



NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2022  
15 studiepoeng

## **Harskningsproblematikk i brød av linfrø**



### **Utført av:**

Hedda Skullerud Lier  
Marthine Rørstad Jensen  
Van Alisa B. T. Nguyen

### **Veiledere:**

Ida Johanne-Jensen  
Marte Berg Wahlgren

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matvitenskap, teknologi og bærekraft ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av oppgavens innhold skjer på eget ansvar.

## Sammendrag

Denne bacheloroppgaven er et samarbeid med Linbakst, der harskningsforløpet i linfrøbrød ble undersøkt. Problemstillingen var å se om tilsetning av ulike antioksidanter vil redusere dannelsen av harskningsprodukter. For å undersøke graden av harskning ble det gjennomført kjemiske og sensoriske analyser, der en resept fra Linbakst av *Klassisk Brød* ble brukt som referanse. Antioksidanter tilsatt i referansebrødet var askorbinsyre og rosmarinekstrakt. For kjemiske analyser ble det i tillegg produsert fire ulike batcher av brød med forskjellige konsentrasjoner og typer antioksidanter; uten tilsetning av antioksidant, dobbel tilsetning av askorbinsyre, dobbel tilsetning av rosmarinekstrakt, og tilsetning av tokoferol. Brødene ble utsatt for oksygen i 1 til 10 dager for å måle forandringen i fettsyresammensetning og utviklingen av primære- og sekundære oksidasjonsprodukter. Det ble også tatt ut en deigprøve for hver batch for å vurdere endringer som kan ha oppstått under varmebehandling.

Fettsyresammensetningen, som ble analysert ved gasskromatografi (GC), viste liten grad av endringer i de ulike brødene og tyder på liten grad av harskning. Flyktige sekundære forbindelser målt ved thiobarbitursyre (TBARS) viste svært lave verdier for samtlige prøver etter steking. Analysene av de primære oksidasjonsproduktene målt i peroksidverdi (PV) og de sekundære målt i TBARS viste ingen signifikant forskjell i brødene lagret i 1 til 7 dager. Brødet tilsatt tokoferol viste imidlertid antydninger til å ha høyest effekt for å redusere dannelsen av oksidasjonsprodukter da både PV og TBARS viste jevnt lavere verdier etter steking. Brødet tilsatt dobbel mengde askorbinsyre så derimot ut til å ha en negativ effekt da PV i deigprøven var svært høy i forhold til referansebrødet og hadde en stigende trend etter steking.

Den sensoriske analysen målte forbrukeraksept for referansebrødet og brødet uten antioksidanter. Resultatene, oppgitt i skalaverdier fra 1-9, viste at referansebrødet hadde signifikant lavere aksept enn brødet uten antioksidanter. Akseptverdiene for begge brødene var på den lavere enden av skalaen, mellom "liker ikke i det hele tatt" og "hverken liker eller ikke liker".

Resultater fra analysene ga ikke klare svar på hvilke antioksidanter som vil ha best effekt på senking av harskningen. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike prøvene før i TBARS-verdiene i dag 10, men fordi det er såpass lave verdier vil lukt og smak påvirkes i liten grad. Med en utvidet testperiode eller ved lagring i romtemperatur kan det være mulig å se hvordan oksidasjonen påvirkes av ulike antioksidanter.

## Abstract

This bachelor thesis is a collaboration with *Linbakst*, the course of rancidity in flaxseed bread was investigated. The goal was to see if the addition of various antioxidants would reduce the formation of rancidity products. To investigate the degree of rancidity, chemical and sensory analyzes were performed, where a recipe from *Linbakst* for *Klassisk Brød* was used as a reference. Antioxidants added to the reference bread are ascorbic acid and rosemary extract. For chemical analyzes, four different batches of bread with different concentrations and types of antioxidants were also produced; without the addition of antioxidant, double addition of ascorbic acid, double addition of rosemary extract, and addition of tocopherol. The breads were exposed to oxygen for 1 to 10 days to measure the change in fatty acid composition and the development of primary and secondary oxidation products. A dough sample was also taken from each batch to assess changes that may have occurred during heat treatment.

The fatty acid composition, which was analyzed by gas chromatography indicated little degree of rancidity in the various breads. The analyzes of the primary oxidation products measured in peroxide value and the secondary, measured in thiobarbituric acid reactive substances, showed no significant difference in the breads stored for 1 to 7 days. However, the tocopherol-added bread showed indications to have the highest effect in reducing the formation of oxidation products as both PV and TBARS showed evenly lower values after baking. The bread with double the amount of ascorbic acid seemed to have a negative effect as the PV in the dough sample was very high in relation to the reference bread and had an increasing trend after baking.

The sensory analysis measured consumer acceptance for the reference bread and the bread without antioxidants. The results, given in scale values from 1-9, showed that the reference bread had significantly lower acceptance than the bread without antioxidants. The acceptance values for both breads were at the lower end of the scale, between "*dislike*" and "*neither like nor dislike*".

Results from the analyzes did not provide clear answers as to which antioxidants will have the best effect on lowering the rancidity. There were no significant differences between the different samples until the TBARS values in day 10, but because the values are so low, odor and taste will be affected to a small degree. With an extended test period or when stored at room temperature, it may be possible to see how the oxidation is affected by various antioxidants.

## Forord

Denne oppgaven markerer avslutningen på en bachelorgrad i Matvitenskap, teknologi og bærekraft. Arbeidet ble utført og finansiert ved NTNU, fakultet for naturvitenskap, og er et samarbeid med Linbakst. Perioden for prosjektet var fra januar til mai 2022, og i løpet av den tiden har vi fått et innblikk i harskningsproblematikken i linfrøbrød. Prosjektet kan være nyttig for utvikling av vegetabiliske produkter med linfrø, da linfrø inneholder en høy andel essensielle fettsyrer, og har kvaliteter som kan benyttes i en rekke matvarer.

Vår største takk går til våre veiledere, Marte Berg Wahlgren og Ida-Johanne Jensen som har gitt oss støtte og oppfølging gjennom hele prosjektet. Vi har satt veldig stor pris på deres tålmodighet og hjelp. Takk for inspirerende og motiverende veiledningsmøter og kritiske syn til alle deler av prosjektet og skriveprosessen.

Vi ønsker også å takke alle som har bidratt til utformingen av denne oppgaven. En særlig oppmerksomhet rettes mot Martin Haider for gode samtaler og verdifull informasjon ved oppstarten av prosjektet, i tillegg til muligheten til å benytte oss av grovkjøkkenet til alle døgnets tider. Videre fortjener John-Kristian Jameson også en ekstra oppmerksomhet for god tålmodighet under opplæring av gasskromatografi, og for å ha stilt opp for oss. Takk til Peter Benjamin Kelley for opplæring av Bligh & Dyer, Siri Stavrum for opplæring av PV og TBARS, og Turid Rustad for sine uvurderlige kommentarer og kompetanse.

Til slutt vil vi takke alle ansatte og tilhørende ved NTNU som deltok i den sensoriske testen som tok sted 5. mai 2022 ved campus Kalvskinnet.


Trondheim, 27.05.2022

Marthine Rørstad Jensen




.....

Van Alisa B. T. Nguyen



.....

Hedda Skullerud Lier



.....

## Innholdsfortegnelse

1.0	Innledning .....	1
2.0	Bakgrunn.....	2
2.1	Lipider.....	2
2.1.2	Fettsyresammensetningen i linfrø .....	4
2.2	Harskningsforløpet.....	4
2.2.1	Dannelse av oksidasjonsprodukter.....	6
2.3	Oksidativ stabilitet og antioksidanter.....	7
2.4	Helseeffekter av oksidasjonsprodukter .....	10
2.5	Metodologisk aspekt .....	11
2.5.1	Ekstrahering av fett og analyse av fettsyresammensetning .....	11
2.5.2	Peroksidverdi .....	12
2.5.3	Tiobarbitursyre-reaktive stoffer .....	14
2.5.4	Usikkerheter i kjemiske målemetoder .....	14
2.6	Sensoriske analysemetoder .....	15
2.6.1	Forbrukeranalyser .....	15
3.0	Materialer og metoder.....	18
3.1	Forsøksdesign - Flytskjema .....	18
3.2	Kjemiske analyser.....	19
3.2.1	Ekstraksjon av fett ved Bligh & Dyer.....	19
3.2.2	Analyse av fettsyresammensetning.....	20
3.2.3	Peroksidverdi (PV).....	22
3.2.4	Bestemmelse av sekundære harskningsprodukter .....	24
3.3	Sensorisk analyse .....	26
3.3.1	Gjennomføring av aksepttest .....	26
4.0	Resultater .....	28

4.1	Resultat av kjemiske analyser .....	28
4.1.1	Resultat av fettsyresammensetning .....	28
4.1.2	Primære oksidasjonsprodukter målt i meqO <sub>2</sub> / kg olje .....	29
4.1.3	Sekundære oksidasjonsprodukter målt i μmol TBARS /g olje.....	30
4.2	Resultat av sensorisk analyse .....	31
5.0	Diskusjon .....	33
5.1	Degradering av flerumettede fettsyrer .....	33
5.2	Dannelse av primære oksidasjonsprodukter .....	34
5.3	Dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter.....	35
5.4	Sensorisk aksept.....	36
5.5	Helseeffekter .....	37
5.6	Oppsummering.....	38
5.7	Forslag til videre arbeid .....	38
6.0	Konklusjon.....	39
7.0	Referanser .....	40
9	vedlegg.....	

Forsidebilde hentet fra <https://www.linbakst.no>

# 1.0 Innledning

Bakgrunnen for denne bacheloroppgaven er et samarbeid med Linbakst, en bedrift som produserer allergenfritt brød bakt med økologiske linfrø som hovedingrediens. Linfrøbrødet skiller seg fra det vi forbinder med et tradisjonelt brød både ved lukt, smak, konsistens og ernæringsmessig sammensetning (Linbakst, 2022). Linfrø har et høyt innhold av essensielle omega-3-fettsyrer, i tillegg til et høyt innhold av kostfiber og en rekke andre vitaminer og mineraler (se vedlegg 1 for næringsinnholdet i Linbakst Klassisk Brød).

Både produksjonen og den ernæringsmessige kvaliteten i linfrøbrødet er i tråd med FNs bærekraftsmål om god helse og forsvarlig forbruk. Det er imidlertid en utfordring med harskning når det gjelder brød bakt på linfrø, noe som kan påvirke både den sensoriske og ernæringsmessige kvaliteten negativt. Matvarer med mye flerumettede fettsyrer er spesielt utsatt for lipidoksidasjon som kan føre at forbruker ikke ønsker å konsumere produktet.

I denne oppgaven har det derfor blitt sett nærmere på utviklingen av harskningsprodukter i linfrøbrød, og hvilken betydning tilsetning av antioksidanter har å si for harskning under i produksjon og lagring. Oppgavens problemstilling ble derfor formulert til «*Vil tilsetning av antioksidanter redusere dannelse av harskningsprodukter i linfrøbrød?*».

Det ble bakt fem batcher brød med ulike tilsetninger av antioksidanter, og gjennomført kjemiske analyser ved å ekstrahere fett, og deretter analysert for oksidasjonsprodukter og fettsyresammensetning. Fordi oksidasjonsproduktene kan gi en uønsket smak ble det også gjennomført en sensorisk analyse på et referansebrød og et brød uten tilsatt antioksidanter for å undersøke hvordan tilsetningen av antioksidanter påvirker smaken og hvor godt forbrukere liker produktet.

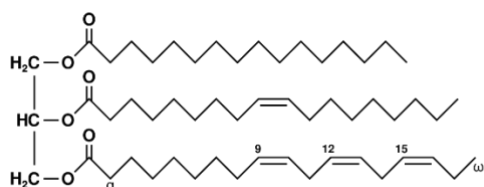
## 2.0 Bakgrunn

Fett bidrar med omtrent 35–40 % av det totale energiinntaket i det norske kostholdet (Helsedirektoratet, 2022, s. 11). I tillegg til å være en energikilde, trenger kroppen fett gjennom kosten for å blant annet bygge cellemembraner, danne forstadier til hormonlignende stoffer, og er bærere av fettløselige vitaminer (Elsevier, 2002, s. 26). Helseeffektene av fett vi spiser påvirkes både av mengden og type fettsyrer. Fettholdige matvarer er spesielt utsatt for forringelse gjennom harskningsprosesser både ved oppvarming og lagring. (Pokorný, 2001, s. 1). Ved å finne metoder som hemmer harskningsprosessene kan man bevare den sensoriske og ernæringsmessige kvaliteten til produktet.

## 2.1 Lipider

Fett er en del av en overordnet gruppe som kalles lipider. Lipider har ingen eksakt definisjon, men felles for dem er at de generelt er løselige i eter, kloroform eller andre organiske stoffer, men lite løselige i vann (Ellefson, 2017, s. 301). Generelt har fett en fast tekstur, mens olje er flytende ved romtemperatur. I dagligtalen brukes gjerne begrepene lipider, fett og olje om hverandre, og i matsammenheng refereres det som regel til triglyserider. Triglyserider er bygget opp av tre fettsyrer som via esterbindinger er bundet til et glyserol-molekyl (Figur 1).

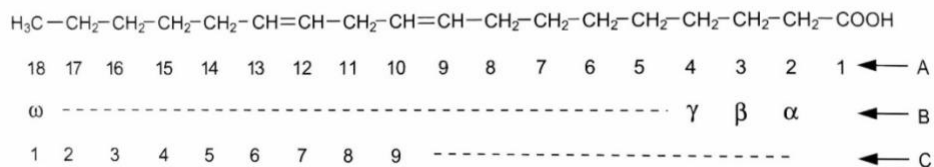
Fett og oljer er en del av en overordnet gruppe som kalles lipider. Lipider har ingen eksakt definisjon, men felles for dem er at de generelt er løselige i eter, kloroform eller andre organiske stoffer, men lite løselige i vann (Ellefson, 2017, s. 301). Lipider varierer mye i den kjemiske strukturen, men i matsammenheng refereres lipidene som regel til triglyserider. Det vil si at den basiske strukturen for fett og oljer er lik, selv om noen er faste og andre er flytende. I dagligtalen brukes derfor gjerne begrepene lipider, fett og olje om hverandre. Triglyserider er bygget opp av tre fettsyrer som via esterbindinger er bundet til et glyserol- molekyl (Figur 1).



Figur 1: Et triglyserid (Pedersen et al., 2010, s. 113)

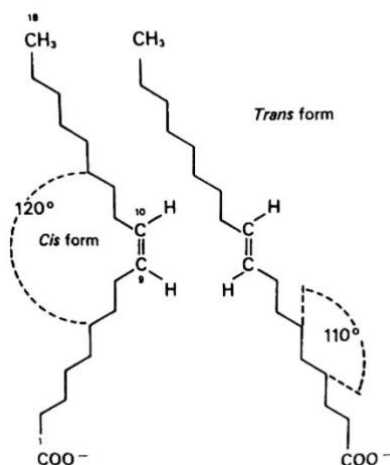


En fettsyre består av en hydrokarbonkjede med en syregruppe (-COOH) i enden (Coulgate, 2016, s. 109-110). Karbon-kjedene er enten mettet, som vil si at den kun består av enkeltbindinger eller umettet, der karbonkjeden har en eller flere dobbeltbindinger. Ved å identifisere antall karbonatomer og dobbeltbindinger med plassering kan man skille de ulike fetttsyrene fra hverandre. Noen vanlige mettede fettstyrer er palmitinsyre (16:0) og stearinsyre (18:0), mens noen vanlige umettede fettstyrer er oljesyre (18:1 ω-9), linolsyre (18:2 ω-6) og α-linolensyre (18:3 ω-3). Det første tallet i parentes angir antall karbonatomer, mens det andre tallet bak kolon angir antall dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden. For å identifisere plasseringen til de ulike dobbeltbindingene ved å benytte omega-systemet (ω) telles det fra første karbonatomet i metylenden (Figur 2).



Figur 2: Fettstyrer karakteriseres ved antall karbonbindinger og dobbeltbindinger, der omega-systemet (B) illustreres (Coulgate, 2016, s. 110).

De to hydrogenatomene bundet på hver side av en dobbeltbinding kan enten sitte på samme (cis) eller motsatt (trans) side av hverandre. De fleste umettede fettstyrer som finnes i plantefett- og oljer er cis-fettstyrer (Pedersen et al. 2010, s.116). Dobbeltbindingene i cis-fettstyrer blir et mer utsatt angrepspunkt på fettstyren fordi de to hydrogenatomene er mer tilgjengelige som vist i Figur 3 (Finley & deMan, 2018 s. 44).



Figur 3: Strukturformel av oljesyre(cis) og eladinsyre(trans) (Pedersen, Hjartåker, Anderssen, 2010, s.116)

Tabell 1 viser smeltepunktet til en rekke fettsyrer, der økende antall dobbeltbindinger og synkende antall karbonatomer i en fettsyre resulterer i et lavere smeltepunkt. Dersom en eller flere dobbeltbindinger opptrer som en cis-dobbeltbinding vil også smeltepunktet synke (Coulate, 2016, s.112).

Tabell 1: Smeltepunkt til relevante fettsyrer. (hentet fra Coulate, 2016, s.114)

<i>Fettsyre</i>		<b>Smeltepunkt (°C)</b>
<i>Palmitinsyre</i>	16:0	62,7
<i>Stearinsyre</i>	18:0	69,6
<i>Oljesyre</i>	18:1 ω-9	10,5
<i>Linolsyre</i>	18:2 ω-6	-5,0
<i>Linolensyre</i>	18:3 ω-3	-11,0

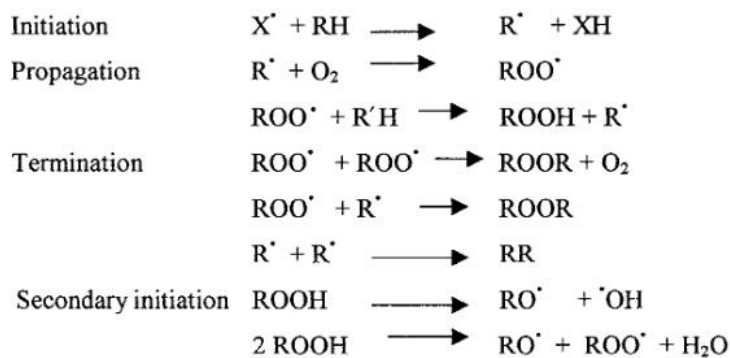
### 2.1.2 Fettsyresammensetningen i linfrø

Lin er en ettårig plante med blå blomster som trives i kaldere klima med mye dagslys. Linfrø er enten brune eller gylne, og begge brukes i matproduksjon avhengig av type produkt (Agricultural marketing resource center, 2022). Knuste linfrø inneholder 42 % fett, 18 % protein og har et fiberinnhold på 27 %. Linolje er den planteoljen med høyest andel umettede fettsyrer, og er den som er rikest på α-linolensyre (18:3 ω-3), der de utgjør 52 % av det totale fettinnholdet (Mattilsynet, 2022).

## 2.2 Harskningsforløpet

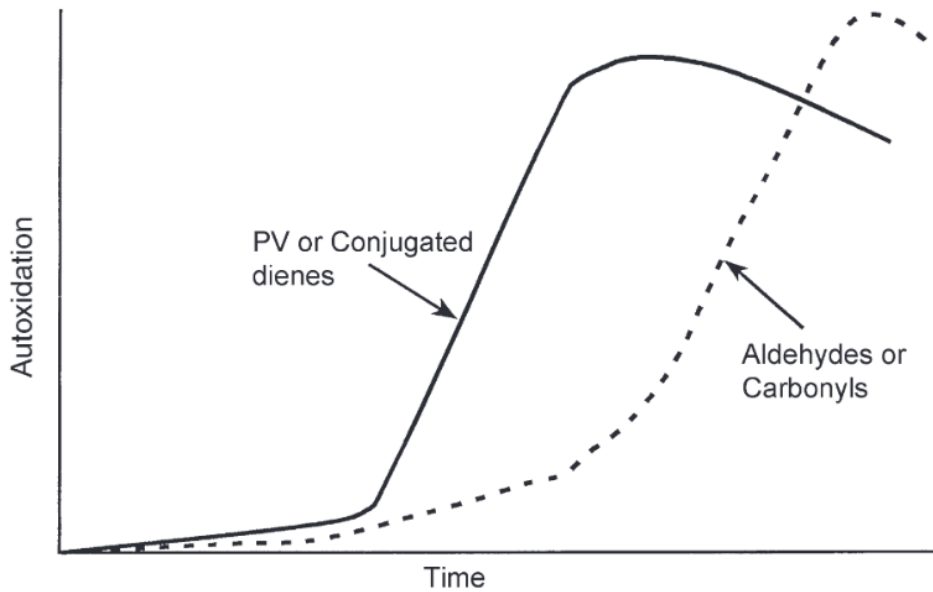
Harskning referer ofte til dårlige lukter og smaker som følge av lipolyse eller lipidoksidasjon. Lipolyse er hydrolyse av fettsyrer fra glyserolmolekylet, mens lipidoksidasjon, også kalt autooksidasjon eller oksidativ harskning, skjer via en fri radikal-mekanisme (Pike & O’Keefe, 2017, s. 418). Nedbrytningen av triglyserider foregår via ulike mekanismer som produserer forskjellige forbindelser avhengig av faktorer som fettsyresammensetningen, prooksidantene den utsettes for (eks. lys, varme og metaller) og antioksidanter til stede.

Autooksidasjon (Figur 4) er en prosess der frie radikaler induseres mellom oksygen og umettede fettsyrer, og skjer via en kjedereaksjon bestående av trinnene initiering, propagering og terminering (Gordon, 2001a, s. 11; Guillén-Sans & Guzmán-Chozas, 1998). Initieringen starter med at et fettsyremolekyl (RH) mister et hydrogenatom, gjerne ved en dobbeltbinding, og det dannes et fettsyreradikal (R·). Ved propagering vil fettsyreradikalet reagere med oksygen og danne et fettsyreperoksidradikal (ROO·) som igjen kan “stjele” et hydrogenatom fra en annen fettsyre og danne et fettsyreperoksid (ROOH). Fettsyreradikalet som dannes vil igjen dannes til et fettsyreperoksidradikal som videre reagerer med en ny fettsyre. Fettsyreperoksidet kan inngå i en initiering og spaltes til et alkylradikal (RO·) og et hydroksylradikal (·OH). Alkylradikalet kan reagere med en ny fettsyre og danne sekundærproduktet alkohol (ROH) og et fettsyreradikal som vil gå tilbake inn i propageringen. Ved terminering avsluttes kjedereaksjonen ved at to radikaler reagerer med hverandre og danner ikke-radikale produkter (Shahidi et al., 2017, s. 519-520).



Figur 4: Trinnene i autooksidasjon; initiering, propagering og terminering (Gordon, 2001a, s.11).

Induksjonsperioden er den tiden det tar før propageringen og produksjonen av fettsyreperoksider kommer i gang. Etter induksjonsperioden begynner dannelsen av primære og sekundære harskningsprodukter (Finley & deMan, s. 79). Som regel dannes de primære oksidasjonsproduktene før de sekundære oksidasjonsproduktene, men i kjedereaksjonen dannes de primære fettsyreperoksidene samtidig som de sekundære (aldehyder og karbonyler) oksidasjonsproduktene (Pike & O'Keefe, 2017, s. 418). Figur 5 viser at utviklingen av primære harskningsprodukter vil nå et maksimum i en tidlig fase, mens de sekundære oksidasjonsproduktene vil dominere ved en senere fase i oksidasjonsforløpet (Frankel, 2005, s.205).



Figur 5: Oksidasjonsforløpet med dannelse av primære og sekundære oksidasjonsprodukter over tid (Frankel, 2005, s.105).

Dannelsen av primære-, sekundære- og tertiære oksidasjonsprodukter kan føre til en uønsket harsk lukt og smak som kan oppleves litt søt, men gradvis bli mer intens og ubehagelig over tid (deMan et al., s. 78). Matvarer med mye flerumettede fettsyrer, spesielt  $\alpha$ -linolensyre er derfor spesielt utsatt for oksidasjon som kan føre til at forbruker ikke ønsker å konsumere produktet. Ved oksidering av disse umettede fettsyrene trengs det betraktelig mindre oksygen til stede enn ved oksidasjon av mettede fettsyrer. Analyser av oksidasjonshastigheten til fettsyrer med 18 karbonatomer i kjeden med null til tre dobbeltbindinger har blitt rapportert å være henholdsvis i forholdet 1:100:1200:2500 (Finley & deMan, s. 81).

### 2.2.1 Dannelse av oksidasjonsprodukter

Fettsyreperoksider som dannes i propageringsfasen, er generelt ustabile og brytes videre ned til frie alkoksy- og hydroksyradikaler (Finley & deMan, 2017, s. 83). Sekundære oksidasjonsprodukter dannes når et alkylradikal reagerer med fettsyrer eller andre stoffer, og danner blant annet aldehyder, ketoner, organiske syrer, hydrokarboner, alkoholer og karbonyler (Finley & deMan, s. 84). Aldehyder som dannes kan bli til kortkjededede flyktige forbindelser, og det er hovedsakelig disse som står for den harske lukten og smaken. Overvåking av vekst- og nedbrytningsfasen av peroksider kan dermed indikere hvor et lipid er i harskningsforløpet (Shahidi et al., 2017, s. 522). Ved starten av propageringsfasen er dannelsen av fettsyreperoksider mye høyere enn nedbrytningen av fettsyreperoksider, som reverseres mot

slutten av propageringsfasen. Overvåkning av initieringsfasen vil i tillegg kunne gi informasjon om stabiliteten til et lipid ved for eksempel tilsetning av antioksidanter. Konsentrasjonen av peroksider kan derfor brukes til å vurdere holdbarhet og kvalitet i et næringsmiddel. Imidlertid har peroksidene ingen betydning for smaksendringer, da denne i sin helhet er forårsaket av de sekundære oksidasjonsproduktene (deMan et al., s. 79). De tertiære forbindelsene er stabile polymere forbindelser som dannes i termineringen av autooksidasjonen.

Oppvarming av olje ved temperaturer over 180 °C, reduserer løseligheten av oksygen, slik at oksygentilgangen blir lavere (Wong, 2018, s. 16). Dette fører til at fettsyreperoksidene som dannes i propageringsfasen brytes raskt ned til en kompleks blanding av produkter. En annen viktig reaksjon som skjer under høy oppvarming, er termisk hydrolyse (Wong, 2018, s. 17). Vann frigjøres fra den oppvarmede maten og fungerer som en nukleofil ved at den bryter ned esterbindingene i triglyseridene. De frie fettsyrene som dannes, og termisk oksidasjon fører til dannelsen av mange flyktige forbindelser som fordamper ut av oljen. Disse flyktige forbindelsene er hovedårsaken til bismak (eventuelt gunstig aroma) i fettholdige produkter som har gjennomgått høy oppvarming. Det dannes også ikke-flyktige forbindelser som vil føre til endringer i oljens fysiske og kjemiske egenskaper.

## **2.3 Oksidativ stabilitet og antioksidanter**

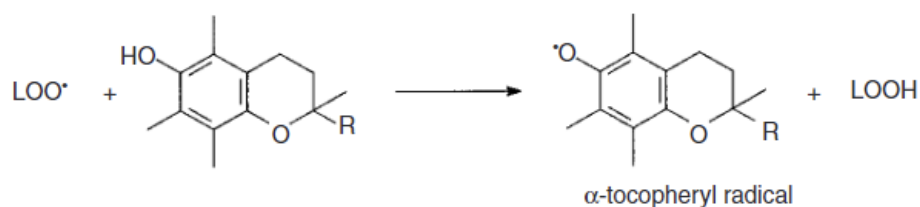
Oksidativ stabilitet kan defineres som motstanden lipider har mot oksidasjon (Pike & O'Keefe, 2017, s. 421). Det finnes flere metoder for å hemme oksidasjonen i næringsmidler på, blant annet ved å fjerne oksygen eller tilsette antioksidanter (Gordon, 2001b, s. 77). Eliminering av oksygen kan gjøres ved å pakke næringsmiddelet i nitrogen eller i vakuum. Reduksjon av oksidasjonshastigheten kan også oppnås ved å unngå å bruke ingredienser som inneholder oksidasjonsfremmende eller oksiderte produkter, eller ingredienser som er naturlig rike på antioksidanter. Noen vanlige antioksidanter er flavonoider, tokoferol (vitamin E) og askorbinsyre (vitamin C), og har vist å ikke gi skadelige virkninger på næringsmiddelets komponenter (Gordon, 2001a, s. 17).

Antioksidanter i mat kan defineres som ethvert stoff som evner å hemme eller forsinke utviklingen av lipidoksidasjon (Gordon, 2001a, s. 17). Tilsetning av antioksidanter før induksjonsperioden bidrar til å forsinke utviklingen i harskningsforløpet, mens tilsetning etter denne perioden har vist seg å være ineffektiv. Antioksidanter kan deles inn i primære og

sekundære antioksidanter, der førstnevnte fungerer ved å fjerne frie radikaler, og kalles radikalfangere. De sekundære antioksidantene gir en indirekte virkning ved blant annet binding av metallioner, fjerning/deaktivering av oksygen, konvertering av fettsyreperoksider til ikke-radikale molekyler og absorbering av lys.

Linfrøoljen inneholder naturlig forekommende hydrokarboner, terpen, alkoholer, steroler, tokoferoler og andre fenoliske komponenter som kan virke oksidasjonshemmende under noen forhold (El-Beltagi et al., 2007, s.187). I linfrøet er lipidene naturlig beskyttet mot oksidasjon ved antioksidanter som lignin, fenoler, tokoferoler og flavonoider. Tokoferoler og flavonoider har en OH-gruppe som kan binde seg til frie radikaler eller metaller.

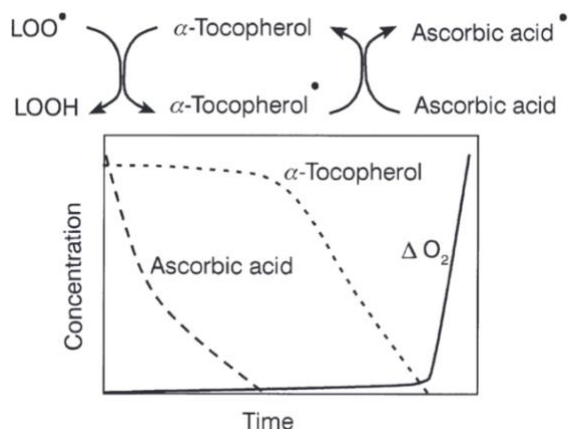
Fenoliske forbindelser som tokoferoler inkluderes blant de primære antioksidantene (Gordon, 2001b, s. 77). Tokoferoler er blant de mest kjente og brukte antioksidanter i matvarer, der den viktigste i denne gruppen er  $\alpha$ -tokoferol som er assosiert med å forsinke nedbrytningen av fettsyreperoksider. Tokoferoler fungerer som antioksidanter ved å donere hydrogen fra sin hydroksylgruppe til peroksyldradikalet (Figur 6), og stabiliserer radikalet som dannes gjennom delokalisering av elektroner over den aromatiske ringstrukturen (Yanishelieva-Maslarova, 2001, s. 44-45). Dette gjør at peroksyldradikalet danner ikke-radikale produkter som stabile peroksider som kan reduseres til tokoferol-dimerer og tokokinoner.



Figur 6:  $\alpha$ -tokoferol som radikalfanger (Yanishelieva-Maslarova, 2001, s.45).

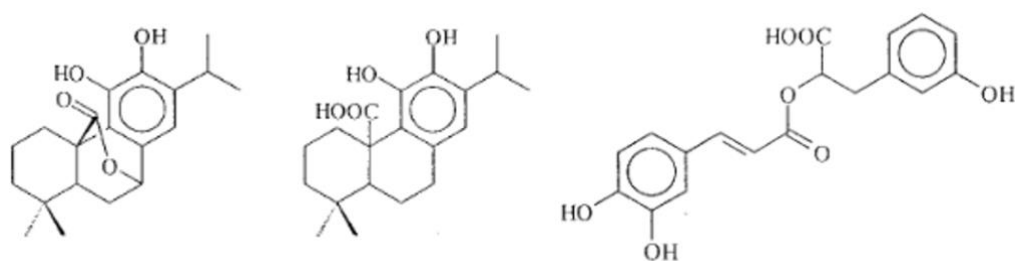
Ascorbinsyre er både en primær og en sekundær antioksidant, og har en synergerende effekt med tokoferol (Figur 7) ved at den kan regenerere tokoferolens antioksidant-egenskaper (Frankel, 2005, s. 228). Den fungerer som en radikalfanger av hydrogenperoksid, hydroksylradikaler og singlett-oksygen i tillegg til at det er en metallbinder og fjerner oksygen. Med høye konsentrasjoner eller tilstedeværelse av metaller i produkter med et høyt innhold av lipid kan askorbinsyre oppføre seg som en prooksidant (Frankel, 2005, s.117) Askorbinsyre blir brukt i produksjon av lyse brød hos brødprodusenter, da det er med på å skape en hvitere

krumme. Ved høy varmebehandling vil askorbinsyren brytes ned, og dermed kun fungere som en antioksidant frem til brødet stekes (Coultate, 2016, s. 221).



Figur 7: Illustrasjon av askorbinsyre og  $\alpha$ -tokoferol med en synergerende effekt under lipidoksidasjon (Frankel, 2005, s. 228)

Urter har tradisjonelt sett blitt benyttet som smaksforsterker i mat eller for å kamuflere uønsket lukt eller smak (Coultate, 2016, s.136). I senere år er det dokumentert at flere urter er rike på en rekke antioksidanter, der blant annet rosmarin inneholder karnosol, karnosinsyre og rosmarinsyre (Figur 8). Rosmarinsyre og karnosinsyre har vist seg å være mer effektiv som antioksidant i rene oljer, mens karnosol i emulsjoner av olje i vann (Yanishlieva-Maslarova, 2001, s.55). Karnosinsyre og karnosol har en evne til å binde jern og fjerne frie radikaler (Yanishlieva-Maslarova, 2001, s. 230). Rosmarinekstrakt benyttes som regel i kjøttprodukter der de bidrar til smak og økt holdbarhet, men det er også et tilsetningsstoff som kan benyttes i matvarer som skal merkes med *økologisk*. Tilsetning av rosmarin kan være uønsket i noen matvarer da den har en intens lukt og smak.



Figur 8:Karnosol til venstre, etterfulgt av karnosinsyre og rosmarinsyre. (Yanishlieva-Maslarova, 2001, s.230)

## 2.4 Helseeffekter av oksidasjonsprodukter

De essensielle fettsyreene er de kroppen ikke kan produsere selv. Kroppen har enzymer som kan forlenge eller forkorte fettsyrer, men kan ikke produsere dobbeltbindinger i  $\omega$ -3 eller  $\omega$ -6-posisjon (Pedersen et al., 2010, s.116-117). Det er derfor nødvendig å få tilført disse gjennom kosten da de spiller en viktig rolle for dannelse av cellemembraner og i nervevev, samt at de er forstadier til ulike hormonlignende signalmolekyler og prostaglandiner.

Helsemyndighetene anbefaler et kosthold med økt inntak av flerumettede fettsyrer. Rapport fra Helsedirektoratet (2011, s. 145), *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer*, viser til studier der blant annet reduksjon av mettede fettsyrer til fordel for umettede fettsyrer i kosten har en gunstig helseeffekt, og gir blant annet en forebyggende virkning mot hjerte- og karsykdommer. Imidlertid kan oksidasjonsprodukter fra matvarer med flerumettede fettsyrer påvirke mattryggheten og forbrukernes helse. Noen av disse oksidasjonsproduktene er kjent for å ha en viss form for toksisitet, og kan være svakt karsinogene (Schaich, 2013, s. 43).

Fettsyreperoksider som blir inntatt gjennom kosten metaboliseres raskt i slimhinnene i tynntarmen til forskjellige oksysyrer og oksideres deretter til karbondioksid. Høye konsentrasjoner kan derimot gi skader på slimhinnen og potensielt føre til dannelse av svulster (Gurr et al., 2016, s. 232). Harskning av flerumettede fettsyrer kan også føre til dannelse av en gruppe reaktive umettede forbindelser av aldehyder som 4-hydroksey-2-nonenal og ketoaldehyder som malondialdehyd (Guéraud. 2015, s. 388-389). Disse forbindelsene har en molekylstruktur som er spesielt utsatt for nukleofilt angrep, og kan derfor være reaktive til å danne kovalente bindinger med kroppens proteiner, DNA og fosfolipider. Epoksider har vist seg å være mer giftige enn aldehyder ettersom de raskere reagerer med DNA og proteiner, mens dimerer og polymerer har redusert fordøyelighet og kan skade tarmslimhinnen (Schaich, 2013, s. 43).

Det er vist at nedbrytningsprodukter av hydroperoksider kan absorberes i kroppen og være giftige. For eksempel er det stor sannsynlighet for at lipidperoksidasjon i arterieveggene kan bidra til utvikling av aterosklerose, men det er imidlertid ikke bevist at disse oksiderte lipidene har en direkte sammenheng fra kostholdet (Gurr et al., 2016, s. 232).

Det er usikkerheter hvorvidt lipidoksidasjonsprodukter er giftige for mennesker. På dyr har det blitt undersøkt målbare, negative helseeffekter som kan forårsakes av lipidoksidasjonsprodukter (Coulate, 2016, s. 132). Felles for flere av disse undersøkelsene



resulterer i mangel på vitamin E og linolsyre, der det antas at et høyt opptak av oksidert fett overdøper kroppens naturlige antioksidant-systemer. Et forsøk på rotter som fikk dietter beriket med sekundære oksidasjonsprodukter viste at de fikk forstørrede lever, økt konsentrasjon av malondialdehyd, peroksider og andre karbonylforbindelser. Dyr som benyttes i eksperimenter får en høyere dose av oksidert fett i forhold til kroppsvekt og levetid, som derfor kan resultere til flere eller mer alvorlige symptomer enn hva mennesker ville fått. Derfor kan det være vanskelig å fastslå konsekvensene av oksidert fett i kostholdet til mennesker.

## **2.5 Metodologisk aspekt**

Ved analysering av harskning kan man følge kjemiske endringer i en gitt lipidprøve over tid ved å sammenligne en kontrollprøve med prøver ved forskjellige oksidasjonstrinn som har blitt utsatt for visse oksidasjonsbetingelser (Eldin, 2010, s. 181). Dette kan derfor gi en indikasjon på ulike antioksidanters virkning og effektivitet mot dannelse av oksidasjons-produkter; dermed forlengelse av holdbarhet og kvalitet. Bestemmelse av harskningsforløpet må kombineres med flere metoder for å kunne bestemme grad av oksidativ stabilitet; minst en metode som måler primære oksidasjonsprodukter (f.eks. peroksidverdi), og en som måler sekundære oksidasjonsprodukter (f.eks. TBARS). Det kan være tidkrevende å bestemme oksidativ stabilitet ved testing av holdbarhet under lagring, og det er derfor utviklet akselererte tester for å fremskynde lipidoksidasjonen kunstig for å evaluere den oksidative stabiliteten i ulike lipidholdige matvarer. Dette kan for eksempel gjøres ved å utsette prøvematerialet for varme, oksygen eller lys. Imidlertid oppstår et problem når det bare er antagelser at de induerte reaksjonene er de samme som oppstår under faktiske normale forhold. (Pike & O’Keefe, 2017, s. 421)

### **2.5.1 Ekstrahering av fett og analyse av fettsyresammensetning**

Ved analyse av fett i matvarer er det vanligvis nødvendig å ekstrahere lipidene før en analyse. Det finnes en rekke metoder for ekstraksjon av fett og for å analysere fettsyreprofilene. Den mest kjente metoden for ekstraksjon er “Folch”-ekstraksjonen som benytter en kombinasjon av kloroform og metanol for å ekstrahere lipider. For analyse av fettsyreprofil er gasskromatografi den mest benyttede metoden.

“Bligh and Dyer” er en modifisert metode av Folch-ekstraksjonen (Ellefson, 2017, s. 306). I prosedyren homogeniseres prøver med løsninger av kloroform og metanol. Ved sentrifugering

vil løsningen deles i tre faser; en vannløselig metanolfase, en fase med uløselige stoffer og en kloroformfase hvor lipidene er løst. Ved fordamping av kloroformfasen vil det kun være lipider som er gjenværende og fettene kan kvantifiseres. For nøyaktige resultater krever det imidlertid at prosedyrene må følges nøye, for eksempel forholdet mellom kloroform og metanol.

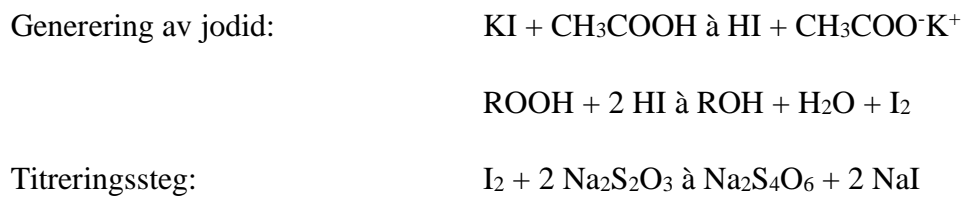
Gasskromatografi (GC) benyttes ofte til å separere kjemiske komponenter i gass eller løsninger. Komponenter av ulike fysiske og kjemiske egenskaper som for eksempel ledningsevne, molekylvekt eller kokepunkt vil med en bæregass bevege seg igjennom systemet med ulik hastighet. På den måten vil ulike stoffer separeres og detekteres slik at de kan identifiseres og kvantifiseres. Organiske stoffer som passerer et forbrenningskammer, vil danne ioner som detekteres ved hjelp av signaler. Tiden det tar fra prøven blir injisert til den blir detektert i forbrenningskammeret kalles for retensjonstid. Retensjonstiden benyttes til å identifisere stoffene i forhold til en kjent prøve, mens toppens areal benyttes til å kvantifisere mengdeforholdet av de ulike stoffene i prøvematerialet.

Fettsyresammensetning eller fettsyreprofilen til et matprodukt bestemmes ved å kvantifisere typen og mengden fettsyrer, vanligvis ved å ekstrahere lipidene og analysere dem ved hjelp av en kapillær gasskromatograf (GC). For å øke flyktigheten før analysen transestifiseres triglyserider vanligvis for å danne fettsyremetylestere (FAME) (Pike & O'Keefe, 2017, s. 423). GC kan være en spesifikk metode for å kvantifisere de sekundære oksidasjonsproduktene som danner flyktige forbindelser i næringsmidler, eller dannelsen av oksidasjonsprodukter ved å identifisere degradering av flerumettede fettsyrer (Kilcast, 2011, s. 390).

### **2.5.2 Peroksidverdi**

Peroksidverdi (PV) er definert som milliekvivalenter (meq) peroksid per kilogram prøve, og bestemmes ved at forbindelsene i prøven reagerer på visse betingelser under redokstitrering. Testen for PV måler forbigående produkter av oksidasjon, der peroksider dannes og brytes ned til andre produkter. Under harskningsforløpet øker peroksidverdier målt i en gitt prøve lagret over tid, for så å reduseres. Peroksidverdier over 20 indikerer som oftest dårlig kvalitet på fett og oljer med betydelig bismak, men dette varierer avhengig av type fett (Pike & O'Keefe, 2017, s. 419). For eksempel vil soyaolje med tilsvarende peroksidverdier på 1–5, 5–10 og >10 indikere henholdsvis lave, middels og høye nivåer av oksidasjon.

Peroksidverdien bestemmes ved at oljen tilsettes kaliumjodid i en eddiksyre-kloroformblanding (Gordon, 2001b, s.77). Fettsyreperoksidene (ROOH) oksiderer jodid (HI) til jod ( $I_2$ ), og mengden bestemmes ved titrering mot natriumtiosulfat (Figur 9).



Figur 9: Generering av jodid (AOCS, 2003)

PV bør ikke brukes som metode for å vurdere forringelsen av oljer som brukes til steking, da fettsyreperoksid spontant spaltes ved temperaturer over 150°C (Gordon, 2001b, s. 77). Den målte peroksidverdien vil da mer være en indikasjon på kjølings- og lagringsforholdene etter steking enn oksidasjonsproduktene dannet under steking.

### **2.5.3 Tiobarbitursyre-reaktive stoffer**

Testen for tiobarbitursyre-reaktive stoffer (TBARS) måler sekundære harskningsprodukter, først og fremst malondialdehyd, ved hjelp av en spektrofotometrisk metode. Malondialdehyd dannes som et oksideringsprodukt fra flerumettede fettsyrer med tre dobbeltbindinger. Tiobarbitursyre (TBA) reagerer med malondialdehyd til en rosa forbindelse som kan måles spektrofotometrisk ved 532-535 nm (Kilcast & Subramaniam, 2011, s.398). Under den sekundære fasen av autooksidasjon dannes det andre aldehyder, ketoner, estere og ketosteroider som også reagerer med TBA (Guillén-Sans & Guzmán-Chozas, 1998).

Ved bruk av en standardkurve kan de avleste absorpsjonsene fra prøvene konverteres til milligram TBARS per kilogram prøve. I likhet med testen for PV, er TBARS et mål på forbigående oksidasjonsprodukter, men studier har vist at testen for TBARS korrelerer bedre med sensorisk evaluering av harskning enn det gjør for PV (Pike & O'Keefe, 2017, s. 420). Næringsmidler med over 1-2  $\mu\text{mol}$  TBARS/g olje vil mest sannsynlig gi en harsk smak og lukt (Kilcast, 2011, s. 389).

### **2.5.4 Usikkerheter i kjemiske målemetoder**

I prinsippet er det mulig å overvåke oksidasjonstilstand eller antioksidantaktivitet ved å måle tap av fettsyrer, eller dannelse av oksidasjonsprodukter (Gordon, 2001b, s. 72). Imidlertid vil det i praksis være en vanskelig vurdering, siden de ulike komplekse forbindelsene som dannes avhenger av en rekke faktorer som innholdet av komponenter til stede og fysiske påvirkninger som temperatur. Det er derfor viktig å ta en riktig beslutning på hvilke forbindelser som skal overvåkes under analysene for å kunne bestemme harskningsgraden.

## 2.6 Sensoriske analysemetoder

Sensoriske tester brukes ofte i utvikling av produkter, og kan gi svar på kvalitetsparametere man ikke får målt ved kjemiske analyser. Det er bare ved bruk av de menneskelige sansene man kan få et helhetlig bilde (den totale sensoriske opplevelsen) av hvordan et produkt oppleves. Det er tre hovedgrupper av sensoriske tester; forskjellstester, kvantitative tester og forbrukertester (Heymann & Lawless, 2010, s. 5, SSG, 2015, s.78). Forskjellstester og kvantitative tester er analytiske metoder som utføres for å finne produktforskjeller eller forskjeller i spesifikke sensoriske egenskaper, og utføres som regel av et trent panel. En forbrukertest er en affektiv eller hedonisk metode hvor forbruker gir uttrykk for sine subjektive meninger om produktet.

### 2.6.1 Forbrukeranalyser

For å måle forbrukeres subjektive meninger om produktet benyttes ofte preferansetest eller aksepttest (Heymann & Lawless, 2019, s. 325-326). En preferansetest går ut på at forbruker skal velge et produkt over et annet. Testen gir svar på hvilke produkter som oppfattes som best, men ikke i hvilken grad forbrukere liker eller misliker produktet. Ved en aksepttest skal forbruker plassere produktet på en hedonisk skala, og man får da svar på hvor godt forbrukerne faktisk liker produktet, i tillegg til hvilket produkt som blir best likt. Fordi man får mer informasjon ut av en aksept-test anses den som et bedre valg enn en preferansetest.

#### 2.6.1.2 Sensoriske prinsipper ved aksepttest

Den hedoniske skalaen ble utviklet på 40-tallet og går ut på å plassere et produkt på en balansert skala, ofte merket fra *liker ikke i det hele tatt* til *liker veldig godt* (Figur 10). Det vanligste er en 9-punktsskala, men det finnes også skalaer med 5, 7 eller 11 punkter (SSG, 2015, s.123-124). Fordi det gjerne er stor variasjon i svarene man får bør man ha mange deltagere for å sikre statistisk signifikans, og det er vanlig med mellom 75 og 150 forbrukere (Heymann & Lawless, 2010, s. 7-8).



Figur 10: Et eksempel på en 9-punkts hedonisk skala som brukes til aksepttest. Skalaen går som fra 1 til 9, der 1 er liker ikke i det hele tatt og 9 er liker veldig godt (SSG, 2015, s. 124)

Det har blitt forsket mye på 9-punktsskalaen og det har vist seg at svarene fra forbruker ikke påvirkes av skalaens utforming, og at den har vist seg å være veldig pålitelig og har en høy svarstabilitet som er uavhengig av område eller størrelse på panelet (Heymann & Lawless, 2010, s.327). En annen grunn til at 9-punktsskalaen fungerer så godt er fordi den har flere punkter som er en fordel da forbrukeren gjerne unngår å bruke ytterpunktene av skalaen (SSG, 2015, s. 124-125). På den måten vil man også i større grad unngå at forbrukeren benytter seg av skalaens midtpunkt, og man vil oppnå en differensiering av produktene.

Ved en sensorisk test merkes alle prøvene med en tresifret kode for at forbrukeren som skal bedømme produktene ikke skal bli påvirket av informasjonen om produktet (Heymann & Lawless, 2010, s.66). Dersom en forbruker vet at et produkt er mer eksklusivt vil man gjerne gi en høyere vurdering enn til et billigere produkt.

I alle sensoriske tester er det viktig med en balansert serveringsrekkefølge som betyr at hver serveringsrekkefølge skal serveres et likt antall ganger (Heymann & Lawless, 2010, s.72). Balanseringen er spesielt viktig fordi dommers opplevelse av den første prøven kan påvirke opplevelsen, og dermed vurderingen av de neste prøvene, en såkalt “carry-over”-effekt (MacFie et. al., 1989). Denne effekten er spesielt vanlig i forbrukerundersøkelser.

Ved gjennomføringen av sensoriske tester er det viktig å rense ganen før og mellom hver av prøvene for å sikre at minst mulig smak sitter igjen fra tidligere prøver (Heymann & Lawless, 2010, s. 65-66). Det er derfor vanlig å be forbruker skylle munnen med vann. I de fleste tester skal man unngå å svelge prøven fordi det kan påvirke bedømmelsen av produktet. I forbrukertester er det derimot akseptert å svelge produktet fordi det er sånn man ellers konsumerer produkter. Det viktigste ved en forbrukertest er derimot at forbruker gjør det samme på alle prøvene slik at prøvene vurderes med samme forutsetning.

I en forbrukertest vil svarene som blir gitt være dommerens opplevelse av produktet, og påvirkes av blant annet forventning (SSG, 2015, s. 72). Dommeren assosierer gjerne en prøve eller egenskapene ved en prøve med en viss smak. Et eksempel er forventningen om at lys saft er mindre søt enn mørk saft. På samme måte vil forbruker ha en forventning til hvordan et brød skal smake, og vil vurdere produktet deretter. I en studie gjennomført av Laureati et al. (2012) om testing av glutenfritt brød var det ingen signifikant forskjell i hvordan cøliakere og ikke-cøliakere vurderte aksepten på brødet.

Forbrukerens besvarelse samles inn på papirskjema eller elektronisk. Resultatene fra en aksepttest viser hvor godt produktene i testen ble likt (ut fra valgt hedonisk skala), og man gjør vurderinger ut fra gjennomsnittlig verdi for hver prøve og standardavviket. For å undersøke om det er signifikant forskjell i aksept mellom to prøver kan man benytte en t-test (Heymann & Lawless, 2010, s.328). Før gjennomføringen settes det opp et hypotesesett. Hypotesesettet inkluderer en null-hypotese  $H_0$ , og en alternativ hypotese  $H_A$  og kan for en aksepttest settes opp som vist i Figur 11.

**$H_0$ :** Det er ikke forskjell i grad av aksept mellom prøve A og prøve B

**$H_A$ :** Det er forskjell i grad av aksept mellom prøve A og prøve B

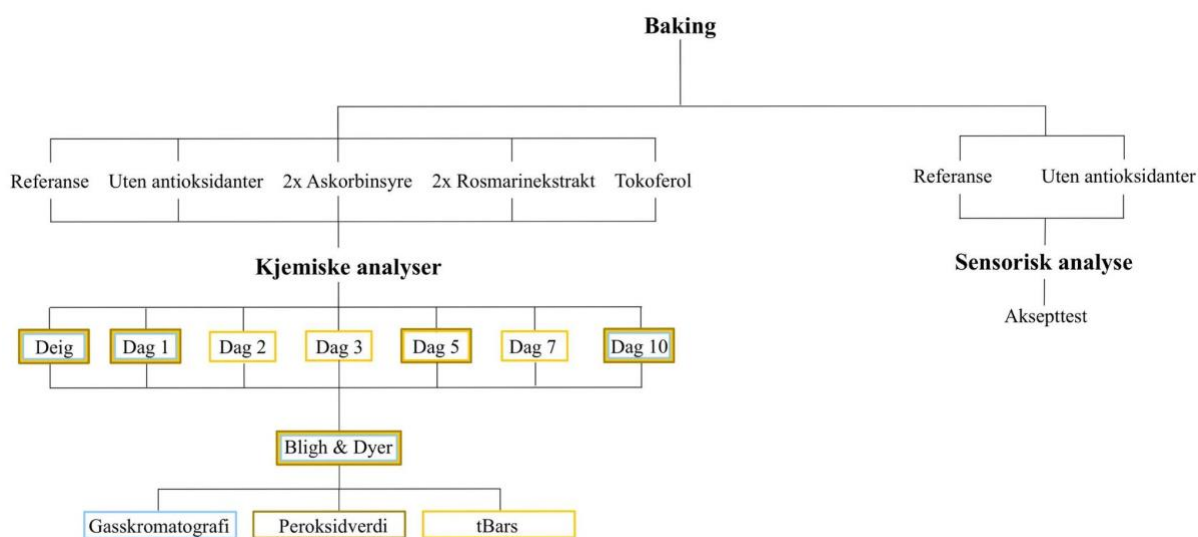
*Figur 11: Et hypotesesett bestående av en null-hypotese  $H_0$ , og en alternativ hypotese  $H_A$ . (Produsert av Jensen, 2022)*

T-testen vil gi en p-verdi som bestemmer om man kan forkaste  $H_0$ , og ved hvilken grad av sikkerhet (Løvås, 2018, s. 266-268). Om p-verdien blir beregnet til 0,05 betyr det at  $H_0$  kan forkastes med 95 % sikkerhet, og at det er 5 % sannsynlighet for at  $H_0$  forkastes på feil grunnlag.

## 3.0 Materialer og metoder

### 3.1 Forsøksdesign - Flytskjema

Alle brød for denne oppgaven ble produsert med samme fremgangsmåte basert på resept mottatt av Linbakst. Resepten mottatt fra Linbakst inneholdende rosmarinekstrakt og askorbinsyre ble kalt “referanse”. For kjemiske analyser ble det produsert fem batcher med ulike mengder og typer antioksidanter, hvorav to av disse ble videre benyttet til sensorisk analyse. De fem ulike batchene var referansebrød, brød uten tilsatt antioksidanter, brød med dobling av mengden askorbinsyre, brød med dobling av mengden rosmarinekstrakt og brød tilsatt tokoferol, vist i flytskjema i Figur 12.



Figur 12: Flytskjema

I hver batch til de kjemiske analysene ble det produsert tre brød som utgjorde tre paralleller, og en deigprøve ble tatt ut av hver batch før steking. Linfrø ble også kvernet til en frømel-prøve som ble analysert ved GC for å undersøke degradering av fettsyrer fra råvaren til det ferdige produktet. En brødslike fra hver parallell ble pakket i nitrogen (N<sub>2</sub>) med en pakke-maskin (Advanced Vakuum Packaging system, Webomatic) og deretter fryst ned ved -20 °C for videre kjemiske analyser. For hver batch ble det pakket totalt seks poser som senere ble tatt ut og åpnet 1, 2, 3, 5, 7 og 10 dager før videre analyser og lagret i kjøleskap ved 1°C. For å kontrollere at alle brødene ble pakket under samme forhold, ble gassammensetningen målt (Vedlegg 2) ved hjelp av gassanalysator (CheckMate 9900, PBI Dansensor). For sensoriske analyser ble det bakt to nye batcher av referansen og brød uten tilsatt antioksidanter. I hver batch ble det produsert fire brød som utgjorde 82 prøver til en forbrukertest.



## 3.2 Kjemiske analyser

Kjemiske analyser ble først utført ved fett ekstraksjon, og deretter ble det ekstraherte fett videre brukt i analyser for gasskromatografi, PV og TBARS.

### 3.2.1 Ekstraksjon av fett ved Bligh & Dyer

Fettet fra brødene ble ekstrahert ved bruk av makro-metoden Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959, s. 911-917). Mengde prøvemateriale av brødet krumme ble modifisert ved å måle vanninnholdet (Vedlegg 3) som ble benyttet i beregning (Formel 1).

*Formel 1: Formel for beregning av mengde lipid i kloroformfasen.*

$$\text{mengde prøve [g]} = \frac{5,33 \text{ cm}^3 \text{ vann} \cdot \rho_{\text{vann}} [\text{g/cm}^3]}{\% \text{ vanninnhold, prøve}} \cdot 100 \%$$

Det ble veid opp 12,8 g prøvemateriale i en sentrifugekopp på 200 mL og tilsatt 16 mL avionisert vann (H<sub>2</sub>O), 40 mL metanol (MeOH, VWR, Frankrike) og 20 mL kloroform (CHCl<sub>3</sub>, VWR, Polen). Blandingen ble homogenisert i to minutter ved hjelp av dispergering (UltraTurrax, IKA) under isbad. Deretter ble ytterligere 20 mL CHCl<sub>3</sub> tilsatt, og blandingen ble homogenisert i 40 sekunder, før 20 mL H<sub>2</sub>O ble tilsatt og homogenisert i 30 sekunder (Figur 13).



*Figur 13: Dispergeringsoppsettet (Foto: Lier, 2022)*

Prøveblandingen ble deretter sentrifugert (Rotina 420R, Hettich) i 15 min ved 4 °C og 4800 rpm. Etter sentrifugeringen ble den nederste væskefasen, kloroformfasen (Figur 14), pipettert ut og fryst ned ved -20 °C inntil videre analyser.



Figur 14: Sentrifugekopper med kloroform og lipider i den nederste fasen (Foto: Jensen, 2022)

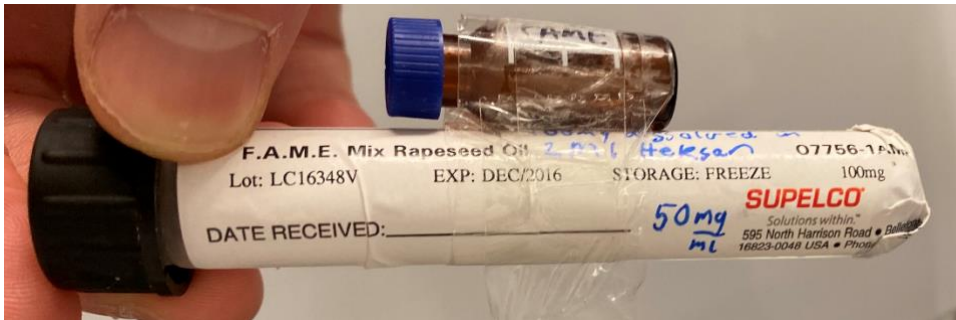
### 3.2.2 Analyse av fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen ble bestemt ved hjelp av gasskromatografi.

Kloroformfase fra B&D ble fordampet ved 60 °C under nitrogen (N<sub>2</sub>) før oljeprøver på 0,6 g ble tilsatt 3 mL metanolisk kaliumhydroksid (KOH, 0,5 M), og mikset på vortex-mikser i 20 sekunder. Prøvene ble deretter oppvarmet ved 70 °C i 20 minutter til alt fett ble forsåpet, mens rørene forsiktig ble ristet hvert femte minutt.

Etter forsåpning ble prøvene avkjølt, tilsatt 5 mL metanolisk bortrifluorid-etyleterat (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>BF<sub>3</sub>O, 0,92 M), og varmet ytterligere 5 min. Løsningen ble avkjølt, og 2 mL n-butylacetat (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) ble tilsatt mens blandingen forsiktig ble ristet. Mettet natriumklorid-løsning (NaCl) ble tilsatt slik at væske-nivået omtrent lå 1 cm fra toppen, og vannfri natriumsulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merch, Tyskland) ble drysset gjennom den organiske fasen. Etter omtrent 30 minutter ble det tilsatt heksan (H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, VWR, Polen).

Prøvemateriale, 1 µl av den vannfrie organiske fasen, ble injisert med en gaskromatograf (Agilent 6850, Agilent Technologies) med kolonne HP-1 Methyl Siloxane, 30 m x 0,25 µm. Hydrogen (H<sub>2</sub>) ble benyttet som bæregass ved en ovnstemperatur på 140-260 °C. Temperatur ved fordammingsinjektor og flammeionisasjonsdetektor ble satt til henholdsvis 300 °C og 250 °C. Retensjonstider for oljeprøvene ble deretter sammenlignet med en kjent standardprøve (F.A.M.E Mix Rapeseed oil, Supelco, USA) for bestemmelse av fettsyrer (Figur 15), og fettsyresammensetningen ble beregnet (Formel 2) ved hjelp av toppenes areal.



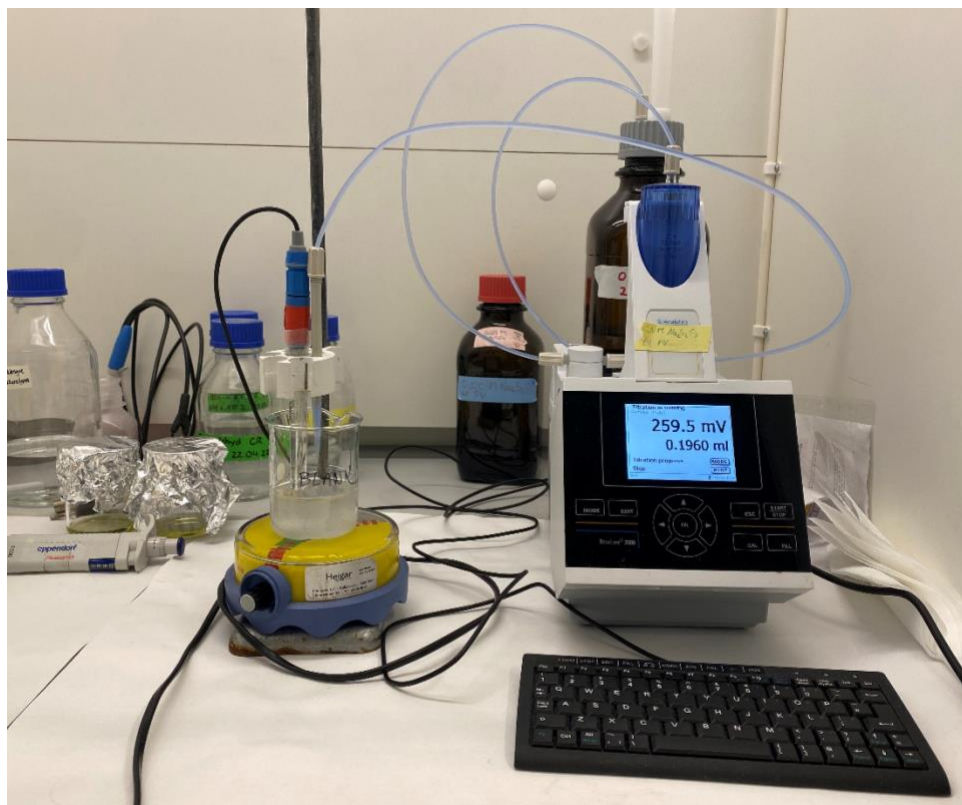
Figur 15: Standardprøven F.A.M.E. Mix Rapeseed oil (Foto: Lier, 2022)

Formel 2: Formel for beregning av % fettsyre

$$\% \text{ fettsyre} = \frac{\text{areal av } x \text{ topp} \cdot 100 \%}{\text{totalt areal}}$$

### 3.2.3 Peroksidverdi (PV)

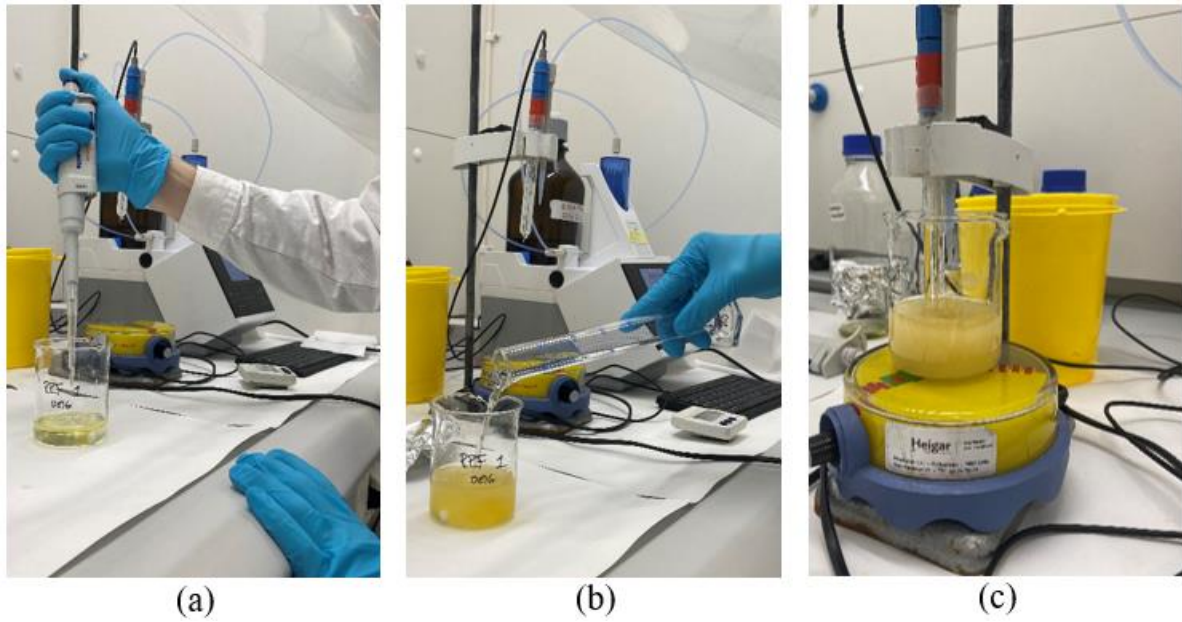
For å bestemme primære harskningsprodukter ble metode for peroksidverdi benyttet (AOCS, 2003). Peroksidverdien ble målt ved jodometrisk titrering med SI analytisk titrator (TitroLine® 6000, SI Analytics) (Figur 16).



Figur 16: Oppsett av TitroLine® 6000 (Foto: Lier, 2022)

KI-løsning (4,6 M) ble laget senest 30 minutter før analysen ble gjennomført. Kloroformfase på 12 mL fra B&D ble tilsatt 0,5 mL KI-løsning og 18 mL eddiksyre ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , VWR, Frankrike) og  $\text{CHCl}_3$  med blandingsforhold 3:2. Løsningen ble blandet i 60 sekunder før det ble tilsatt 30 mL destillert vann ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Prøven ble deretter auto-titrert med natriumtiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,01 M) til ekvivalenspunktet (Figur 17). Mellom hver parallell ble både elektroden og magneten til røring skylt med  $\text{H}_2\text{O}$ . Blankprøve bestod av 30 mL av løsningen med  $\text{CH}_3\text{COOH}$  og  $\text{CHCl}_3$ , 0,5 mL KI-løsning (KI, Merck KGaA, Tyskland) og 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

For hver prøve ble PV (meqO<sub>2</sub>/kg olje) beregnet (Formel 3). For statistiske beregninger ble det først benyttet en-faktors variansanalyse i Excel for å undersøke om det var en signifikant forskjell mellom de ulike batchene. Videre ble det utført en t-test med antatt like varianser for å spesifikt se hvilke batcher som skiller seg fra referansebrødet.



Figur 17: Viser (a) tilsetning av KI-løsning i kloroformprøven, (b) tilsetning av vann etter første røring og (c) automatisk pipettering til ekvivalenspunktet. (Foto: Lier, 2022)

Formel 3: Formel for beregning av PV(meqO<sub>2</sub>/kg olje)

$$PV \left( \frac{m_{eqO_2}}{kg \text{ oil}} \right) = \frac{(V-B) \times T \times M \times F_1}{w \times F_2}$$

V = volum av titrant brukt i jodometrisk titrering av prøven (mL)

B = Volum av titrant brukt i jodometrisk titrering av blankprøven (mL)

T = Titrant (0,001 M) (mol/L)

M = Molaritet (100)

F<sub>1</sub> = F<sub>2</sub> = 1

w = vekt av oljeprøve

### 3.2.4 Bestemmelse av sekundære harskningsprodukter

Metoden tBars ble brukt for å bestemme de sekundære harskningsproduktene.

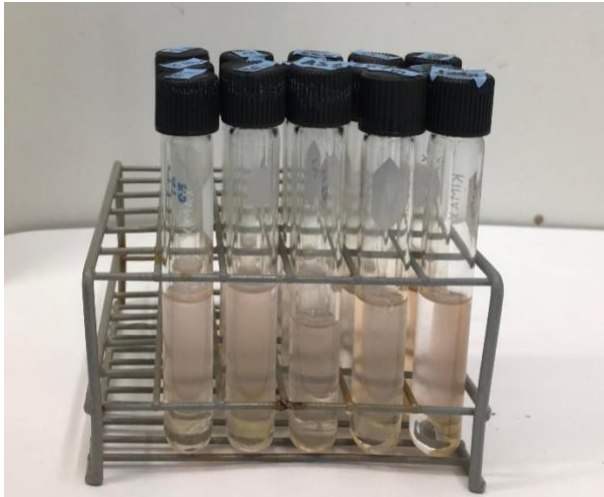
På forhånd ble det laget en tet-butylalkohol-løsning (TBA-stock-løsning), en trikloreddiksyre-løsning (TCA-løsning, 0,28 M) og en 1,1,3,3-tetraetyoksypropan-løsning (TEP-løsning, 0,1 mM) som ble oppbevart på kjølerom frem til bruk. På analysedagen ble det forberedt tet-butylalkohol-arbeidsløsning (TBA arbeidsløsning).

For å lage en standardkurve ble TEP-løsningen (0,1 mM) brukt og i tre paralleller ble det tilsatt 0(blank), 10, 30, 50, 100, 150, og 200  $\mu\text{L}$  av løsningen (Figur 18). Fremgangsmåten var den samme som for resten av lipidprøvene.



Figur 18: Kimaxrør med ulike mengder TEP-løsning som utgjorde standardkurven (Foto: Jensen, 2022)

Fett ekstrahert i kloroform ved hjelp av B&D, 200  $\mu\text{L}$ , ble tilsatt i kimaxrør. I alle prøvene ble 5 mL av TBA arbeidsløsningen tilsatt og blandet i 15 sekunder på vortexmikser. Blandingen ble deretter inkubert i vannbad ved 90 °C i 45 minutter før avkjøling i kaldt vannbad. Avkjølte prøver ble tilsatt 2,5 mL av TCA-løsningen, vendt forsiktig et par ganger og sentrifugert (Multifuge X1R, Thermo Scientific) i 10 minutter på 2500 rpm ved romtemperatur. Det øverste sjiktet (Figur 19), ble pipettert over i kyvetter (Figur 20), og målt spektrofotometrisk på 538 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec).



Figur 19: Kimaxrør etter sentrifugering, der det øverste sjiktet ble pipettert ut (Foto: Jensen, 2022)



Figur 20: Fettfasen pipettert over i kyvetter. Prøveparallell tre (øverst) til en, med prøver fra venstre: referanse, uten antioksidanter, dobbel askorbinsyre, dobbel rosmarinestrukt og tokoferol, alle fra dag 7. (Foto: Lier, 2022)

Hver prøve ble beregnet (Formel 4), og videre benyttet for statistiske beregninger. Det ble først gjennomført en en-faktors variansanalyse i Excel for å undersøke om det var en signifikant forskjell. Videre ble det utført en t-test med antatt like varianser for å spesifikt se hvilke batcher som skiller seg fra referansebrødet.

Formel 4: Formel for beregning av TBARS ( $\mu\text{mol TBARS/g olje}$ )

$$\frac{\mu\text{Mol TBARS}}{\text{g lipid}} = \frac{A_s - I}{S \times L \times 1000}$$

$A_s$  = Absorbans av prøve

$I$  = Skjæringspunkt, standardkurve

$S$  = Stigningstall, standardkurve

$L$  = Lipidinnhold, i 12 mL kloroformfase

### 3.3 Sensorisk analyse

For å undersøke grad av aksept for referansebrød og brød uten tilsatte antioksidanter, og forskjell i aksept mellom disse, ble det gjennomført en forbrukertest (n=82). Det ble satt opp et hypotesesett med en 0-hypotese og en alternativ hypotese Figur 21.

**H<sub>0</sub>:** Det er ingen forskjell i grad av aksept mellom referansebrødet og brødet uten antioksidanter.

**H<sub>A</sub>:** Det er forskjell i grad av aksept mellom referansebrødet og brødet uten antioksidanter.

Figur 21: Hypotesesettet som ble satt opp, med en 0-hypotese og en alternativ hypotese.

#### 3.3.1 Gjennomføring av aksepttest

Fire referansebrød og fire brød uten tilsatt antioksidanter ble bakt to dager i forkant av analysen. Brødene ble skjært i skiver med tykkelse på omtrent 1 cm. Ved hjelp av en rund utstikkerform med diameter 3,5 cm ble det trykket ut to prøver av hver skive, som ble pakket i poser med nitrogen (N<sub>2</sub>), vist i Figur 22.



Figur 22: Brødprøvene som ble pakket i nitrogen til aksepttesten. (Foto: Lier, 2022)

Et svars skjema for undersøkelsen ble laget med programvaren EyeQuestion® (Vedlegg 4). Det ble benyttet en 9-punktsskala for å undersøke aksept for lukt og smak. Prøvene ble markert med hver sin tresifrede kode, kode 919 for referansebrødet, og kode 318 for brød uten antioksidanter. Det ble preparert 82 prøver av hver.

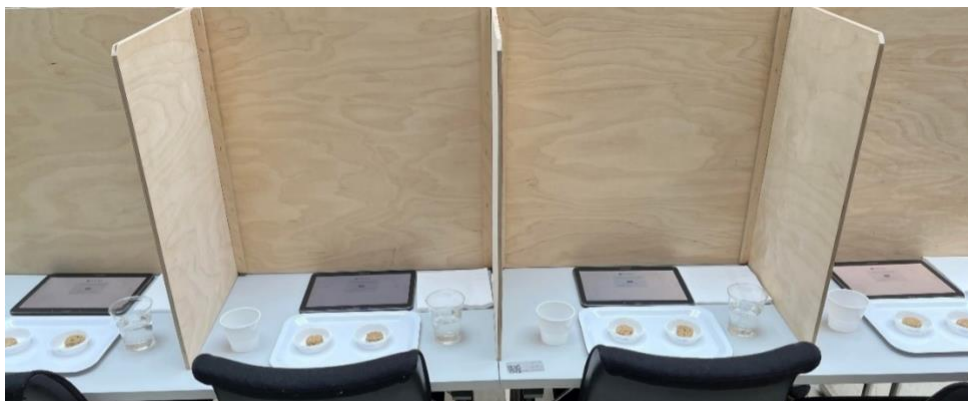
Åtte portable båser ble satt opp i ved inngangen på NTNUs lokale Akrinn, Kalvskinnet. Svarene ble registrert ved bruk av nettbrett (Galaxy 4, Samsung). Romtemperert vann og



spyttebrett var tilgjengelig i båsene. For hver deltager ble det satt et brett med prøvene som vist i Figur 23 og Figur 24. Deltagerne ble hentet inn fortløpende, og båsene ble ryddet og desinfisert mellom hver gjennomføring.



Figur 23: Oppsettet til hver deltager (Foto: Jensen, 2022)



Figur 24: Båsene klare til gjennomføringen (Foto: Jensen, 2022)

Med resultatene som ble samlet inn ble det utført en t-test i EyeQuestion® sitt analyseverktøy.

## 4.0 Resultater

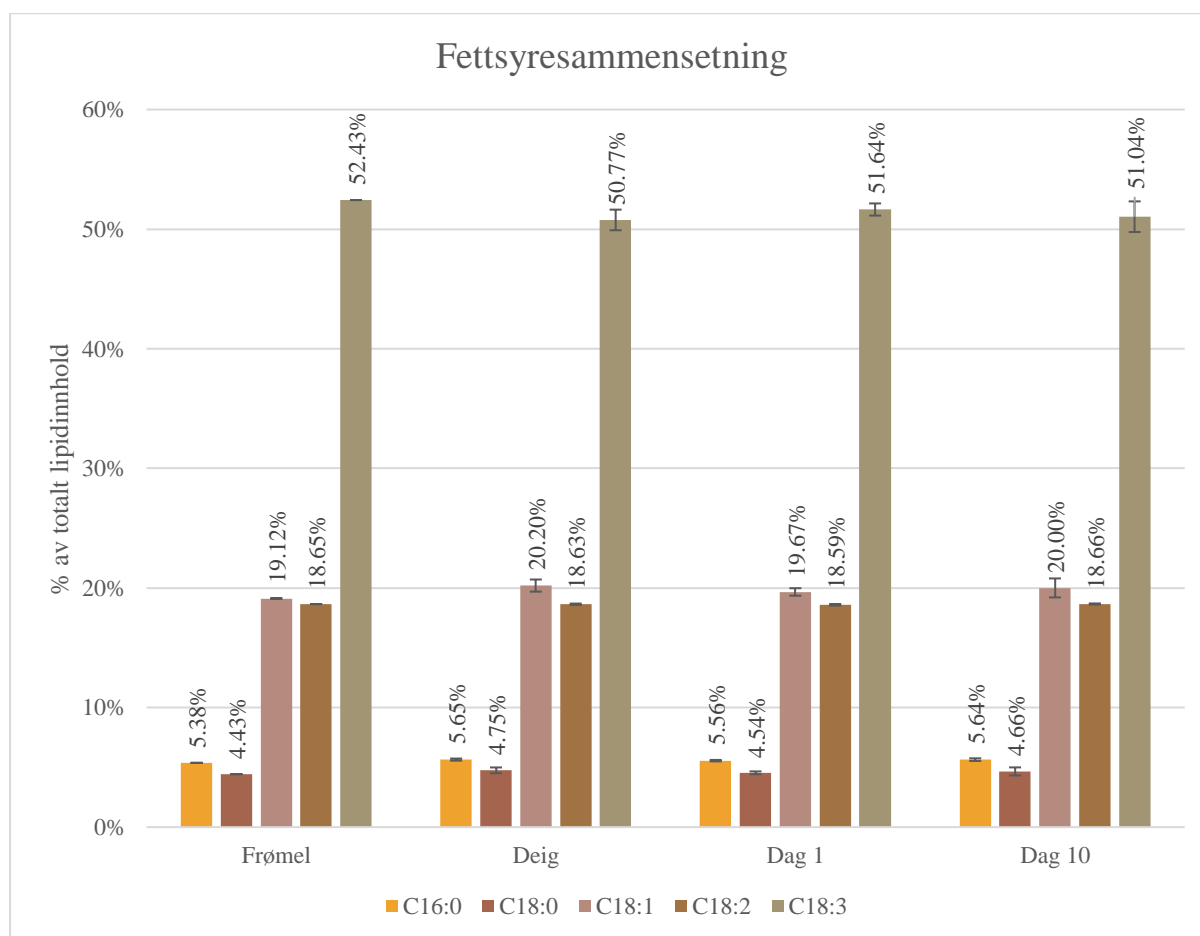
I denne delen vil resultater fra de kjemiske og sensoriske analysene bli presentert. Hvert avsnitt vil bli presentert med en graf og relevante signifikansverdier mellom prøvene vil bli trukket fram.

### 4.1 Resultat av kjemiske analyser

For kjemiske analyser vil resultater fra GC, PV og TBARS bli presentert.

#### 4.1.1 Resultat av fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen ble målt i frømel, deigprøvene, brødet fra dag 1 og fra dag 10. Gjennomsnittet av fettsyresammensetningen i de ulike prøvene ble beregnet (Vedlegg 5) og presenteres i Figur 25. Resultatene fra GC viser at omtrent 90 % av fettsyrene i batchene er umettet, hvorav 18:3  $\omega$ -3 utgjør minst 50 %, mens både 18:2  $\omega$ -6 og 18:1  $\omega$ -9 utgjør omtrent 20 % hver. Imidlertid hadde frømelet et litt høyere prosentandel av 18:3  $\omega$ -3 enn deigprøven og brødprøvene.



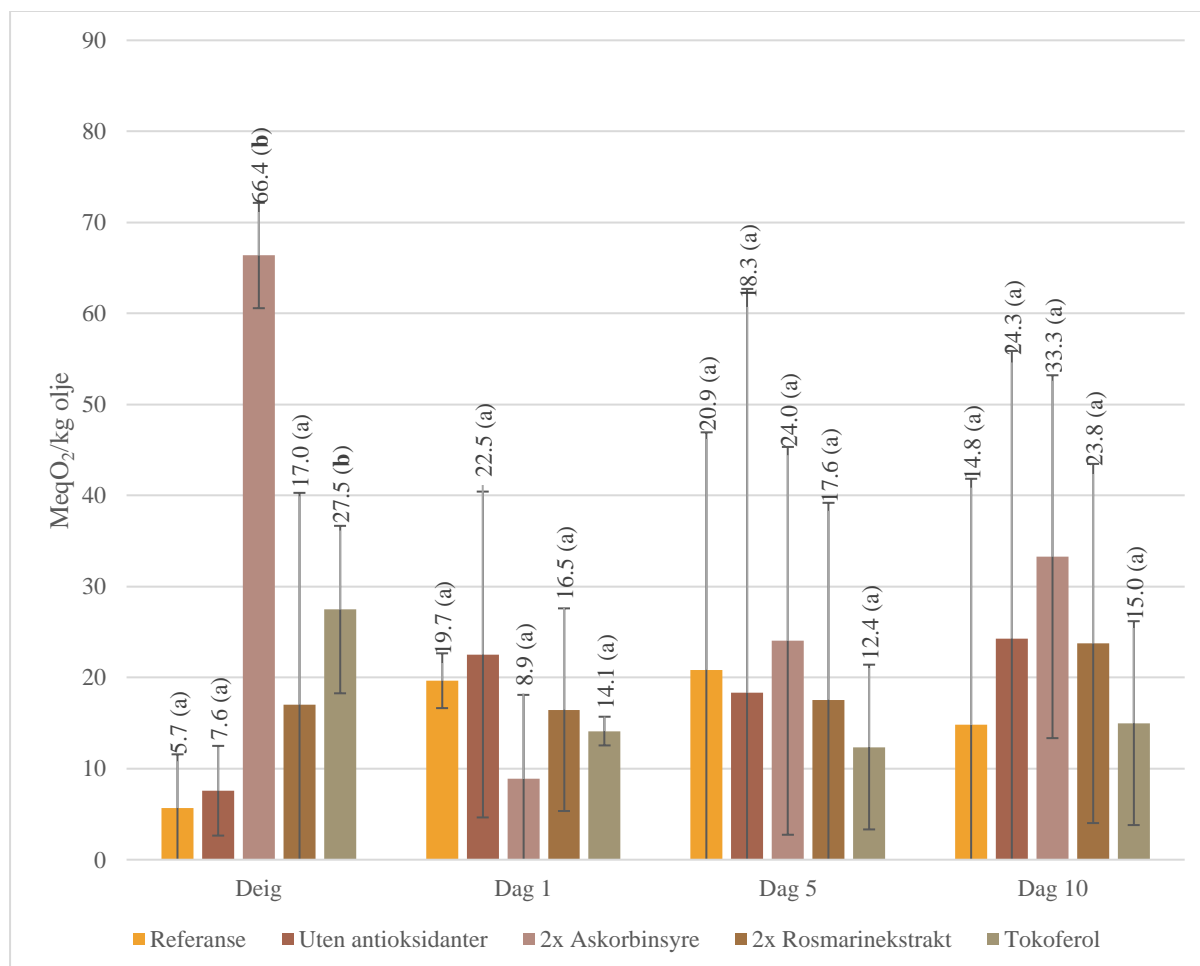
Figur 25: Fettsyresammensetningen i frømel, deigprøve og brød dag 1 og dag 10.

### 4.1.2 Primære oksidasjonsprodukter målt i meqO<sub>2</sub> / kg olje

Peroksidverdien ble målt i deigprøven og brødprøvene dag 1, dag 5 og dag 10.

Peroksidverdien ble beregnet med standardavvik (Vedlegg 6), og presenteres i Figur 26.

Alle brødprøvene etter steking med unntak av brødet tilsatt dobbel mengde askorbinsyre i dag 1 har en høyere verdi enn 10 meqO<sub>2</sub>/kg olje som har vist seg å utvikles til harsk lukt og smak.

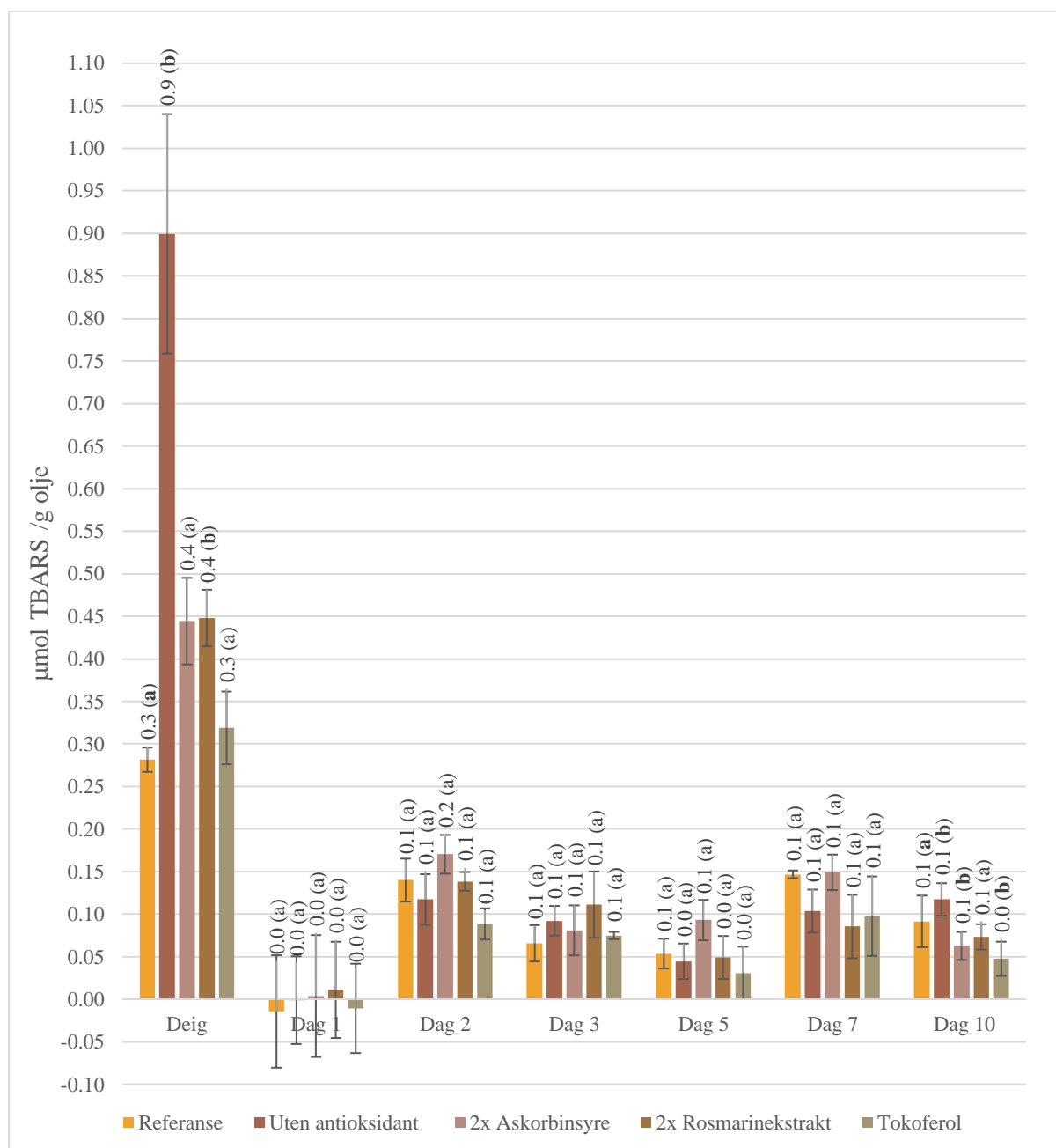


Figur 26: Peroksidverdi i deigprøven og brødprøvene som ble utsatt for O<sub>2</sub> i 1, 5 og 10 dager. Bokstavene a og b forteller om man kan skille PV i prøvene uten eller tilsatt ekstra antioksidanter i forhold til referansen. Bokstaven a viser at det ikke er signifikant forskjell, mens prøven merket b kan skilles fra referansen ved signifikansnivå lavere enn 0,05.

Ut ifra variansanalysen (Vedlegg 6) er det ikke vist signifikant forskjell mellom de ulike batchene i brødprøvene og det ble derfor kun gjennomført en t-test (Vedlegg 6) innad i deigprøvene. I deigprøvene er PV signifikant høyere i deigen med dobbel mengde askorbinsyre og deigen tilsatt tokoferol med signifikansnivå lavere enn 0,05.

### 4.1.3 Sekundære oksidasjonsprodukter målt i $\mu\text{mol TBARS /g olje}$

De tre parallellene av deigprøven og brødene fra dag 1, dag 2, dag 3, dag 5, dag 7 og dag 10 ble analysert med TBARS. Resultatene ble beregnet i henhold til standardkurvene (Vedlegg 7) og gjennomsnittet med standardavvik er presentert i Figur 27. Alle brødprøvene etter steking har en betraktelig lavere verdi enn 1-2  $\mu\text{mol TBARS /g olje}$  som har vist seg å gi harsk lukt og smak.



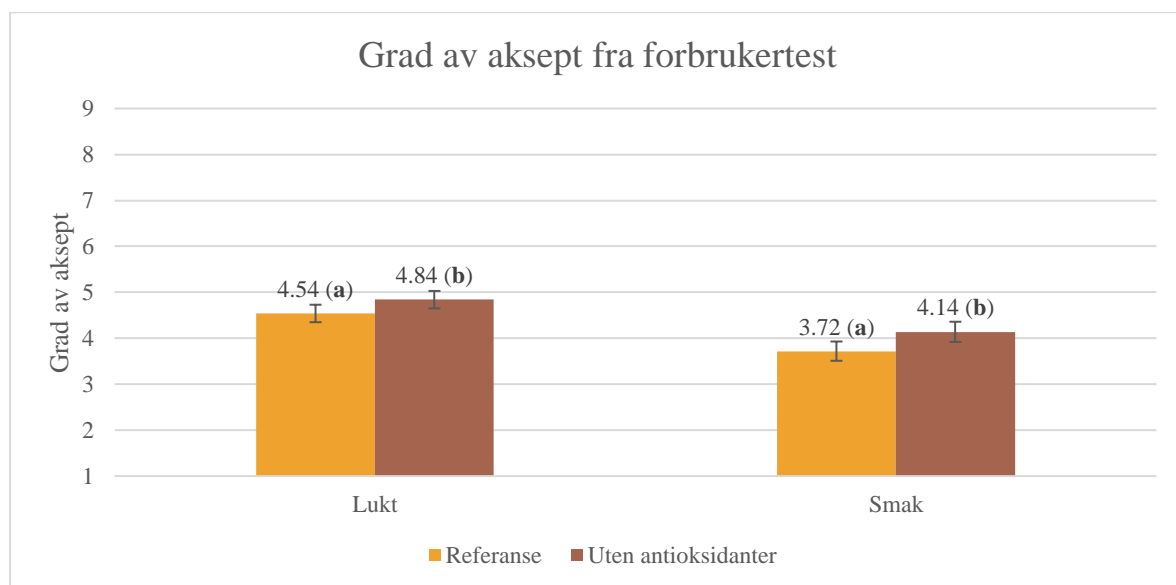
Figur 27: TBARS-verdier i deigprøven og brødene som ble utsatt for  $\text{O}_2$  i 1, 2, 3, 5, 7 og 10 dager. Bokstavene a og b forteller om man kan skille TBARS-verdiene i prøvene uten eller tilsatt ekstra antioksidanter i forhold til referansen. Bokstaven a viser at det ikke er signifikant forskjell mellom prøvene, mens prøven merket b kan skilles fra referansen ved signifikansnivå lavere enn 0,05.

Ut ifra variansanalysen (Vedlegg 7) er det ikke vist signifikant forskjell mellom de ulike batchene i brødprøvene fra dag 1 til dag 7, og det ble derfor kun gjennomført en t-test (Vedlegg 7) innad i deigprøvene og dag 10. Deigprøvene uten antioksidanter og dobbel mengde rosmarinekstrakt har en signifikant høyere verdi enn referansedeigen med signifikansnivå lavere enn 0,05, mens deigprøvene med dobbel mengde askorbinsyre og tilsatt tokoferol kan ikke med sikkerhet skilles fra referansedeigen.

I brødene som er utsatt for oksygen i 10 dager har brødet tilsatt dobbel mengde askorbinsyre og brødet tilsatt tokoferol en lavere TBARS-verdi enn referansebrødet med signifikansnivå lavere enn 0,05. Brødet uten tilsatt antioksidanter har en signifikant høyere TBARS-verdi enn referansebrødet med signifikansnivå lavere enn 0,05.

## 4.2 Resultat av sensorisk analyse

Resultatene fra forbrukertesten ble samlet inn i programvaren EyeQuestion® og analysert i programvarens analyseverktøy EyeOpenR. Gjennomsnittverdiene med standardavvik for grad av aksept for brødet uten antioksidanter og referansebrødet for smak og lukt presenteres i Figur 28.



Figur 28: Gjennomsnittsverdier for lukt og smak fra forbrukertesten med standardavvik. På skalaen er 1= liker ikke i det hele tatt og 9 = liker veldig godt. Kolonner med ulike bokstaver er signifikant forskjellig fra hverandre.

Referansebrødet har i gjennomsnitt fått lavere tallpoeng for lukt (4,54) og smak (3,72) enn brødet uten tilsatt antioksidant (lukt 3,72, smak 4,14), og alle poengsummene ligger mellom “Verken liker eller ikke liker” og “Liker ikke i det hele tatt” (antall poeng i vedlegg 8).

Standardavvikene for referansebrødet for henholdsvis lukt og smak er 0,19 og 0,21, og for brødet uten antioksidanter 0,19 og 0,22.

I t-testen som ble gjennomført i EyeOpenR ble p-verdien for lukt og smak mellom referanseprøven og prøven uten antioksidanter beregnet til henholdsvis 0,044 og 0,037. Hypotesen  $H_0$  om at det ikke er noen forskjell i aksept mellom de to prøvene når det gjelder lukt og smak kan forkastes på signifikansnivå 0,05, og dermed blir  $H_A$  den gjeldende hypotesen (Figur 29).

**$H_A$ :** Det er forskjell i grad av aksept mellom lukt og smak på referansebrødet og brødet uten antioksidanter.

*Figur 29: Den gjeldende hypotesen  $H_A$ .*

Det betyr at forbrukere generelt foretrekker brødet uten antioksidanter over referansebrødet både når det gjelder lukt og smak. De mest relevante kommentarene er oppført i vedlegg 8. Forbrukerne kommenterte at referansebrødet hadde grøtete konsistens, dyrefôrlukt, og smak som minnet om fisk, tran og dyrefôr. Brødet uten antioksidanter fikk kommentarer for fiskesmak og dyrefôrlukt.

## 5.0 Diskusjon

Gjennom diskusjonen skal resultatene fra analysene diskuteres opp mot hverandre med fokus på de ulike antioksidantenes virkninger på å redusere oksidasjonsprodukter dannet i brødet. Det praktiske arbeidet i oppgaven ble godt utført etter arbeidsplanen. Alle brødene ble bakt på samme måte og pakket i nitrogen like lang tid etter oppskjæring. Etter lipidekstraksjon ble prøvene fryst ned umiddelbart for å unngå videre oksidasjon da de kjemiske analysene ble utført over flere dager.

### 5.1 Degradering av flerumettede fettsyrer

Gasskromatografi ble benyttet i frømel, deigprøven, dag 1 og dag 10 for å se om det var en antydning til degradering av flerumettede fettsyrer, særlig 18:3  $\omega$ -3 som ifølge Finley & deMan (2018, s. 81) oksideres 2500 ganger raskere enn 18:0.

Ved degradering av en type fettsyre vil prosentandelen av de andre fettsyrene i fettsyresammensetningen naturligvis øke. Etter steking ble det observert i hver batch en svært liten variasjon i fettsyresammensetningen fra deigprøven til dag 10 (Vedlegg 5), og alle batchene ble dermed gjennomsnittlig samlet i resultatene. I Figur 25 ser man at konsentrasjonen av 18:3  $\omega$ -3 i noen tilfeller kan øke fra deigprøven til brødprøven, som motsier teorien om at flerumettede fettsyrer vil degradere raskere enn mettede fettsyrer. Det er dermed utfordrende å trekke konklusjoner ut fra resultatene, men da det ikke er særlig variasjoner i fettsyresammensetningen fra deigprøven til dag 10 kan det tyde på at brødene ikke er særlig harske. Man kan også antyde at konsentrasjonen av 18:3  $\omega$ -3 er noe høyere i frømel enn i deigprøvene og brødprøvene.

Da GC er en stabil metode, ble det valgt å kun analysere en parallell av hver prøve. Prøvene måtte fortynnes da det i første omgang ble for høye topper som ikke kunne kvantifiseres. Ved fortynning risikerer man at stoffer i små konsentrasjoner ikke blir detektert og at det blir en feilaktig vurdering av fettsyrene av høyere konsentrasjoner. Mot slutten av fordampningen av prøvene til GC ble nitrogenilgangen brutt, og i perioden kan prøvene ha vært utsatt for lipidoksidasjon. Ved lipidoksidasjon vil fettsyrene degraderes (Kilcast, 2011, s. 390), og den målte fettsyresammensetningen kan derfor ha blitt unøyaktig. Det er usikkert hvor lenge nitrogenilgangen var brutt, men siden samtlige prøver var utsatt for oksygen like lenge, vil man fortsatt kunne se endringer fra frømel, deig, dag 1 og dag 10. Det kunne likevel være lurt å gjennomføre analysen på nytt for å sikre at oljen ikke utsettes for oksidering.

## 5.2 Dannelse av primære oksidasjonsprodukter

For å unngå en harsk lukt og smak i næringsmidler bør PV ifølge Kilcast (2011, s.398) ikke overskrive 10-20 meqO<sub>2</sub>/kg olje. Peroksidverdiene som ble målt i brødene (Figur 26) viste store variasjoner mellom de ulike prøvene, men har høye standardavvik. Referansedeigen (5,7 meqO<sub>2</sub>/kg olje) og deigen uten antioksidanter (7,6 meqO<sub>2</sub>/kg olje), samt brødprøven fra dag 1 med dobbel mengde askorbinsyre (8,9 meqO<sub>2</sub>/kg olje) var de eneste prøvene med peroksidverdi lavere enn 10 meqO<sub>2</sub>/kg olje. Deigprøvene med doblet mengde tilsatt askorbinsyre (66,4 meqO<sub>2</sub>/kg olje) og med tilsatt tokoferol (27,5 meqO<sub>2</sub>/kg olje) var prøvene med høyeste peroksidverdi, og var forskjellig fra referansen med signifikansnivå lavere enn 0,05.

Det kan se ut som dobbel mengde askorbinsyre akselererte dannelsen av primære oksidasjonsprodukter i deigen. Imidlertid viser de statistiske beregningene for prøvene etter steking at det ikke med sikkerhet kan skille de ulike batchene fra referansen, og man kan derfor heller ikke fastslå fra PV-analysene hvilke effekter antioksidanter har for oksidasjonsforløpet.

Etter å ha gjennomført PV ble det erfart at metoden kan være noe ustabil. I deigprøvene ble en parallell i samtlige batcher utenom tokoferol (Vedlegg 6) avvikende, som dermed ikke ble benyttet til videre beregninger. Med avvikende prøver fra resultatene av peroksidverdi, i tillegg til høye standardavvik hadde det dermed vært lurt å benytte seg av triplikate i tillegg til paralleller. Dette var i utgangspunktet planen, men med lite prøvemateriale og begrensninger på laben ønsket gruppen heller å fokusere på å teste ut flere batcher og antall dager etter åpning i håp om å se en signifikant forskjell i oksidasjonshastighet. En grunn til at metoden virket ustabil kan være ujevnheter i lipidkonsentrasjonen i kloroform-fasen. Under lipidekstraksjonen kan ulik mengde kloroform ha fordampet fra prøvene grunnet variasjoner av temperatur og tid ved dispergering. Gjennomsnittlig lipid-konsentrasjon (n=15) ble beregnet til 5,5 % der prøvene hadde verdier fra 3,7 % til 8,2 % (Vedlegg 9). En høyere konsentrasjon av lipid i kloroformfasen vil gi en lavere beregnet peroksidverdi (Formel 3). Det samme gjelder for beregninger av TBARS-verdier (Formel 4). For å få et mer nøyaktig resultat i PV og TBARS ville det vært en fordel å ha fordampet samtlige prøver og beregnet lipidkonsentrasjonen i hver enkelt prøve før videre beregninger.



### 5.3 Dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter

Figur 27 viser verdier lavere enn 0,2  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje i samtlige prøver etter steking. Ifølge Kilcast (2011, s. 389) vil næringsmidler med TBA over 1-2  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje mest sannsynlig gi en harsk smak og lukt. Dermed vil de sekundære oksidasjonsproduktene i brødet ikke være i tilstrekkelig mengde til å kunne gi utslag på uønsket smak og lukt.

Da man ikke med sikkerhet kan skille primære og sekundære oksidasjonsprodukter i de ulike batchene fra referansebrødet er det utfordrende å fastslå hvilke antioksidanter som har best virkning for å senke oksidasjonsforløpet. Det dannes flere primære oksidasjonsprodukter i deigen tilsatt askorbinsyre (66,4  $\text{meqO}_2/\text{kg}$  olje) og deigen tilsatt tokoferol (27,5  $\text{meqO}_2/\text{kg}$  olje), og flere sekundære oksidasjonsprodukter i deigen uten antioksidanter (0,9  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje) og deigen tilsatt rosmarinekstrakt (0,5  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje) enn i referansedeigen (0,3  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje). Fordi det både er lave mengder primære og sekundære oksidasjonsprodukter i brødene kan det tyde på at produktene har blitt brutt ned til tertiære oksidasjonsprodukter under steking. I brødprøvene har brødet tilsatt tokoferol jevnt lavere verdier ( $\leq 0,1$ ) som kan tyde på at produksjonen av de sekundære oksidasjonsproduktene har gått noe saktere, men prøven er kun signifikant ulik referansebrødet i dag 10.

På bakgrunn av utviklingskurven for PV og aldehyder over tid (Figur 5) kan det se ut til at lipidoksidasjonen i brødene ikke har utviklet seg langt nok til at høyere verdier av primære og sekundære oksidasjonsprodukter vil oppstå. Fordi produksjonen av sekundære oksidasjonsprodukter holdt seg lavt i tidsperioden for analysene ( $< 0,2 \mu\text{mol TBARS/g}$  olje), kunne lengre lagringstid og oppbevaring i romtemperatur ført til at det er mulig å se hvilke ulike effekter de tilsatte antioksidantene kan ha. Den stabile fettsyresammensetningen målt i GC kan i tillegg indikere at brødene ikke har kommet særlig langt ut i oksidasjonsforløpet.

På grunn av mangel på kimax-rør ble TBARS gjennomført over to dager. Deigprøvene og brødprøvene fra dag 1 ble gjennomført på en dag, mens brødprøvene fra dag 2, 3, 5, 7 og 10 ble gjennomført på en annen dag. Fordi standardkurven som lages samme dag er utgangspunktet for beregningene vil det kunne oppstå avvik når flere dager skal sammenlignes. Selv om de spektrofotometriske målingene fra dag 1 er relativt like resten av brødprøvene har den en annen standardkurve med et høyere skjæringspunkt i y-aksen (0,0231 mot 0,0082), og TBARS-verdien for de spektrofotometriske verdiene fra dag 1 målt lavere enn 0,0231 har derfor blitt beregnet til å ligge under 0 (Vedlegg 7). Dette kan skyldes bruk av forskjellige pipetter

eller TEP-løsningen som ble laget på de forskjellige dagene. For å få mer nøyaktige resultater hadde det vært en fordel å utføre TBARS for alle prøvene på samme dag og beregnet resultatene ut ifra samme standardkurve.

TBA og malondialdehyd vil danne en rosa farge (Kilcast, 2011, s. 389), men i noen av prøvene ble det observert en mørkere, nærmere oransje farge (Figur 20) og en mørk blå. Dette kan skyldes urene kimax-rør, som også kan ha påvirket andre prøver uten at man ser det. Selv om noen av disse prøvene ikke så ut til å gi store utslag spektrofotometrisk (Vedlegg 7), ble de ikke tatt med i videre beregninger av TBARS. Det gikk også noen prøver tapt da kimax-rør knuste under sentrifugering. Derfor var det noen prøver med kun to paralleller, som gir mer usikre resultater.

## 5.4 Sensorisk aksept

Som tidligere nevnt er det ikke store forskjeller i de sekundære oksidasjonsproduktene etter steking, og med lave konsentrasjoner forventes det lite harsk lukt og smak. Det var derfor interessant å finne svar på om det er forskjell i aksept på brød med og uten antioksidanter. Brødet uten antioksidanter fikk høyest akseptscore både når det gjaldt lukt (4,8 mot 4,5) og smak (4,1 mot 3,7), men begge prøvene fikk en aksept mellom “*Verken liker eller ikke liker*” og “*Liker ikke i det hele tatt*”. Likevel var det lave standardavvik på alle prøvene som indikerer enighet hos de fleste forbrukerne. Ut ifra kommentarene hadde også referansebrødet mer transmak og bløtere konsistens enn brødet uten antioksidanter, men forbrukere kan også ha valgt å kun kommentere det ene produktet, og egenskapene kan gjelde for begge prøvene.

Forskjellen i aksept kan skyldes en intens lukt og smak fra rosmarin som forbruker ikke liker, eller at rosmarin oppleves fremmed i et brød. Kamouflering av harsk lukt og smak kan føre til at forbruker konsumerer det harske produktet, og man overdøver den naturlige avskyen for harske produkter. Selv om en konsentrasjon på 1-2  $\mu\text{mol TBARS/g}$  olje har vist seg å gi en harsk lukt eller smak kan også noen flyktige oksidasjonsprodukter oppfattes ved lavere konsentrasjoner. På bakgrunn av de lave verdiene fra TBARS er det ikke nødvendigvis de sekundære oksidasjonsproduktene som bidrar til en uønsket aroma. Det kan være andre aromakomponenter i linfrø som påvirker de sensoriske kvalitetene til brødet, som for eksempel det høye innholdet av omega-3 som kan føre til at forbrukere forbinder smaken med tran (Vedlegg 8). Dette kan skyldes bismak fra de flyktige forbindelsene som dannes under nedbrytningen av triglyserider under oppvarming (Wong, 2018, s.16). Når brødet uten tilsatt

antioksidanter ble vurdert som bedre, kan det tenkes at tilsetningen av antioksidantene, spesielt rosmarinekstrakt, kan virke som en smaksforsterker (Coultate, 2016, s.136).

Fordi den sensoriske testen ble gjennomført på universitetet var forbrukergruppen som deltok relativt smal. De som deltok var enten studenter eller forelesere ved NTNU. For å nå ut til en mer spesifikk målgruppe ville det vært en fordel å gjennomføre testen med forbrukere som allerede spiser spesialkost (glutenfritt, lavkarbo eller annen helsekost) som er mer representativ for bedriftens kundegruppe. Linfrøbrød markedsføres som et brød med sterkere smak (Linbakst, 2021) og dersom man forventer smaken av et vanlig brød er det lett å bli overveldet og rangere brødet lavere enn man ville gjort om man var klar over brødets sammensetning. På grunn av det store utvalget (n=82) var det mest sannsynlig noen som hadde et kosthold uten gluten, og ifølge Laureati et al. (2012) vil det ikke påvirke hvordan forbruker rangerer produktet, og dermed ikke resultatet. Siden dette bare er én studie, er det en mulighet for at resultatet hadde blitt annerledes om aksepttesten ble gjennomført med brødets målgruppe.

## 5.5 Helseeffekter

Analysen av fettsyresammensetningen viste liten endring i analyseperioden og at litt over 50 % av fettsyrene var  $\alpha$ -linolensyre og 40 % var andre umettede fettsyrer. De essensielle fettsyrene er dermed i stor grad bevart, og den ernæringsmessige kvaliteten kan antas å ikke ha blitt betydelig påvirket. På grunn av høyere verdier av primære og sekundære oksidasjonsprodukter i deigprøvene kan det tyde på at tertiære oksidasjonsprodukter har blitt dannet under stekeprosessen. Om linfrøbrødet holdes kjølt frem til forbruker skal spise det vil det ikke være stor forskjell i oksidasjonsprodukter produsert i brød tilsatt ulike antioksidanter. Etter steking og lagring i kjøleskap har oksidasjonen gått veldig sakte, og det har vært liten til ingen tydelig økning av oksidasjonsprodukter i batchene.

Da det ikke er satt noen faste grenseverdier for hva som er akseptabel mengde oksidasjonsprodukter når det kommer til mattrygghet, kan brødet vurderes til å ikke ha en negativ helsevirkning. På bakgrunn av linfrøbrødets ernæringsmessige kvaliteter, kan det derfor antas at helsefordelene ved inntak av linfrøbrød er høyere enn de potensielle toksiske stoffene som dannes under ugunstige lagringsforhold. Det bør likevel bemerkes hvilke toksiske effekter oksidasjonsprodukter kan ha for mennesker, og man bør stille seg kritisk til å kamuflere harsk lukt og smak for at forbruker skal velge å konsumere produktet. Generelt er det ikke anbefalt å innta høye konsentrasjoner av oksidasjonsprodukter da det kan ha uheldige helsevirkninger.

## 5.6 Oppsummering

De ulike analysene ga ikke klare svar på hvilken effekt de ulike antioksidantene har for oksidasjonsforløpet. Statistiske beregninger viste ingen signifikante forskjeller i PV mellom prøvene etter steking og TBARS fra dag 1-7. Samlet sett kan det se ut som om tilsetning med tokoferol hadde høyest effekt for å redusere dannelsen av oksidasjonsprodukter da både PV og TBARS viste jevnt lavere verdier. Tilsatt dobbel mengde askorbinsyre viste seg derimot å gi høyere konsentrasjon av peroksider i deigen. Nesten alle prøvene hadde høye peroksidverdier, men svært lave TBARS-verdier, og det kan antas at de sekundære oksidasjonsproduktene ikke kunne gi utslag på uønsket smak og lukt. På bakgrunn av resultatet fra den sensoriske testen kan det se ut til at den uønskede smaken i brødet kommer fra aromakomponenter fra rosmarinekstrakt. Da brødet uten antioksidanter fikk høyere aksept kan tilsetningen av antioksidanter (askorbinsyre og rosmarinekstrakt) ha en negativ påvirkning på brødets sensoriske egenskaper. Ut ifra de kjemiske analysene er det heller ikke dannet en betydelig mengde oksidasjonsprodukter ved kjølelagring, og det er ikke mulig å konkludere med at konsum av brødet kan ha skadelige helsevirkninger.

## 5.7 Forslag til videre arbeid

For videre arbeid kan det være en idé å beholde askorbinsyre, men fjerne rosmarinekstrakt for å undersøke om den faktisk bidrar til den uønskede aromaen. Det er usikkert om det er en hensikt å tilsette askorbinsyre da den ikke er særlig varmestabil, men det kan være en idé å undersøke om den har en synergerende effekt med  $\alpha$ -tokoferol både før og etter steking. Det er verdt å se nærmere på  $\alpha$ -tokoferol som er en varmestabil antioksidant, da den viser antydninger til jevnt lavere verdier av PV og TBARS. Fordi brødet er rikt på omega-3 som lett kan assosieres med en fiskesmak vil det heller være en fordel å finne måter å redusere smaken på, enten ved å redusere innholdet fett i brødet eller bismaken som kan skyldes nedbrytning av triglyserider. For å tydeligere se virkningen av antioksidantene vil det være en fordel å lagre prøvene ved romtemperatur eller over en lengre periode for å indukere oksidasjonshastigheten.

## 6.0 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å undersøke hvilken effekt antioksidanter hadde på harskningsforløpet på brød bakt av linfrø. Ut ifra verdiene fra de kjemiske analysene er det usikkert om antioksidantene som ble tilsatt i referansebrødet har en hensikt ved kjølelagring. I brødene lagret i 1 til 7 dager var det ingen signifikant forskjell i oksidasjonsprodukter mellom de ulike batchene. For dag 10 i TBARS var det signifikant forskjell mellom noen av prøvene, men fordi verdiene var såpass lave vil det ikke utgjøre en betydelig sensorisk forskjell. Den sensoriske testen viste at begge brødene hadde aksept fra lav til middels, men brødet uten tilsatt antioksidanter ble akseptert i større grad på både lukt og smak i forhold til referansebrødet med signifikansnivå lavere enn 0,05. Det kan dermed virke som om rosmarinekstrakten i referansen bidrar til en uønsket aroma eller fungerer som en smaksforsterker.

Det bør bemerkes hvilke toksiske effekter oksidasjonsprodukter kan ha for mennesker, og man bør stille seg kritisk til å kamuflere harsk lukt og smak for at forbruker skal velge å konsumere produktet. Ut ifra fettsyresammensetningen ser man at de ernæringsmessige egenskapene i brødet i stor grad er bevart da det fortsatt er høye konsentrasjoner av flerumettede fettsyrer etter kjølelagring i 10 dager.

Prosjektet har vist oss en praktisk implementering for utvikling av produkter med et høyt innhold av vegetabiliske, umettede fettsyrer. For videre arbeid kan det være en idé å fjerne rosmarinekstrakt, se nærmere på varmemestabil  $\alpha$ - tokoferol og om askorbinsyre har en synergerende effekt med  $\alpha$ - tokoferol etter steking. Det kan også være interessant å se nærmere på aromakomponentene i linfrø, eller bismaken som kan skyldes nedbrytning av triglyserider.

## 7.0 Referanser

Agricultural marketing resource center (2022, februar) *Flax Profile*. AgMRC.org.

AOCS (2003). Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society. Method Cd 8b-90: Peroxide value. Hentet 11.05.22 fra

<https://www.agmrc.org/commodities-products/grains-oilseeds/flax-profile>

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.

<https://doi.org/10.1139/o59-099>

Coulter, T. (2016). *Food: The chemistry of its Components* (6th edition). CPI Group.

El-Beltagi, H.S.; Salama, Z.A.; El-Hariri, D.M. (2007). Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (*Linum usitatissimum* L.). *General Applied Plant Physiology*, 33(3-4), 187-202.

Eldin, A. K. (2010). Methods to determine the extent of lipid oxidation in foods. I Decker, E. A., Elias, R. J. & McClements, D. J (Red.). *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. (s. 181-195). Woodhead Publishing Limited.

Ellefson, W. C. (2017). Fat Analysis. I Nielsen, S. S. (Red.). *Food Analysis* (5. utg., s. 299-314). Springer International Publishing AG.

Elsevier. (2002). *Encyclopedia of Foods: A Guide to Healthy Nutrition*. Academic Press.

Finley, J. W. & deMan, J. M. (2018) Lipids. I deMan, J. M., Finley, J. W., Hurst, W. J. & Lee, C. Y. (Red.). *Principles of Food Chemistry* (4. utg. s. 39-116). Springer International Publishing AG.

Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation* (2. utgave). Woodhead Publishing.

Gordon, M. (2001a). The development of oxidative rancidity in foods. I Pokomy, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M (Red.) *Antioxidants in foods - practical application* (s. 7-21). CRC Press.

Gordon, M. (2001b). Measuring antioxidant activity. I Pokomy, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M (Red.) *Antioxidants in foods - practical application* (s. 71-84). CRC Press.

- Guéraud, F. (2015). Oxidized Lipid Products and Carcinogenesis. I Spickett, M. & Forman, J. (Red.) *Lipid oxidation in health and disease* (387-403). CRC Press.
- Guillén-Sans, R. & Guzmán-Chozas, M. (1998), The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 315-350.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J. & Michell, R. H. (2016). *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health* (6. utg.). Wiley Blackwell.
- Helsedirektoratet. (01/2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer* (IS-1881). Helsedirektoratet.
- Helsedirektoratet. (01/2022). *Utviklingen i norsk kosthold* (IS-3031). Helsedirektoratet.
- Heymann, H. & Lawless, H. T. (2010). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (2. utg.). Springer New York.
- Kilcast, D. & Subramaniam, P. (2011). *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (1. utg.) Woodhead Publishing.
- Laureati, M., Giussani, B. og Pagliarini, E. (2012), Sensory and hedonic preception of gluten-free bread: Comparison between celiac and non-celiac subjects, *Food Research International*, 47(1), 326-333
- Linbakst. (2021). *Linbakst - Sunne brød uten korn*. Linbakst.no. <https://www.linbakst.no/>
- Løvås, G. G. (2018) *Statistikk: for universiteter og høyskoler* (4. Utg) Universitetsforlaget.
- MacFie, H. J., Bratchell, N., Greenhoff, K. & Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect og order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of sensory studies*, 4(2), 129-148.
- Mattilsynet. (2022, 11.03). *Matvaretabellen*. [www.matvaretabellen.no](http://www.matvaretabellen.no)
- Pedersen, I. J., Hjartåker, A., Anderssen, S. A. (2010) *Grunnleggende ernæringslære*. Gyldendal Norsk Forlag AS
- Pike, O. A & O'Keefe, S. (2017). Fat Characterization. I Nielsen, S. S. (Red.). *Food Analysis* (5. utg., s. 407-428). Springer International Publishing AG.
- Pokorný, J. (2001). Introduction. I Pokomy, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M (Red.), *Antioxidants in foods - practical application* (s. 1-3). CRC Press.

Schaich, K. M. (2013). Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms: When, Where, and How do Products Arise? I Logan, A., Nienaber, U. & Pan, X (Red.). *Lipid Oxidation: challenges in food systems*. AOCS Press.

Sensorisk StudieGruppe (SSG) (2015). *Sensorikk: Måling med menneskelige sanser* (3. utg.). Kopinor Pensum AS.

Shahidi, F., Wang, J. & Wanasundara, U. N. (2017). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. I Akoh, C. C. (Red.). *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology* (4. utg., s. 519-542). CRC Press.

Wong, D. W. S. (2018). *Mechanism and Theory in Food Chemistry* (2. utg.). Springer International publishing AG.

Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001). *Inhibiting oxidation*. I Pokomy, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M (Red.) *Antioxidants in foods - practical application* (s. 22-70). CRC Press.



### Produktinformasjon Linbakst klassisk brød



**Linbakst**  
et sunnere alternativ  
**KLASSISK**

FERDIGSTEKT BRØD PAKKET I BESKYTTET  
ARMOSFÆRE ca. 450 g

Næringsinnhold	Per 100 g
Energi	1342 kJ / 326 kcal
Fett	27 g
- mettede fettsyrer	2 g
- enumettede fettsyrer	5 g
- flerumettede fettsyrer	18 g*
Karbohydrater	1 g
- hvorav sukkerarter	1 g
Kostfiber	17 g
Proteiner	12 g
Salt	1 g

HØYT PÅ  
OMEGA-3

PROTEIN  
KILDE

FIBER  
RIK

INGEN  
KORN

<2%  
KARBO

GLUTEN  
FRITT

Oppbevares i romtemperatur uten direkte sollys. Etter åpning bør lagres i lukket beholder/pose og kjølt i maks 10 dager.



**Ingredienser:** økologiske gyline linfrø (59%), vann, havsalt, surhetsregulerende middel (økologisk eple sidereddik), hevelsesmiddel (Natron) antioksidanter: rosmarinekstrakt og Vitamin C.

\* Hvorav Omega-3 fettsyrer (ALA) er 14.5 g per 100 g

Vitaminer og mineraler	Per 100g
Vitamin B1 (Thiamin)	1 mg (94%**)
Vitamin B6	0.3 mg (21%**)
Vitamin B9 (Folate)	55.1 mg (28%**)
Vitamin C	24 µg (30%**)
Kalsium	162.2 µg (20%**)
Jern	3.6 mg (26%**)
Kalium	516.1 mg (26%**)
Sink	3 mg (27%**)
Kobber	0.8 mg (77%**)
Fosfor	406.7 µg (58%**)



\*\* % av referanseverdi: det anbefalte daglige inntaket for sunne, normalvektige personer.



**Produsent:** Linbakst AS, [www.linbakst.no](http://www.linbakst.no)  
Grostadveien 185, 7316 Lensvik, tlf - 95722713, epost - [bestilling@linbakst.no](mailto:bestilling@linbakst.no)

*Målt gassammensetning de ulike bagedagene*

<i>Bakedager</i>	<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	<b>N<sub>2</sub> (%)</b>
22/03/2022	0,070	99,9
	0,062	99,9
	0,059	99,9
	0,083	99,9
23/03/2022	0,047	100,0
	0,077	99,9
	0,037	100,0
	0,025	100,0
	0,023	100,0
	0,032	100,0
03/05/2022	0,018	100,0
	0,013	100,0

*Gjennomsnitt vanninnhold i prøvene:* 41,68 %

*Beregning for riktig prøvemengde til fett ekstraksjon:*

$$\frac{5,33 \text{ cm}^3 \text{ vann} \cdot 1,00 \text{ g/cm}^3}{41,68 \%} \cdot 100 \% = 12,8 \text{ g}$$

**Svarskjema for den ene prøven, 318.**

Skjerm bilde 1/6

**Forbrukertest for allergenfritt brød**

Velkommen til sensorisk test.

Du har to prøver av brød foran deg som du skal vurdere.

Du skal bare smake på prøven en gang. Du kan velge om du vil svelge eller spytte ut prøven, men gjør det samme på begge prøvene. Bruk den hvite koppen til å spytte i.

Om det er noe du lurer på er det bare å gi et tegn, så skal du få hjelp!  
Lykke til! ♥

Skjerm bilde 2/6

Skyll munnen med vann.

Du vil nå få noen spørsmål om prøven med **kode 318**

Du skal først lukte prøven og plassere den på en skala fra 1 til 9.  
Deretter skal du smake på prøven og plassere den på en skala fra 1 til 9.  
Etterpå får du mulighet til å kommentere prøven.

**Dobbeltsjekk at du tar riktig prøve****LUKT prøve 318**

Lukt på prøven uten å smake på den

Hvor godt liker du lukten på produktet på en skala fra *liker ikke i det hele tatt* til *liker veldig godt*.

1 Liker ikke i det hele tatt	2	3	4	5 Verken liker eller ikke liker	6	7	8	9 Liker veldig godt
------------------------------	---	---	---	---------------------------------	---	---	---	---------------------

**SMAK prøve 318**

Putt hele biten i munnen

Hvor godt liker du smaken på produktet på en skala fra *liker ikke i det hele tatt* til *liker veldig godt*.

1 Liker ikke i det hele tatt	2	3	4	5 Verken liker eller ikke liker	6	7	8	9 Liker veldig godt
------------------------------	---	---	---	---------------------------------	---	---	---	---------------------

[Neste](#)

Skjerm bilde 3/6

Hvis du har en kommentar kan du skrive den her:

## 5.1 Resultat fra GC av deig, dag 1 og dag 10

	Fettsyre	Deig			Dag 1			Dag 10		
		Ret.tid	Areal	Areal %	Ret.tid	Areal	Areal %	Ret.tid	Areal	Areal %
<i>Referanse</i>	C16:0	4,628	58,3	<b>5,56</b>	4,627	52,3	<b>5,50</b>	4,626	33,3	<b>5,62</b>
	C18:0	7,877	47,9	<b>4,57</b>	7,871	42,8	<b>4,50</b>	7,869	27,6	<b>4,66</b>
	C18:1	8,222	207,7	<b>19,81</b>	8,212	185,4	<b>19,48</b>	8,206	118,1	<b>19,92</b>
	C18:2	9,111	194,7	<b>18,57</b>	9,104	177,1	<b>18,61</b>	9,096	110,6	<b>18,65</b>
	C18:3	10,462	539,7	<b>51,48</b>	10,455	494	<b>51,91</b>	10,435	303,3	<b>51,16</b>
	Sum	1048,3	100		Sum	951,6	100	Sum	592,9	100
<i>Uten</i>		<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>
	C16:0	4,629	46,5	<b>5,60</b>	4,628	47,1	<b>5,50</b>	4,627	47,4	<b>5,47</b>
	C18:0	7,876	38,7	<b>4,66</b>	7,872	38,9	<b>4,55</b>	7,869	35,8	<b>4,13</b>
	C18:1	8,215	165,4	<b>19,93</b>	8,212	166,7	<b>19,48</b>	8,211	162,4	<b>18,74</b>
	C18:2	9,106	155,3	<b>18,71</b>	9,104	159,5	<b>18,64</b>	9,102	161,1	<b>18,59</b>
	C18:3	10,452	424,1	<b>51,10</b>	10,449	443,6	<b>51,83</b>	10,449	459,7	<b>53,06</b>
Sum	830	100		Sum	855,8	100	Sum	866,4	100	
<i>2x askorbinsyre</i>		<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>
	C16:0	4,629	50,1	<b>5,66</b>	4,625	44,1	<b>5,55</b>	4,626	38,5	<b>5,73</b>
	C18:0	7,875	41,9	<b>4,74</b>	7,869	35,2	<b>4,43</b>	7,868	32,4	<b>4,82</b>
	C18:1	8,216	179,0	<b>20,23</b>	8,208	154,7	<b>19,45</b>	8,208	137,1	<b>20,40</b>
	C18:2	9,107	164,6	<b>18,61</b>	9,099	147,0	<b>18,49</b>	9,098	125,3	<b>18,65</b>
	C18:3	10,452	449,1	<b>50,76</b>	10,446	414,2	<b>52,09</b>	10,438	338,7	<b>50,40</b>
Sum	884,7	100		Sum	795,2	100	Sum	672	100	
<i>2x rosmarinekstrakt</i>		<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>
	C16:0	4,628	43,6	<b>5,79</b>	4,627	48,8	<b>5,64</b>	4,625	42,5	<b>5,65</b>
	C18:0	7,873	38,9	<b>5,17</b>	7,871	41,0	<b>4,74</b>	7,865	34,9	<b>4,64</b>
	C18:1	8,213	158,6	<b>21,06</b>	8,221	174,7	<b>20,19</b>	8,208	150,9	<b>20,06</b>
	C18:2	9,104	140,7	<b>18,69</b>	9,102	161,3	<b>18,64</b>	9,098	140,5	<b>18,68</b>
	C18:3	10,445	371,2	<b>49,30</b>	10,447	439,5	<b>50,79</b>	10,44	383,5	<b>50,98</b>
Sum	753	100		Sum	865,3	100	Sum	752,3	100	
<i>Tokoferol</i>		<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>	<b>Ret.tid</b>	<b>Areal</b>	<b>Areal %</b>
	C16:0	4,63	44,7	<b>5,62</b>	4,624	44,0	<b>5,60</b>	4,626	37,8	<b>5,74</b>
	C18:0	7,876	36,8	<b>4,62</b>	7,87	35,4	<b>4,51</b>	7,869	33,2	<b>5,05</b>
	C18:1	8,214	158,8	<b>19,96</b>	8,208	155,0	<b>19,72</b>	8,204	137,4	<b>20,88</b>
	C18:2	9,105	148,0	<b>18,60</b>	9,1	146,1	<b>18,59</b>	9,099	123,2	<b>18,72</b>
	C18:3	10,449	407,4	<b>51,20</b>	10,444	405,28	<b>51,58</b>	10,438	326,4	<b>49,60</b>
Sum	795,7	100		Sum	785,7	100	Sum	658	100	

### 5.2 Resultat av GC frømel

Frømel			
fettsyre	Ret.tid	Areal	Areal %
C16:0	4,625	56	<b>5,38</b>
C18:0	7,871	46,1	<b>4,43</b>
C18:1	8,211	199,1	<b>19,12</b>
C18:2	9,103	194,2	<b>18,65</b>
C18:3	10,451	546	<b>52,43</b>
Sum		1041,4	100 %

### 5.3 Gjennomsnitt og standardavvik av fettsyresammensetningen for deig, dag 1 og dag 10 og resultatene fra frømelanalysen.

Fettsyre	Frømel		Deig		Dag 1		Dag 10	
	GJ.snitt	ST.avvik	GJ.snitt	ST.avvik	GJ.snitt	ST.avvik	GJ.snitt	ST.avvik
C16:0	5,38 %	0,00 %	5,65 %	0,09 %	5,56 %	0,06 %	5,64 %	0,11 %
C18:0	4,43 %	0,00 %	4,75 %	0,24 %	4,54 %	0,12 %	4,66 %	0,34 %
C18:1	19,12 %	0,00 %	20,20 %	0,51 %	19,67 %	0,31 %	20,00 %	0,79 %
C18:2	18,65 %	0,00 %	18,63 %	0,06 %	18,59 %	0,06 %	18,66 %	0,05 %
C18:3	52,43 %	0,00 %	50,77 %	0,86 %	51,64 %	0,51 %	51,04 %	1,28 %

## 6.1 Rådata fra analysen og beregning av peroksidverdi og standardavvik

		1	2	3	GJ.snitt	PV (meqO2/kg olje)	PV ST. Avvik (meqO2/kg olje)
	Na <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	0,01 M	0,01 M	0,01 M			
Dag 0	Blank	0,04	0,03	0,03			
	Referanse	0,69	209,00	0,13	0,41	5,682	5,55
	Uten antioksidant	0,77	0,30	24,55	0,54	7,58	4,58
	2x Askorbinsyre	45,55	4,68	4,14	4,41	66,36	5,33
	2x Rosmarinekstrakt	68,62	0,07	2,24	1,16	17,05	22,79
	Tokoferol	1,51	2,66	2,39	2,19	27,47	8,66
Dag 1	Referanse	1,49	1,09	1,22	1,16	19,66	2,64
	Uten antioksidant	0,84	3,07	1,30	2,19	22,54	17,38
	2x Askorbinsyre	0,52	1,30	0,10	0,70	8,86	8,77
	2x Rosmarinekstrakt	1,61	1,08	0,15	0,62	16,48	10,74
	Tokoferol	1,05	0,84	0,89	0,87	14,13	1,21
Dag 5	Blank	0,06	0,06	0,06			
	Referanse	0,33	0,56	3,42	1,44	20,86	25,17
	Uten antioksidant	6,34	1,20	1,34	1,27	18,33	43,45
	2x Askorbinsyre	3,12	0,32	1,50	1,65	24,04	20,39
	2x Rosmarinekstrakt	0,54	0,26	2,86	1,22	17,58	20,71
	Tokoferol	1,52	0,77	0,34	0,88	12,37	8,14
Dag 10	Blank	0,16	0,16	0,16			
	Referanse	2,46	0,12	0,83	1,14	14,80	15,75
	Uten antioksidant	1,58	0,13	3,58	1,76	24,29	23,82
	2x Askorbinsyre	0,24	2,42	4,41	2,36	33,28	29,18
	2x Rosmarinekstrakt	2,00	0,12	2,51	1,32	23,75	17,56
	Tokoferol	0,46	1,85	0,72	1,01	15,00	10,89

Titrert til 40 mL: ikke gyldig resultat

Blankprøve: 0,02

Prøven er avvikende og brukes ikke i beregningene

*6.2 Sammendrag av en-faktor variansanalyse*

	<i>Grupper</i>	<i>Antall</i>	<i>Gjennomsnitt</i>	<i>Varians</i>
<i>Dag 1</i>	Referanse	2	5,682	34,722
	Uten antioksidant	2	7,576	24,288
	2x Askorbinsyre	2	66,364	33,471
	2x Rosmarin ekstrakt	2	17,045	540,507
	Tokoferol	3	32,626	84,581
<i>Dag 1</i>	Referanse	3	18,687	9,053
	Uten antioksidant	3	25,808	320,301
	2x Askorbinsyre	3	9,192	85,407
	2x Rosmarin ekstrakt	3	13,838	123,883
	Tokoferol	3	13,535	2,487
<i>Dag 5</i>	Referanse	3	20,859	680,311
	Uten antioksidant	3	43,939	1968,136
	2x Askorbinsyre	3	24,040	453,658
	2x Rosmarin ekstrakt	3	17,576	467,585
	Tokoferol	3	12,373	81,872
<i>Dag 10</i>	Referanse	3	24,798	731,367
	Uten antioksidant	3	34,293	997,988
	2x Askorbinsyre	3	21,970	397,176
	2x Rosmarin ekstrakt	3	15,101	389,126
	Tokoferol	3	15,000	125,367



## 6.3 Variansanalyse peroksidverdi

<i>Deig</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	5052,629	4	1263,157	9,448	<b>0,009</b>	4,5337
	Innenfor grupper	802,150	6	133,698			
	Totalt	5854,779	10				
<i>Dag 1</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	480,869	4	120,217	1,111	<b>0,404</b>	3,478
	Innenfor grupper	1082,262	10	108,226			
	Totalt	1563,131	14				
<i>Dag 5</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	1750,790	4	437,697	0,599	<b>0,672</b>	3,478
	Innenfor grupper	7303,122	10	730,312			
	Totalt	9053,912	14				
<i>Dag 10</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	765,8157	4	191,454	0,3625	<b>0,830</b>	3,478
	Innenfor grupper	5282,048	10	528,205			
	Totalt	6047,863	14				

*6.4 T-test, med antatt lik varians for deigprøvene (for å se om det er signifikant forskjell fra referanse til de andre batchene)*

	<i>Referanse</i>	<i>Uten antioksidanter</i>	<i>2x Askorbinsyre</i>	<i>2x Rosmarin-ekstrakt</i>	<i>Tokoferol</i>
Gjennomsnitt	5,6818	7,576	66,364	17,046	32,626
Varians	34,7222	24,288	33,471	540,507	84,581
Observasjoner	2	2	2	2	3
Gruppevarians		29,505	34,097	287,615	67,961
fg		2	2	2	3
t-Stat		-0,349	-10,392	-0,670	-3,580
P(T<=t) ensidig		0,380	0,005	0,286	0,019
T-kritisk, ensidig		2,920	2,920	2,920	2,353
<b>P(T&lt;=t) tosidig</b>		<b>0,761</b>	<b>0,009</b>	<b>0,572</b>	<b>0,037</b>
T-kritisk, tosidig		4,303	4,303	4,303	3,182

## 7.1 Spektrofotometrisk måling TBARS

Paralleller		1	2	3
Deig	Referanse	0,118	0,095	0,084
	Uten antioksidant	0,313	0,295	0,201
	2x Askorbinsyre	0,171	0,157	0,104
	2x Rosmarin ekstrakt	0,132	0,156	0,147
	Tokoferol	0,119	0,109	0,100
Dag 1	Referanse	0,018	0,020	0,014
	Uten antioksidant	0,026	knust	0,016
	2x Askorbinsyre	0,024	0,022	0,021
	2x Rosmarin ekstrakt	0,026	0,029	0,018
	Tokoferol	0,016	0,013	0,026
Dag 2	Referanse	0,037	0,038	0,042
	Uten antioksidant	0,021	0,031	0,050
	2x Askorbinsyre	0,034	0,043	0,060
	2x Rosmarin ekstrakt	0,042	0,042	0,032
	Tokoferol	0,023	0,031	0,029
Dag 3	Referanse	0,019	0,023	0,026
	Uten antioksidant	0,100	0,020	0,037
	2x Askorbinsyre	0,024	0,027	0,027
	2x Rosmarin ekstrakt	0,024	0,022	0,052
	Tokoferol	0,021	0,020	0,033
Dag 5	Referanse	0,018	0,017	0,025
	Uten antioksidant	0,017	0,022	0,015
	2x Askorbinsyre	0,019	0,023	0,044
	2x Rosmarin ekstrakt	0,018	0,017	0,022
	Tokoferol	0,014	0,201	0,016
Dag 7	Referanse	0,047	0,217	0,034
	Uten antioksidant	0,033	0,028	0,032
	2x Askorbinsyre	0,038	0,040	0,045
	2x Rosmarin ekstrakt	0,027	0,027	0,142
	Tokoferol	0,051	0,019	0,019
Dag 10	Referanse	0,027	0,028	0,030
	Uten antioksidant	0,030	0,034	0,038
	2x Askorbinsyre	0,017	0,023	0,026
	2x Rosmarin ekstrakt	0,030	0,021	0,022
	Tokoferol	0,017	0,016	0,023

Prøvene hadde en mørkere rød/orange farge, og ble ikke brukt i videre beregning.

Prøven hadde en blå farge, og ble ikke brukt i videre beregning.

**7.2 Gjennomsnitt TBARS-verdier**

	Deig	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 5	Dag 7	Dag 10
<i>Referanse</i>	0,281	-0,014	0,140	0,066	0,054	0,147	0,092
<i>Uten antioksidant</i>	0,900	-0,001	0,117	0,092	0,045	0,104	0,117
<i>2x Askorbinsyre</i>	0,444	0,004	0,170	0,081	0,093	0,149	0,063
<i>2x Rosmarinekstrakt</i>	0,448	0,008	0,138	0,111	0,049	0,085	0,073
<i>Tokoferol</i>	0,319	-0,011	0,088	0,075	0,031	0,098	0,048

**7.3 Standardavvik TBARS-verdier**

	Deig	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 5	Dag 7	Dag 10
<i>Referanse</i>	-0,0143	-0,0661	-0,0252	-0,0213	-0,0175	0,0045	-0,0303
<i>Uten antioksidant</i>	0,1407	-0,0515	0,0297	0,0174	-0,0209	-0,0252	-0,0191
<i>2x Askorbinsyre</i>	0,0509	-0,0716	0,0227	-0,0294	0,0238	-0,0209	-0,0164
<i>2x Rosmarinekstrakt</i>	0,0332	-0,0490	-0,0110	0,0390	-0,0252	-0,0373	-0,0149
<i>Tokoferol</i>	0,0427	-0,0525	-0,0183	-0,0044	-0,0308	0,0467	-0,0201

**7.4 Standardkurver for de to analysedagene**

Deigprøve og dag 1:  $y = 0,0246x + 0,0213$

Dag 2, 3, 5, 7 og 10:  $y = 0,02x + 0,0082$

## 7.5 Sammendrag fra en-faktor variansanalyse

	<i>Grupper</i>	<i>Antall</i>	<i>Gjennomsnitt</i>	<i>Varians</i>
<i>Deig</i>	Referanse	3	0,281	0,004
	Uten antioksidant	3	0,900	0,047
	2x Askorbinsyre	3	0,444	0,016
	2x Rosmarinekstrakt	3	0,448	0,002
	Tokoferol	3	0,319	0,001
<i>Dag 1</i>	Referanse	3	-0,014	0,000
	Uten antioksidant	2	-0,001	0,001
	2x Askorbinsyre	3	0,004	0,000
	2x Rosmarinekstrakt	2	0,008	0,001
	Tokoferol	3	-0,011	0,001
<i>Dag 2</i>	Referanse	3	0,140	0,000
	Uten antioksidant	3	0,117	0,004
	2x Askorbinsyre	3	0,170	0,004
	2x Rosmarinekstrakt	3	0,138	0,001
	Tokoferol	3	0,088	0,000
<i>Dag 3</i>	Referanse	3	0,066	0,000
	Uten antioksidant	2	0,092	0,003
	2x Askorbinsyre	3	0,081	0,000
	2x Rosmarinekstrakt	3	0,111	0,006
	Tokoferol	3	0,075	0,001
<i>Dag 5</i>	Referanse	3	0,054	0,000
	Uten antioksidant	3	0,045	0,000
	2x Askorbinsyre	3	0,093	0,004
	2x Rosmarinekstrakt	3	0,049	0,000
	Tokoferol	2	0,031	0,000
<i>Dag 7</i>	Referanse	2	0,147	0,002
	Uten antioksidant	3	0,104	0,000
	2x Askorbinsyre	3	0,149	0,000
	2x Rosmarinekstrakt	2	0,085	0,000
	Tokoferol	3	0,098	0,007
<i>Dag 10</i>	Referanse	3	0,092	0,000
	Uten antioksidant	3	0,117	0,000
	2x Askorbinsyre	3	0,063	0,000
	2x Rosmarinekstrakt	3	0,073	0,001
	Tokoferol	3	0,048	0,000

## 7.6 Enveis variansanalyse beregnet i Excel av TBARS-verdiene

	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
<i>Dag 1</i>	Mellom grupper	0,731	4	0,1828	12,8903	<b>0,001</b>	3,478
	Innenfor grupper	0,142	10	0,0142			
	Totalt	0,873	14				
<i>Dag 2</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	0,001	4	0,0002	0,6341	<b>0,652</b>	3,838
	Innenfor grupper	0,003	8	0,0004			
<i>Dag 3</i>	Mellom grupper	0,011	4	0,0028	1,4866	<b>0,278</b>	3,478
	Innenfor grupper	0,019	10	0,0019			
	Totalt	0,030	14				
<i>Dag 4</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	0,004	4	0,0009	0,4697	<b>0,757</b>	3,633
	Innenfor grupper	0,017	9	0,0019			
<i>Dag 5</i>	Totalt	0,021	13				
	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	0,006	4	0,0015	1,4645	<b>0,291</b>	3,633
<i>Dag 6</i>	Innenfor grupper	0,009	9	0,0010			
	Totalt	0,015	13				
	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
<i>Dag 7</i>	Mellom grupper	0,009	4	0,0021	1,0222	<b>0,451</b>	3,838
	Innenfor grupper	0,017	8	0,0021			
	Totalt	0,025	12				
<i>Dag 8</i>	<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
	Mellom grupper	0,009	4	0,0022	6,7586	<b>0,007</b>	3,478
	Innenfor grupper	0,003	10	0,0003			
<i>Dag 9</i>	Totalt	0,012	14				

## 7.7 T-test med antatt like varianser for deigprøvene og dag 10

	<i>Referanse</i>	<i>Uten antioksidanter</i>	<i>2x Askorbinsyre</i>	<i>2x Rosmarin-ekstrakt</i>	<i>Tokoferol</i>	
<i>Deig</i>	Gjennomsnitt	0,281	0,900	0,444	0,448	0,319
	Varians	0,004	0,048	0,016	0,002	0,001
	Observasjoner	3	3	3	3	3
	Gruppevarians		0,026	0,010	0,003	0,003
	fg		4	4	4	4
	t-Stat		-4,722	-1,980	-3,764	-0,905
	<b>P(T&lt;=t) ensidig</b>		<b>0,005</b>	<b>0,059</b>	<b>0,010</b>	<b>0,208</b>
	T-kritisk, ensidig		2,132	2,132	2,132	2,132
	P(T<=t) tosidig		0,009	0,119	0,020	0,417
	T-kritisk, tosidig		2,776	2,776	2,776	2,776

	<i>Referanse</i>	<i>Uten antioksidanter</i>	<i>2x Askorbinsyre</i>	<i>2x Rosmarin-ekstrakt</i>	<i>Tokoferol</i>	
<i>Dag 10</i>	Gjennomsnitt	0,092	0,117	0,063	0,073	0,048
	Varians	4,82E-05	0,0003	0,0004	0,0005	0,0003
	Observasjoner	3	3	3	3	3
	Gruppevarians		0,0002	0,0002	0,0003	0,0002
	fg		4	4	4	4
	t-Stat		-2,292	2,271	1,342	4,101
	P(T<=t) ensidig		0,042	0,043	0,125	0,007
	T-kritisk, ensidig		2,132	2,132	2,132	2,132
	<b>P(T&lt;=t) tosidig</b>		<b>0,084</b>	<b>0,086</b>	<b>0,251</b>	<b>0,015</b>
	T-kritisk, tosidig		2,776	2,776	2,776	2,776

**8.1 Antall svar for hver tallverdi**

<b>Rangering</b>	<b>Uten antioksidanter</b>		<b>Referanse</b>	
	<b>Lukt</b>	<b>Smak</b>	<b>Lukt</b>	<b>Smak</b>
<b>1</b>	1	8	3	13
<b>2</b>	2	11	6	9
<b>3</b>	18	19	14	20
<b>4</b>	17	11	18	14
<b>5</b>	16	7	21	12
<b>6</b>	16	17	10	7
<b>7</b>	7	6	7	5
<b>8</b>	4	2	8	2
<b>9</b>	2	2	2	1

**8.2 Relevante kommentarer fra den sensoriske analysen.**

<b>Referanse</b>		<b>Uten antioksidanter</b>	
Grøtete/pudding	8	papp-smak	1
Tran	7	Tran	1
Fisk	3	Fisk	3
fôr-lukt	2	fôr-lukt	2
fôr-smak	2	gress-smak	1
Smakløs	1	Smakløs	1
Olje	1	Linolje	1
Syrlig	1	Tørr	1
Bitter ettersmak	1	Salt	1
Harskt	1	Lite salt	1



*Lipid i kloroformfase*

		Olje per 1 gram kloroformfase (g)	Prosent olje (%)
<i>Dag 1</i>	Ref	0,0429	4,29
	UA	0,0408	4,08
	2x AS	0,0408	4,08
	2x RE	0,0592	5,92
	Toko	0,0651	6,51
<i>Dag 10</i>	Ref	0,0426	4,26
	UA	0,0468	4,68
	2x AS	0,0371	3,71
	2x RE	0,0441	4,41
	Toko	0,0609	6,09
<i>Dag 10</i>	Ref	0,0806	8,06
	UA	0,0474	4,74
	2x AS	0,0688	6,88
	2x RE	0,0682	6,82
	Toko	0,0823	8,23
<b>Gjennomsnitt</b>		<b>0,0552</b>	<b>5,52</b>
<b>Standardavvik</b>		<b>0,0151</b>	<b>1,51</b>