, vil opptaket av næringsstoffer bli forstyrret dersom pankreatisk enzymaktivitet reduseres med bare 10%.

Bukspyttkjertelen er derfor den viktigste kilden til fordøyelsesenzymer, og enzymene som skilles ut her kan deles inn i 4 kategorier; proteaser, amylolytisk enzym, lipaser og nukleaser. Majoriteten av enzymene som skilles ut fra bukspyttkjertelen er proteaser, hvor trypsinogen, forløperen til trypsin, står for 40% av totalvekten til proteasene (Barrett, 2014c).

I likhet med pepsin og trypsin, skilles det lipolytiske enzymet fosfolipase A₂ (PLA₂) også ut som zymogen kalt profosfolipase A₂ av bukspyttkjertelen. I tillegg skilles det ut lipase og

kolesterol esterase, samt kofaktoren kolipase (skilles ut som prokolipase), som alle bidrar til nedbrytningen av lipider (Barrett, 2014f).

2.8.4 Tykktarmen:

Tykktarmen fungerer som et oppbevaringslager for avfall og ufordøyd materiale fram til avføring. Colonocytter (epitelceller i tykktarmen) er ikke involvert i opptak av monosakkarider, peptider, aminosyrer og vitaminer, men kan bidra med absorpsjon av andre bestanddeler (Barrett, 2014a). Slike bestanddeler kan være kortkjeda fettsyrer produsert av tarmbakterier gjennom fermentering av ufordøyelig kostfiber. Det dannes i hovedsak 3 korte fettsyrer; propionsyre (propionat), eddiksyre (acetat) og smørsyre (butyrat). Colonocytter kan bruke de frie fettsyrene som energi, slik at god tarmhelse opprettholdes (Robertson et al., 1999). Bakteriesammensetningen i tykktarmen er mangfoldig, og danner unike økosystemer som er viktig for total ernæringsstatus. Hos friske individer består den hovedsakelig av kommensale anaerobe bakterier (Barrett, 2014a). Andre bakterielle metabolitter, slik som enkelte vitaminer, og vann vil også absorberes her.

2.9 Fordøyelse og absorpsjon av fett:

Fordøyelse av fett er svært komplekst, og kan anses som et fenomen avhengig av kolloidal overflateaktivitet. Dette er fordi fordøyelsesstoffer, slik som gallesalter og lipaser, samhandler med komponenter i mat, som blant annet fiber og proteiner, og reagerer med lipider på lipid-vann grenseflaten, som videre påvirker lipasenes evne til å hydrolysere lipidene. Grunnen til dette fenomenet er fordi lipider er uløselig i vann (Grundy & Wilde, 2021) og systemer for å holde lipidene suspendert i mageinnholdet slik at overflaten er tilgjengelig for lipaseaktivitet er nødvendig (Barrett, 2014f).

2.9.1 Magesekk

Emulgeringen starter i magesekken, hvor peristaltiske bevegelser fører til skjærekrefter, som fordeler lipider som triglyserider og fosfolipider inn i en jevn emulsjon. I en slik emulsjon er oljedråpene tilgjengelig for gastrisk lipase, som binder seg til dråpeoverflaten hvor den kan begynne å bryte ned triglyserider (Barrett, 2014f). Enzymet har høy aktivitet for triglyserider, mindre for diglyserider, og veldig lite for monoglyserider, og vil ikke hydrolysere kolesterol estere eller fosfolipider. Det er vist at gastrisk lipase bryter *sn*-3 bindingen i triglyserider både *in vivo*, og *in vitro* (Carrière et al., 1997), og det dannes diglyserider og en frie fettsyrer

(Grundy & Wilde, 2021). På grunn av lav pH i magesekken vil de frie fettsyrene bli protonert, og bevege seg mot midten av oljedråpene (Barrett, 2014f).

2.9.2 Tynntarm

Etter hvert som maten beveger seg videre nedover tynntarmen vil pH i massen øke som følge av tilsetning av bukspytt og galle som inneholder bikarbonat. Endringen i pH gjør at fettsyrene som ble frigitt i magesekken vil bli ionisert, og posisjonere seg på utsiden av oljedråpene.

Dette vil hovedsakelig bidra med stabilitet. Fettsyrene (og peptider) har stimulerende effekt på utskillelse av hormonetolecystokinin (CCK), som har en rekke viktige roller innenfor fordøyelse av lipider; det øker utskillelse av pankreatiske enzymer, avslapper Oddisfinkter og skiller ut galle. Massen vil blande seg med det duodenale sekretet, hvor galle vil fungere som en emulgator og reduserer partikkelstørrelse til de hydrofobe oljedråpene. Pankreatisk lipase har funksjonelle likheter med gastrisk lipase, men pankreatisk lipase vil i tillegg til å hydrolysere *sn*-3 bindingen i triglyserider, også bryte *sn*-1. Dette resulterer i et monoglyserid, og to frie fettsyrer (Barrett, 2014f).

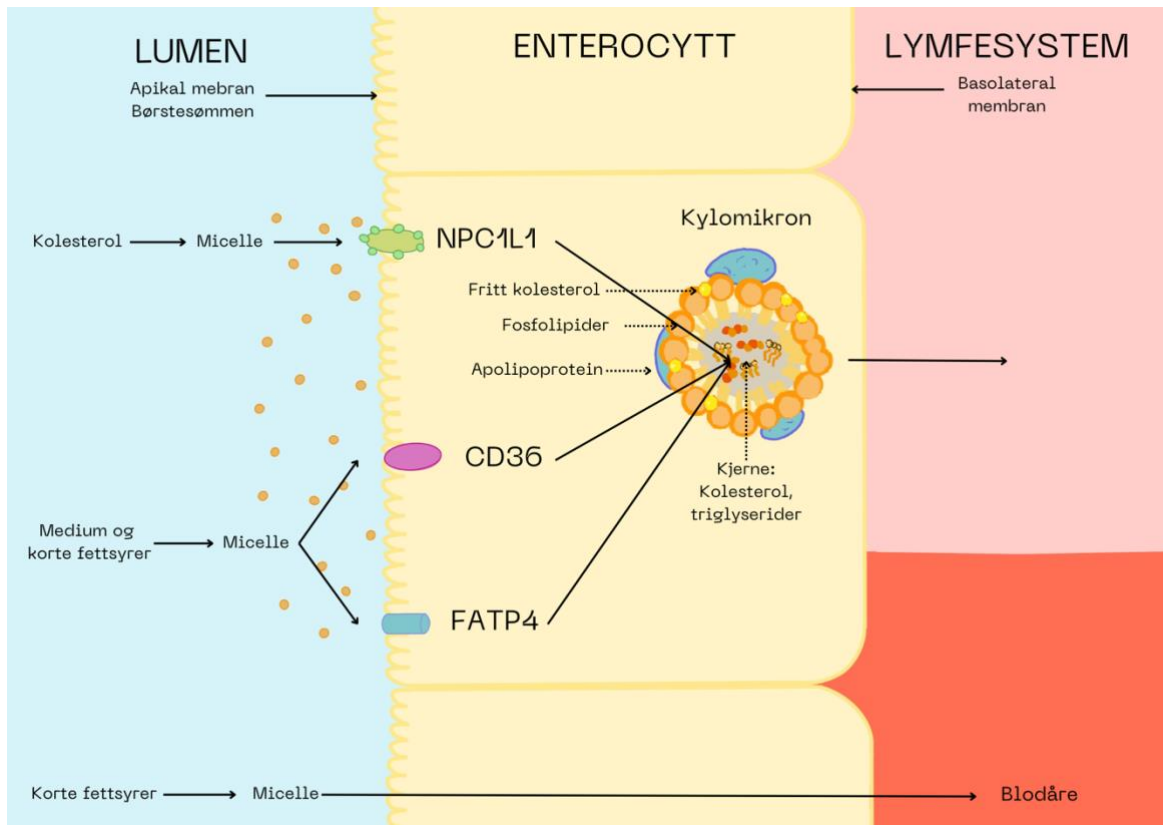
Begge lipasene vil hemmes av galle. For gastrisk lipase, som kun er aktiv i magesekken, har det liten påvirkning da det i utgangspunktet er lite gallesyrer til stede, men for pankreatisk lipase er situasjonen annerledes. For at pankreatisk lipase skal fungere i samvær med gallesyrer er det avhengig av kolipase, som forankrer pankreatisk lipase og gallesyre til overflaten på oljedråpen slik at aktiviteten kan opprettholdes

Fosfolipase A₂ vil bryte ned fosfolipider ved å angripe *sn*-2 bindingen i glyserolet. Kolesterol esterase bryter estere av kolesterol fra kosten, i tillegg til estere av vitamin A, D og E. På grunn av bred spesifisitet hos dette enzymet kan det også bryte den siste *Sn*-2 bindingen i monoglyseridene som tidligere ble spaltet av pankreatisk og gastrisk lipase (Barrett, 2014f). Andre enzymer som deltar i fordøyelse av fett er Pankreatisk Lipase-Relatert Protein 2 (PLRP2) og Karboksyl Ester Hydrolase/Galle Salt-Stimulert Lipase (CEH-BSSL) som også produseres i bukspyttkjertelen. CEH-BSSL finnes også i morsmelk, og kan derfor også refereres til som brystmelk lipase. Disse proteinene vil bryte ned estere av karotenoider, monoglyserider, triglyserider, vitamin A og E estere, fosfolipider og galaktolipider (Grundy & Wilde, 2021).

2.9.3 Absorpsjon:

Etter fordøyelse må nedbrytningsproduktene transporteres over tarmlumen. Gallesyrer har en viktig rolle med å løse opp endeproduktene fra lipolyse, som fremmer transporten mot mikrovilli, som er det absorberende epitelium. Etter hvert som forholdet mellom gallesyre og lipolytiske produkter øker, vil de pakkes sammen i micellelignende strukturer, hvor produktene er totalt løselig. Mengden gallesyre til stede i lumen avgjør dannelsen av miceller, og micellene gjør det mulig å transportere lipidene til børstesømmen hvor de lipolytiske produktene kan absorberes. Det er verdt å merke seg at frie fettsyrer og monoglyserider kan diffundere til børstesømmen på egenhånd, og dermed ikke er avhengig av å pakkes i miceller, slik som kolesterol, fettløselige vitaminer og plantesteroler (Barrett, 2014f).

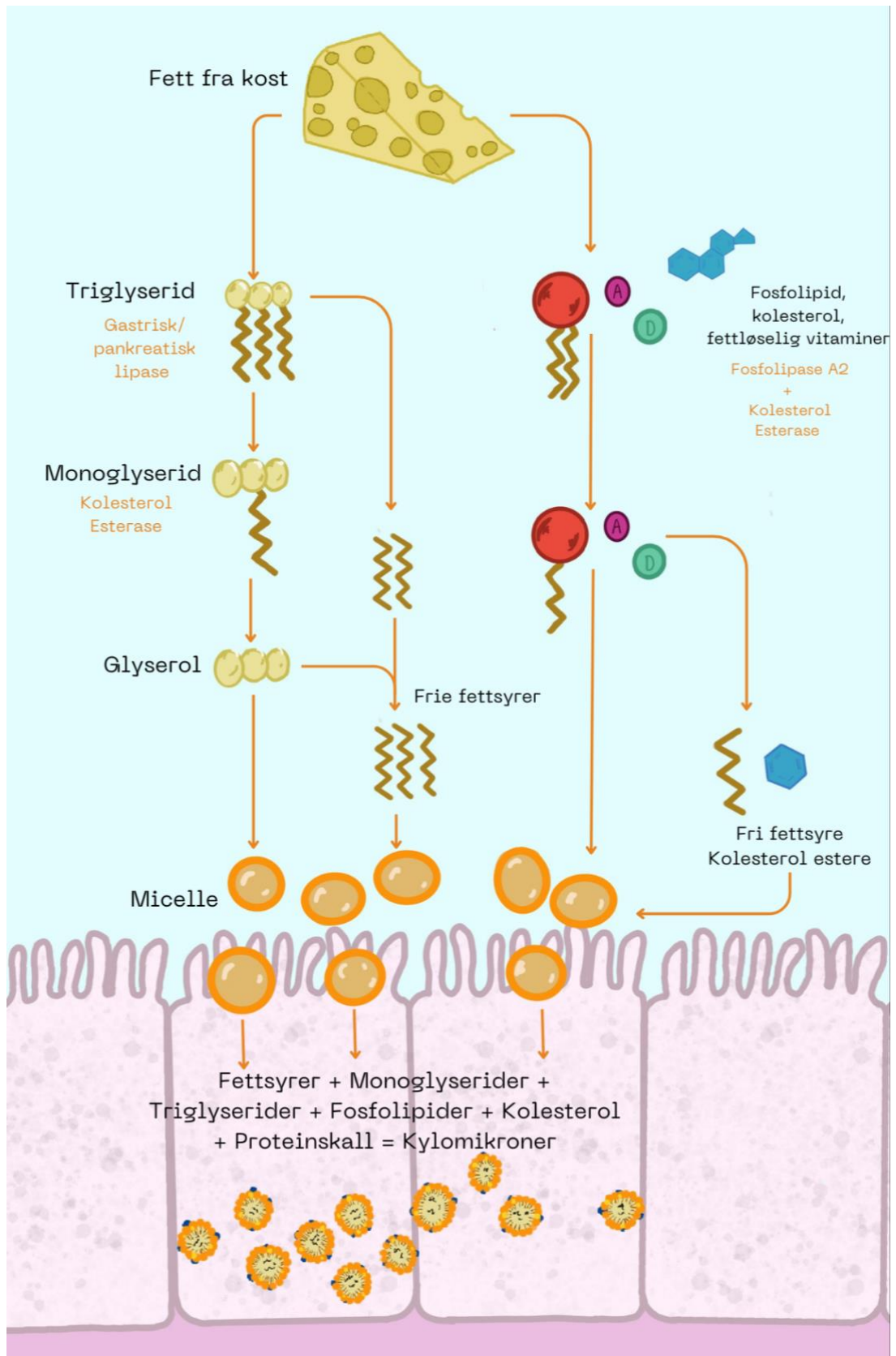
Framme ved børstesømmen vil lipidenes transport over membranen variere avhengig av kjemiske og strukturelle egenskaper. Grovt sett kan absorpsjon av lipider deles inn i 4 mekanismer som er illustrert i figur 12. Den første mekanismen innebærer at medium langkjedede og langkjedede fettsyrer kan benytte seg av et protein kalt FATP4 (Fatty Acid Transport Protein 4), eller CD36 (Fatty Acid Translocase). Disse proteinene sitter i apikal (ytre) membran, og frakter fettsyrene til innsiden av enterocytene. Den andre mekanismen går ut på at korte fettsyrer kan krysse membranen gjennom enkel passiv diffusjon, inn i mesenterisk venøst blod og inn i portalvenen. Den siste mekanismen går ut på at kolesterol absorberes gjennom assistert transport, ved hjelp av et transporterprotein kalt Niemann Pick C1 (NPC1L1).



Figur 12: Illustrasjon av de ulike mekanismene for absorpsjon av lipolyseprodukter i enterocytter (absorberende celler i tarmen). Egen illustrasjon basert på informasjon fra Wang, T. Y., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q.-H. (2013). *New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption*. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(11), 1203–1223. <https://doi.org/10.1111/eci.12161>. S. 1208.

75% av de absorberte fettsyrene blir remontert til triglyserider, noe passerer membranen med enkel passiv transport, og resten forblir i enterocytter ved behov. Remontering skjer i endoplasmatisk retikulum, deretter blir de overført til golgi-apparatet, der de blir omringet av fosfolipider, kolesterol estere og apoproteiner, som danner en struktur kalt kylomikroner. Denne strukturen brukes for å frakte lipidene over basolateral (indre) membran i enterocytter gjennom eksocytose, og rundt i kroppen. På grunn av kylomikronenes store størrelse må de transporteres ut via lymfesystemet, og størrelsen på kylomikronet reduseres etter hvert som komponenter fjernes. Fettsyrer vil for eksempel spaltes fra kylomikronet av lipoprotein lipase (Barrett, 2014f).

En illustrasjon som oppsummerer fordøyelse og absorpsjon av fett er vist i figur 13.



Figur 13: Oppsummerende illustrasjon av fordøyelse av fett fra kosten. Egen illustrasjon basert på informasjon fra *Gastrointestinal Physiology* (s. 8), av K. E. Barrett, 2014, McGraw-Hill Education. CC BY McGraw-Hill Education. S.285 – 295.

2.10 Sammenhengen mellom kjemisk struktur til mat og fordøyelse:

Lipider er energi- og næringsrike bestanddeler i humant kosthold, som er viktige for normale celle- og kroppsfunksjoner. I tillegg er enkelte fettsyrer (alfalinolensyre og linolsyre) helt essensielle for overlevelse, da kroppen ikke syntetiserer disse selv. Et overdrevent konsum av lipider vil ha negative helseeffekter, og den totale ernæringsmessige kvaliteten til en diett er i stor grad assosiert med mange tilstander og sykdommer, som igjen påvirker helse og velvære. Dette er ingen ny kunnskap, men hvordan matens kjemiske struktur påvirker hvordan det fordøyes, og i så fall i hvor stor grad er et stadig voksende tema. Det er flere studier som i nyere tid har undersøkt effekten av pasteurisering og homogenisering på fordøyelse av melkefett.

Islam et al. (2017) gjennomførte en studie hvor 4 ulike melkeprodukter ble *ex vivo* fordøyd. Melkeproduktene var; 1. rå melk, 2. kun pasteurisert (HTST), pasteurisert (HTST) og homogenisert ved 50 bar og pasteurisert (HTST) og homogenisert ved 150 bar. Fordøyelsen ble gjort med humane fordøyesvæsker fra 25 frivillige. Fettsyremetylestere (FAME) fra materiale etter gastrisk fase i 60 minutter, og duodenal fase i 5, 30 og 120 minutter ble analysert på GC-MS. En annen tidligere studie gjort av Tunick et al. (2016) benyttet *in vitro* fordøyesmodell istedenfor *ex vivo*. Studien brukte melk med standardisert fettprosent på 3.25%, og behandlet melken med både HTST-pasteurisering og UHT-behandling (135 °C i 2 sek) i kombinasjon med homogenisering (ukjent trykk). Dette resulterte i fem melkeprodukter; 1. rå melk, 2. kun homogenisert, 3. kun HTST-pasteurisert, 4. homogenisert og HTST-pasteurisert, 5. homogenisert og UHT-behandlet. FAME fra fordøyd materiale etter 0, 30, 60 og 120 minutter etter fordøyelse ble analysert på GC-FID. En siste studie gjort av Zhao et al. (2019) behandlet melken med tottrinshomogenisering (200/40 bar), HTST-pasteurisering og UHT-behandling, som resulterte i 4 produkter; 1. rå melk, 2. kun homogenisert, 3. homogenisert og HTST-pasteurisert og 4. homogenisert og UHT pasteurisert. Produktene ble *in vitro* fordøyd, og FAME etter 60 min gastrisk fase, og 120 min duodenal fase ble analysert med GC. Resultatet i alle studiene var at homogenisering økte mengden frie fettsyrer som ble frigitt, i tillegg til at økt temperaturbehandling økte mengden ytterligere. Årsaken til dette er at homogenisering reduserer fettkulestørrelse, som øker overflateareal, og lipaser får dermed bedre tilgang på fettkulemembranen. I tillegg kan sterk varmebehandling føre til skade på strukturen til fettkulen, som tillater enzymene å lettere fordøye lipidene (Tunick et al., 2016). Dette fenomenet er spesielt viktig for mennesker med problematikk knyttet til fordøyesystemet.

2.11 Fordøyelsesmodeller:

Fordøyelse er prosessen hvor munn, mage og tarm fysisk reduserer størrelsen til makronæringsstoffene i et måltid, til en suspensjon med små partikler av næringsstoffer, som videre blir kjemisk endret for å kunne krysse slimhinnen i tarmen (Barrett, 2014a).

Fordøyelighet defineres som et mål på mengden nedbrytbart materiale, og kan representeres av forskjellen mellom inntak og mengde avføring (Watts et al., 2020). Det finnes flere måter å undersøke hvordan en matvare fordøyes, blant dem er *in vitro*, *in vivo* og *ex vivo* fordøyelsesmodeller.

In vivo metoder som inkluderer observasjon i levende dyr eller mennesker gir den mest nøyaktige og troverdige informasjonen om fordøyelsen og absorpsjonen. Slike forsøk har ofte en rekke utfordringer, de er svært penge- og tidskrevende, i tillegg til å være knyttet til problematikk med dyrevelferd og etikk (Li et al., 2020). Ved å utvikle en metode som foregår uavhengig av liv elimineres disse komplikasjonene, i tillegg kan det fordøyes et stort antall prøver, som er bedre egnet for videre analyser (Minekus et al., 2014).

In vitro metoder kan være statiske, dynamiske eller semi-dynamiske, og de kan gjøres i ett eller to trinn. En statisk metode innebærer konstant pH, samt konstant forhold mellom mengde mat, enzymer og fordøyelsesvæsker, mens ved en dynamisk modell kan slike faktorer variere (Zhou et al., 2023). En *ex vivo* fordøyelsesmodell innebærer å fordøye mat utenfor liv, men med humane fordøyelsesenzymer.

Innenfor statiske *in vitro* modeller er protokollen utviklet av INFOGEST nettverket den mest brukte metoden (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). For en *in vitro* fordøyelsesmodell er det viktigste at metoden simulerer de mekaniske, kjemiske og enzymatiske prosessene som forgår i human magen og tarmkanal, samtidig som det er mulig å undersøke matens struktur, sammensetting, fordøyelse og løselighet, i munnfasen, magefasen og tarmfasen (Zhou et al., 2023). INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) protokollen tillater dette dersom man tar ut prøvemateriale underveis i fordøyelsen, det vil si etter gastrisk fase er ferdig, eller ved å fordøye med dobbelt så mange rør, og avslutte fordøyelsen etter gastrisk fase for halvparten av rørene.

Dupont et al. (2019) undersøkte om dynamiske *in vitro* modeller av gastrisk fordøyelse kan etterligne human fordøyelse, ved å sammenligne åtte ulike modeller med data fra *in vivo* studier. Det ble funnet at dynamisk *in vivo* modeller, i kombinasjon med de riktige fysiologiske parametere, var en god etterlikning. For statiske *in vitro* modeller derimot simplifiseres etterlikningen av disse fysiologiske parameterne, men Bradkorb et al. (2019) hevder at dette gjør metoden enklere, derfor mer brukervennlig og lettere for uerfarne å oppnå troverdige og reproducerbare resultater.

For å simulere de enzymatiske prosessene i *in vitro* fordøyelsesmodell blir matvaren som skal fordøyes tilsatt enzymer, i de fleste tilfeller i form av ekstrakter fra dyr. Avhengig av hva som skal fordøyes, tilsettes det ulike ekstrakter med ulike enzymer, eventuelt individuelle enzymer. I fordøyelse av fett brukes ulike varianter som erstatninger til Human Gastrisk Lipase (HGL). En tidligere studie gjort av Sassane et al. (2016) sammenlignet 3 ulike av de ulike erstatningene på markedet; Rhizopus Oryzae Lipase (ROL), Rabbit Gastric Lipase (RGL) og rekombinert (kunstig fremstilt) HGL (rHGL). Hensikten var å finne en god erstatning for HGL siden utviklingen av fordøyelsesmodeller hindres av mangel på en lipase med like gode egenskaper som HGL. Dette undersøkte de ved å *in vitro* fordøye to varianter av morsmelkerstatning; en med mye medium-kjedede triglyserider, og en med lang-kjedede triglyserider, med de 3 ulike enzymene. ROL viste ingen preferanse for hvilke frie fettsyrer den frigjorde, mens RGE og rHGL viste at de frigjorde mest medium kjedede fettsyrer. Mens rHGL også frigjorde noen lang kjedede fettsyrer, viste RGE at den kun frigjorte medium lange fettsyrer (Sassane et al., 2016). I tillegg til erstatninger for HGL i *in vitro* fordøyelser av fett, brukes ofte pankreatin fra bukspyttkjertelen til svin i duodenal fase, da det inneholder både amylase, trypsin, lipase, ribonuklease og protease (Sigma-Aldrich, 2024).

3 Materialer og metoder:

Hensikten med denne studien var å undersøke effekten av pasteurisering og homogenisering på fordøyelse av melkefett. For å gjennomføre dette ble melk behandlet med 3 ulike grader av homogenisering; uhomogenisert, 180 bar og 280 bar, og 3 temperaturer; upasteurisert (rå melk), lav temperatur - lang- tid (LTLT) pasteurisering (63 °C i 30 minutter) og ultrahøytemperatur (UHT) pasteurisering (145 °C i 3 sekunder). Dette resulterte i 9 varianter av behandling, som vist i tabell 3. Melkeproduktene ble statisk *In vitro* fordøyd og frie fettsyrer og nøytrale lipider i ufordøyd melk, samt frie fettsyrer i fordøyd melk ble ekstrahert ved bruk av Folchs metode, fraksjonert med SPE-robot, og analysert ved hjelp av GC-FID. Partikkelstørrelse i ufordøyde melkeprøver og i fordøyd materiale ble målt ved av Mastersizer 3000.

Tabell 1 viser de 9 ulike kombinasjonene av melkebehandling. Den upasteuriserte og uhomogeniserte melken var ubehandlet, og produktet med minst mulig behandling, mens melken som var UHT-behandlet, og homogenisert ved 280 bar hadde blitt utsatt for den sterkeste behandlingen.

Tabell 3: Oversikt over de ulike melkebehandlingene. Det ble laget to produktpartier av upasteurisert og LTLT pasteurisert melk, og kun ett produktparti av UHT pasteurisert melk. Upasteurisert og LTLT-pasteurisert melk stammer ikke fra samme melketank. UP = upasteurisert, LTLT = Lav-temperatur, lang tid, UHT = Ultrahøytemperatur.

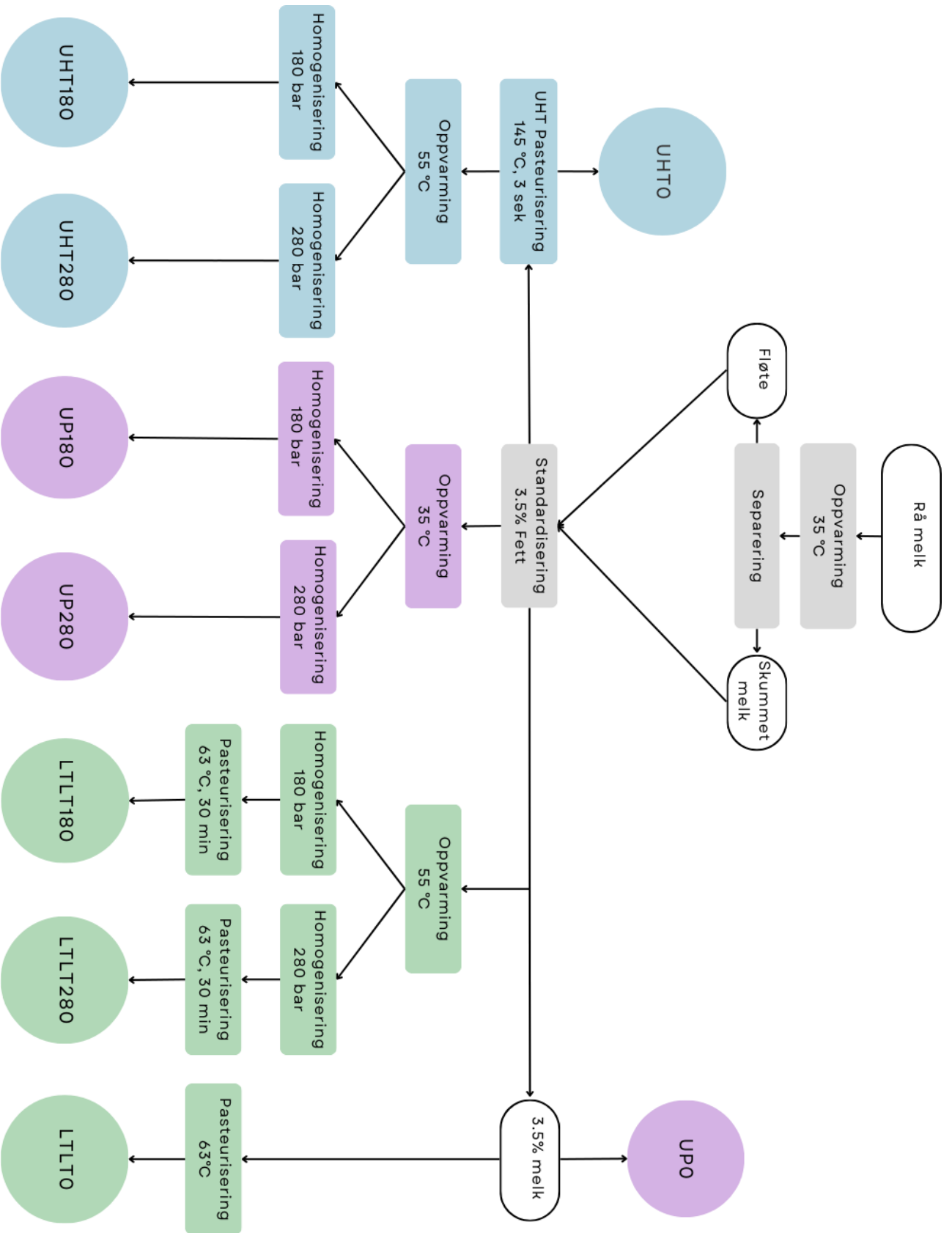
	Upasteurisert	LTLT (63 °C, 30 min)	UHT (145 °C, 3 sek)
Uhomogenisert	Upasteurisert (UP) – Uhomogenisert (0 bar) UP0	LTLT – Uhomogenisert (0 bar) LTLT0	UHT – Uhomogenisert (0 bar) UHT0
180 bar, 50 bar	Upasteurisert (UP) – 180 bar UP180	LTLT – 180 bar LTLT180	UHT – 180 bar UHT180
280 bar, 50 bar	Upasteurisert (UP) – 280 bar UP280	LTLT – 280 bar LTLT280	UHT – 280 bar UHT280

3.1 Produksjon av melk benyttet i oppgaven:

De ulike melkeproduktene benyttet i denne oppgaven ble produsert av rå melk fra Senter for husdyrforsøk (SHF), på pilotanlegget tilhørende Norges Miljø-og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) Ås-1432. Melken kom fra rasen Norsk Rødt Fe (NRF).

I forkant av produksjonen av melkeproduktene som skulle brukes til selve in vitro fordøyelsen, ble det gjennomført test-produksjoner for å finne de mest effektive produksjonsmetodene. De viktigste faktorene som ble undersøkt var nødvendige melkemengder, homogenisatorens evne til å holde stabilt trykk over tid og separatorens evne til å separere melk ved kaldest mulige temperaturer. Det ble erfart at det for hvert gjentak var nødvendig med tolv liter råmelk for produksjonen av upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter. Homogenisatoren holdt mest stabilt trykk ved et jevnt nivå av melk i balansetanken, men det ble observert noe ustabilitet. For å redusere grad av varmebehandling på de upasteuriserte melkeproduktene var det behov for å separere den rå melken ved så lav temperatur som mulig. Separeringsevne ved 3 ulike temperaturer ble undersøkt; 4 °C, 22 °C (romtemperatur) og 35 °C. Oppvarming til 35 °C ga desidert best separering, og siden 35 °C er kjøligere enn kuas kroppstemperatur, og dermed også melkens temperatur ut av juret under melking, vil ikke denne temperaturen påføre melken ytterligere varmebelastning. Det ble derfor bestemt at råmelken skulle separeres, og at de upasteuriserte melkeproduktene skulle homogeniseres ved 35 °C. De LTLT-pasteuriserte og UHT-behandlede melkeproduktene ble homogenisert ved 55 °C.

Basert på test-produksjonene ble det laget et flytskjema som ble benyttet under selve produksjonen av de faktiske melkeproduktene, og flytskjemaet er vist i figur X. Upasteurisert og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter ble laget på samme rå melk, mens UHT-behandlede melkeprodukter ble laget på en annen rå melk ved senere anledning. I motsetning til de LTLT-pasteuriserte melkeprøvene, måtte de UHT-behandlede melkeproduktene homogeniseres før pasteurisering. Dersom homogenisering skulle blitt plassert før pasteurisering måtte hele volumet av melk (100 liter) blitt homogenisert, noe som ikke var praktisk mulig i Panda Plus homogenisatoren, da den kun homogeniserer ni liter i timen. For den UHT-pasteuriserte melken ble det produsert et eneste parti, som ble brukt til både pH-justering, gjentak 1 og gjentak 2. På grunn av dårligere holdbarhet i de upasteuriserte melkeproduktene var det nødvendig å produsere et nytt parti med melkeprøver hver for pH-justeringen, gjentak 1 og gjentak 2, altså 3 separate melkeproduksjoner, gjennomført på 3 separate tidspunkter.



Figur 14: Flytskiema over melkeproduksjon for de ulike produktene: A = upasteurisert – 180 bar, B = upasteurisert – 280 bar, C = LTLT – 180 bar, D = LTLT – 280 bar, E = LTLT – uhomogenisert, F = upasteurisert – uhomogenisert, G = UHT – 180 bar, H = UHT – 180 bar, I = UHT – 280 bar. Blå representerer UHT-pasteurisert melk, rosa representerer upasteurisert melk, grønn representerer pasteurisert melk. Det ble laget to produktpartier av upasteurisert og LTLT pasteurisert melk, og kun ett produktparti av UHT pasteurisert melk. Upasteurisert og LTLT-pasteurisert melk stammer ikke fra samme melketank. Figuren er laget i Canva.com.

3.1.1 Produksjon av upasteurisert og LTLT pasteurisert melk:

Tolv liter rå melk ble overført til 3 fireliters melkespann, og varmet i vannbad til melkens temperatur nådde 35 °C. Melken ble deretter separert til fløte og skummetmelk, med en Milky fløteseparator, modell FJ 125 EAR3, produsert av Franz Janschitz Ges.m.b.H (Althofen, Østerrike). Fettinnhold i fløte og skummetmelk ble målt ved bruk av MilkoScan FT1 fra produsenten Foss (Hillerød, Danmark). Mengde skummetmelk og fløte for å lage standardisert melk med 3,5 % fettinnhold ble regnet ut ved bruk av formel;

$$\text{Liter fløte} = \frac{\text{Liter skummetmelk} * (\text{Ønsket fettprosent} - \text{Fettprosent skummetmelk})}{(\text{Fettprosent fløte} - \text{Ønsket fettprosent})}$$

Riktige mengder fløte og skummetmelk ble blandet i et nytt melkespann, og melken ble godt rørt om. Fettprosent på den standardiserte melken ble målt, og eventuelt justert ved behov. For hver gang standardisert melk ble overført i nye spann, eller delt i ulike partier, ble den rørt godt om for å sikre så lik fordeling av melkefett som mulig i hvert melkeprodukt. Før videre pasteurisering og homogenisering ble gjennomført, ble det laget 2 mindre partier av den standardiserte melken; Parti LTLT0 og parti UP0. Parti LTLT0 ble pasteurisert ved 63 °C i 30 minutter, mens parti UP0 forble uberørt.

Videre ble 4 liter standardisert melk varmet i vannbad til temperaturen på melken nådde 35 °C, og delt inn i 2 melkepartier; parti UP180 og UP280. Begge partiene ble totrinns-homogenisert i Panda Plus 2000 homogenisator, produsert av GEA Niro Soavi (Parma, Italia). Parti UP180 ble totrinns-homogenisert ved 180 bar og 50 bar, mens parti UP280 ble totrinns-homogenisert ved 280 bar og 50 bar.

Videre ble 4 liter standardisert melk varmet opp til 55 °C i vannbad. Melken ble deretter delt i 2 melkepartier; parti LTLT180 og LTLT280. Parti LTLT180 ble totrinns-homogenisert ved 180 bar og 50 bar, mens parti LTLT280 ble totrinns-homogenisert ved 280 bar og 50 bar. Begge partiene ble deretter pasteurisert i vannbad ved 63°C i 30 minutter.

3.1.2 Produksjon av ultrapasteurisert melk:

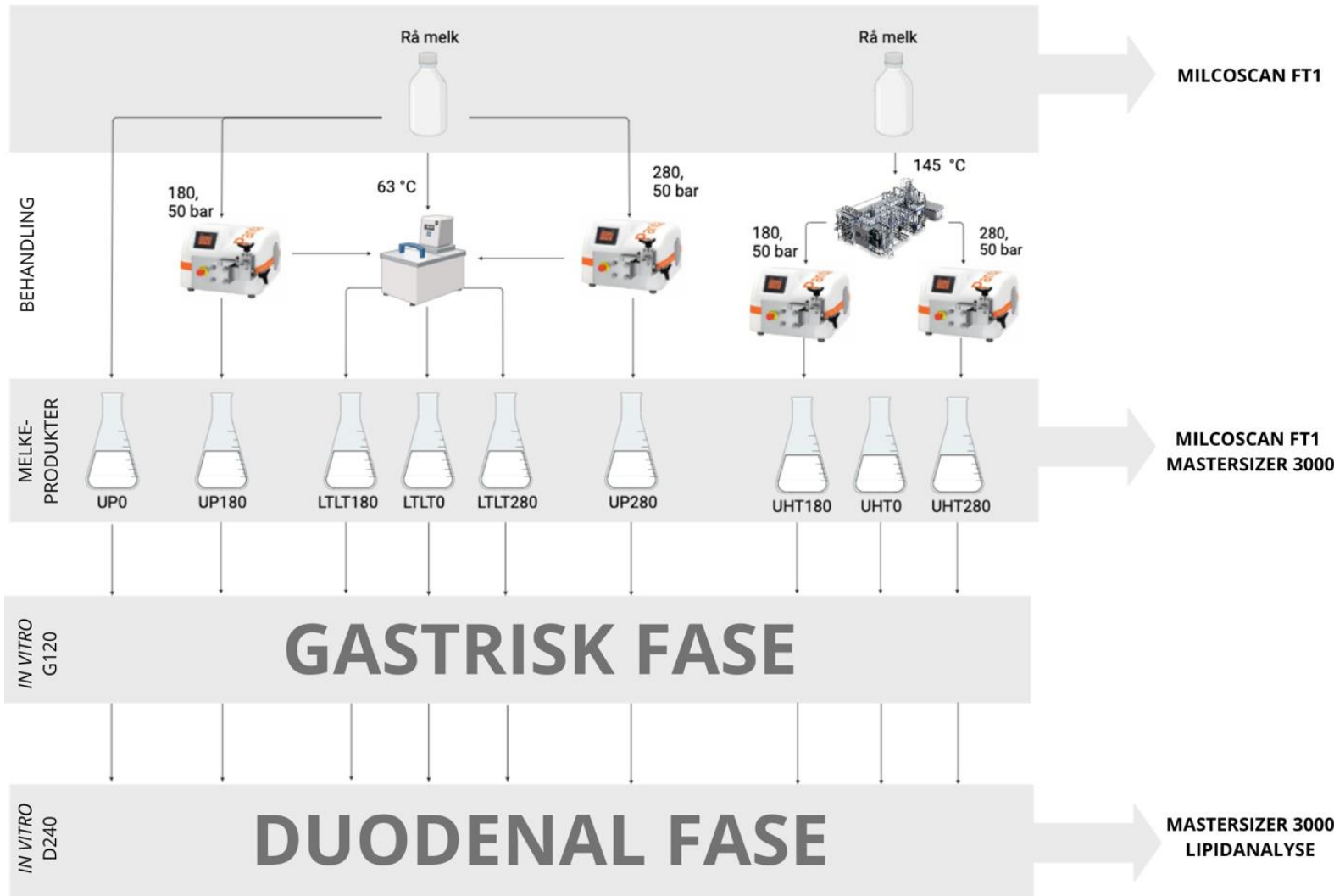
For produksjon av UHT-varmebehandlet melk ble hundre liter rå melk separert av en Westfalia Separator, modell M5D50-01-076 (Oelde, Tyskland) til skummetmelk og fløte. Skummetmelken ble pasteurisert ved 72 °C i 15 sek ved bruk av Alfa Laval platevarmeveksler, modell M6-MFMC, mens fløten ble behandlet ved å varmes opp til 62 °C, for så å kjøles ned til 40 °C i en LabMaster High Shear Mixer (Daniatech, Danmark). Femti liter helmelk ble standardisert til 3.5% fett, og deretter UHT behandlet ved 145 °C i APV UHT pilotanlegg (Charlotte, Nord-Carolina, USA).

Etter UHT behandlingen ble melkeparti UHT0 (UHT- uhomogenisert) tappet, og satt direkte på kjøøl. Deretter ble 4 liter UHT-behandlet melk tappet over i et nytt melkespann, som ble varmet til 55 °C. Melken ble delt i 2 nye partier; parti UHT180 og UHT280. UHT180 totrinnshomogenisert ved 180 bar, og UHT280 ble totrinnshomogenisert ved 280 bar.

Fettprosenten i alle melkeproduktene ble målt, før de ble satt direkte på kjøøl. Verdiene er vist i tabell A, i vedlegg 1.

3.2 Forsøksoppsett

Rå melk ble behandlet med 9 ulike behandlinger, og etterfulgt av statistisk *In vitro* fordøyelse. Figur 15 illustrerer de ulike analysene på de ulike melkevariantene (rå melk, LTLT-pasteurisert (63 °C, 30 minutter), og UHT-behandlet (145°C, 3 sekunder), både fordøyd og ufordøyd.



Figur 15: Analyser utført på de ulike melkeproduktene, både før *in vitro* fordøyelse, etter gastrisk fase og etter duodenal fase. A = upasteurisert – 180 bar, B = upasteurisert – 280 bar, C = LTLT – 180 bar, D = LTLT – 280 bar, E = LTLT – uhomogenisert, F = upasteurisert – uhomogenisert, G = UHT – 180 bar, H = UHT – 180 bar, I = UHT – 280 bar, G120 = gastrisk fase 120 minutter, D240 = duodenal fase 240 minutter. Figuren er laget i Biorender.com.

For å unngå for stor variasjon i fordøyelsen av de ubehandlede melkeproduktene, ble de upasteuriserte prøvene fordøyet like mange dager etter produksjon for hvert gjentak, og alltid innen 72 timer etter produksjon. De pasteuriserte prøvene ble alltid fordøyet innen 8 dager

etter produksjon. Se vedlegg 2 (tabell B) for oversikt over produksjonsdato og fordøyelsesdato for melkeproduktene.

3.3 In vitro fordøyelse:

Hensikten med *in vitro* fordøyelse er å imitere fordøyelse av et produkt gjennom de 3 ulike fysiologiske miljøene som befinner seg i øvre del av fordøyelsessystemet, henholdsvis i munn, mage og tynntarm. Dette gjøres ved tilsetning av fordøyelsesenzymmer, fordøyelsesvæsker, kalsiumklorid (CaCl_2), galle og vann. Dette er for å kunne observere fordøyelsen av en spesifikk matvare, og gjennomføre ønskelige analyser både under og etter fordøyelse. Forholdet mellom mat, enzymer og elektrolytter er konstant. Metoden (INFOGEST 2.0) brukt i denne studien for å gjennomføre statisk *in vitro* fordøyelse er utviklet av INFOGEST nettverket, og beskrevet i protokollen "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion» (Brodkorb et al., 2019). For mer detaljert beskrivelse av fremgangsmåte henvises det til denne protokollen.

3.3.1 Forarbeid:

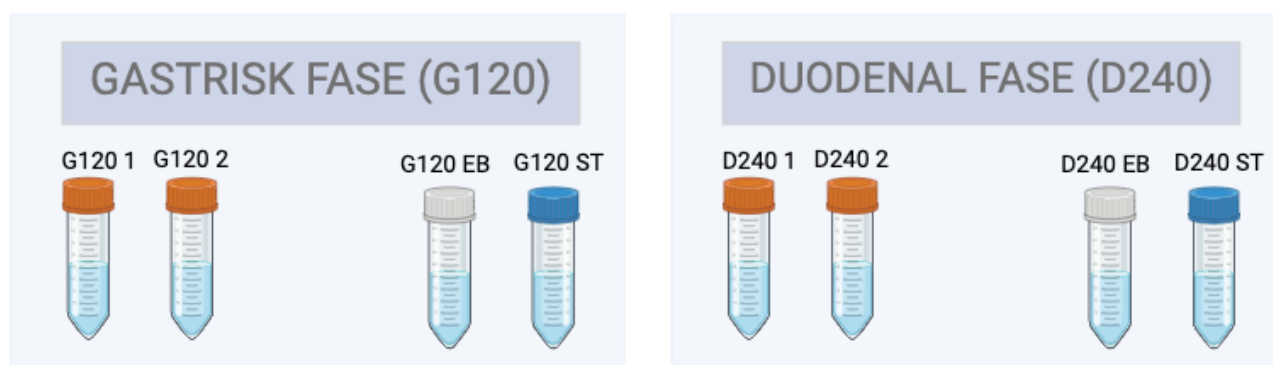
For å kunne gjennomføre selve *in vitro* fordøyelsen så effektivt som mulig var det nødvendig å utføre et for-forsøk for å få riktig pH-justering. Hensikten var å finne riktige mengder 1 M HCL og 1 M NaOH for å senke og øke pH med fordøyelsessubstratet (melk) som ble brukt. Dette for å oppnå riktig pH i mage- og tarmfase, henholdsvis pH 3 og 7 i, det faktiske fordøyelsesforsøket. Siden ulik behandling kan påvirke melkens bufferegenskaper ble det gjennomført en pH-justering per melkeprodukt. De eksakte verdiene 1 M HCl og 1 M NaOH er vist i vedlegg 3 (tabell C). pH ble målt ved bruk av SevenExcellence pH meter S400 (Mettler Toledo, Ohio, USA), som ble kalibrert ved hver ny pH-justering.

I forkant av både pH-justeringene og selve *in vitro* fordøyelsen ble det gjennomført analyser for å måle enzymaktiviteten til pepsin fra gastrisk slimhinne hos svin, lipase og pepsin i RGE (Rabbit Gastric Extract), trypsin i pankreatin fra bukspyttkjertel hos svin, og konsentrasjonen av gallesalter i galle fra oksedyr. Fremgangsmåte for enzymanalysene er å finne i INFOGEST 2.0 protokollen (Brodkorb et al., 2019). Aktiviteten avgjør mengden som er nødvendig for å oppnå riktig konsentrasjon i enzymløsningen, eller mengden gallesalter for å oppnå riktig saltkonsentrasjon. Preparat med korresponderende lot nummer, deres enzymaktivitet eller konsentrasjoner er vist i tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over enzymer med produktnavn, produsent, lot nummer, enzymaktivitet eller konsentrasjon av gallesalter i alle enzymene og galle benyttet i denne studien. U/mg = enhet per milligram.

Preparat	Produsent	Lot nummer	Enzym	Aktivitet/kons.
<i>Pancreatin from porcine pancreas</i> P7545-25G	Sigma Aldrich	SLCM8903	Trypsin	3.78 U/mg
		SLCQ9801	Trypsin	6.07 U/mg
<i>Pepsin from porcine gastric mucosa</i> P7012-1G	Sigma Aldrich	SLCR2108	Pepsin	3460 U/mg
<i>Rabbit Gastric Extract (RGE) 15-1G</i>	LipolyTech	1204	Lipase	10.33 U/mg
			Pepsin	436 U/mg
		1501	Lipase	11.2 U/mg
			Pepsin	426 U/mg
		2903	Lipase	18.4 U/mg
			Pepsin	525 U/mg
<i>Bile bovine B3883-25G</i>	Sigma Aldrich	SLCG9142	Gallesalt	1.48 mmol/g
		SLCP4246	Gallesalt	5.35 mmol/g

Det var 2 paralleller for hver fordøyelsesfase; G120 1 og G120 2 (gastrisk fase, 120 minutter) og D240 1 og D240 2 (duodenal fase, 240 minutter). I tillegg ble det fordøyd en enzym-blank per fordøyelsesfase; G120 EB og D240 EB (gastrisk fase enzymblank og duodenal fase enzymblank), og en stabilitetsprøve per fordøyelsesfase; G120 ST og D240 ST (gastrisk stabilitetstest og duodenal stabilitetstest). Se figur 16 for illustrasjon.



Figur 16: Oversikt over rør i in vitro fordøyelsen. EB = enzymblank, ST = stabilitetstest.

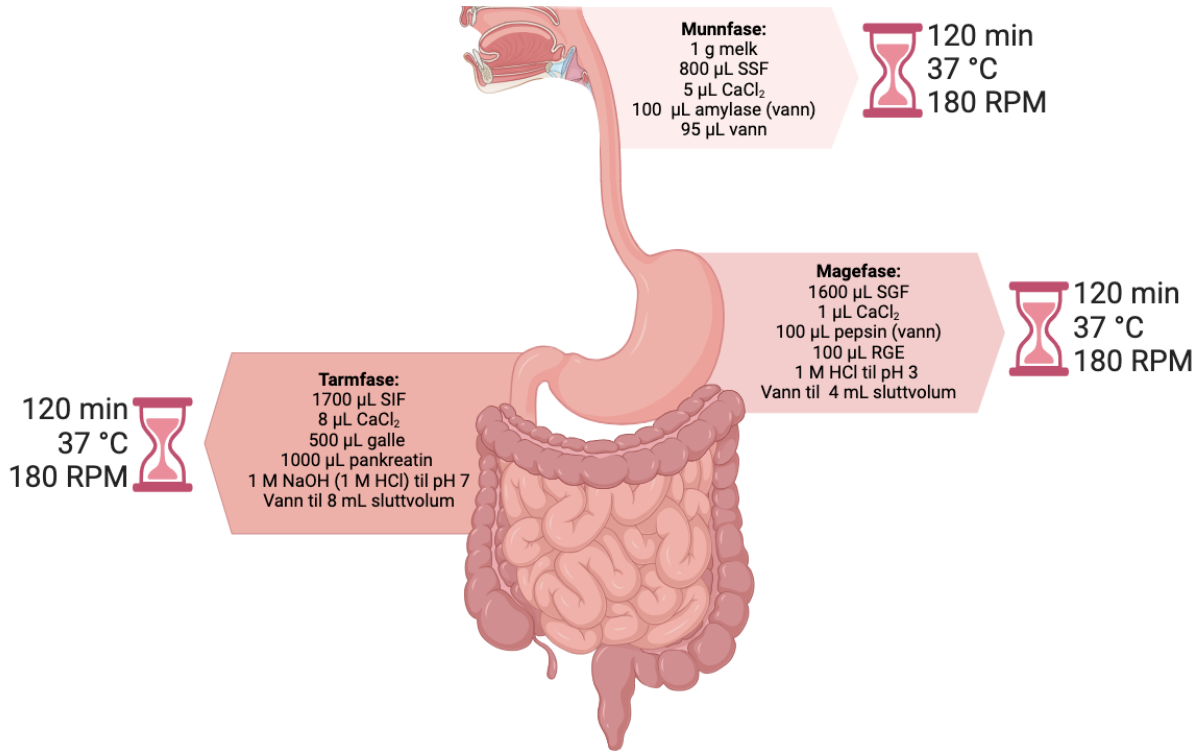
Figuren er laget i Biorender.com.

I enzym-blank prøvene ble 1 g melk erstattet med 1 g vann, og i stabilitetsprøvene ble fordøyelsesenzymer og galle erstattet med tilsvarende mengde vann. Begge inneholdt fordøyelsvæskene SSF (simulated salivary fluid) som tilsettes i munnfase, SGF (simulated gastric fluid) som tilsettes i magefase, SIF (simulated intestinal fluid) som tilsettes i tarmfase, i tillegg til CaCl₂, HCl, NaOH og vann. Tillaging av SSF, SGF, SIF er vist i tabell 5.

Tabell 5: Volum av elektrolytt stockløsning av fordøyelsvæsker for et volum av 400 mL fortynnet med vann. SSF = simulated salivary fluid, SGF = simulated gastric fluid, SIF = simulated intestinal fluid, M = Molar

Saltløsning	Stock konsentrasjon (g/L)	(M)	SSF (pH 7)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7)
			mL stockløsning tilsatt for å lage 0.4 L	mL stockløsning tilsatt for å lage 0.4 L	mL stockløsning tilsatt for å lage 0.4 L
KCl	37.3	0.5	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	1	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	2	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.15	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.5	0.06	0.5	-
HCl		6	0.09	1.3	0.7
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44.1	0.3	0.025	0.005	0.04

Hensikten med enzym-blank er å kunne identifisere enzymenes effekt på fordøyelsen uten substrat, mens hensikten til stabilitetsprøve er å vurdere melkens endring under fordøyelsen uten påvirkning av enzymer. Videre forklares fremgangsmåte for de vanlige fordøyelsesprøvene, og hele prosessen er illustrert i figur 17.



Figur 17: Oversikt over *in vitro* fordøyelse basert på protokoll INFOGEST 2.0 (Bradkorb et al, 2019). SSF = simulated salivary fluid, SGF = simulated gastric fluid, SIF = simulated intestinal fluid, RPM = omdreininger per minute, min = minutter. Figuren er laget i Biorender.com.

3.3.2 In vitro fordøyelse:

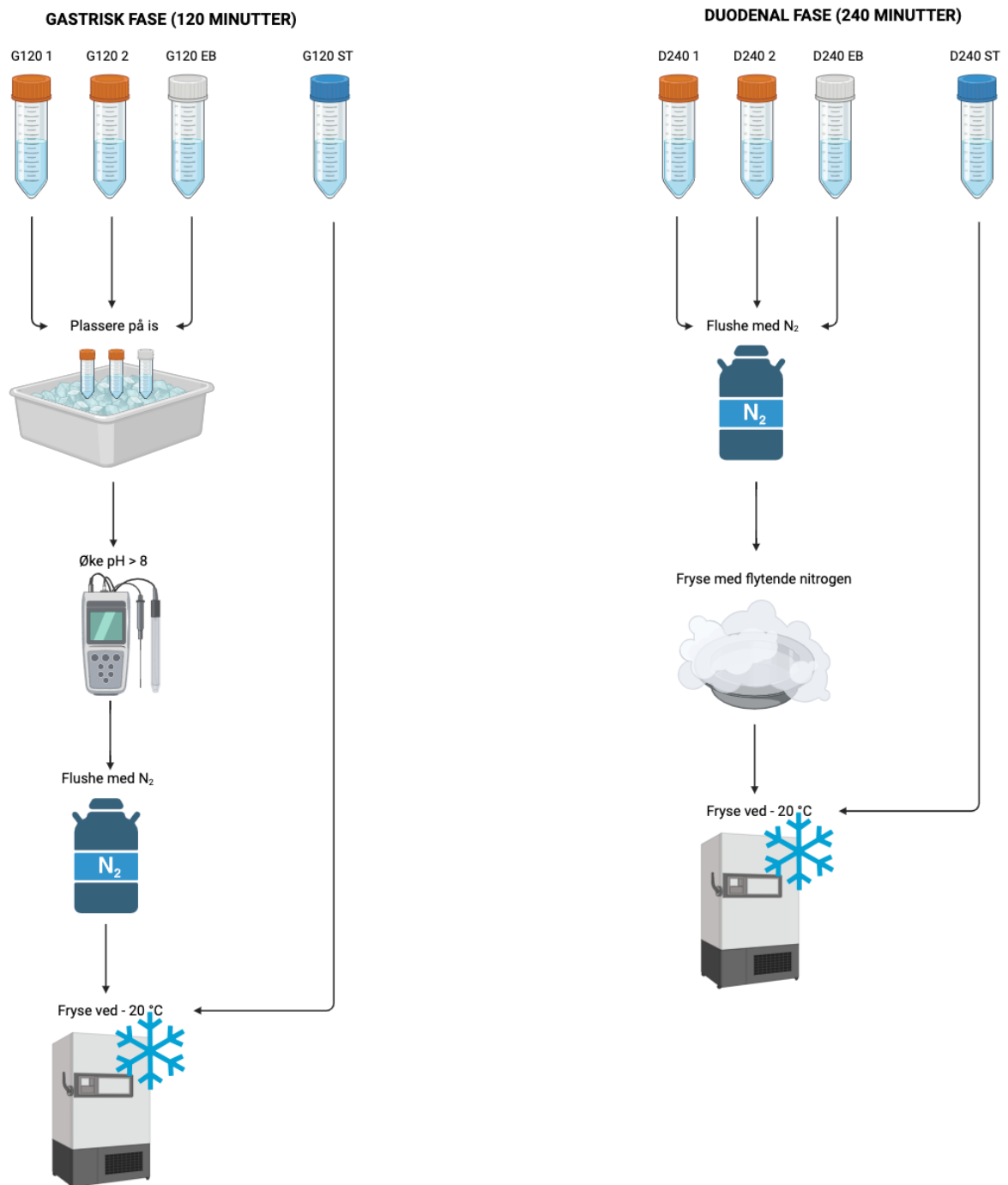
Før *in vitro* fordøyelsen startet for dagen ble melkeproduktet romtemperert i 30 minutter, samtidig som fordøyelsesvæskene SGF og SIF ble temperert i varmeskap ved 37 °C (Ecotrom Incubator Shaker, INFORS HT, Sveits). Alle fordøyelsesvæskene, med unntak av SSF, ble holdt på varmeskap fram til de ble tilsatt prøvene. Melkeproduktet ble vendt 10 ganger for å forsikre jevn fordeling av melkefett, og 1 g melk ble pipettert over i 50 mL Falconrør. Deretter ble det tilsatt 0.8 mL SSF, 5 µL 0.3 M CaCl₂ og µL 195 vann, og prøvene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C og 180 rpm i 2 minutter. Det ble ikke tilsatt amylase i munnfasen, og volumet ble derfor erstattet med vann.

I mellomtid ble RGE løst opp mengden vann som ga en aktivitet på 60 U/mL sluttvolum, og blandet med hjelp av vortex (Advanced Vortex Mixer ZX3, Velp Scientifica, Usmate Velate, Italia) uten å danne for mye skum. Oppløst RGE ble umiddelbart plassert på is. Etter 2 minutter ble prøvene tilsatt 1.6 mL SGF, 1 μ L M 0.3 CaCl₂, riktig mengde 1 M HCl for å nå pH 3, 100 μ L RGE og til slutt riktig mengde vann for å nå sluttvolum på 4 mL. Siden det ble benyttet ulike lot nummer av RGE varierte lipase- og pepsinaktiviteten noe mellom de ulike partiene. I de fleste tilfeller var pepsinaktiviteten i RGE tilstrekkelig, men enkelte ganger var det nødvendig med ekstra pepsin. I tilfeller der aktiviteten var tilstrekkelig ble 100 μ L pepsin erstattet med 100 μ L vann.

Prøvene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C ved 180 rpm i 2 timer. Deretter ble galle løst opp i 37 °C temperert SIF, i mengden som ga en konsentrasjon på 10 mmol/mL SIF, og plassert i varmeskap for å forsikre best mulig oppløsning av gallesaltene. Pankreatin ble løst i mengden kroppstemperert SIF som ga en aktivitet på 100 U trypsin /mL sluttvolum. For å redusere store uløselige partikler av pankreatin i fordøyelsesprøvene ble pankreatin løst i SIF behandlet med ultralyd i 5 minutter med Branson B200 ultralydrengjøringsmaskin (Emerson Electric Co., St.Louis, USA), deretter sentrifugert ved 2000 x g i 5 minutter med Multifuge X3R sentrifuge (Thermo scientific, Langerwehe, Tyskland). Det oppløste pankreatinet ble oppbevart på is inntil start av tarmfase.

Da magefasen var ferdig (etter 2 timer), var det 4 rør som ikke skulle fordøyas videre, slik som vist i figur 16. Dette gjaldt henholdsvis G120 1, G120 2, G120 EB og G120 ST, og for disse prøvene ble fordøyelsen stoppet ved dette punktet. Etersom stabilitetsprøvene ikke inneholdt enzymer, kunne prøven plasseres direkte i fryser. Resten ble oppbevart på is, samtidig som pH ble økt til over 8 med 1 M NaOH så fort som mulig. For å hindre oksidasjon av fett under oppbevaring av prøvene i fryseren ble alle prøvene flushet med nitrogengass, og deretter plassert i fryser ved – 20 °C. De resterende 4 prøverørene som skulle fordøyas videre ble tilsatt 1.7 mL SIF, 8 μ L 0.3 M CaCl₂, 0.5 mL 10 mM/mL galle, nødvendig mengde 1 M NaOH for å oppnå pH 7 og nødvendig mengde vann for å oppnå et sluttvolum på 8 mL. 100 μ L pankreatin ble tilsatt ved å pipettere fra supernatanten av ultralydbehandlet og sentrifugert pankreatinløsning, uten å inkludere noe fra pelleten. Prøvene ble så inkubert i 2 timer ved 37 °C ved 180 rpm.

Etter 2 timer var duodenal fase ferdig, og enzymene ble inhibert så fort som mulig. Prøvene ble først flushet med nitrogen, og deretter fryst med flytende nitrogen, og plassert i fryser ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Siden stabilitetstesten ikke inneholdt aktive enzymer, ble den satt direkte i fryser ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Før frysing ble det holdt av 3 mL fordøyd materiale til måling av partikkelstørrelse på Malvern Mastersizer 3000. Figur 18 illustrerer hvordan alle prøvene i fordøyelsen ble håndtert ved avsluttet fordøyelsesfase.



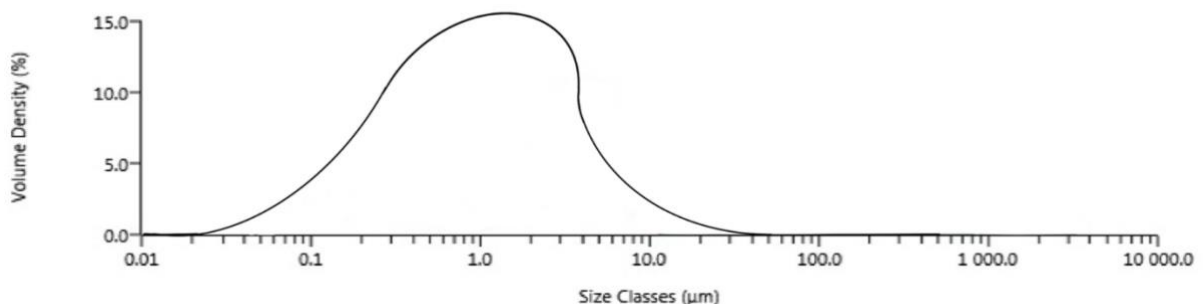
Figur 18: Oversikt over enzyminhiberingsmetode for fordøyelsesrør i gastrisk fase, duodenal fase, enzymblanker og stabilitetstester. EB = enzymblank, ST = stabilitetstest. Figuren er laget i Biorender.com.

3.4 Analyse av partikkelstørrelse:

For å måle partikkelstørrelse ble Malvern Mastersizer 3000, med våt modul; Hydro LV, brukt. Prinsippet baserer seg på laserdiffraksjon, og instrumentet fungerer ved at prøvemateriale blir dispergert i vann i instrumenttanken, og fordelt ved hjelp av en propell i bunn av tanken.

Instrumentet sender deretter laser gjennom vannet, og når lyset treffer en partikkel vil det bli sendt i forskjellige retninger med ulike spredningsvinkler, avhengig av partikkelens størrelse. Små partikler gir brede vinkler, mens store partikler gir smale vinkler. En detektor måler intensiteten av det spredte lyset ved de ulike vinklene, og ved hjelp av Mie-teorien blir det beregnet en partikkelstørrelse (Ransmark et al., 2019).

En programvare koblet opp til instrumentet, Mastersizersoftware 3.10, vil analysere data fra målingene og presenterer resultatene som en grafisk kurve med størrelsesklasser (μm) på x-aksen (logaritmisk skala), og volumtetthet (%) på y-aksen, og kurven viser partikkelstørrelsesfordeling. Eksempel på en slik kurve er vist i figur 19. Programmet vil også beregne $D_x(10)$, $D_x(50)$ og $D_x(90)$. $D_x(10)$ og $D_x(90)$ er punktet i fordelingen hvor (til og med) henholdsvis 10 og 90% av totalvolumet i prøven er tilsvarende verdi eller mindre. $D_x(50)$ er den verdien hvor 50% av de totale partiklene er mindre eller større enn denne verdien, og brukes som en medianverdi.



Figur 19: Illustrasjonsbilde som viser grafisk størrelsesfordeling ved bruk av Malvern Mastersizer 3000.

Verdiene som ble stilt inn i programmet som betingelser for målingene ble hentet fra «Measurement of homogenisation efficiency of milk by laser diffraction and centrifugation» (Ransmark et al., 2019). Verdiene er vist i tabell 6.

Tabell 6: Programvareingsinstillinger for måling av partikkelstørrelse stilt inn i Mastersizersoftware
3.10. rpm = omdreininger per minutt.

<i>Partikkeltype</i>		
	Partikkeltype	Sfærisk
<i>Material egenskaper</i>		
	Material navn	Melk
	Brytningsindeks	1,461
	Absorpsjon indeks	0,005
	Tetthet (g/cm ³)	0,85*
<i>Dispersant</i>		
	Dispersant navn	Vann
	Refraktiv indeks	1,33
	Level sensor terskel	100
<i>Varighet</i>		
	Bakgrunn måling varighet (sek)	10
	Prøve måling varighet (sek)	20
<i>Obskurasjon</i>		
	Obskurasjon minimumgrense (%)	1
	Obskurasjon maksimumgrense (%)	10
<i>Motorhastighet</i>		
	rpm	3000

*Verdi for tetthet til melk var for lav, men var den verdien oppgitt som instruks for bruk av måling av melk. Denne verdien er brukt for alle målinger.

Det ble tilsatt prøvemateriale tilsvarende en obskurasjonprosent på ~ 2% (3 mL) for fordøyd materiale, og ~ 6% (0.5 mL) for melk. Instrumentet målte 5 paralleller av hver prøve, og mellom hver prøve ble det gjennomført en rensesyklus av typen «extensive». For å unngå bakgrunnsstøy fra fremmede partikler ble dispersanttanken manuelt fylt med luftfritt MilliQ-vann for hver måling. Det var planlagt å analysere ferskt fordøyd material umiddelbart etter at tarmfasen var ferdig for alle de fordøyde prøven. Grunnet uforutsett problematikk knyttet til instrumentets motor og akutt behov for reparasjon, ble kun et utvalg fersk fordøyd materiale målt. Det ble besluttet å plassere resten i fryser etter avsluttet tarmfase, og måle ved senere anledning.

3.5 Forarbeid til lipidanalyser:

I dette delkapittelet beskrives det forberedende arbeidet til analyse av frie fettsyrer, som besto av tillagingen av ulike løsninger.

Tabell 7: Kjemikalier og produkter benyttet under ekstraksjon, fraksjonering, eller metylering av lipider fra fordøyde og ufordøyde melkeprodukter.

Produkt	Produsent	Renhet	CAS-nr
Baron triflourid-metanol løsning (14% i metanol)	Merck, Darmstadt, Tyskland		373-57-9
Dietyleter	Merck, Darmstadt, Tyskland	99.9%	60-29-7
Eddiksyre	VWR Chemicals, Frankrike	99.9%	64-19-7
Helium	Linde, Dublin, Irland	99.99+%	7740-59-7
n-Heptan	Merck, Darmstadt, Tyskland	≥ 99.9%	142-82-5
Isopropanol	VWR Chemicals, Frankrike	100.0%	67-63-0
Kloroform	VWR Chemicals, Frankrike	100.0%	67-66-3
Metallisk natrium	Merck, Darmstadt, Tyskland		
ME100 mix	Larodan AB, Malmø, Sverige	>99%	
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland	≥ 99.9%	67-56-1
Metylnonanoat (C9:0 ME)	Larodan AB, Malmø, Sverige	> 99%	1731-84-6
Metylnonadecanoat (C19:0 ME)	Larodan AB, Malmø, Sverige	> 99%	1731-94-8
Milli-Q vann	Merck, Darmstadt, Tyskland	230 V	
Natriumklorid	VWR Chemicals, Polen	99.9%	7647-14-5
Nitrogen	Linde, Dublin, Irland	≥ 99.99+%	
Nonadesansyre (C19:0 FF)	Larodan AB, Malmø, Sverige	> 99%	646-30-0
Nonansyre (C9:0 FF)	Larodan AB, Malmø, Sverige	> 99%	112-05-0
Trinonadecanoin (C:19 TG)	Larodan AB, Malmø, Sverige	> 99%	26536-19-0
Trinonanoin (C9:0 TG)	Larodan AB, Malmø, Sverige	<99%	126-53-4

Tabell 8: Laboratorieutstyr benyttet under ekstraksjon, fraksjonering, eller metylering av lipider fra fordøyde og ufordøyde melkeprodukter.

Laboratorieutstyr	Navn	Produsent	Modell/ spesifikasjoner
Blåkorkflaske m/kork	Schott Laboratory Bottle	DURAN, Mainz, Tyskland	
Bordsentrifuge	Compact Tabletop Centrifuge, Kubota 2010	Kubota, Osaka, Japan	2010
Digitalvekt		Sartorius, Göttingen, Tyskland	ENTRIS224-1S
Forestringsrør	Screwthread tubes	DURAN, Mainz, Tyskland	
GC-hetteglass m/aluminium krympe kork	300 µL fixed insert vial, aluminum cap	Thermo Scientific, Langerwehe, Tyskland	11 mm (kork)
GC-kolonne	CP-SIL 88 kapillær kolonne	(Varian, Middelburg, Nederland.	50 m
SPE kolonne	Discovery DSC-NH ₂ SPE kolonne	Merck, Darmstadt, Tyskland	500 mg, 3 mL
SPE lokk		Gilson, Wisconsin, USA	
HPLC-rør m/ skrukork		VWR International, Pennsylvania, USA	1,5 mL
Pasteurpipette av glass	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR International, Pennsylvania, USA	150 mm
Ristebrett	Orbital Shaker	Biosan Riga, Latvia	PSU-20i
Sentrifuge	Multifuge X3R	Thermo scientific, Langerwehe, Tyskland	
Sentrifugerør	Pyrex sentrifugerør m/ gummipakning skrukort	Corning Inc., New York, USA	GPI-24-400
Varmeblokk m/ inndampingsstativ	Block Heater	Stuart, Staffordshire, England	SBH130D/3
Vannbad	AquaLine Waterbath	LAUDA, Lauda-Köningshofen, Tyskland	AL2
Vortex	Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA	2

3.5.1 Internstandarder og kalibreringsløsninger:

I forkant av Folch ekstraksjon ble det laget to ulike internstandarder; en til frie fettsyrer og en til nøytrale lipider. C9:0 ble brukt for å bestemme fettsyrer fra C4:0 til C13:0, mens C19:0 ble brukt til å bestemme fettsyrer fra C14:0 og oppover. For internstandard til analyse av frie fettsyrer ble det brukt 5 mg av hver fettsyre per mL kloroform. For internstandard til analyse av nøytrale lipider ble det brukt 2 mg/mL C9:0, og 10 mg/mL C19:0. Deretter ble det tilsatt riktig mengde kloroform til målekolben, og løsningen ble ristet godt. Etter noen minutter risting ble innholdet overført til 1.5 mL HPLC-prøveglass med skrukork, som deretter ble plassert i fryser ved - 20 °C fram til bruk. FAME internstandard ble laget ved å veie inn 33,1 mg ME9:0 og 84,1 mg ME19:0 i en 10 mL målekolbe og fylle til streken med heptan. Konsentrasjonen til kalibreringsløsninger er vist i vedlegg 3 (tabell C). Hamiltonsprøyte ble brukt for alle uttak, og skylt godt med heptan mellom endring av løsninger.

3.5.2 0.1 M NaCl i vann:

0.1 M NaCl saltvannsløsning ble laget ved å veie inn 5.43 g NaCl i en 500 mL målekolbe, og fylle til markert strek med Milli-Q vann. Løsningen ble overført til 500 mL blåkorkflaske og oppbevart mørkt og kaldt (4°C) frem til bruk.

3.5.3 Folch løsning:

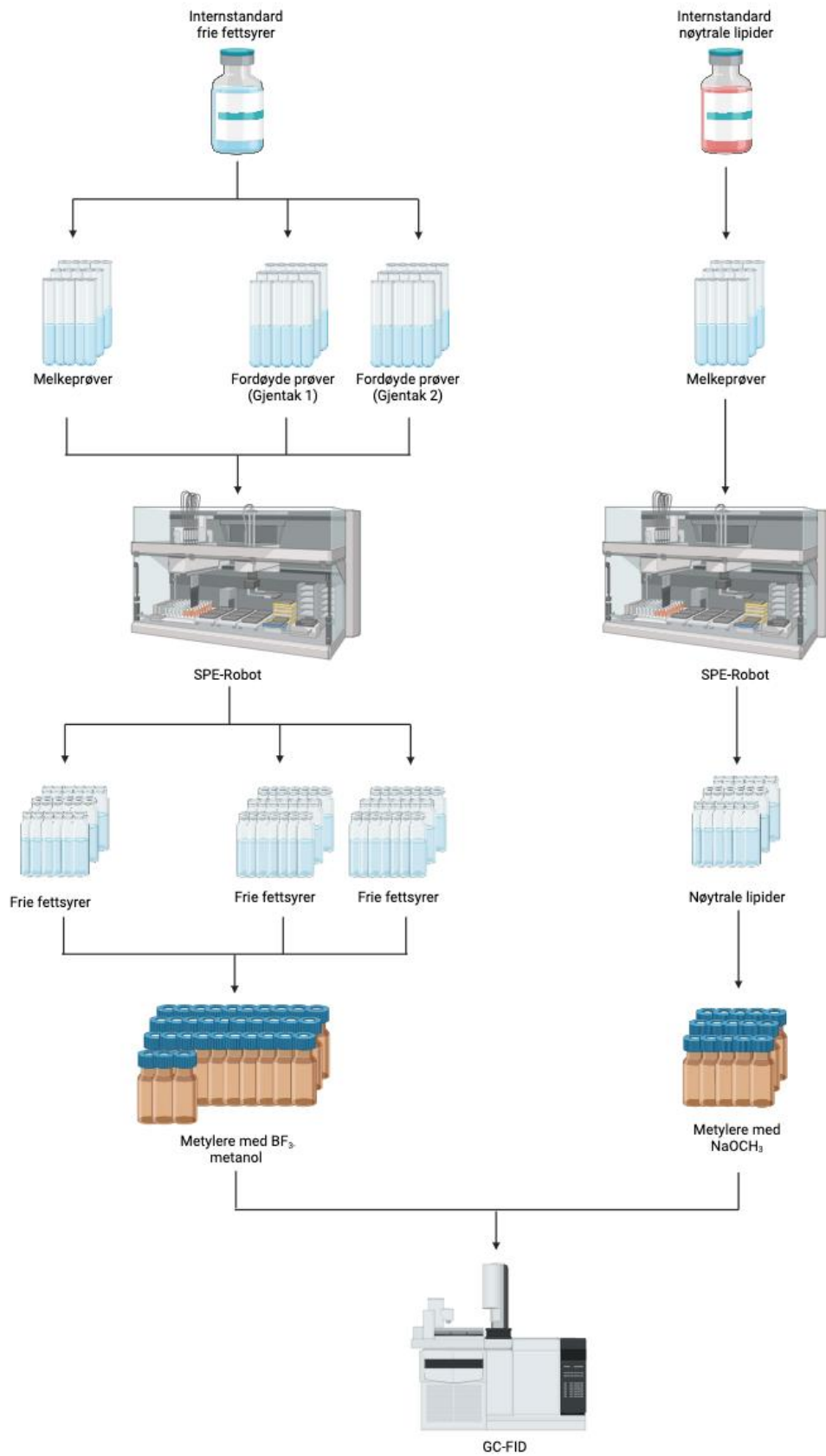
Folch løsning ble laget ved å blande kloroform og metanol 2:1 forhold. Metanol og kloroform ble målt opp i hver sin målesylinder, og blandet i blåkorkflaske. Løsningen ble oppbevart i kjemikalieskap fram til bruk.

3.5.4 Dietyleter:eddiksyre (98:2):

Dietyleter:eddiksyre ble laget ved å måle dietyleter og eddiksyre i hver sin målesylinder og blande 98:2 forhold i blåkorkflaske. Det ble laget ny løsning dietyleter:eddiksyre til SPE-roboten for hver gang.

3.5.5 Natriummetanolat (NaOCH₃):

For å lage natriummetanolat ble det benyttet 5 mg natriummetall per mL metanol (5mg/mL NaOCH₃). 30 mL metanol ble målt og tilsatt en blåkorkflaske. Deretter ble 150 mg natrium (s) veid og tilsatt blåkorkflasken med metanol, og løsningen fikk stå uten kork til metanolen var ferdig med å boble. Løsningen ble oppbevart i kjemikalieskap fram til bruk.



Figur 20: Oversikt over internstandard tilsatt under ekstraksjon av henholdsvis frie fettsyrer og nøytrale lipider, samt metyleringsmetode. Figuren er laget i Biorender.com.

3.6 Analyse av frie fettsyrer og nøytrale lipider:

For å analysere de frie fettsyrene i melkeprøvene og de fordøyde prøvene, ble fettsyrene ekstrahert ved bruk av en modifisert versjon av Folch ekstraksjon. For å fraksjoneringen ble en automatisk SPE robot (Gilson, GX-274 ASPEC™, Middleton, WI, USA) benyttet. Etter fraksjonering ble de frie fettsyrene og lipidene metylert, og omdannet til FAME for å øke analytisk ytelse og nøyaktighet. Nøytrale lipider ble metylert med natriummetanolat, mens frie fettsyrer ble metylert med BF₃-metanol (Boron triflourid i metanol), Til slutt ble FAME analysert ved hjelp av gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor (GC-FID).

Melkeprøvene ble analysert for både frie fettsyrer og nøytrale lipider, mens de fordøyde prøvene kun ble analysert for frie fettsyrer. Se figur 20.

3.6.1 Ekstraksjon av lipider med Folch metode:

Før ekstraksjonen kunne foregå måtte prøvene tines i 25 °C vannbad i 5 minutter. På denne måten ble prøvematerialet flytende, slik at nødvendig mengde prøve kunne veies inn, samtidig som temperaturen var kjølig nok til at enzymaktiviteten ikke hadde betydelig øking.

Resterende prøvemateriale ble igjen flushet med N₂-gass, fryst med flytende nitrogen og oppbevart ved – 20 °C. For selve Folch ekstraksjonen ble 0.5 g ± 0.005 tint prøvemateriale veid inn i glassrør med skrukork, og 10 mL Folch løsning (kloroform: metanol (2:1)) ble umiddelbart tilsatt for å stoppe all enzymaktivitet. 250 µL av romtemperert internstandard ble tilsatt hver prøve ved bruk av hamiltonsprøyte, og sprøyten ble skylt med heptan etter bruk. 2 mL 0.1 M NaCl i vann ble tilsatt prøvene med automatpipette, og prøvene ble vortex-mikset i 30 sekunder hver. Prøvene ble deretter sentrifugert på Multifuge X3R ved 670 g i 10 minutter, som delte prøven i 2 faser; en øvre vandig fase, et mellomsjikt med proteinrester og annet biologisk restmateriale, og en nedre organisk fase hvor de frie fettsyrene befant seg. Den nederste fasen ble ekstrahert, først fjerne mest mulig av den vandige fasen ved å suge den opp med glasspipette. Deretter ble det bytte til en ny ren glasspipette, og samtidig som det ble blåst luft ut av den ble den ført ned gjennom den resterende vandige fasen og proteinlaget i midten, for å kunne suge opp den nedre fasen og overføre den til et rent glassrør.

Kloroformfasen ble ekstrahert på samme måte, uten å hente vannfasen. Prøvene ble deretter dampet til tørrhet ved bruk av N₂-gass og en varmeblokk ved 40 °C. Da prøvene var ferdigtørket ble de tilsatt 1 mL kloroform, løsningen ble godt blandet med en pasteurpipette, og overført til 1,5 mL HPLC-prøveglass. Prøvene var klare for SPE robot.

3.6.2 Fast-fase fraksjonering med SPE-robot:

SPE-roboten fraksjonerte lipidene i nøytrale lipider (NL) og frie fettsyrer (FFA). Det ble benyttet ferdigpakkede 500 mg aminopropynol 3 mL SPE kolonner med lokk. Roboten ble automatisk gjennomrenset med isopropanol, og rør ble visuelt inspisert for luftbobler. GC-rør med Folch ekstraherte prøver, SPE-kolonner med lokk og glassrør til oppsamling av nøytrale lipider og frie fettsyrer ble plassert på sine respektive plasser. Kjemikaliereservoar posisjon 1, 2 og 3 ble fylt med henholdsvis heptan, kloroform, og dietyleter:eddiksyre. Roboten kondisjonerte med 7.5 mL heptan, eluerte nøytrale lipider med 5.0 mL kloroform og de frie fettsyrene med 5.0 mL dietyleter:eddiksyre. Roboten ble innstilt på programmet «NL-FFA» og fraksjoneringen startet. Grunnet mulig lipid-kontaminasjon fra materialet i SPE-kolonnene, ble det analysert 2 blank prøver per ny pakke SPE-kolonner. En blank besto av omtrent 1 mL kloroform. Fraksjonene ble overført til forestringsrør, og deretter dampet inn med N₂-gass på varmeblokk ved 40 °C.

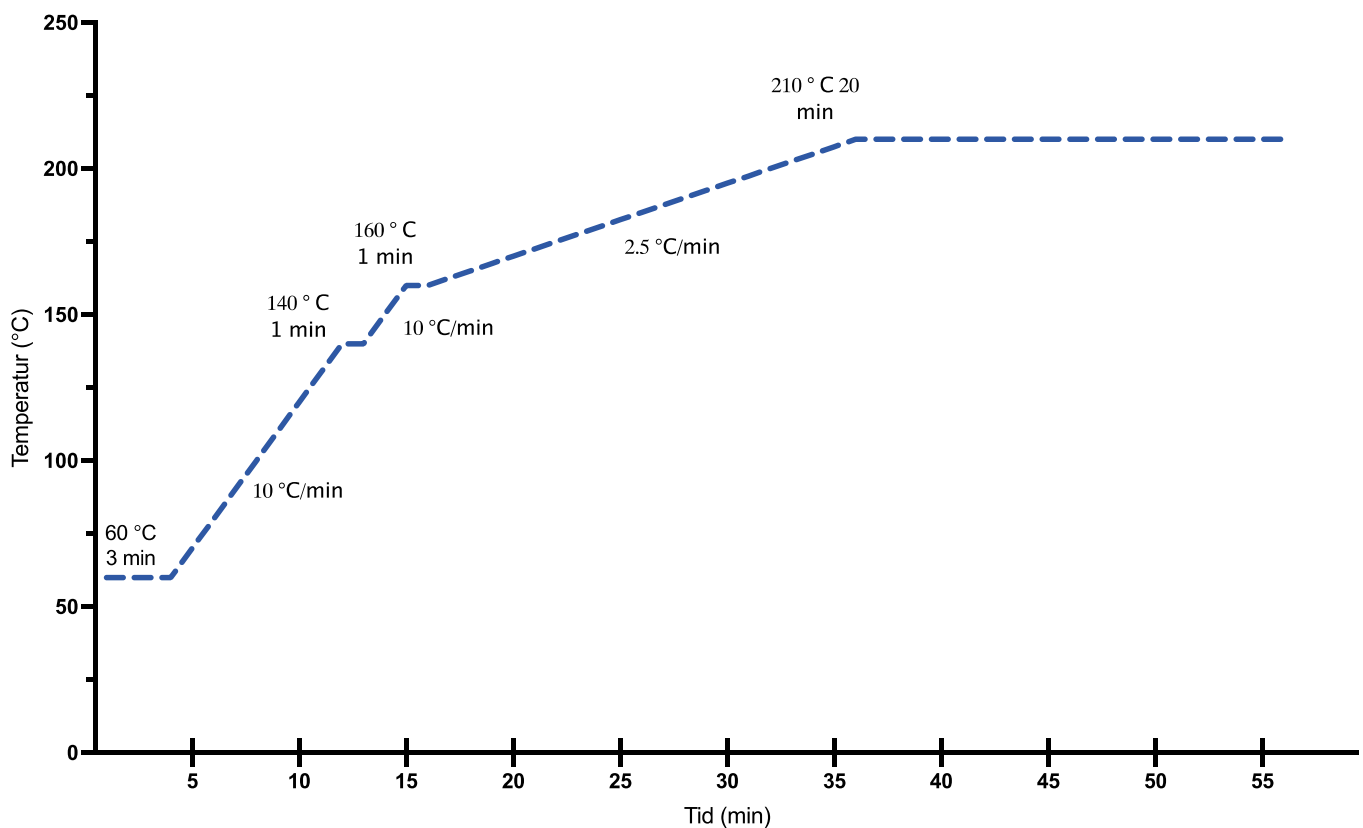
3.6.3 Metylering:

De dampede rørene med fraksjoner av frie fettsyrer ble tilsatt 1 mL BF₃-metanol, før prøvene ble plassert i 70 °C vannbad i 5 minutter. Prøvene ble deretter romtemperert, tilsatt 1 mL heptan og mikset på vortexmikser i noen sekunder. Deretter ble de sentrifugert ved 3000 rpm i 3 minutter, og den øvre heptanfasen ble overført til GC-rør med insert, og resten ble overført til 1.5 mL HPLC-rør som backup.

For metylering av de nøytrale lipidene ble det istedenfor 1 mL BF₃-metanol tilsatt 2 mL heptan med kontrollert automatpipette, og deretter 1.5 mL natriummetanolat. Prøven ble ristet horisontalt på 350 bevegelser per minutt i 30 minutter, og deretter tilsatt 500 µL 0.1 M NaCl i vann for å hindre kvantifisering av C4:0. Prøvene ble så sentrifugert ved 1500 rpm i 5 minutter, og øverste heptanfase ble overført til GC-rør med insert, og resten i 1.5 mL HPLC-rør som backup. Alle de metylerte prøvene ble lagret i fryser ved – 20 °C, fram til videre analyse.

3.6.4 Analyse av frie fettsyrer med gaskromatografi med flammeionisasjonsdetektor (GC-FID):

Før analyse av melkeprodukter og fordøyde prøver ble instrumentet kalibrert ved å analysere de kjente konsentrasjonene av standardene i kalibreringsløsningen. Alle fettsyrer som ble detektert under den laveste konsentrasjonen i kalibreringen ble markert som n.d (not detected) i rapporten. Analyse av de metylerte fettsyrene ble utført på en Agilent 6890 Series GC system, koblet til en flammeionisasjonsdetektor (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), utstyrt med 7683B automatisert prøveinjektor (Agilent Technologies). Programvaren benyttet var Open LAB CDS (Agilent Technologies). Kolonnene som ble benyttet var 50 meter CP-SIL 88 kapillær kolonne med en indre diameter (id) på 0.25 mm og 0.2 μm filmtykkelse. Helium ble brukt som bæregass med konstant strømningshastighet på 0.5 mL/minutt. Injeksjonstemperatur var 250 $^{\circ}\text{C}$, og deteksjonstemperatur var 300 $^{\circ}\text{C}$. Det ble brukt en splitt injektor, med en splitt ratio på 1:25. GC ovnstemperatur var programmert fra 60 $^{\circ}\text{C}$ (3 minutter), deretter økt til 140 $^{\circ}\text{C}$ (1 minutt), med en hastighet på 10 $^{\circ}\text{C}/\text{minutt}$, igjen økt til 160 $^{\circ}\text{C}$ (1 minutt), med en hastighet på 10 $^{\circ}\text{C}/\text{minutt}$, og til slutt ble temperatur økt til 210 $^{\circ}\text{C}$ (20 minutt) med en hastighet på 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{minutt}$. Temperaturprogrammet er vist i figur 21.



Figur 21: Temperaturprogram brukt under GC-FID av Agilent 6890 Series GC system med flammeionisasjonsdetektor.

For å beregne konsentrasjon av fettsyrene ble følgende formel benyttet;

$$\text{mg/mL} = A_{(\text{FAME})} / A_{(\text{ISTD})} * Rf * [\text{ISTD}]$$

der $A_{(\text{FAME})}$ er topparealet av signalene i kromatogrammene av hver FAME, $A_{(\text{ISTD})}$ er arealet til internstandard, Rf er responsfaktor og $[\text{ISTD}]$ er konsentrasjonen til internstandard. Ved utgreining av verdier under LOD og LOQ (n.d) ble 0 benyttet som verdi.

3.7 Sensorisk analyse:

For å undersøke de sensoriske effektene av homogenisering og pasteurisering ble det gjennomført både diskrimineringstest (forskjelltest) og beskrivende test. For diskrimineringstesten ble det benyttet triangeltest, som går ut på at deltakere blir tildelt 3 prøver, hvor 2 av prøvene er identiske, mens en er ulik. Deltakernes oppgave var å diskriminere den prøven som skiller seg ut. Deltakerne hadde et tvunget valg, det vil si at de måtte velge en prøve å skille ut, som gir grunnlag for at det er 1/3 sjans for å gjette riktig.

Triangel-diskrimineringstesten ble gjort på 2 ulike prøvesett; nummer 1 og nummer 2. Prøvesett 1 besto av 2 prøver med Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmjølk, og en prøve med Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmjølk som hadde blitt tottrinshomogenisert ved 180 og 50 bar. Prøvesett 2 besto av 2 prøver med Tine Lettmelk 1% fett, og en prøve med Tine Langtidsholdbar Lettmelk 1,2% fett. Etter triangel-testen skulle deltakerne rangere rundhet, fylldighet og søthet i den uhomogeniserte Økologiske Gardsmjølka fra Røros Lettmjølk fra 1 (litt) til 3 (mye), samt svare på om de synes den homogeniserte varianten smakte naturlig eller kunstig. Det siste spørsmålet i undersøkelsen var om Tine Langtidsholdbar Lettmelk 1,2% fett hadde kokt smak.

23 deltakere ble rekruttert fra NMBU, og prøvene ble servert romtemperert (20°C), i like, gjennomsiktige, 30 mL medisinglass, med lunkent vann på siden og mulighet for skylling mellom hver prøve. Prøvene ble kodet med ulike randomiserte tresifrede koder. Det ble utviklet og benyttet elektronisk undersøkelse fra Nettskjema.no for å gjennomføre testene.

3.8 Databehandling:

All data ble behandlet ved bruk av Microsoft Excel versjon 16.66.1 og GraphPad Prism versjon 10.2.3. Alle statistiske analyser ble utført i GraphPad Prism med 95% konfidensintervall. Tukey's test ble brukt for å undersøke signifikante forskjeller mellom ulike prøver, mens toveis variansanalyse (ANOVA) ble benyttet for å analysere hvilke faktorer som har hatt signifikant effekt på resultatene.

3.9 KI (Kunstig Intelligens):

KI, i form av ChatGPT 3.5, har ved enkelte tilfeller blitt brukt som Engelsk-Norsk ordbok, og synonymordbok.

4 Resultater:

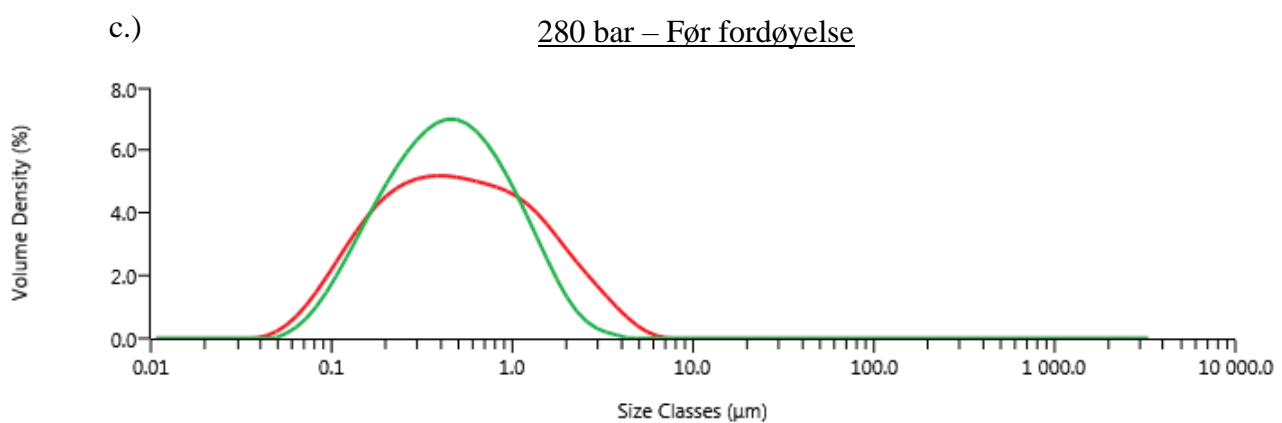
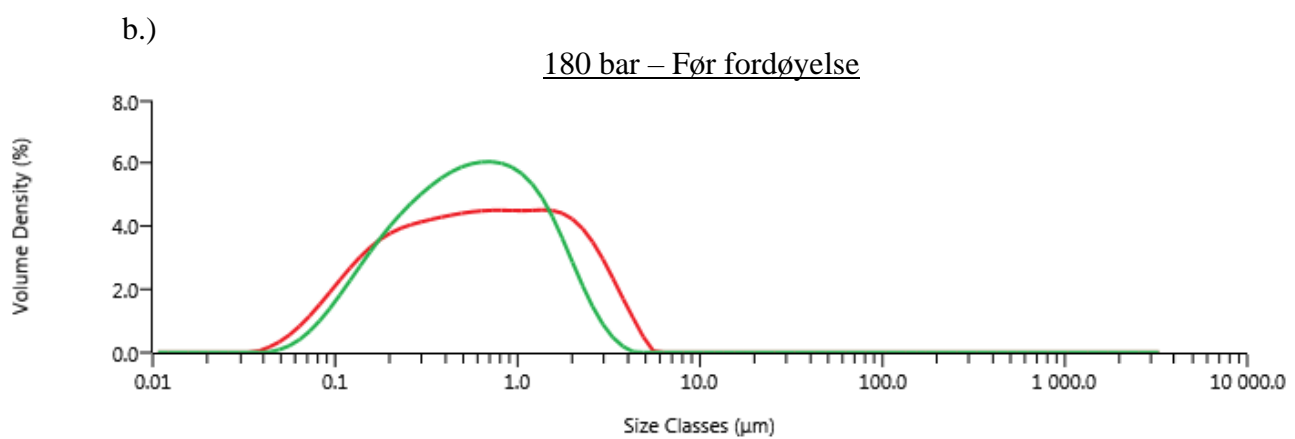
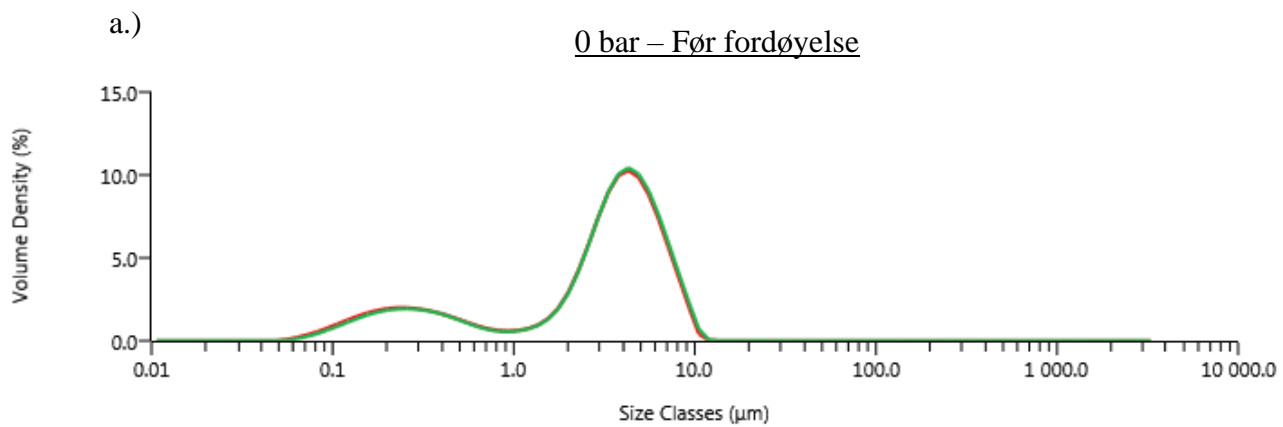
Effekten av homogenisering og pasteurisering på lipider i melk og partikkelstørrelse til partikler ble undersøkt. I dette kapittelet vil resultatene fra analyser av lipider og fettkulestørrelse gjort på ufordøyde og fordøyde melkeprodukter som var upasteuriserte, LTLT-pasteuriserte eller UHT-behandlede og homogenisert ved 0, 180 eller 280 bar presenteres. I tillegg presenteres resultater fra sensorisk undersøkelse gjort på Tine Lettmelk, Tine Langtidsholdbar Lettmelk og uhomogenisert og homogenisert (180 bar) Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmelk. Kapittelet er delt i 3 hoveddeler, dedikert til henholdsvis partikkelstørrelse, lipidanalyse og sensorisk analyse.

4.1 Partikkelstørrelse:

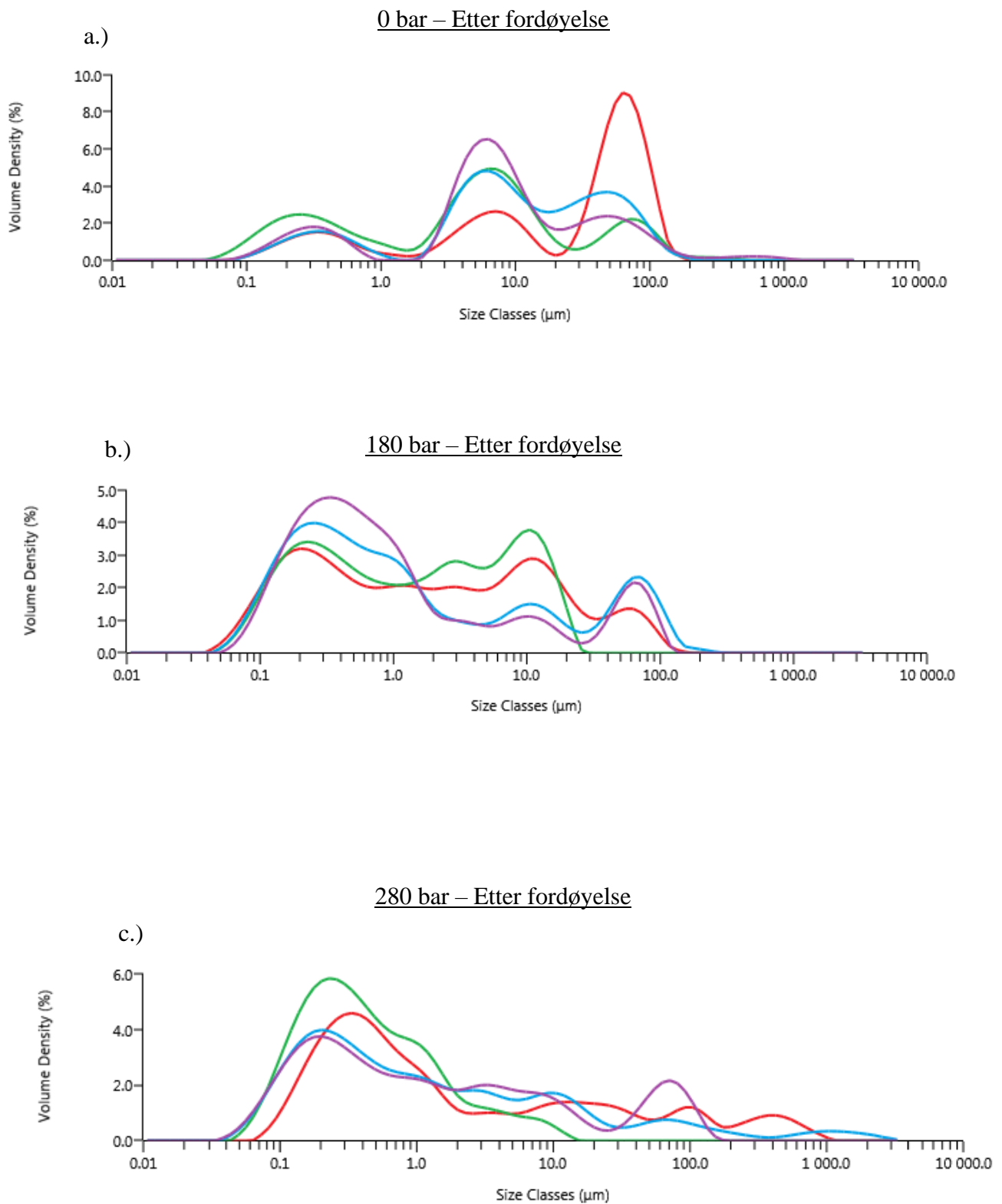
Partikkelstørrelse ble målt ved bruk av Malvern Mastersizer 3000, både i fordøyde og ufordøyde melkeprodukter. Instrumentet bruker laserdiffraksjon for å beregne ulike parametere som beskriver partiklenes størrelsesfordeling, blant annet $D_x(50)$ som en gjennomsnittsverdi der 50% av partiklene i prøvematerialet befinner seg enten under eller over denne verdien. I tillegg lages det en partikkelstørrelsefordeling, hvor partikkelstørrelse (μm) er plottet på en logaritmisk skala, mot volumtetthet (5%).

4.1.1 Partikkelstørrelsefordeling til fordøyde og ufordøyde prøver:

Programvaren til Malvern Mastersizer 3000 lager en grafisk visualisering av fordelingen til partikkelstørrelse. En smal og høy topp indikerer en stor konsentrert gruppe av partikler med omtrent samme størrelse, mens to eller flere topper indikerer flere grupper av partikler med ulik størrelse. Slak topp indikerer at flere forskjellige partikkelstørrelser befinner seg i prøven, men at ingen klasser dominerer. Partikkelstørrelse i fordøyd materiale umiddelbart etter duodenalfase ble målt i hver parallell i fordøyelsen (D120 1 og D120 2) i gjentak 2, og partikkelstørrelse til ufordøyde melkeprøver ble målt i melk fra gjentak 2. For å oppnå tilstrekkelig obskurasjon ble det brukt 0.5 mL prøvemateriale av melkeprøver før fordøyelse, og 3 mL av prøvemateriale fra fordøyde prøver. Partikkelstørrelsefordelingen til ufordøyde og fordøyde upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprøver er vist i figur 22 og 23.



Figur 22: Partikkelstørrelsefordeling til upasteuriserte (rød) og LTLT-pasteuriserte (grønn) melkeprodukter fra gjentak 2 homogenisert ved a) 0 bar, b) 180 bar, c) 280 bar. Vær oppmerksom på ulike y-akse verdier.

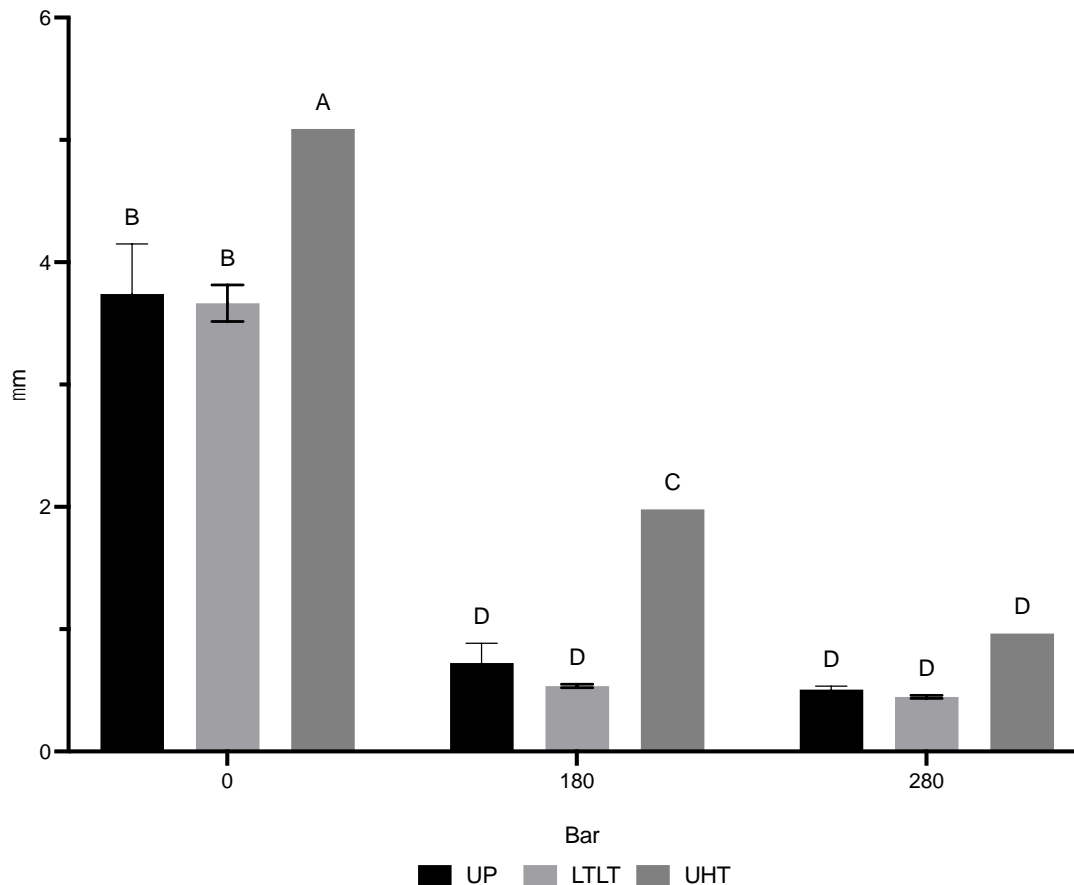


Figur 23: Partikkelstørrelsefordeling til upasteuriserte fordøyde prøver fra parallell 1 (rød) og parallell 2 (grønn), og LTLT-pasteuriserte fordøyde melkeprodukter fra parallell 1 (blå) og (lilla), fra melkeprodukter homogenisert ved a) 0 bar, b) 180 bar og c) 280 bar. Vær oppmerksom på ulike y-akse verdier.

Figur 22a viser at forsøksfaktoren behandlingstemperatur ikke har hatt effekt på fordeling av partikkelstørrelse i uhomogenisert prøver (UP0 og LTLT0), da fordelingen er tilnærmet identisk. Fordelingen viser to topper, som indikerer to dominante størrelsesklasser. Figur 22 viser at homogenisering har ført til kun en topp, i tillegg til at denne toppen var mindre, og har forskjøvet seg mot venstre. Dette indikerer at homogenisering har ført til én størrelsesklasse blant partiklene, som består av partikler med mindre størrelser. Figur 22b og 22c viser at toppene i fordelingen av partikkelstørrelse i upasteuriserte pasteuriserte melkeprodukter var litt lavere enn hos upasteuriserte prøver, i tillegg til at grafen for partikkelstørrelsefordeling i upasteuriserte melkeprøver hadde litt lengre høyre hale. Dette kan tyde på at pasteurisering har ført til noen større partikler. Figur 23 viser at fordøyelse fører til dannelse av en mer kompleks partikkelstørrelsesammensetting, med partikler i mange ulike størrelseskategorier. Dette tyder på at det har vært desintegrering av enkelte partikler, som har ført til mindre størrelser, og aggregering og koalesens, som har ført til større partikler. Figur 23a viser at partikkelstørrelsefordelingen i alle parallellene fra UP0 og LTLT0 hadde 3 topper. Endringen i partikkelstørrelsefordelingen til UP0 og LTLT0 før og etter fordøyelse tyder på at det har blitt dannet store partikler under fordøyelsen, og denne trenden vises blant alle produktene. Figur 23 viser at økt homogeniseringstrykk reduserer størrelse under fordøyelse.

4.1.2 Partikkelstørrelse i ufordøyd materiale:

For å undersøke effekten av varmebehandling og homogenisering på partikkelstørrelse, ble alle melkeprøvene før fordøyelse analysert. Gjennomsnittlig størrelse til partiklene i hvert melkeprodukt er presentert i figur 24.



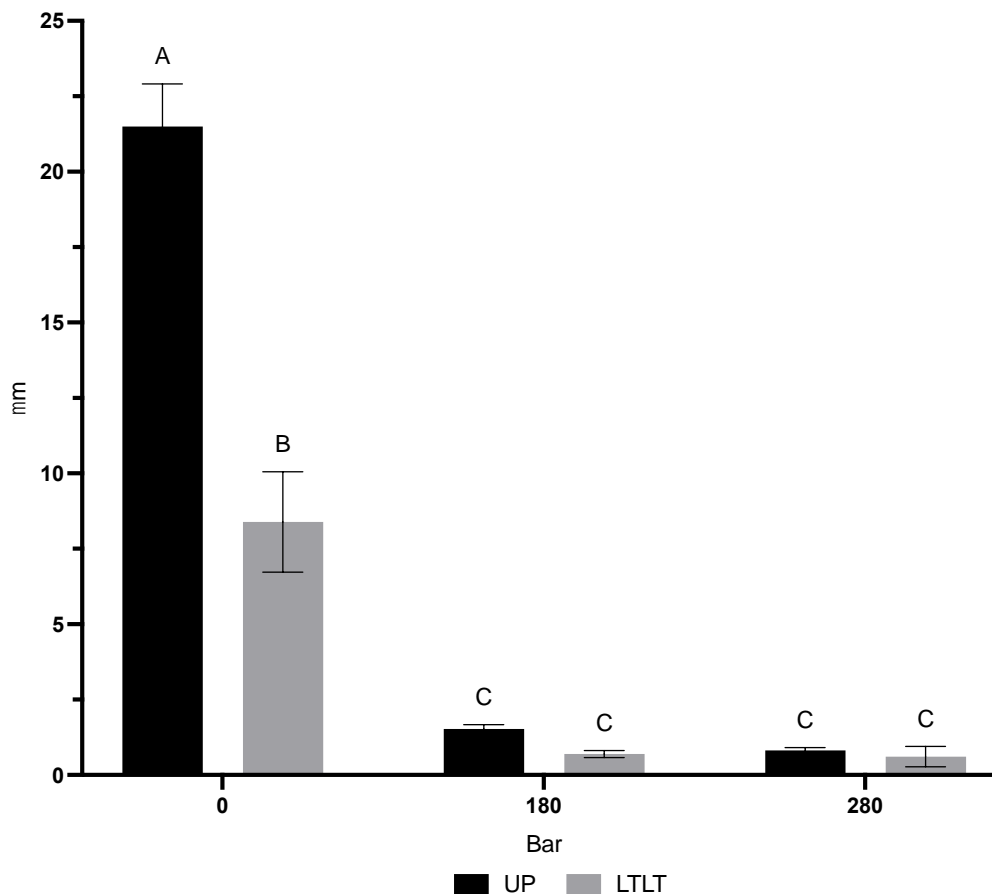
Figur 24: Gjennomsnittlig partikkelstørrelse (μm) i upasteuriserte ($n=2$), LTLT-pasteuriserte ($n=2$), og UHT-behandlede ($n=1$) melkeprøver \pm standardavvik. Bokstaver representerer signifikant forskjell mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p < 0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang.)

Toveis ANOVA (tabell E, vedlegg 5) viser at begge forsøksfaktorene (behandlingstemperatur og homogeniseringstrykk) har hatt like stor signifikant effekt ($p < 0.05$) på partikkelstørrelse, og at det var signifikant interaksjonseffekt mellom faktorene. Gjennomsnittlig størrelse på fettkuler i uhomogeniserte melkeprodukter var signifikant større enn i homogeniserte melkeprodukter. Videre viser figuren at partikkelstørrelse i UHT-behandlet melk var alltid størst ved hvert homogeniseringstrykk. Blant alle melkeproduktene hadde UHT0 størst gjennomsnittlig fettkulestørrelse, og var signifikant større enn alle andre prøver.

Det var ingen signifikant effekt av økt homogeniseringstrykk på gjennomsnittlig fettkulestørrelse mellom melkeprøver homogenisert ved 180 eller 280 bar blant upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte prøver. Det var dog signifikante forskjeller mellom alle 3 homogeniseringstrykkene i UHT-behandlede prøver. Figuren viser en trend hvor fettkulene i melk homogenisert ved 280 bar var mindre enn fettkulene i melk homogenisert ved 180 bar uavhengig av temperaturbehandling.

4.2.3 Partikkelstørrelse i fordøyd materiale:

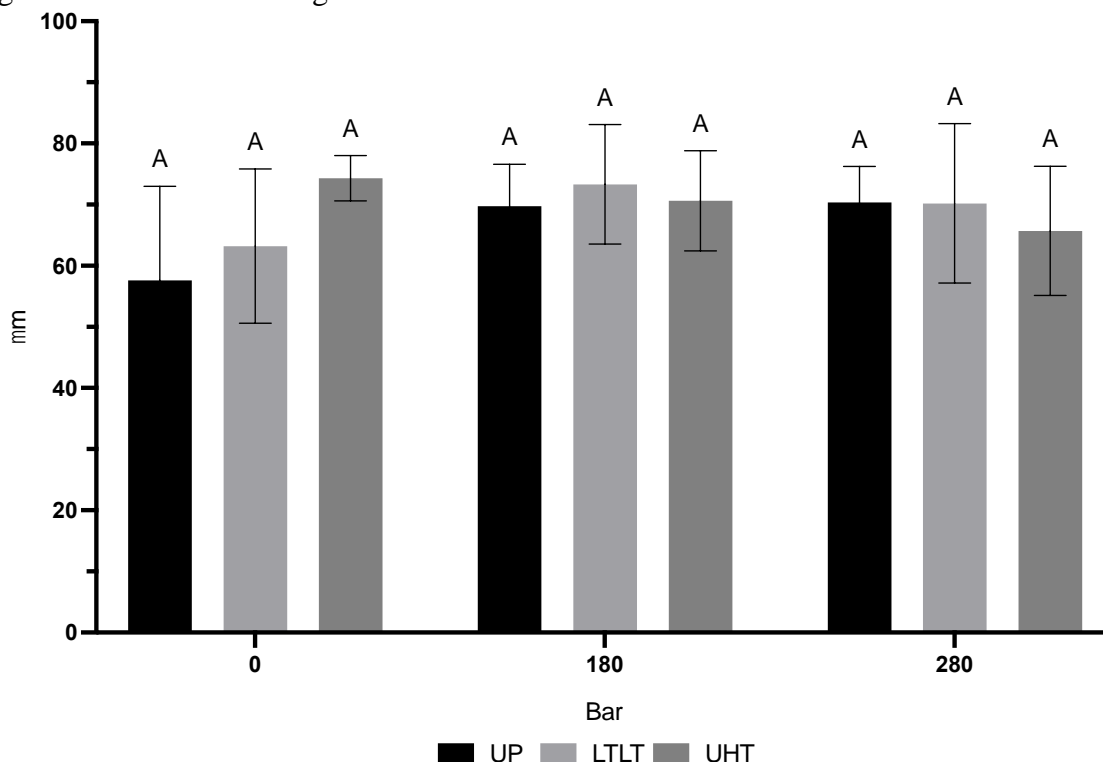
Partikkelstørrelse ble målt i fordøyde prøver kort tid etter avsluttet duodenal fase for upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter. Partikkelstørrelse ble målt i melk fra kun fra gjentak 2, i hver parallell fra fordøyelsen (D120 1 og D120 2).



Figur 25: Gjennomsnittlig partikkelstørrelse (μm) på ferskt fordøyd materiale \pm standardavvik ($n=2$). Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p<0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. .

Toveis ANOVA (tabell F, vedlegg 6) viser at begge faktorene (behandlingstemperatur og homogeniseringstrykk) har hatt signifikant ($p < 0.05$) effekt på partikkelstørrelsen, og at det har vært en signifikant samspillseffekt mellom temperatur og trykk. Figur 25 viser at blant de ferske fordøyde prøvene var gjennomsnittlig fettkulestørrelse signifikant størst i uhomogeniserte melkeprøver, hvor UP0 hadde størst fettkulestørrelse, etterfulgt av LTLT0. Disse prøvene var signifikant forskjellig fra hverandre, samt at de var forskjellig fra de homogeniserte prøvene. Figuren viser også at homogeniserte melkeprøver hadde minst partikkelstørrelse, og selv om det ikke var signifikante forskjeller mellom de ulike homogeniseringstrykkene, var gjennomsnittlig størrelse alltid minst i prøven homogenisert ved 280 bar.

På grunn av plutselige problemer med Mastersizer ble alle fordøyde prøver plassert i fryser, og partikkelstørrelse ble målt på opptinte fordøyde prøver av upasteuriserte, LTLT-pasteuriserte og UHT-behandlede melkeprodukter ved senere anledning. Partikkelstørrelse til fryst fordøyd materiale ble målt i hver parallell i fordøyelsen (D120 1 og D120 2) i gjentak 1 og 2. Resultatet er vist i figur 26.

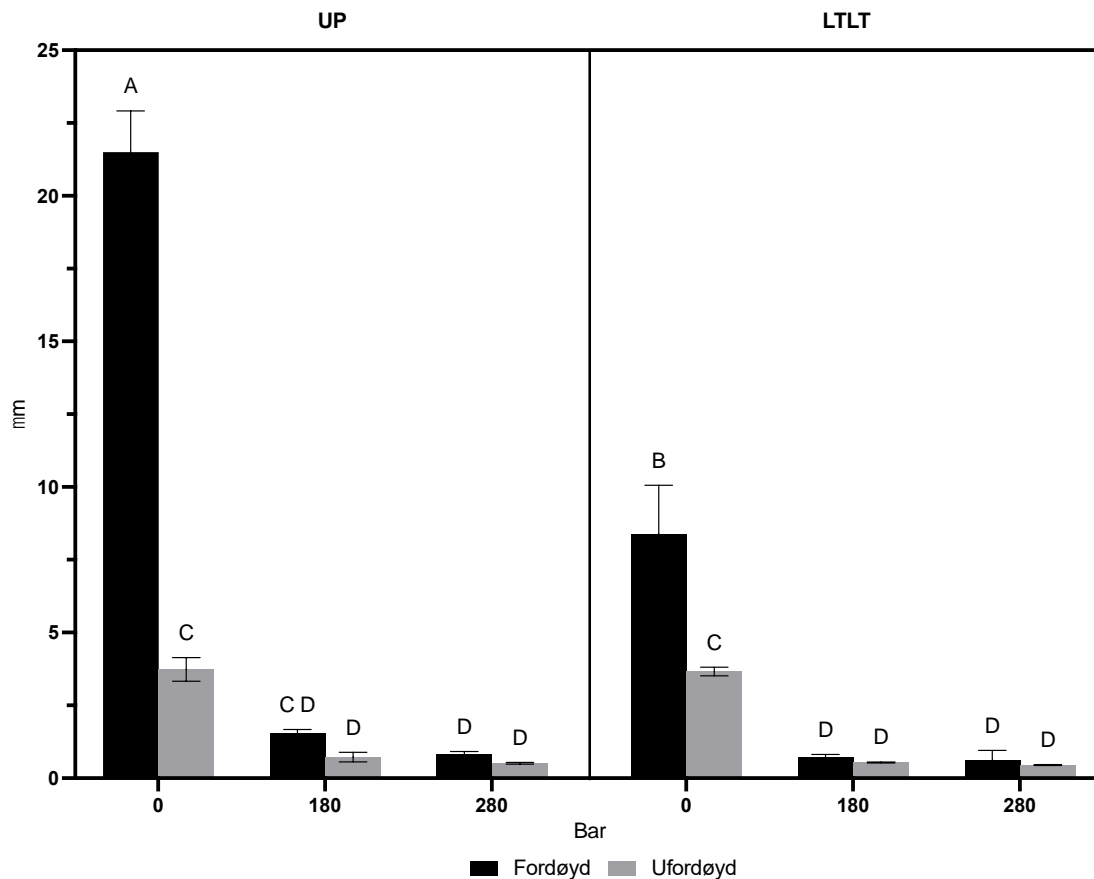


Figur 26: Gjennomsnittlig partikkelstørrelse (μm) på fryst fordøyd materiale \pm standardavvik ($n=4$). Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p < 0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang.)

Figur 26 viser at det er ikke var signifikante forskjeller mellom gjennomsnittlig partikkelstørrelse i fordøyde melkeprodukter som har vært fryst, og det er ingen signifikante forskjeller av melkebehandlingene før fordøyelse. Gjennomsnittlig partikkelstørrelse i disse prøvene som har vært fryst var betraktelig større enn i materiale som ble analysert umiddelbart etter avsluttet fordøyelse.

4.2.4 Partikkelstørrelse i fordøyd og ufordøyd materiale:

For å se på effekt av fordøyelse på partikkelstørrelse ble gjennomsnittlig partikkelstørrelse i ferskt fordøyd materiale sammenlignet med gjennomsnittlig partikkelstørrelse i ufordøyde melkeprøver. Målingene til ferskt fordøyd materiale ble gjort på materiale fra hver parallell i fordøyelsen (D120 1 og D120 2) i gjentak 2, mens partikkelstørrelse til ufordøyde melkeprøver ble målt i melk fra gjentak 1 og gjentak 2. Resultatet er vist i figur 27.



Figur 27: Gjennomsnittlig partikkelstørrelse (μm) på ferskt fordøyd materiale ($n=2$) og melkeprøver \pm standardavvik ($n=2$). Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p<0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang.)

Treveis ANOVA (tabell G, vedlegg 7) viser at det har vært signifikant ($p < 0.05$) effekt av alle 3 forsøksfaktorene (behandlingstemperatur, homogeniseringstrykk og fordøyd/ikke fordøyd), og at det var samspill mellom alle 3 faktorene. Det var signifikant forskjell i fettkulestørrelse mellom fordøyde og ufordøyde prøver av UP0 og LTLT0. Blant de homogeniserte prøvene var det ingen signifikante forskjeller i partikkelstørrelse mellom prøver behandlet med ulik temperatur, eller mellom melkeprøver før og etter fordøyelse. Figuren viser en trend hvor gjennomsnittlig partikkelstørrelse har økt etter fordøyelse for alle prøvene, og det kan se ut som melkeproduktene som hadde størst fettkulestørrelse før fordøyelse, også hadde det etter fordøyelsen.

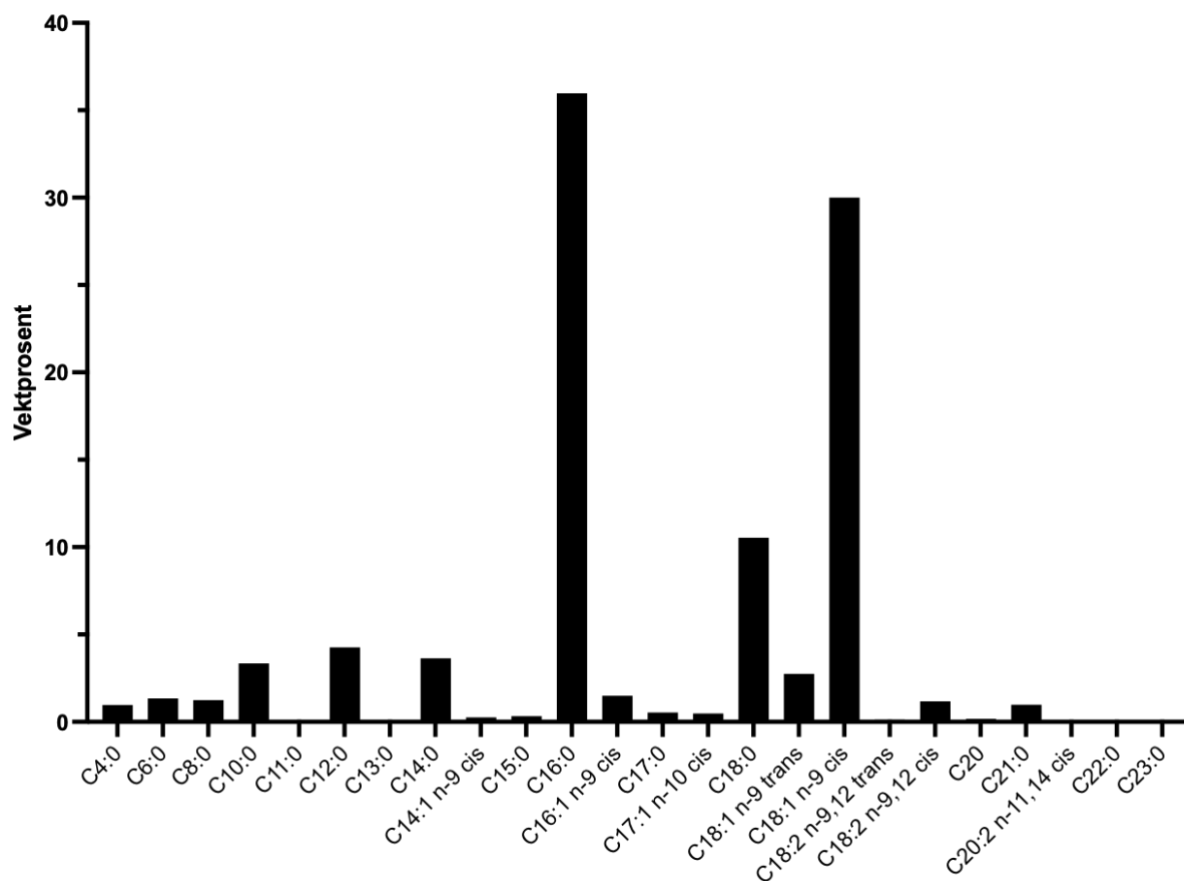
4.2 Lipidanalyser:

Melkeprodukter med ulike varmebehandlinger og homogeniseringstrykk ble fordøyet ved hjelp av statisk *in vitro* fordøyelsesmodell. Lipidene ble ekstrahert ved hjelp av Folchs metode og fraksjonert på SPE-robot. I ufordøyd melk ble lipidene fraksjonert som nøytrale lipider og frie fettsyrer, mens for fordøyd melk ble lipidene ekstrahert som frie fettsyrer. Verdiene er oppgitt i mg fettsyre per mL melk, og resultatene er vist i dette delkapittelet. Der konsentrasjonen av FAME var under Limit of Detection (LOD) og Limit of Quantification (LOQ) for GC-FID analysen ble 0 benyttet som verdi.

4.2.1 Ufordøyde prøver:

4.2.1.1 Fettsyresammensetning i ubehandlet melk:

Gjennomsnittlig mengde (mg/mL) av hver fettsyre i ubehandlet melk ble summert og den relative mengde av hver fettsyre ble regnet om til prosentandel av den totale fettsyremengden i melken. Dette visualiserer den ekstraherte fettsyreprofilen. Gjennomsnittet er beregnet på fettsyrer fra både nøytrale lipider og frie fettsyrer i melk fra gjentak 1 og 2. Det antas at 1 mL melk veier 1 g, og resultatet er vist i figur 28.



Figur 28: Vektprosent (mg fettsyre individuell fettsyre/mg total mengde fettsyre) i ubehandlet melk (UP0).

Figur 28 viser at fettsyrene som utgjorde størst andel av de nøytrale lipidene og frie fettsyrene i ubehandlet melk var C16:0 (35.97%), C18:1 n-9 cis (30%) og C18:0 (10.54%). Fettsyrene som utgjorde minst andel var C4:0 (0.97%), C6:0 (1.34%), C8:0 (1,24%), C16:1 n-9 cis (1,49%), C17:0 (0,54%), C18:2 n-9, 12 cis (1,18%) og C21:0 (0,98%).

4.2.1.2 Konsentrasjon av individuelle fettsyrer i nøytral lipidfraksjon:

Fettsyrekonsentrasjon (mg/mL) for alle individuelle fettsyrer i nøytrale lipider fra melkeprodukter før fordøyelse ble beregnet. De nøytrale lipidene ble ekstrahert fra hvert gjentak av upasteurisert og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter, og det ene gjentak som var av UHT-behandlede melkeprodukter. Resultatet er vist i tabell 9.

Tabell 9: Gjennomsnittlig mengde (mg/mL) individuelle fettsyrer i neytral lipidfraksjon i upasteuriserte (n=2), LTLT-pasteurisert (n=2), og UHT-behandlede (n=1) melkeprodukter homogenisert ved 0, 180 eller 280 bar før fordøyelse ± standardavvik. Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der ulike bokstaver er signifikant ulike (p<0,05). (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang). Fettsyrer med verdi < LOD og LOQ i alle melkeprodukter er ekskludert.

	Upasteurisert			LTLT-pasteurisert			UHT-behandlet		
	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar
C4:0	0,28 ± 0,03 ^A	0,20 ± 0,03 ^B	0,20 ± 0,03 ^B	0,31 ± 0,00 ^A	0,31 ± 0,01 ^A	0,31 ± 0,01 ^A	0,30 ^A	0,31 ^A	0,31 ^A
C6:0	0,40 ± 0,03 ^{AB}	0,28 ± 0,05 ^C	0,29 ± 0,05 ^C	0,43 ± 0,00 ^A	0,43 ± 0,01 ^A	0,43 ± 0,00 ^A	0,44 ^{BC}	0,44 ^{AB}	0,44 ^{AB}
C8:0	0,32 ± 0,05 ^A	0,34 ± 0,17 ^A	0,25 ± 0,04 ^A	0,36 ± 0,00 ^A	0,36 ± 0,00 ^A	0,36 ± 0,00 ^A	0,37 ^A	0,38 ^A	0,38 ^A
C10:0	0,85 ± 0,12 ^{AC}	0,72 ± 0,09 ^C	0,75 ± 0,09 ^{BC}	0,93 ± 0,01 ^{AC}	0,93 ± 0,01 ^{AC}	0,92 ± 0,03 ^{AC}	0,97 ^{AB}	1,00 ^A	0,99 ^{AB}
C11:0	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,02 ^A	0,01 ± 0,01 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A
C12:0	1,11 ± 0,24 ^A	1,00 ± 0,12 ^A	1,05 ± 0,13 ^A	1,25 ± 0,02 ^A	1,25 ± 0,03 ^A	1,23 ± 0,05 ^A	1,32 ^A	1,35 ^A	1,34 ^A
C13:0	0,03 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,01 ± 0,02 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A
C14:0	0,89 ± 0,10 ^A	0,73 ± 0,04 ^A	0,74 ± 0,08 ^A	0,85 ± 0,01 ^A	0,91 ± 0,00 ^A	0,91 ± 0,01 ^A	0,91 ^A	0,90 ^A	0,89 ^A
C14:1 n-9 cis	0,06 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,00 ^A	0,05 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ^A	0,06 ^A	0,06 ^A
C15:0	0,08 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,08 ± 0,00 ^A	0,08 ± 0,00 ^A	0,08 ± 0,00 ^A	0,08 ^A	0,08 ^A	0,08 ^A
C16:0	9,97 ± 0,87 ^A	8,02 ± 0,18 ^A	8,08 ± 0,39 ^A	9,53 ± 0,35 ^A	10,10 ± 0,23 ^A	9,99 ± 0,08 ^A	9,95 ^A	9,90 ^A	9,80 ^A
C16:1 n-9 cis	0,40 ± 0,05 ^A	0,34 ± 0,01 ^A	0,34 ± 0,03 ^A	0,04 ± 0,02 ^A	0,43 ± 0,00 ^A	0,43 ± 0,00 ^A	0,41 ^A	0,41 ^A	0,41 ^A
C17:0	0,15 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,00 ^A	0,15 ± 0,01 ^A	0,16 ± 0,01 ^A	0,15 ± 0,00 ^A	0,15 ^A	0,15 ^A	0,15 ^A
C17:1 n-10 cis	0,03 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A

Tabell x: (fortsettelse)

C18:0	3,02 ± 0,28 ^A	2,52 ± 0,05 ^A	2,49 ± 0,05 ^A	2,91 ± 0,09 ^A	3,06 ± 0,04 ^A	3,03 ± 0,01 ^A	2,94 ^A	2,95 ^A	2,92 ^A
C18:1 n-9	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ^A	0,04 ^A	0,04 ^A
<i>trans</i> C18:1 n-9 <i>cis</i>	8,60 ± 1,34 ^A	7,33 ± 0,28 ^A	7,20 ± 0,51 ^A	8,61 ± 0,36 ^A	9,30 ± 0,06 ^A	9,15 ± 0,15 ^A	8,80 ^A	8,81 ^A	8,80 ^A
C18:1 n-9	0,04 ± 0,05 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ^A	0,04 ^A	0,04 ^A
<i>trans</i> C18:2 n-9,12	0,31 ± 0,50 ^A	0,27 ± 0,01 ^A	0,27 ± 0,03 ^A	0,32 ± 0,01 ^A	0,35 ± 0,00 ^A	0,34 ± 0,01 ^A	0,32 ^A	0,32 ^A	0,32 ^A
<i>cis</i> C20:0	0,04 ± 0,04 ^{AB}	0,04 ± 0,00 ^{AB}	0,04 ± 0,00 ^B	0,05 ± 0,00 ^A	0,05 ± 0,00 ^{AB}	0,05 ± 0,00 ^A	0,05 ^{AB}	0,05 ^{AB}	0,05 ^{AB}
C21:0	0,28 ± 0,37 ^A	0,24 ± 0,01 ^A	0,23 ± 0,02 ^A	0,29 ± 0,02 ^A	0,30 ± 0,01 ^A	0,30 ± 0,00 ^A	0,27 ^A	0,27 ^A	0,28 ^A
C20:2 n-11,14	0,25 ± 0,04 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,02 ^A	0,03 ^A	0,03 ^A
<i>cis</i> C22:0	0,16 ± 0,03 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A
C23:0	0,24 ± 0,05 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A	0,02 ^A

Toveis ANOVA (tabell H, vedlegg 8) viser at det har vært en signifikant effekt ($p < 0.05$) av behandlingstemperatur på konsentrasjonen av fettsyrene, og ikke homogeniseringstrykk, men likevel at det vært samspillseffekt mellom trykk og temperatur. Det var signifikante forskjeller for 4 fettsyrer; C4:0, C6:0, C10:0 og C20:0. For C4:0 og C6:0 hadde melkeproduktene UP0 og UP180 signifikant lavere konsentrasjon enn resten av melkeproduktene. For C10:0 hadde UP180 den laveste konsentrasjonen, og var signifikant forskjellig fra UHT-behandlede melkeprodukter, uansett homogeniseringstrykk. UHT180 hadde størst konsentrasjon av C10:0, og var signifikant høyere enn UP180 og UP280. For C20:0 var LTLT0 og LTLT280 signifikant større enn UP280, som var melkeproduktet med minst konsentrasjon av C20:0. I tillegg viser tabellen at fettsyrene som befant seg i størst konsentrasjon i de nøytrale lipidene var C16:0, C18:1 n-9 cis og C18:0. Det ser ikke ut til å være en trend i hvilke melkeprodukter de signifikante forskjellene befinner seg i.

4.2.1.3 Konsentrasjon av individuelle fettsyrer i fri fettsyrefraksjon:

Fettsyrekonsentrasjon (mg/mL) for alle individuelle frie fettsyrer i melkeprodukter før fordøyelse ble beregnet. De frie fettsyrene ble ekstrahert fra hvert gjentak av upasteurisert og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter, og det ene gjentak som var av UHT-behandlede melkeprodukter. Resultatet er vist i tabell 10.

Tabell 10: Gjennomsnittlig mengde (mg/mL) individuelle fettsyrer i fri fettsyrefraksjon i upasteuriserte (n=2), LTLT-pasteurisert (n=2), og UHT-behandlede (n=1) melkeprodukter homogenisert ved 0, 180 eller 280 bar før fordeling ± standardavvik. Bokstavn representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der ulike bokstaver er signifikant ulike (p<0,05). (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang). Fettsyrer med verdi < LOD og LOQ i alle melkeprodukter er ekskludert.

	Upasteurisert			LTLT-pasteurisert			UHT-behandlet		
	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar
C6:0	0,01 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,02 ^A	0,03 ± 0,02 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C8:0	0,03 ± 0,03 ^B	0,09 ± 0,00 ^A	0,09 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C10:0	0,11 ± 0,11 ^{BC}	0,25 ± 0,00 ^{AB}	0,29 ± 0,01 ^A	0,01 ± 0,01 ^C	0,03 ± 0,01 ^C	0,03 ± 0,00 ^C	0,01 ^C	0,03 ^C	0,02 ^C
C11:0	nd.	0,01 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C12:0	0,11 ± 0,12 ^B	0,30 ± 0,01 ^A	0,36 ± 0,03 ^A	0,01 ± 0,01 ^B	0,05 ± 0,01 ^B	0,04 ± 0,01 ^B	0,01 ^B	0,03 ^B	0,01 ^B
C13:0	nd.	0,01 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C14:0	0,15 ± 0,16 ^B	0,53 ± 0,10 ^A	0,65 ± 0,02 ^A	0,02 ± 0,00 ^B	0,07 ± 0,04 ^B	0,06 ± 0,00 ^B	0,02 ^B	0,04 ^B	0,02 ^B
C14:1 n-9 cis	0,02 ± 0,02 ^{BC}	0,04 ± 0,00 ^{AB}	0,05 ± 0,0 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C15:0	0,01 ± 0,02 ^B	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	nd.	0,01 ± 0,00 ^B	nd.	nd.	nd.	nd.
C16:0	0,34 ± 0,38 ^B	1,61 ± 0,04 ^A	1,81 ± 0,00 ^A	0,13 ± 0,14 ^B	0,25 ± 0,15 ^B	0,20 ± 0,04 ^B	0,03 ^B	0,10 ^B	0,05 ^B
C16:1 n-9 cis	0,02 ± 0,03 ^B	0,07 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C17:0	nd.	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,01 ± 0,01 ^B	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C18:0	0,11 ± 0,12 ^A	0,52 ± 0,03 ^A	0,52 ± 0,01 ^A	0,27 ± 0,37 ^A	0,11 ± 0,08 ^A	0,70 ± 0,01 ^A	0,01 ^A	0,03 ^B	0,01 ^B
C18:1 n-9 trans	nd.	0,01 ± 0,00 ^A	0,01 ± 0,00 ^{AB}	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C18:1 n-9 cis	0,73 ± 0,81 ^{AB}	1,74 ± 0,32 ^A	1,83 ± 0,45 ^A	0,04 ± 0,01 ^B	0,18 ± 0,08 ^B	0,16 ± 0,03 ^B	0,04 ^B	0,11 ^B	0,06 ^B
C18:2 n-9,12 cis	0,02 ± 0,03 ^{AB}	0,06 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C20 cis	nd.	nd.	nd.	0,01 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C21:0	0,02 ± 0,03 ^{AB}	0,05 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.

nd.: ikke detektert («not detected»)

Toveis ANOVA (tabell I, vedlegg 9) for hver enkelt fettsyre viser at behandlingstemperatur har hatt størst signifikant ($p < 0.05$) effekt på konsentrasjon. For enkelte fettsyrer, C17:0, C16:0, C15:0, C14:0, C12:0, C10:0 og C8:0 viste toveis ANOVA at homogeniseringstrykk også har hatt en signifikant ($p < 0.05$) effekt, og at det har vært interaksjon mellom de to forsøksfaktorene. Det er en tydelig trend hvor konsentrasjonen av frie fettsyrer er størst i UP180 og UP280, og avtar med økt temperaturbehandling for alle fettsyrene. Tabellen viser også at det var signifikante forskjeller i konsentrasjonen av frie fettsyrer mellom de ulike melkeproduktene for alle fettsyrene, med unntak av C6:0, C11:0, C13:0, C18:0 og C20:0. Tabell også at fettsyrene som fantes i størst konsentrasjon som frie fettsyrer i ufordøyd melk var C16:0 og C18:1 n-9 cis, men det gjaldt kun UP180 og UP280. Det er en trend der høyere temperaturbehandling reduserte konsentrasjonen av frie fettsyrer.

4.3 Fordøyde prøver:

4.3.1.1 Konsentrasjon av individuelle fettsyrer i fri fettsyrefraksjon:

Fettsyrekonsentrasjon (mg/mL) for alle individuelle fettsyrer i fri fettsyrefraksjon fra melkeprodukter etter fordøyelse ble beregnet. De frie fettsyrene ble ekstrahert fra hver parallell (D120 1 og D120 2) av fordøyd melkeprodukt fra hvert gjentak av upasteurisert og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter, gjentak 1 og 2, og det ene gjentak som er av UHT-behandlede melkeprodukter. Resultatet er vist i tabell 11.

Tabell 11: Gjennomsnittlig mengde (mg/mL) individuelle fettsyrer i fri fettsyrefraksjon i upasteurisert, LTLT-pasteurisert, og UHT-behandlede melkeprodukter homogenisert ved 0, 180 eller 280 bar etter fordøyelse ± standardavvik (n=4). Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der ulike bokstaver er signifikant ulike ($p < 0,05$). (UP og LTLT var ulik melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert en gang. Fettsyrer med verdi < LOD og LOQ i alle melkeprodukter er ekskludert.

	Upasteurisert (mg/mL ± SD)			LTLT-pasteurisert (mg/mL ± SD)			UHT-behandlet (mg/mL ± SD)		
	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar	0 bar	180 bar	280 bar
<i>C6:0</i>	0,10 ± 0,02 ^A	0,09 ± 0,06 ^A	0,07 ± 0,05 ^A	0,09 ± 0,06 ^A	0,09 ± 0,02 ^A	0,06 ± 0,05 ^A	0,09 ± 0,03 ^A	0,05 ± 0,04 ^A	0,04 ± 0,03 ^A
<i>C8:0</i>	0,25 ± 0,03 ^{AB}	0,26 ± 0,03 ^A	0,22 ± 0,02 ^{AB}	0,24 ± 0,03 ^{AB}	0,24 ± 0,03 ^{AB}	0,25 ± 0,01 ^{AB}	0,19 ± 0,07 ^{AB}	0,13 ± 0,02 ^C	0,13 ± 0,02 ^C
<i>C10:0</i>	1,10 ± 0,08 ^{AB}	1,15 ± 0,06 ^A	1,11 ± 0,09 ^{AB}	1,10 ± 0,08 ^{AB}	1,09 ± 0,05 ^{AB}	1,11 ± 0,09 ^{AB}	0,80 ± 0,37 ^{AB}	0,50 ± 0,03 ^C	0,50 ± 0,04 ^C
<i>C12:0</i>	1,60 ± 0,16 ^{AB}	1,69 ± 0,18 ^{AB}	1,68 ± 0,20 ^A	1,58 ± 0,18 ^{AB}	1,61 ± 0,10 ^{AB}	1,59 ± 0,15 ^{AB}	1,14 ± 0,52 ^{AB}	0,71 ± 0,06 ^C	0,71 ± 0,07 ^C
<i>C14:0</i>	3,04 ± 0,22 ^B	2,78 ± 0,25 ^B	2,99 ± 0,10 ^B	2,86 ± 0,21 ^B	3,11 ± 0,14 ^{AB}	2,97 ± 0,22 ^B	3,39 ± 0,30 ^{AB}	3,52 ± 0,37 ^{AB}	3,56 ± 0,27 ^A
<i>C14:1 n-9 cis</i>	0,28 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,02 ^A	0,10 ± 0,01 ^A	0,10 ± 0,01 ^A	0,11 ± 0,02 ^A	0,11 ± 0,08 ^A	0,13 ± 0,02 ^A	0,16 ± 0,02 ^A	0,14 ± 0,03 ^A
<i>C15:0</i>	0,12 ± 0,02 ^B	0,26 ± 0,01 ^B	0,26 ± 0,02 ^B	0,27 ± 0,02 ^B	0,29 ± 0,02 ^{AB}	0,27 ± 0,04 ^B	0,31 ± 0,03 ^{AB}	0,33 ± 0,04 ^{AB}	0,34 ± 0,01 ^A
<i>C16:0</i>	8,81 ± 0,65 ^B	8,34 ± 0,44 ^{AB}	8,96 ± 0,48 ^{AB}	8,48 ± 0,43 ^B	9,13 ± 0,65 ^{AB}	8,86 ± 0,66 ^{AB}	9,54 ± 0,95 ^{AB}	10,01 ± 0,76 ^{AB}	10,05 ± 0,76 ^A
<i>C17:0</i>	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,13 ± 0,00 ^B	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,14 ± 0,01 ^{AB}	0,14 ± 0,02 ^{AB}	0,15 ± 0,01 ^A
<i>C18:0</i>	3,37 ± 0,18 ^A	3,48 ± 0,15 ^A	3,57 ± 0,07 ^A	3,43 ± 0,27 ^A	3,50 ± 0,20 ^A	3,55 ± 0,15 ^A	3,30 ± 0,33 ^A	3,51 ± 0,11 ^A	3,57 ± 0,32 ^A
<i>C18:1 n-9 trans</i>	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,01 ^A	0,02 ± 0,01 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,00 ^A
<i>C18:1 n-9 cis</i>	5,23 ± 0,38 ^{AB}	6,20 ± 1,07 ^A	3,34 ± 1,57 ^B	4,23 ± 0,52 ^{AB}	4,66 ± 0,96 ^{AB}	5,33 ± 2,60 ^{AB}	5,24 ± 1,00 ^{AB}	6,40 ± 0,59 ^{AB}	5,55 ± 1,00 ^{AB}
<i>C18:2 n-9,12 cis</i>	0,26 ± 0,02 ^A	0,31 ± 0,05 ^A	0,14 ± 0,10 ^A	0,21 ± 0,03 ^A	0,22 ± 0,07 ^A	0,25 ± 0,16 ^A	0,29 ± 0,06 ^A	0,27 ± 0,18 ^A	0,30 ± 0,08 ^A
<i>C20:0</i>	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,05 ± 0,03 ^A	0,05 ± 0,03 ^A	0,06 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,00 ^A
<i>C21:0</i>	0,12 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,04 ^A	0,05 ± 0,06 ^A	0,09 ± 0,01 ^A	0,08 ± 0,06 ^A	0,11 ± 0,10 ^A	0,09 ± 0,06 ^A	0,15 ± 0,02 ^A	0,12 ± 0,05 ^A
<i>C20:2 n-11,14 cis</i>	0,04 ± 0,00 ^A	0,02 ± 0,02 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	0,04 ± 0,01 ^A	0,03 ± 0,02 ^A	0,03 ± 0,02 ^A	0,04 ± 0,00 ^A

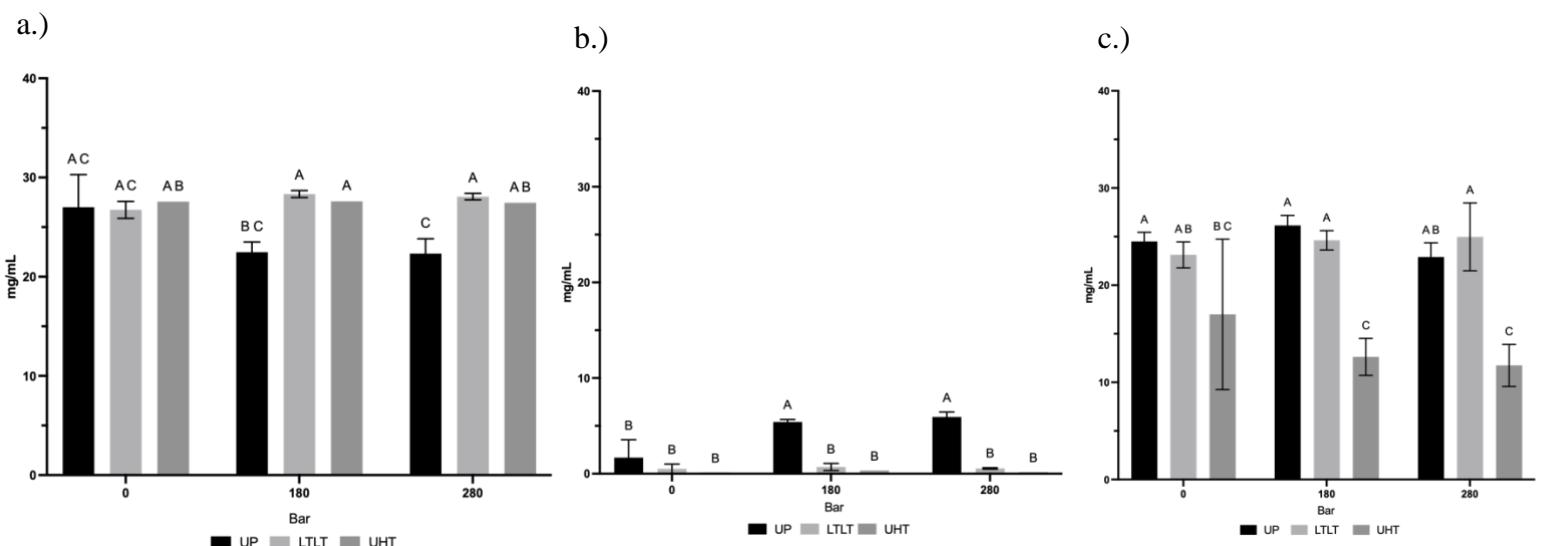
Toveis ANOVA (tabell J, vedlegg 10) viser at homogeniseringstrykk ikke hadde signifikant ($p > 0.05$) effekt på konsentrasjon av frie fettsyrer, men at det likevel for enkelte fettsyrer var signifikant interaksjonseffekt mellom de to forsøksfaktorene. Tabellen viser at det var signifikante forskjeller i konsentrasjon av frie fettsyrer mellom de ulike melkeproduktene for halvparten av fettsyrene.

For fettsyrene C13:0 og C18:1 n-9 cis viste toveis ANOVA at selv om det har vært signifikante ($p < 0.05$) forskjeller i konsentrasjon av de frie fettsyrene mellom de ulike produktene, har ingen av forsøksfaktorene hatt signifikant effekt, men det har vært signifikant samspill mellom faktorene. Videre viser tabell 11 at fettsyrene i størst konsentrasjon i fraksjonen av frie fettsyrer etter fordøyelse var C16:0, C18:1 n-9 cis, og C18:0.

4.4 Fordøyde og ufordøyde prøver:

4.4.1 Totale mengder fettsyrer i nøytrale lipider og frie fettsyrer:

Summen av alle fettsyrene i hvert melkeprodukt representerer total mengde (mg/mL) fettsyrer i de ulike fraksjonene, som var nøytrale lipider og frie fettsyrer for melkeprodukter før fordøyelse, og frie fettsyrer for fordøyde melkeprodukter. Resultatet av de totale mengdene er vist i figur 29.

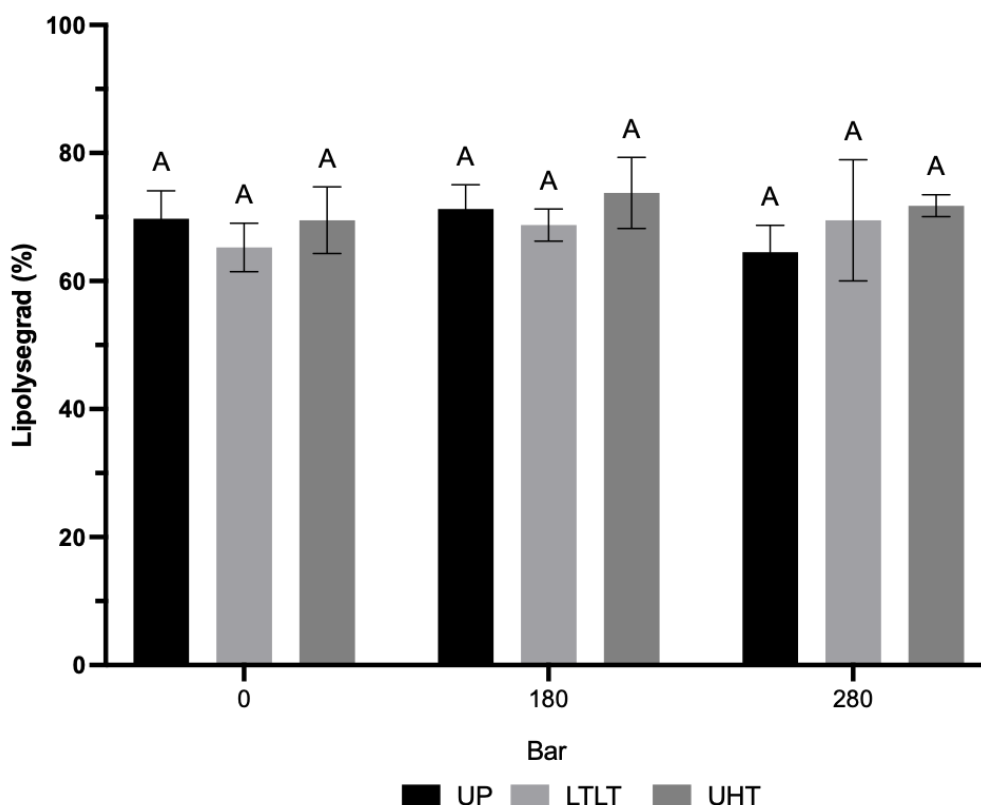


Figur 29: Summert mengde (mg/mL) fettsyre i fraksjoner av a) nøytrale lipider og b) frie fettsyrer fra upasteuriserte ($n=2$) og LTLT-pasteuriserte ($n=2$) og UHT-behandlede ($n=1$) melkeprodukter homogenisert ved 0, 180 eller 280 bar før fordøyelse, og c) frie fettsyrer i fordøyd materiale ($n=4$). Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p < 0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur. (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang.)

Toveis ANOVA (tabell K, vedlegg 11) mellom fettsyrekonsentrasjon i nøytrale lipider før fordøyelse viser at det kun var signifikant ($p < 0.05$) effekt av behandlingstemperatur av forsøksfaktorene, men at det har vært samspill. Figur 29a viser at mellom melkeprodukter homogenisert med samme trykk var det kun to signifikante forskjeller i total fettsyrekonsentrasjon. UP180 hadde signifikant lavere total fettsyrekonsentrasjon enn LTLT180 og UHT180, og UP280 hadde signifikant lavere konsentrasjon enn LTLT280 og UHT280. Mellom prøver behandlet med samme behandlingstemperatur var det ingen signifikante forskjeller. Toveis ANOVA mellom frie fettsyrer i ufordøyd melk viser signifikant ($p < 0.05$) effekt av både behandlingstemperatur og homogeniseringstrykk, samt interaksjonseffekt mellom de to faktorene. Figur 29b viser at de samme prøvene hadde signifikante forskjeller som i figur 29a, men UP180 og UP280 hadde her signifikant høyere konsentrasjon av frie fettsyrer enn resten av prøvene. Videre viser toveis ANOVA mellom frie fettsyrer etter fordøyelse at det har vært en signifikant ($p < 0.05$) effekt av behandlingstemperatur. Figur 29a og 29b viser at sum av fettsyrer i nøytrale lipider ble redusert parallelt med stigende mengde frie fettsyrer for upasteuriserte prøver i ufordøyd melk. Figur 29c viser at det ikke var signifikante forskjeller i konsentrasjon av frie fettsyrer i de ulike fordøyde melkeprøvene.

4.5.2 Grad av lipolyse under fordøyelse:

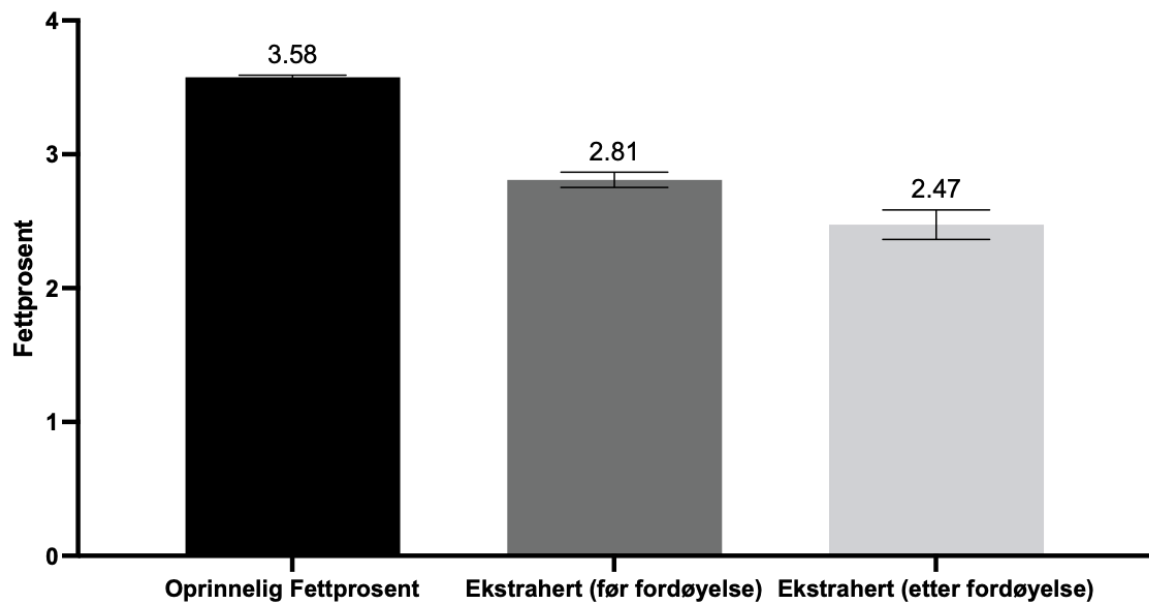
Lipolyse er omdannelsen av esterifiserte fettsyrer (nøytrale lipider, fosfolipider og polare lipider) til frie fettsyrer. En fullstendig lipolyse (100%) av alt fett tilsvarer at mengden esterifiserte fettsyrer før fordøyelse er lik mengden frie fettsyrer etter fordøyelse. Basert på opprinnelig fettprosent i melkeproduktene før fordøyelse (tabell B, vedlegg 2) ble grad (%) av lipolyse beregnet. Det antas at 1 mL melk veier 1 g, og resultatet er vist i figur 30.



Figur 30: Grad av lipolyse (%) basert på mengden (mg/mL) fettsyrer i fri fettsyrefraksjoner i materialet etter fordøyelse sammenlignet med mengden fettsyrer i fri fettsyrefraksjon og nøytral lipidfraksjon før fordøyelse. Bokstav representerer signifikante forskjeller mellom ulike prøver, der søyler med ulik bokstav er signifikant ulike ($p < 0.05$). UP = upasteurisert, LTLT = lav temperatur-lang tid, UHT = ultrahøytemperatur, 0 = 0 bar 180 = 180 bar, 280 = 280 bar (UP og LTLT var ulike melk fra UHT. UP og LTLT produkter ble produsert to ganger, UHT produkter ble produsert én gang.)

Toveis ANOVA (tabell L, vedlegg 12) viser at det hverken var signifikant ($p > 0.05$) effekt av behandlingstemperatur eller homogeniseringstrykk, eller samspill mellom faktorene. Figur 30 viser at det ikke var noen signifikante forskjeller i grad av lipolyse mellom de ulike melkebehandlingene, som tyder på at hverken behandlingstemperatur eller homogeniseringstrykk har hatt signifikant effekt på grad av lipolyse.

For å beregne grad av ekstraksjon ble gjennomsnittlig fettkonsentrasjon av alle melkeproduktene før fordøyelse beregnet. Ved å ta utgangspunkt i denne verdien og sammenligne med gjennomsnittlig fettsyrekonsentrasjon i fraksjoner av nøytrale lipider og frie fettsyrer før fordøyelse, samt konsentrasjon i fri fettsyrefraksjon etter fordøyelse kan ekstraksjonsutbytte visualiseres. Resultatet er vist i figur 31.



Figur 31: Gjennomsnittlig fettinnhold i melkeprodukter før fordøyelse, gjennomsnittlig summert fettsyrekonsentrasjon i nøytrale lipider og frie fettsyrer i melkeprøver før fordøyelse og gjennomsnittlig fettsyrekonsentrasjon i frie fettsyrer etter fordøyelse.

Figur 31 viser at mengden fettsyrer i materiale har redusert med ekstraksjon. Gjennomsnittlig total fettsyrekonsentrasjon var ble redusert med ekstraksjon.

4.5 Sensorisk analyse:

Det ble gjennomført en sensorisk analyse for å kartlegge forbrukeres evne til å avdekke forskjeller mellom homogenisert og uhomogenisert melk, samt LTLT og UHT pasteurisert melk. Resultatet fra den sensoriske undersøkelsen er vist i tabell 12.

Tabell 12: Antall av deltakerne som diskriminerte riktig melk under prøvesett 1 = homogenisert Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmelk sammenlignet med uhomogenisert Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmelk og prøvesett 2 = Tine lettmelk sammenlignet med Tine langtidsholdbar lettmelk. Bokstav representerer signifikans mellom ulike prøver, der ulik bokstav er signifikant ulike ($p < 0.05$).

<i>Prøvesett</i>	<i>Melketype</i>	<i>Feil svar</i>	<i>Riktig svar</i>	<i>p-verdi < 0.05</i>
1	<i>Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmelk</i>	9	14	A
	<i>Økologisk Gardsmjølk fra Røros Lettmelk, homogenisert</i>			B
2	<i>Tine Lettmelk 1% fett</i>	14	9	A
	<i>Tine Langtidsholdbar Lettmelk 1,2% fett</i>			A

Tabell 12 viser at deltakere klarte å avdekke forskjellen mellom homogenisert og uhomogenisert melk, men ikke LTLT-pasteurisert og UHT-behandlet melk.

5 Diskusjon:

I denne masteroppgaven ble effekten av varmebehandling og homogenisering av melk på fordøyelsen av melkefett undersøkt. Studien brukte statisk *in vitro* fordøyelsesmodell, med 2 minutter oral fase, 120 minutter mage fase og 120 minutter duodenal fase, til å kunstig fordøye melkeprodukter behandlet med 3 ulike behandlingstemperaturer; upasteurisert, LTLT-pasteurisert og UHT-behandlet, og 3 ulike homogeniseringstrykk; 0, 180 og 280 bar. Partikkelstørrelse og fettisyreprofiler i prøver av fordøyd materiale etter duodenal fase, og melkeprodukter før fordøyelse ble analysert. En kortfattet sensorisk analyse ble også gjennomført for å kartlegge om homogenisering og varmebehandling av melk fører til signifikante forskjeller i smak.

Av praktiske årsaker ble enkelte av melkeproduktene som var undersøkt i denne studien produsert av forskjellig rå melk. Det ble produsert to ulike batcher melk (gjentak 1 og 2), og i hvert gjentak ble det produsert både upasteuriserte og LTLT pasteuriserte melkeprodukter. UHT-behandlet melk ble kun produsert én gang, og stammet fra en helt annet rå melk enn upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter i gjentak 1 og gjentak 2. Variasjoner i fettkulestørrelser på grunn av naturlige faktorer hos kuene (slik som laktasjonsstadiet og fôr), kan derfor ha påvirket resultatet.

5.1 Partikkelstørrelse:

Den gjennomsnittlige størrelsen i ubehandlede melkeprøver lå på mellom 3.74 – 5.09 μm , og for homogeniserte melkeprøver lå størrelsen mellom 0.44 – 0.72 μm . Innad i melkeprøver behandlet med samme behandlingstemperatur, ble partikkelstørrelsen redusert med økt homogeniseringstrykk. I tillegg til mindre partikler, viste grafisk framstilling av partikkelstørrelsefordeling til upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter at homogenisering av rå melk ved 180 bar førte til én størrelsesklasse blant partiklene. Dette stemmer overens med teorien om at gjennomsnittlig fettkulestørrelse for rå melk ligger på mellom 3-5 μm , og at homogenisering reduserer denne størrelsen til 0.3 – 0.8 μm (Fox et al., 2015.b; Thiebaud et al., 2003).

UHT-behandlede prøver hadde alltid større gjennomsnittlig partikkelstørrelse enn upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte prøver. Denne observasjonen er også funnet en studie gjort av Zhao et al. (2019), og årsaken er trolig rekkefølgen på varmebehandlingen. Homogenisering alene fører til at kaseinmiceller absorberes på den nye MFGM, mens varmebehandling alene fører til at denaturert myseprotein bindes til membranen. Påvirkningen av en kombinasjon av disse to avhenger av rekkefølge. I tilfeller der homogenisering foregår i forkant av varmebehandling dannes det en ny membran av kaseinmiceller og kaseinfragmenter. Under påfølgende varmebehandling binder denaturerte myseproteiner seg til kaseinmicellene som har dannet en ny membran. I tilfeller der homogenisering skjer etter varmebehandlingen, og der varmebehandlingen er mye kraftigere, vil kaseinmicellene være større fordi det allerede vil være festet myseprotein på overflaten til kaseinmicellene (kilde). I tillegg fant en tidligere studie gjort av Rynne et al. (2004) at omtrent 2.8% av myseproteiner denatureres ved HTST-pasteurisering, mens 70% denaturerer under indirekte UHT-behandling (Labrapoulus et al., 1981). Dette fører til at mer denaturert myseprotein kan binde seg til den nye fettkulemembranen. I motsetning til LTLT-pasteuriserte melkeprodukter, ble UHT-produkter homogenisert etter pasteurisering. Dette vil føre til at det dannes større komplekser av kaseiner med denaturert myseprotein som binder seg til kaseinmicellene, og som så absorberes på den nye fettkuleoverflaten, som igjen resulterer i større partikkelstørrelse (Michalski & Januel, 2006).

Ransmark et al. (2019) undersøkte Malvern Mastersizer 3000 sin evne til å måle kun fettkulestørrelser i direkte UHT-behandlet melk, ved bruk av ulike materialpreparasjoner og metoder, slik som for eksempel oppvarming av materialet før analysering. Ransmark et al. (2019) fant at instrumentet kunne registrere de store kaseinaggregatene, som vil være til stede i UHT-behandlet melk. Denne studien viste også at melk med ulikt fettinnhold (1.5 og 3%) fikk ulik partikkelfordeling grunnet ulikt protein:fett forhold. Dette ansees ikke som en aktuell problemstilling i vår studie, da fettinnholdet i alle melkeproduktene ble standardisert til 3.5%, og differensen mellom produktene med høyest og lavest fettinnhold kun var 0.36 % (se tabell B, vedlegg 2). For å unngå forstyrrelser fra proteiner på målingene kunne det blitt tilsatt solA (Soluble Aggregate Remover). I tillegg til forskjeller i rekkefølge på homogenisering og pasteurisering og måleusikkerhet i instrumentet, kom den UHT-behandlede melken fra en annen melkeleveranse enn upasteurisert og LTLT-pasteurisert melk, og ulik partikkelstørrelse mellom uhomogeniserte prøver av forskjellig melk var derfor som forventet.

For upasteurisert og LTLT-pasteurisert melk var det ingen signifikant effekt av homogenisering på gjennomsnittlig partikkelstørrelse mellom de ulike homogeniseringstrykkene. Dette kan skyldes at homogenisatoren som ble brukt til produksjonen av melkeproduktene var noe ustabil ved 180 og 280 bar. Under produksjon ble det observert at trykket økte og sank med ± 30 bar, som kan ha redusert trykkdifferansen med 60 bar. Dette er i samsvar med en observasjon gjort av Islam et al. (2017), hvor det ble funnet at en forskjell i trykk på 50 bar ikke er tilstrekkelig til å gi effektiv reduksjon i fettkulestørrelse.

At fettkulestørrelse minsker med homogenisering var en tydelig trend både før og etter fordøyelse og som forventet, men fettkulestørrelsen økte under fordøyelse, spesielt i upasteuriserte melkeprøver. Dannelsen av flere topper i den grafiske fremstillingen av partikkelstørrelsefordeling til melkeprodukter før og etter fordøyelse tyder på at fordøyelse har ført til dannelse av flere ulike størrelsesklasser. Det fordøyde materialet var ikke lenger ensartet og homogent slik som før fordøyelse. I tillegg tyder resultatene på at økt homogeniseringstrykk har gitt økt reduksjon av de største partiklene under fordøyelse. Observasjonene fra studien tydet også på at fordøyelse dannet noen få, men veldig store aggregater. Det er dog vanskelig å bruke partikkelstørrelsefordeling til å konkludere med hva som har hendt med partiklene under homogenisering, pasteurisering og fordøyelse, da fordelingen ikke viser hva de ulike partiklene består av. Det kan av den grunn ikke med sikkerhet bekreftes at det er fettkuler som har blitt mindre etter homogenisering, men antakeligvis, basert på resultatene til gjennomsnittlig partikkelstørrelser målt i denne studien, har homogenisering ført til mindre fettkuler.

En tidligere studie (Gallier et al., 2012) som undersøkte fordøyelsen av fettkuler i melk fra rå, pasteurisert, eller pasteurisert og homogenisert melk hos rotter, fant at fettkuler ble destabilisert underveis i fordøyelsen. Dette førte til koalesens og økt partikkelstørrelse. Denne observasjonen gjaldt ikke fettfri skummet-melk, som er en sterk indikasjon på at fenomenet skyldes aggregering eller koalesens av fettkuler. At UP0 hadde større øking i fettkulestørrelse under fordøyelse kan forklares med at dette melkeproduktet hadde størst fettkuler før fordøyelse, og dermed større partikler som fusjonerte seg sammen, og resulterte i de største aggregatene. Koalesens av fettkuler vil også resultere i en bredere partikkelstørrelsefordeling, og dermed en større span-verdi, som forklarer hvorfor de fordøyde prøvene hadde bredest partikkelstørrelsefordeling (Walstra et al., 2006.f).

Det var ingen signifikante forskjeller i gjennomsnittlig partikkelstørrelse blant fordøyde melkeprøver som ble plassert i fryser, hvor partikkelstørrelse ble målt på tint materiale. Dette kan skyldes at det dannes aggregater mellom komponenter i det fordøyde materialet under frysing som ikke brytes opp. Det ble undersøkt om hastigheten (3000 rpm) til propellen i tanken til Mastersizeren var i stand til å bryte opp aggregatene, men observasjonene knyttet til disse målingene gir tegn på at det ikke var mulig. Det kan derfor antas at måling av partikkelstørrelse i fordøyd materiale ikke bør foregå på fryst materiale, da resultatene var svært ulike fra fersk fordøyd materiale.

5.2 Lipidanalyse:

Fettsyresammensetningen i triglyserider i melk varierer som nevnt tidligere på grunn av flere faktorer, og det er som forventet at fettsyrene det var mest av i de nøytrale lipidene var C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1 n-9 cis. I vår studie besto 83.95% av de nøytrale lipidene av disse fettsyrene i ubehandlet rå melk. Tunick et al. (2016) fant at 75% av fettsyrene i melk besto av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1. Dette samsvarer med andel av individuelle fettsyrer (wt%) i triglyserider som er presentert tidligere, med unntak av mengden C4:0 og C6:0 som var forventet å finne i nærmere 3%, og 1.5%. Som Islam et al. (2017) beskrev, kan det være vanskelig å oppnå riktige målinger av disse korte fettsyrene. Sannsynligvis har de i vår studie forsvunnet under bearbeiding av prøvene, trolig under ekstraksjon. Det er mulig denne type ekstraksjon ikke er best egnet for de korteste, mest vannløselige fettsyrene, da resultatet viste troverdige verdier av lengre fettsyrer, slik som C16:0 og C18:1 n-9 cis. Dette tyder på at ekstraksjonen av fettsyrene i de nøytrale lipidene har foregått riktig for de lengre fettsyrene, men ikke de korte. Siden resultatet av mengden C4:0 og C6:0 ikke gjenspeiler realistiske verdier vil ikke mengden av disse fettsyrene diskuteres ytterligere.

For de upasteuriserte prøvene var det forventet å se en signifikant reduksjon i fettsyrekonsentrasjon i de nøytrale lipidene, med parallell øking av frie fettsyrer i korresponderende melkeprodukt før fordøyelse. I upasteurisert melk finnes det naturlig forekommende lipaser, som ved homogenisering av melken vil få lettere tilgang på fettkulene som følge av redusert størrelse og økt overflateareal (Zhao et al., 2019). I vår studie ble det ikke observert noen signifikante forskjeller i fettsyrekonsentrasjonen til nøytrale lipider mellom upasteurisert melk homogenisert ved 0, 180 og 280 bar.

Det ble likevel observert en signifikant forskjell i mengden frie fettsyrer i samme melk, mellom 0 bar og 180/280 bar. Dette stemmer overens med teorien om at homogenisering øker effektiviteten til lipase. Konsentrasjonen av frie fettsyrer i varmebehandlede melkeprodukter var signifikant større enn i upasteuriserte produkter ved samme homogeniseringstrykk (med unntak av 0 bar). Dette kan forklares med at varmebehandling inaktiverer lipaser.

Økt effekt av nedbrytning av esterifiserte fettsyrer til frie fettsyrer gjelder også for lipaser i fordøyelsessystemet. En rekke studier gjort av blant annet Islam et al. (2017), Tunick et al. (2016) og Zhao et al. (2019) fant at prosessering (homogenisering og pasteurisering) økte graden av frie fettsyrer under fordøyelse, i tillegg til at det endret profilen til fettsyrene som ble frigitt. Tunick et al. (2016) fant også at UHT-behandling økte frigjøringen av frie fettsyrer under fordøyelse, som følge av at behandlingen fører til skade på fettkulen, som igjen gjør fettkulen mer tilgjengelig for lipaser. Dette er grunnlaget for teorien om at homogenisering forbedrer fordøyeligheten til lipidene i melk, spesielt hos individer med tarm-relatert problematikk (Michalski, 2007). Basert på denne teorien var det uforventet å observere at det ikke var noen signifikante forskjeller konsentrasjonen av frie fettsyrer i fordøyde melkeprøver. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom grad av lipolyse mellom de ulike melkeproduktene.

Det var forskjell i prosenten av de nøytrale lipidene og frie fettsyrene som ble ekstrahert sammenlignet med den opprinnelige fettprosenten i melken for melkeproduktene. En andel av forskjellen kan forklares ved at polare lipider (fosfolipider, glykolipider og kolesterol) ikke ble fraksjonert og analysert. Slike lipider utgjør dog kun en liten andel (~2%) av totalt fettinnhold i melk, så resten av forskjellen skyldes trolige tap av lipider under analyse. Det var også forskjeller i mengde ekstraherte lipider mellom fordøyde og ufordøyde prøver, som kan forklares med at de frie glyserolmolekylene som er til stede i fordøyd materiale ikke ekstraheres med de frie fettsyrene etter fordøyelsen. Total sett var det størst tap av lipider fra ubehandlet melk, til frie fettsyrer i fordøyd materiale. En tidligere studie undersøkte om ekstraksjonsmetode påvirket hvor stor andel av lipider i melke som ble ekstrahert, og fant at Folch metode hadde signifikant ($p < 0.05$) lavere utbytte (Castro-Gómez et al., 2014). Dette er sannsynlig at dette har påvirket resultatet i studien, og skyldes antakeligvis tap av lipider under lipidanalysen, og at frie fettsyrer er vanskeligere å ekstrahere enn nøytrale lipider.

I de fordøyde prøvene var det størst konsentrasjon av fettsyrene C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1 n-9 cis. Dette var de samme fettsyrene som fantes i størst konsentrasjon i de nøytrale lipidene i melkeprøver før fordøyelse. Oppbyggingen av triglyserider er ikke tilfeldig, og baserer seg på ulike fettsyrs preferanse for de ulike posisjonene i glyserol molekyler i triglyseridene. Preferansen avhenger av fettsyrens kjedelengde, og vanligvis finnes fettsyrene C4:0 til C10:0 i *sn*-3 posisjon i glyserolmolekylet, mens lengre fettsyrer mellom C12:0 til C16:0 finnes bundet til *sn*-2 posisjon. Lengre fettsyrer finnes som oftest i *sn*-1 posisjon. (Fox et al., 2015b; Walstra et al., 2006c). Gastrisk og pankreatisk lipase i human fordøyelse, samt de fleste andre lipolytiske enzymene bryter *sn*-1 og *sn*-3 posisjon, som resulterer i to frie fettsyrer, og et glyserid med fettsyrer bundet til *sn*-2 posisjon. Andre tidligere studier (henviser) som har undersøkt lipider i *in vitro* modell fant mest korkjedede fettsyrer etter fordøyelse. I vår studie var mengden kortkjedete fettsyrer mye mindre enn forventet, og årsaken til at dette er som nevnt trolig ekstraksjonsmetoden. Dette gjør det vanskelig å avgjøre hvilke posisjoner i glyserolmolekylet RGL har brutt i vår studie. Likevel viste studien (kilde) at RGL frigir medium kjedete fettsyrer, som samsvarer med observasjonene i vår studie.

Gjennomsnittlige fettsyrekonsentrasjoner enkelte fettsyrer i vår studie hadde store standardavvik. Ved bruk av GC-FID vil konsentrasjoner av fettsyrer under LOD og LOQ ikke bli detektert, og ved utregninger av konsentrasjon av fettsyrer i denne studien ble slike lave konsentrasjoner erstattet med 0. På denne måten kan ett og samme melkeprodukt få konsentrasjoner av samme fettsyrer tilsvarende 0, eller over. En mulig forklaring på hvorfor deler av resultatet avviker fra tidligere studier og teorier kan være at statistisk *in vitro* fordøyelsesmodell var et for dårlig alternativ til å simulere human fordøyelse. Som beskrevet tidligere vil fordøyelsesstudier gjennomført i dyr (*in vivo*) gi de mest presise og troverdige resultatene.

5.3 Sensorisk analyse:

Homogenisering og pasteurisering kan være faktorer som påvirker sensorisk profil hos melk. Svært høye temperaturer, slik som UHT-varmebehandling, fører til nedbrytning av eksponerte thiolgrupper på myseproteinene, som danner H₂S, en svovelkomponent som forårsaker «kokt» smak i UHT-behandlet melk (Fox et al., 2015e). Trekant-diskrimineringstesten i denne studien viste at deltagerne i den sensoriske testen ikke fant signifikant forskjell mellom smaken til UHT-behandlet og HTST-pasteurisert melk.

Dette skyldes sannsynligvis at svovelkomponentene, som er grunnen til denne smaken er ustabil, og forsvinner lett under lagring (Fox et al., 2015e). I tillegg er dagens moderne UHT-anlegg utviklet for å føre til minst mulig endringer i melken. I motsetning til UHT-behandlet melk, var det var mulig for deltagerne i den sensoriske testen å oppdage forskjellen mellom homogenisert og uhomogenisert melk. En mulig årsak til at flere av deltakerne diskriminerte riktig prøve kan ha vært visuelle forskjeller mellom prøvene i prøvesett 1, hvor homogenisert Gardsmjølk endret farge over tid, og skilte seg derfor lettere ut. Det er likevel usikkert hvor tydelig fargeendringen har vært for deltakerne, som gjennomførte den sensoriske undersøkelsen i et dommerom uten tilgang på naturlig lys. Barrett (2014f) beskriver at mange av smak-og aromakomponenter i mat er flyktige hydrofobiske komponenter, som betyr at lipider er viktige bidragsyttere i smaksprofiler. At deltakerne kunne oppdage signifikante forskjeller i smak mellom homogenisert og uhomogenisert melk kan også forklares ved at fett og fettkulenes struktur har størst signifikant effekt på astringens.

5.4 Studiens funn i lys av dagens debatt om melkeprosessering:

Hvordan homogenisering og pasteurisering påvirker melkekjemi og mikrobiologi er godt studert og dokumentert. Allerede eksisterende kunnskap legges til grunn for teorier angående prosessert melk i fordøyelsessystemet. Disse teoriene dukker ofte opp i artikler og studier, gjort av spesialister, som fører til at effekten av homogenisering og pasteurisering er et aktuelt tema, ikke bare blant fagfolk, men også blant den generelle befolkningen og medieorganisasjoner.

Pasteurisering er en lovpålagt prosess for all konsummelk i Norge, med unntak av tilfeldig salg fra gård eller seter direkte til forbrukere. Dette gjelder dog kun tilfeldig og sporadisk handel, og det er ikke lov for melkegårder å ha regelmessig salg av rå melk til de samme kundene over lenger tid. Slikt regelverk er med på å beskytte norske forbrukere mot mulig helseskadelig melk. Pasteurisering, som har vært lovpålagt i Norge siden 1951, beskrives av Mattilsynet som «et av de viktige historiske tiltakene for å forbedre folkehelse og unngå smitte av zoonotiske sykdommer». Sett i lys av dagens debatt om prosessering og ultraprosesering er det fler og fler som ønsker uproseserte matvarer, men til hvilken pris?

For 100 år siden herjet den livsfarlige sykdommen tuberkulose i landet. *Mycobacterium tuberculosis* (som forårsaker sykdommen hos mennesker) danner sammen med flere arter, slik som *Mycobacterium bovi* (som forårsaker storfetuberkulose) et *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (Veterinærinstituttet, n.d). *M. tuberculosis* er den bakterien som har tatt flest menneskeliv gjennom tidene, og som fortsatt den dag i dag tar livet av mange millioner mennesker verden over (WHO, 2023). Bakterien er multiresistent, som betyr at den ikke responderer på minst to av de sterkeste antibiotikaene (WHO, 2018). Før innføringen av lovpålagt pasteurisering av melk i Norge var melk en vanlig smittekilde for tuberkulose fra dyr til mennesker, men på grunn av tiltak slik som pasteurisering og smittesporing er storfetuberkulose i dag utryddet i Norge (Veterinærinstituttet, n.d).

I tillegg kan rå melk og upasteuriserte meieriprodukter være mulige bærere av *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter ssp* og *Escherichia coli* (Mattilsynet, 2023b). Nofima hevder at *Listeria monocytogenes* er en av bakteriene som byr på størst utfordringer, både innen norsk og internasjonal matproduksjon, og kan ha drastiske konsekvenser for folkehelse og bedriftsøkonomi. De antar at blant smittede individer dør 15-20%, og ekstra utsatt er barn, gravide, og personer med svekket immunforsvar (Nofima, 2024). Flere offentlige etater slik som Mattilsynet og Folkehelseinstituttet understreker på sine nettsider viktigheten med å være varsom med inntak av rå melk, og anbefaler varmebehandling før konsum (Folkehelseinstituttet, 2019; Mattilsynet, 2023c) Når det kommer til matvaretrygghet og pasteurisering av melk, er det ikke nødvendigvis effekten av prosesseringen som bør være i fokus, men viktigheten av å konsumere trygge matvarer som ikke fører til alvorlige helseskader. Det faktum at rå melk ikke er «så rå lenger» etter pasteurisering er en stor fordel sett i lys av de fatale konsekvensene som kan følge med å drikke uprosessert melk.

Angående homogenisering oppsto det i 1973 en teori, utviklet av Kurt A. Oster, knyttet til reduksjon av fettkulestørrelse slik at han mente de kunne passere tarmepitelet og fører til arteriosklerose (Oster, 1973). Arteriosklerose er en tilstand der kolesterolrikt plakk bygges opp på innsiden av veggene i blodkarene og delvis eller helt tetter disse (Michalski, 2007). En overdreven postprandial lipemisk respons (mengde fett i blodet etter et måltid) er naturligvis en påvirkende faktor i å utvikle arteriosklerose.

En artikkel skrevet av Michalski (2007) ser blant annet på effekten av homogenisering på arteriosklerose, ved å ta for seg flere artikler som har sett på postprandial lipemisk respons, og aspekter ved dette, i tillegg til å presentere Oster's hypotese. Ingen av studiene er spesielt aktuelle i undersøkelsen av hvorvidt homogenisering fører til arteriosklerose, med unntak av Oster's hypotese (Oster, 1973).

I et lite utvalg av studiene Michalski (2007) refererte til i sin artikkel nevntes det at Clemente et al. (2003) fant at ulike meieriprodukter med ulike strukturer gav ulike lipidnivåer i blodet. Produktene som ble undersøkt var melk, Mozzarella og smør, med andre ord et lite representativt utvalg for undersøkelse av spesifikt homogenisert og uhomogenisert melk (Clemente et al., 2003). Videre fant Tholstrup (2006) at hverken homogeniserte eller uhomogeniserte melkeprodukter gir hjerte-og karsykdommer hos friske menn av alle aldre, eller yngre og middel-aldrede kvinner (Tholstrup, 2006). Barba et al. (2006) fant signifikant omvendt sammenheng mellom inntak av helmelk og økt BMI hos barn, men assosiasjonen fantes ikke lenger når barn som konsumerte skummetmelk ble inkludert i analysen (Barba et al., 2005). De vurderte om bioaktive peptider eller kalsium kan ha forårsaket denne positive effekten, men Michalski (2007) undret på om det skyltes homogenisering. Her varierte melkens fettinnhold, som igjen gjorde det vanskelig å undersøke effekt av kun homogenisering.

Hypotesen dannet av Oster var riktignok en av studiene i Michalski sin artikkel (2007) som faktisk undersøkte sammenhengen av homogenisering og arteriosklerose (Oster, 1973). Oster studerte plasmalogen, en viktig fettforbindelse som bygger opp store deler av membraner i celler hjertemusklatur og veggene i arteriene, og fant at cellemembraner i vev rundt hjertet og i blodårene som normalt sett burde inneholdt plasmalogen ikke gjorde det (Linder et al., 1999; Oster, 1971). Tilstanden arteriosklerose skyldes en skade eller unormale lesjoner i veggene i blodårene. Oster mente at denne skaden skyltes tap av plasmalogen i cellene som befant seg i blodårene, som igjen førte til dannelsen av plakk (Oster, 1971). Oster konkluderte med at tilstedeværelse av XO i lever og slimvevet i tynntarmen var knyttet til fravær av plasmalogen i disse stedene, som skulle forklare hvorfor plasmalogen ikke fantes i hjerter til syke pasienter, for hos disse pasientene hadde XO kommet seg til hjertet (Ross et al., 1973).

Plasmalogen og XO befinner seg normalt sett ikke i samme vev, som betyr at blant annet blodserum, hjertet, og lever hos friske individer ikke skal ha spor av XO (Linder et al., 1999).

Oster hadde derfor i utgangspunktet to teorier; 1. akutt lever sykdom som første til at serumnivåer av XO økte og 2. melk, da det hadde blitt funnet at mengden antistoffer mot XO var signifikant høyere hos pasienter med hjertesykdom (Oster, 1971)

Fettkulemembranen inneholder flere enzymer, blant dem er XO, og siden mennesker har drukket kumelk i århundrer og Oster observerte at trenden i økt arteriosklerose skjedde i nyere tid (1930), konkluderte han med at moderne meieriprosessering, nærmere bestemt homogenisering, kunne være årsaken (Oster, 1973).

Oster fant at i pasteurisert og uhomogenisert melk befinner XO seg på utsiden av membranen til melkefettet, og vil gjennom fordøyelsessystemet bli brutt ned av fordøyelsesenzymer. Det samme gjaldt rå melk. Oster's hypotese var da at siden homogenisering reduserer fettkulestørrelse, vil XO plassere seg på innsiden av den nye fettkulemembranen som blir dannet under homogeniseringen. Han refererte til denne strukturen som et liposom. Den nye fettkulemembranen ville beskytte XO gjennom fordøyelsessystemet, og liposomet kunne passere fra tarmen, inn i sirkulasjonssystemet, fortsatt med XO på innsiden, og fram til hjertet hvor det oksiderte plasmalogen, som initierte arteriosklerose.

Oster's hypotese forutsetter at de homogeniserte fettkulene er intakt gjennom fordøyelsessystemet for å kunne beskytte XO mot fordøyelsesenzymer. Ifølge Michalski (2007) økte tilgjengeligheten av fettkulene med homogenisering, som følge av at overflatearealet til fettkulen øker (Michalski, 2007). Dette ga bedre tilgang for lipase, som kunne bryte ned fettkulene til monoglyserider og fettsyrer, som strider imot Oster's forutsetning om at fettkulene er intakt i fordøyelsessystemet. I tillegg har kunnskapen om fordøyelsessystemet og i hvilken tilstand næringsstoffer blir absorbert i tarmen utviklet seg siden 1970. Clifford et al. (1983) hevdet at det hverken ble dannet liposomer under homogeniseringen av melk, og selv om enkelte studier har vist at liposomer ikke brytes ned gjennom fordøyelsen (Ross et al., 1980) fant han at liposomer ikke kan absorberes i intakt form i tarmen (Clifford et al., 1983).

I tillegg viser nyere kunnskap om fordøyelse at barrieren for absorpsjon varierer avhengig av næringsstoffets fysiokjemiske karakteriser, spesielt om det er hydrofilt eller hydrofobt. For de største, viktigste næringsstoffene baserer ikke absorpsjon seg på diffusjon, men en aktiv transportmekanisme. For lipider betyr det at de må fordøyas av enzymer for å kunne absorberes, og transporteres rundt i kroppen (Barrett, 2014f). I tillegg kritiseres Oster's påstand om at de nye homogeniserte fettkulene med XO er liposomer, da liposomer er kunstig framstilte vesikler, oppfunnet i 1960 og som hovedsakelig brukes til å bære medisiner rundt i kroppen (Bozzuto & Molinari, 2015) Et annet motstridende aspekt ved Oster's hypotese er at dersom XO er i stand til å oksidere fettforbindelsen plasmalogen, burde enzymet også bryte ned fosfolipidene i membranen til liposomene, og dermed ødelegge sin beskyttelse mot fordøyelsesenzymer. Til slutt har det også blitt bevist at høye intravenøse inntak av BXO hos kanin ikke førte til at det fantes i hverken hjertet, årer, lever eller nyrer (Ho & Clifford, 1977; Mangino & Brunner, 1976).

I Norge i dag er det ikke mulig å kjøpe upasteurisert, uhomogenisert melk, kun uhomogenisert og pasteurisert, eller både pasteurisert og homogenisert melk. I vår studie ble det observert at en kombinasjon av homogenisering og varmebehandling av melk førte til dannelse av flere større partikler av ulike størrelsesklasser under fordøyelsen. Dersom dette stemmer overens med human fordøyelse vil ikke Oster's påstand om at små homogeniserte fettkulene blir til liposomer, som kan passere fordøyelsessystemet, stemme. I tillegg indikerte observasjoner i vår studie at en stor andel av esterifiserte fettsyrer i nøytral lipidfraksjon i melkeprodukter før fordøyelse, ble til frie fettsyrer gjennom fordøyelse. Dersom det antas at forskjellen i fettsyrekonsentrasjon skyldes ekstraksjonsmetode, og ikke intakte fettkuler, skal så og si alt av fett før fordøyelse blitt brutt ned til frie fettsyrer. Siden nøytrale og polare lipider ikke ble ekstrahert i materiale etter fordøyelse er det ikke mulig å med sikkerhet si om det skyldes ekstraksjonsmetode, eller at esterifiserte fettsyrer ikke har blitt brutt ned. Det kan derfor ikke konkluderes med dette basert på funnene i vår studie.

Michalski (2007) konkluderte artikkelen sin med at selv om XO ikke er bevist å ha noen rolle i arteriosklerose, forblir hypotesen stadig diskutert, og at langtidseffekter hos enkelte individer kanskje kan skyldes melkeprosessering kan ikke utelukkes. Flere studier som sammenligner fordøyelse av spesifikt homogenisert og uhomogenisert melk, samt studier som undersøker effekten av homogenisering på arteriosklerose i mennesker er høyst nødvendig for å kunne konkludere i dette tilfellet.

6 Konklusjon:

Formålet med denne masteroppgaven var å undersøke effekten av de to vanligste prosesseringstrinnene innenfor meieri, homogenisering og pasteurisering, på fordøyelse av lipider i melk. Gjennom statisk in vitro fordøyelse av ni ulike melkeprodukter med ulik grad av behandling, ble det funnet at homogenisering reduserte partikkelstørrelse, mens varmebehandling i kombinasjon med homogenisering, førte til økt gjennomsnittlig partikkelstørrelse, spesielt ved bruk av UHT-behandlet melk. Dette tyder på at rekkefølge og grad av prosessering (høye trykk og temperaturer) spiller en viktig rolle i dannelse av partikler i melk behandlet melk. Under fordøyelse ble det observert en øking av partikkelstørrelse blant UHT-behandlede melkeprodukter, som indikerer destabilisering og koalaens av partiklene.

Funn knyttet til lipidanalyser tyder på at av homogenisering og varmebehandling har sistnevnte hatt mest effekt på fettsyrekonsentrasjon, med størst effekt på frigjøring av frie fettsyrer fra de nøytrale lipidene i melkeprodukter før fordøyelse. Resultatene tyder på at dette skyldes inaktivering av endogene lipaser i upasteurisert melk. For grad av lipolyse, det vil si graden av frigjøring av frie fettsyrer, har hverken av behandlingene hatt effekt, og det var ingen forskjell mellom produktene. I tillegg var det lite forskjell mellom summen av nøytrale lipider og frie fettsyrer i melkeproduktene før fordøyelse sammenlignet med etter, som tyder på at det har vært en effektiv nedbrytning av esterifiserte fettsyrer. Ekstraksjon kan ha ført til tap av lipider underveis i analysen. Disse funnene studien strider, samt observasjonene knyttet til partikkelstørrelse, strider imot flere fundamentale forutsetninger i Oster's hypotese om at homogeniserte fettkuler fører til arteriosklerose.

Den sensoriske analysen viste at dagens moderne meieriteknologi fører til lite endring av smak i UHT-behandlet, men at homogenisering kan endre den sensoriske profilen i melk, antakeligvis som følge av endring strukturen til melkefettet.

Til tross for noen utfordringer knyttet til Mastersizer, og lipidekstraksjon har denne studien bidratt med forståelse av hvordan homogenisering og pasteurisering påvirker lipider og partikler i ulikt behandlet melk, og påfølgende fordøyelse.

7 Til ettertanke og videre forskning:

Når det gjaldt melkeproduksjon ble upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter produsert i 3 separate omganger (en for pH-justering, gjentak 1 og gjentak 2) mens UHT-behandlet melk ble kun produsert i en omgang. De ulike gjentakene ble også produsert på ulike melk, og rekkefølgen på homogenisering og varmebehandling for LTLT-pasteuriserte melkeprodukter og UHT-behandlede melkeprodukter var ulike. Dette har ført til utfordring med tanke på å sammenligne resultatene fra de ulike analysene gjort på melkeproduktene. Det kunne med fordel blitt produsert like mange partier av melkeproduktene, og tillegg ville det vært mer hensiktsmessig dersom melkeproduktene kom fra samme melkeleveranse, slik at naturlige forskjeller mellom melken kan elimineres. Dette vil også gjøre at mengdene HCl og NaOH som blir beregnet under pH-justering stemmer for alle melkeproduktene som skal fordøyas. Til slutt ville det vært bedre dersom homogenisering og pasteurisering foregikk i samme rekkefølge for alle melkeproduktene. Disse faktorene var dog ikke praktisk mulig å gjennomføre slik for denne masteroppgaven, men verdt å sette søkelys på ved eventuell videre forskning.

Angående lipidanalyse ble nøytrale lipider og frie fettsyrer fra melkeprodukter før fordøyelse, og frie fettsyrer etter fordøyelse ekstrahert. For å kunne sammenligne de totale fettsyrekonsentrasjonene i melkeproduktene før og etter fordøyelse kunne det vært fordelaktig å ekstrahere både nøytrale lipider, polare lipider og frie fettsyrer. På denne måten ville det vært mulig å bestemme eksakte mengder ekstrahert prøve, og dermed grad av lipolyse, samt hvor stor andel av lipidene som forsvant under ekstraksjon.

For å måle partikkelstørrelse ble Malvern Mastersizer 3000 brukt. Gjennomsnittlig partikkelstørrelse, $D_x(50)$, og partikkelstørrelsefordeling ble brukt i oppgaven for å beskrive partiklene i melkeprodukter før og etter fordøyelse. Det kunne vært interessant å dypere undersøke hva de ulike partiklene i melkeproduktene, både før og etter fordøyelse besto av, og hvordan partiklene var organisert i materialet. Dette kunne blitt gjort ved bruk av elektronmikroskopi. I den forbindelse kunne det også vært spennende å undersøke absorpsjon av proteiner i MFGM som følge av homogenisering og pasteurisering, som kunne blitt analysert med kapillær elektroforese.

I vår studie ble det brukt en statisk *in vitro* modell, med 2 timers i hver fase, henholdsvis gastrisk- og duodenal fase. På grunn av stor mengde laboratoriearbeid knyttet til lipidanalysene ble det bestemt at hovedfokuset i masteroppgaven var på melkeprodukter før fordøyelse, materiale etter duodenal fase. Prøvematerialer fra gastrisk fase, enzymblanker eller stabilitetstester ble derfor aldri undersøkt, hverken for partikkelstørrelse eller lipidanalyse. Det ville bidratt til å få en mer helhetlig forståelse av effekten av homogenisering og pasteurisering dersom disse prøvene også hadde blitt analysert. I tillegg ville det vært interessant å ha flere uttak i duodenalfase, for eksempel etter 5, 10, 20, 30, 90 og 120 minutter for å kartlegge fordøyelsesrate av lipidene.

8 Litteraturliste:

- Akoh, C. C. (2017a). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. Chapter 1: Nomenclature and Classification of Lipids*. CRC press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejlt.200390077>
- Baliga, S., Muglikar, S., & Kale, R. (2013). Salivary pH: A diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol*, 17(4), 461-465. <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0972-124X.118317>
- Barba, G., Troiano, E., Russo, P., Venezia, A., & Siani, A. (2005). Inverse association between body mass and frequency of milk consumption in children. *Br J Nutr*, 93(1), 15-19.
<https://doi.org/10.1079/BJN20041300>
- Barrett, K. E. (2014a). *Gastrointestinal physiology. Chapter 1: Functional Anatomy of the GI Tract and Organs Draining into it* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Barrett, K. E. (2014b). *Gastrointestinal physiology. Chapter 3: Gastric Secretion* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Barrett, K. E. (2014c). *Gastrointestinal physiology. Chapter 4: Pancreatic and Salivary Secretion* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Barrett, K. E. (2014d). *Gastrointestinal physiology. Chapter 8: Gastric Motility* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Barrett, K. E. (2014e). *Gastrointestinal physiology. Chapter 15: Carbohydrate and Protein Assimilation* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Barrett, K. E. (2014f). *Gastrointestinal physiology. Chapter 16: Lipid Assimilation* (Second edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10(default), 975-999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., & Carrière, F. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Carrière, F., Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Laugier, R., & Verger, R. (1997). In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 5(2), 429-435.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(96\)00251-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00251-9)
- Castro-Gómez, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Calvo, M. V., Romero, J., Mendiola, J., Ibáñez, E., & Fontecha, J. (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of dairy science*, 97(11), 6719-6728.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2014-8128>
- Clemente, G., Mancini, M., Nazzaro, F., Lasorella, G., Riviaccio, A., Palumbo, A. M., Rivellese, A. A., Ferrara, L., & Giacco, R. (2003). Effects of different dairy products on postprandial lipemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 13(6), 377-383.
[https://doi.org/10.1016/S0939-4753\(03\)80007-8](https://doi.org/10.1016/S0939-4753(03)80007-8)
- Clifford, A. J., Ho, C. Y., & Swenerton, H. (1983). Homogenized bovine milk xanthine oxidase: a critique of the hypothesis relating to plasmalogen depletion and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 38(2), 327-332.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/38.2.327>

- Collins, J. T., Nguyen, A., & Badireddy, M. (2024). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083773>
- De Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2005). The role of friction in perceived oral texture. *Food Quality and Preference*, 16(2), 121-129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.03.002>
- De Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2006). Mechanisms underlying the role of friction in oral texture. *Journal of Texture Studies*, 37(4), 413-427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2006.00060.x>
- Des Gachons, C. P., Mura, E., Speziale, C., Favreau, C. J., Dubreuil, G. F., & Breslin, P. A. (2012). Opponency of astringent and fat sensations. *Current Biology*, 22(19), R829-R830. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.017>
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18(5), 436-457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.01>
- Docherty, A., Bodmer, M., Angal, S., Verger, R., Riviere, C., Lowe, P., Lyons, A., Emtage, J., & Harris, T. (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of rat lingual lipase cDNA. *Nucleic Acids Research*, 13(6), 1891-1903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/13.6.1891>
- Engelen, L., & de Wijk, R. A. (2012). Oral processing and texture perception. *Food oral processing: Fundamentals of eating and sensory perception*, 8, 157-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444360943.ch8>
- FAO. (1999). In.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015.a). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 1: Production and Utilization of Milk* (2nd 2015. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015.b). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 3: Milk Lipids* (2nd 2015. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015.c). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 4: Milk Proteins* (2nd 2015. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015.d). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 5: Salts of Milk* (2nd 2015. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015.e). *Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapter 9: Heat-Induced Changes in Milk* (2nd 2015. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Gardner, J. D., Ciociola, A. A., Filinto, J., & Robinson, M. (2001). In vivo gastric autotitration: a novel, simple method to measure meal-stimulated gastric acid secretion. *The American journal of gastroenterology*, 96(9), S55-S55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(01\)02910-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9270(01)02910-0)
- Goff, H. D. (1997). Instability and partial coalescence in whippable dairy emulsions. *Journal of dairy science*, 80(10), 2620-2630. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76219-2](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76219-2)
- Griffiths, M. W. (2010). *Improving the Safety and Quality of Milk: Improving quality in milk Products*. Elsevier.

- Grundy, M. M. L., & Wilde, P. J. (2021). *Bioaccessibility and digestibility of lipids from food* (1st 2021. ed.). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-56909-9>
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J., & Michell, R. H. (2016). *Lipids: biochemistry, biotechnology and health*. John Wiley & Sons.
- Harwalkar, V., Cholette, H., McKellar, R., & Emmons, D. (1993). Relation between proteolysis and astringent off-flavor in milk. *Journal of dairy science*, 76(9), 2521-2527. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77587-6](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77587-6)
- Heda, R., Toro, F., & Tombazzi, C. R. (2019). Physiology, pepsin. Tilgjengelig fra: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk537005>
- Heinzerling, C. I. (2013). *Saliva and sensory perception: Interplay between the person and the food stimuli*. Wageningen University and Research.
- Ho, C. Y., & Clifford, A. J. (1977). Bovine milk xanthine oxidase, blood lipids and coronary plaques in rabbits. *The Journal of Nutrition*, 107(5), 758-766.
- Humbert, G., Driou, A., Guerin, J., & Alais, C. (1980). Effets de l'homogénéisation à haute pression sur les propriétés du lait et son aptitude à la coagulation enzymatique. *Le Lait*, 60(599-600), 574-594. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/lait:1980599-60031>
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, 5(3), 942-949. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bm0345110>
- Karnul, A. M., Murthy, C. K., & Murthy, C. K. (2022). A Study of Variations of the Stomach in Adults and Growth of the Fetal Stomach. *Cureus*, 14(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.7759/cureus.28517>
- Kolarič, L., & Šimko, P. (2022). Application of β -cyclodextrin in the production of low-cholesterol milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 13-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.023>
- Lee, S. J., & Sherbon, J. W. (2002). Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *Journal of Dairy Research*, 69(4), 555-567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S002202990200571X>
- Lee, W. J. (2019). Digestive system. *Vitamin C in Human Health and Disease: Effects, Mechanisms of Action, and New Guidance on Intake*, 141-151.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- Li, Y., Joyner, H., Carter, B., & Drake, M. (2018). Effects of fat content, pasteurization method, homogenization pressure, and storage time on the mechanical and sensory properties of bovine milk. *Journal of dairy science*, 101(4), 2941-2955. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13568>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation* (pp. 53-107). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>
- Lu, P.-J., Hsu, P.-I., Chen, C.-H., Hsiao, M., Chang, W.-C., Tseng, H.-H., Lin, K.-H., Chuah, S.-K., & Chen, H.-C. (2010). Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases. *World*

- journal of gastroenterology: WJG*, 16(43), 5496.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i43.5496>
- Mangino, M., & Brunner, J. (1976). Homogenized milk: is it really the culprit in dietary-induced atherosclerosis? *Journal of dairy science*, 59(8), 1511-1512.
[https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84393-7](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84393-7)
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2013). *Advanced Dairy Chemistry : Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (4th 2013. ed.). Springer US : Imprint: Springer.
- Michalski, M.-C. (2007). On the supposed influence of milk homogenization on the risk of CVD, diabetes and allergy. *Br J Nutr*, 97(4), 598-610.
<https://doi.org/10.1017/S0007114507657900>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., & Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mouritsen, O. G., & Zuckermann, M. J. (2004). What's so special about cholesterol? *Lipids*, 39(11), 1101-1113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11745-004-1336-x>
- Myer, P. R., Parker, K. R., Kanach, A. T., Zhu, T., Morgan, M. T., & Applegate, B. M. (2016). The effect of a novel low temperature-short time (LTST) process to extend the shelf-life of fluid milk. *Springerplus*, 5(1), 660-660.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40064-016-2250-1>
- Oster, K. (1973). Evaluation of serum cholesterol reduction and xanthine oxidase inhibition in the treatment of atherosclerosis. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*, 3, 73-80.
- Pea, A., Riva, G., Bernasconi, R., Sereni, E., Lawlor, R. T., Scarpa, A., & Luchini, C. (2018). Ampulla of Vater carcinoma: Molecular landscape and clinical implications. *World journal of gastrointestinal oncology*, 10(11), 370.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i11.370>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J., Guamis, B., & Trujillo, A. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of dairy science*, 90(3), 1081-1093.
[https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3)
- Ransmark, E., Svensson, B., Svedberg, I., Göransson, A., & Skoglund, T. (2019). Measurement of homogenisation efficiency of milk by laser diffraction and centrifugation. *International Dairy Journal*, 96, 93-97.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.04.011>
- Rauh, V., & Xiao, Y. (2022). The shelf life of heat-treated dairy products. *International Dairy Journal*, 125, 105235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105235>
- Robertson, J. A., Ryden, P., Botham, L., & Ring, S. (1999). Ileal effluent as a fermentation substrate: implications for butyrate production in the colon. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 18(2), 141-146. Tilgjengelig fra:
<https://europepmc.org/article/med/15281226>
- Ross, D. J., Sharnick, S. V., & Oster, K. A. (1980). Liposomes as a proposed vehicle for the persorption of bovine xanthine oxidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 163(1), 141-145. <https://doi.org/10.3181/00379727-163-40736>

- Sassene, P., Fanø, M., Mu, H., Rades, T., Aquistapace, S., Schmitt, B., Cruz-Hernandez, C., Wooster, T., & Müllertz, A. (2016). Comparison of lipases for in vitro models of gastric digestion: lipolysis using two infant formulas as model substrates. *Food & function*, 7(9), 3989-3998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C6FO00158K>
- Sharma, S. K., & Dalgleish, D. G. (1994). Effect of heat treatments on the incorporation of milk serum proteins into the fat globule membrane of homogenized milk. *Journal of Dairy Research*, 61(3), 375-384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S002202990003079X>
- Sigma-Aldrich. (2024). *Pancreatin from porcine pancreas*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p7545>
- Skandalakis, J. E., Skandalakis, L. J., Skandalakis, P. N., Skandalakis, J. E., Skandalakis, L. J., & Skandalakis, P. N. (2000). Small intestine. *Surgical Anatomy and Technique: A Pocket Manual*, 425-441.
- Smith, T. P. (2010). Got E. coli? Raw milk's appeal grows despite health risks. *Scientific American*, 31.
- Tholstrup, T. (2006). Dairy products and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 17(1), 1-10. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000199813.08602.58>
- Tran, H., Datta, N., Lewis, M., & Deeth, H. (2008). Predictions of some product parameters based on the processing conditions of ultra-high-temperature milk plants. *International Dairy Journal*, 18(9), 939-944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.01.006>
- Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G., & Veerman, E. C. (2004). Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries research*, 38(3), 247-253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000077762>
- Van Zoeren-Grobbe, D., Schrijver, J., Van den Berg, H., & Berger, H. M. (1987). Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch Dis Child*, 62(2), 161-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40064-016-2250-1>
- Vangen, O. (2022). *norsk rødt fe*. Tilgjengelig fra: https://snl.no/norsk_r%C3%B8dt_fe
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006a). *Dairy science and technology. Chapter 1: Milk: Main Characteristics* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006b). *Dairy science and technology. Chapter 2: Milk Components* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006c). *Dairy science and technology. Chapter 3: Collidal Particles of Milk* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006e). *Dairy science and technology. Chapter 7: Heat Treatment* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006f). *Dairy science and technology. Chapter 9: Homogenization* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006g). *Dairy science and technology. Chapter 16: Milk for Liquid Consumption* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Walstra, P., Geurts, T., & Wouters, J. T. M. (2006h). *Dairy science and technology. Chapter 19: Concentrated Milks* (2nd ed.). CRC/Taylor & Francis.
- Watts, S. A., Lawrence, A. L., & Lawrence, J. M. (2020). Chapter 9 - Feeding, Digestion and Digestibility of Sea Urchins. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 43, 135-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00009-5>
- Withers, C., Lewis, M. J., Gosney, M., & Methven, L. (2014). Potential sources of mouth drying in beverages fortified with dairy proteins: A comparison of casein-and whey-

rich ingredients. *Journal of dairy science*, 97(3), 1233-1247.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2013-7273>

Withers, C. A., Cook, M. T., Methven, L., Gosney, M. A., & Khutoryanskiy, V. V. (2013). Investigation of milk proteins binding to the oral mucosa. *Food & function*, 4(11), 1668-1674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C3FO60291E>

Zhou, H., Tan, Y., & McClements, D. J. (2023). <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>. *Annual Review of Food Science and Technology*, 14, 135-156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>

9 Vedlegg

Oversikt over vedlegg:

Vedlegg 1: Oversikt over produksjonsdato og dato for in vitro fordøyelse

Vedlegg 2: Fettprosent i de ulike melkeproduksjonene umiddelbart etter produksjon.

Vedlegg 3: Mengde (mL) 1 M HCl eller 1 M NaOH tilsatt under pH justering.

Vedlegg 4: Konsentrasjoner til kalibreringsløsninger

Vedlegg 5: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse

Vedlegg 6: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse fryst og ferskt fordøyd

Vedlegg 7: Treveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse i fordøyd og ufordøyd

Vedlegg 8: Toveis ANOVA av nøytral lipidfraksjon

Vedlegg 9: Toveis ANOVA av fri fettsyrefraksjon før fordøyelse.

Vedlegg 10: Toveis ANOVA av fri fettsyrefraksjon etter fordøyelse.

Vedlegg 11: Toveis ANOVA av summert fettsyrekonsentrasjon av fettsyrer

Vedlegg 12: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig prosentvis grad av lipolyse

Vedlegg 1:*Tabell A: Fettprosent i de ulike melkeproduksjonene umiddelbart etter produksjon.*

Melkeprodukt	Batch 1	Batch 2	Batch 3
	pH justering	Gjentak 1	Gjentak 2
<i>UP0</i>	3.59	3.55	3.55
<i>UP180</i>	3.67	3.56	3.54
<i>UP280</i>	3.65	3.60	3.58
<i>LTLT0</i>	3.45	3.55	3.41
<i>LTLT180</i>	3.68	3.59	3.58
<i>LTLT280</i>	3.77	3.60	3.59
		<i>Kun en batch</i>	
<i>UHT0</i>		3.59	
<i>UHT180</i>		3.58	
<i>UHT280</i>		3.57	

Vedlegg 2:

Tabell B: Oversikt over produksjonsdato og dato for *in vitro* fordøyelse for upasteuriserte melkeprøver og LTLT pasteuriserte melkeprøver.

	Dato	Gjøremål	Timer etter prosessering
Gjentak 1	28. Jan	Produksjon (UP, LTLT)	Ferdig kl. 19.00
	29. Jan.	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, uhomogenisert</i>	14 timer
	30. Jan	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, 180 bar</i>	38 timer
	31. Jan	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, 280 bar</i>	62 timer
	1. Feb – 5 Feb	In vitro fordøyelse; <i>resten av melkeproduktene</i>	< 8 dager
Gjentak 2	6. Feb	Produksjon (UP, LTLT)	Ferdig kl. 18.00
	7. Feb	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, uhomogenisert</i>	15 timer
	8. Feb	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, 180 bar</i>	39 timer
	9. Feb	In vitro fordøyelse; <i>upasteurisert, 280 bar</i>	63 timer
	12. – 14. Feb	In vitro fordøyelse; <i>resten av melkeproduktene</i>	< 8 dager
Gjentak 1 +	22. Feb	Produksjon (UHT)	Ferdig kl. 12.00
Gjentak 2	23. Feb	pH justering; <i>UHT</i>	20 timer
	26-28 Feb	In vitro fordøyelse; <i>UHT</i>	< 48 timer

Vedlegg 3:

Tabell C: Mengde (mL) 1 M HCl eller 1 M NaOH tilsatt under pH justering av de ulike melkeproduktene, for å oppnå henholdsvis pH 3 (gastrisk fase) og pH 7 (duodenal fase). UP = upasteurisert, LTLT = LTLT-pasteurisert, UHT = UHT-behandlet, 0 = 0 bar, 180 = 180 bar, 280 = 280 bar.

Melkeprodukt	Mengde 1 M HCl (mL)	Mengde 1 M NaOH (mL)
UP0	0.031	0.022
UP180	0,014	0.014
UP280	0,05	0.053
LTLT0	0,05	0.057
LTLT180	0.065	0.065
LTLT280	0.085	0.036
UHT0	0.04	0.058
UHT180	0.043	0.032
UHT280	0.06	0.052

Vedlegg 4:

Vedlegg D: Konsentrasjoner til de ulike kalibreringsløsningene brukt til kalibrering av GC-MS.

Standard	1	2	3
µL ME100	50 µL	125 µL	250 µL
µL Internstandars	100 µL	100 µL	100 µL
µL heptan	850 µL	775 µL	650 µL
Kons. v/4%	20 µL/mL	50 µL/mL	100 µL/mL
Kons. FAME C9:0	331.0 µL/mL	331.0 µL/mL	331.0 µL/mL
Kons. FAME C19:0	841.0 µL/mL	841.0 µL/mL	841.0 µL/mL

Vedlegg 5:

Tabell E: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse målt i melkeprodukter før fordøyelse. Is = $p > 0.05$, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$.

Homogenisering	Pasteurisering	Interaksjon
****	****	**

Vedlegg 6:

Tabell F: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse målt i fryst fordøyd materiale, og Toveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse målt i fordøyd materiale umiddelbart etter duodenal fase (ikke fryst). Is = $p > 0.05$, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$.

Produkt	Homogenisering	Pasteurisering	Interaksjon
<i>Ikke fryst</i>	****	***	****
<i>Fryst</i>	is	is	is

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 7:

Tabell G: Treveis ANOVA av gjennomsnittlig partikkelstørrelse i fordøyde og ufordøyde upasteuriserte og LTLT-pasteuriserte melkeprodukter. Is = $p > 0.05$, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$.

Variasjonskilde	Signifikans (p<0.05)
<i>Homogenisering</i>	****
<i>(AB vs CD)</i>	***
<i>(AC vs BD)</i>	****
<i>Homogenisering x (AB vs CD)</i>	***
<i>Homogenisering X (AC vs BC)</i>	****
<i>(AB vs CD) X (AC vs BD)</i>	***
<i>Homogenisering X (AB vs CD) X (AC vs BD)</i>	***

A = Upasteurisert, fordøyd

B = Upasteurisert, ikke fordøyd

C = LTLT-pasteurisert, fordøyd

D = LTLT-pasteurisert, ikke fordøyd

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 8:

Tabell H: Toveis ANOVA av konsentrasjon av hver enkelt fettsyre i nøytral lipidfraksjon i melkeprodukter før fordøyelse. $Is = p > 0.05$, $* = p \leq 0.05$, $** = p \leq 0.01$, $*** = p \leq 0.001$, $**** = p \leq 0.0001$.

Fettsyre	Homogenisering	Varmebehandling	Interaksjon
<i>C4:0</i>	is	****	*
<i>C6:0</i>	is	****	*
<i>C8:0</i>	is	***	is
<i>C10:0</i>	is	is	is
<i>C12:0</i>	is	**	is
<i>C13:0</i>	is	is	is
<i>C14:0</i>	is	*	is
<i>C14:1 n-9 cis</i>	is	*	is
<i>C15:0</i>	is	*	is
<i>C16:0</i>	is	*	is
<i>C16:1 n-9 cis</i>	is	*	is
<i>C17:0</i>	is	is	is
<i>C17:1 n-10 cis</i>	is	is	is
<i>C18:0</i>	is	*	is
<i>C18:1 n-9 trans</i>	is	is	is
<i>C18:1 n-9 cis</i>	is	*	is
<i>C18:2 n-9, 12 trans</i>	is	*	is
<i>C18:2 n-9, 12 cis</i>	is	*	is
<i>C20:0</i>	is	*	is
<i>C21:0</i>	is	*	is
<i>C20:2 n-11, 14</i>	is	*	is
<i>C22:0</i>	is	*	is
<i>C23:0</i>	is	is	is

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 9:

Tabell 1: Toveis ANOVA av konsentrasjon av hver enkelt fettsyre i fri fettsyrefraksjon i melkeprodukter før fordøyelse. *Is* = $p > 0.05$, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$.

Fettsyre	Homogenisering	Varmebehandling	Interaksjon
<i>C6:0</i>	<i>is</i>	**	<i>is</i>
<i>C8:0</i>	*	****	*
<i>C10:0</i>	*	****	<i>is</i>
<i>C11:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C12:0</i>	**	****	*
<i>C13:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C14:0</i>	**	****	**
<i>C14:1 n-9 cis</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C15:0</i>	**	****	**
<i>C16:0</i>	***	****	***
<i>C17:0</i>	**	****	***
<i>C18:0</i>	<i>is</i>	**	<i>is</i>
<i>C18:1 n-9 trans</i>	<i>is</i>	***	<i>is</i>
<i>C18:1 n-9 cis</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C18:2 n-9, 12 trans</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C18:2 n-9, 12 cis</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C20:0</i>	<i>is</i>	*	<i>is</i>
<i>C21:0</i>	<i>is</i>	***	<i>is</i>

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 10:

Tabell J: Toveis ANOVA av konsentrasjon av hver enkelt fettsyre i fri fettsyrefraksjon i melkeprodukter etter fordøyelse. *Is* = $p > 0.05$, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$.

	Homogenisering	Pasteurisering	Interaksjon
<i>C6:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C8:0</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C10:0</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C12:0</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C13:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	*
<i>C14:0</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C14:1 n-9 cis</i>	<i>is</i>	*	<i>is</i>
<i>C15:0</i>	<i>is</i>	****	<i>is</i>
<i>C16:0</i>	<i>is</i>	***	<i>is</i>
<i>C17:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C18:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C18:1 n-9 trans</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C18:1 n-9 cis</i>	<i>is</i>	****	*
<i>C18:2 n-9, 12 trans</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C18:2 n-9, 12 cis</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C20:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>
<i>C21:0</i>	<i>is</i>	<i>is</i>	<i>is</i>

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 11:

Tabell K: Toveis ANOVA av summert fettsyrekonsentrasjon av fettsyrer i nøytrale lipider og frie fettsyrer i ufordøyde melkeprodukter, og frie fettsyrer etter fordøyelse.

	Homogenisering	Varmebehandling	Interaksjon
<i>Nøytrale lipider (ufordøyd materiale)</i>	is	*	*
<i>Frie fettsyrer (ufordøyd materiale)</i>	**	****	**
<i>Frie fettsyrer (fordøyd materiale)</i>	is	****	is

is = «ikke signifikant»

Vedlegg 12:

Tabell L: Toveis ANOVA av gjennomsnittlig prosentvis grad av lipolyse i de ulike melkeproduktene.

Lipolyse	Homogenisering	Varmebehandling	Interaksjon
Lipolyse %	is	is	is

is = «ikke signifikant»



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway