



Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Inzicht in de biotoegankelijkheid van lycopeen in olie/tomaatmengsels na toepassen van hittebehandelingen en hogedrukhomogenisatie

(Insight into the bioaccessibility of lycopene in oil/tomato mixtures after the application of heat treatments and high pressure homogenization)

Promotor: Prof. Dr. Ir. M. Hendrickx

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen
Centrum voor Levensmiddelen- en Microbiële Technologie

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van

Master of Science in de bio-ingenieurswetenschappen:
Levensmiddelentechnologie

Kristof Met

Juni - 2012

“Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina.”



Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Inzicht in de biotoegankelijkheid van lycopeen in olie/tomaatmengsels na toepassen van hittebehandelingen en hogedrukhomogenisatie

(Insight into the bioaccessibility of lycopene in oil/tomato mixtures after the application of heat treatments and high pressure homogenization)

Promotor: Prof. Dr. Ir. M. Hendrickx

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen
Centrum voor Levensmiddelen- en Microbiële Technologie

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van

Master of Science in de bio-ingenieurswetenschappen:
Levensmiddelentechnologie

Kristof Met

Juni - 2012

Woord vooraf

Een thesis maak je nooit alleen. Vandaar dat ik hier enkele mensen zou willen bedanken die me afgelopen jaar geholpen hebben.

Allereerst dank ik mijn twee begeleidsters, Ines en Lien. Ik waardeer ten zeerste hun hulp en raad in het labo. Ook de moeite die ze deden om deze thesis na te lezen en te verbeteren wordt geapprecieerd. Ik wens hen nog veel familiegeeluk met hun kindjes.

Verder wens ik ook de twee professoren Marc Hendrickx en Ann Van Loey te bedanken voor hun nuttige feedback en het gebruik van de laboapparatuur.

Ook bedank ik de andere thesisstudenten, doctoraatsstudenten en buitenlandse studenten van het labo LFT voor de goede sfeer en de afleiding. Dit deed me af en toe vergeten dat ik aan het werk was. Verder bedank ik ook Margot en Heidi voor hun hulp en advies.

Ik wil ook de Glenn bedanken om 2 jaar geleden na onze opleiding tot Industriële ingenieur samen in dit Leuvens avontuur te stappen. Ik denk dat we het ons zeker niet beklaagd hebben. Zelfgemaakte pizza, koken met bier, barbecue, de frituur en terrasjes, het “praktisch gedeelte” van onze opleiding kwam samen met jou ruimschoots aan bod.

Graag wil ik ook mijn vriendin Hanne bedanken voor haar steun en affectie. Gedurende 2 jaar zat ik gedurende de week op kot in Leuven en zij thuis in Boechout. Het vergde soms inspanningen om tijd voor elkaar te maken, maar we zijn er zonder kleerscheuren doorgeraakt. Nu ik afgestudeerd ben kunnen we eindelijk op zoek gaan naar een stek voor ons tweeën.

Ten slotte wil ik ook mijn ouders bedanken voor het warme nest dat ze me schonken elk weekend opnieuw. En ik dank hen natuurlijk ook omdat ze me de kans boden om op kot te gaan en verder te studeren in Leuven.

Samenvatting

Lycopen is, als belangrijkste carotenoïde in tomaten, verantwoordelijk voor de rode kleur van deze groente. Steeds meer studies tonen aan dat de inname van lycopen geassocieerd wordt met gezondheidsbevorderende effecten. Hoewel lycopen in grote mate aanwezig is in tomaten, verloopt de opname van deze stof in het menselijke lichaam niet efficiënt omwille van zijn hydrofoob karakter en lokalisatie in de chromoplasten. Dit thesisonderzoek poogde om zowel de intrinsieke (voedselsamenstelling) als de extrinsieke factoren (hittebehandelingen en homogenisaties) die de vrijzetting van lycopen uit tomaten kunnen beïnvloeden te onderzoeken. Om beter inzicht te verwerven in de manier waarop de vrijzetting van lycopen uit de tomatenmatrix optreedt, werd ook gedetailleerd onderzoek gevoerd naar de structurele barrières die de vrijzetting van lycopen belemmerden.

In het eerste deel werd zowel de invloed van het toevoegen van 5% olie met verschillende vetzuursamenstellingen als van hittebehandelingen en hogedrukhomogenisatie op de biotoegankelijkheid van lycopen in tomatenpulp onderzocht. Uit de resultaten bleek dat de biotoegankelijkheid van lycopen significant steeg bij toevoegen van 5% olie, ongeacht de vetzuursamenstelling. Hogedrukhomogenisatie van tomatenpulp en olie/tomaatmengsels bij 100 bar zorgde niet voor een verhoogde biotoegankelijkheid. Verder werd waargenomen dat enkel hittebehandelingen bij 120 °C intens genoeg waren om de biotoegankelijkheid van lycopen in zowel tomatenpulp als olie/tomaatmengsels te doen stijgen. Bij de olie/tomaat-emulsies werd vastgesteld dat hogedrukhomogenisatie bij 100 bar, gevolgd door een hittebehandeling gedurende 20 min bij 90 °C, al volstond om de biotoegankelijkheid van lycopen te doen stijgen ten opzichte van deze in de emulsies die enkel de hittebehandeling bij 90 °C ondergaan hadden.

In het tweede deel werd tomatenpulp in fracties onderverdeeld waarin lycopen omgeven wordt door een verschillend aantal barrières. De verschillende fracties waren de grote en kleine celclusterfractie (lycopen in intacte cellen), de chromoplastfractie (lycopen in celorganellen) en lycopen in o/w-emulsie (vrij lycopen). Vervolgens werden deze fracties onderworpen aan hittebehandelingen en werd de biotoegankelijkheid van lycopen in de hittebehandelde fracties vergeleken met deze in de onbehandelde fracties. De resultaten toonden aan dat de vrijzetting van lycopen uit de celclusterfracties laag was en bijgevolg sterk verhinderd was. Aangezien de vrijzetting van lycopen uit de chromoplastfractie even laag was kon hieruit besloten worden dat de belangrijkste structurele barrière zich in de chromoplasten bevond of dat de biotoegankelijkheid van lycopen sterk bepaald werd door de fysische toestand van lycopen in de chromoplasten. De hoogste biotoegankelijkheid van lycopen werd bereikt in de o/w-emulsie. Wanneer hittebehandelingen toegepast werden op de celclusterfracties en chromoplastfractie werd

een verlaagde biotoegankelijkheid geobserveerd. Verhitting van de met lycoppeen aangerijkte olie veroorzaakte geen stijging in biotoegankelijkheid van lycoppeen in de uiteindelijke aangerijkte o/w-emulsie. Filtratie van de aangerijkte olie veroorzaakte een kleine stijging in de biotoegankelijkheid van lycoppeen.

Deze studie heeft dus aangetoond dat lycoppeen in de oliefase dient opgelost te zijn, voordat een hoge biotoegankelijkheid verkregen wordt. Het thermische behandelen van individuele fracties bleek geen efficiënte methode te zijn om de structurele barrières weg te nemen.

Abstract

As the most abundant carotenoid present in tomatoes, lycopene is responsible for the red colour of this vegetable. An increasing number of studies show that the intake of lycopene is associated with health-related benefits. Despite its high concentration in tomatoes, the absorption of lycopene is hindered by the hydrophobic nature and localization in the chromoplasts. The aim of this study is to investigate the influence of intrinsic (food composition) and extrinsic factors (heat treatments and homogenizations) on the release of lycopene from the tomato sample. Furthermore, to gain a better insight into the release of lycopene from the tomato matrix, detailed research was carried out on the impact of structural barriers on the release of lycopene from the tomato matrix.

The first part of the study describes the influence of 5% oil addition, heat treatments and high pressure homogenization on the bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. Results showed that adding oil of different compositions causes an increased bioaccessibility of lycopene. High pressure homogenization at 100 bar on the other hand did not result in an increased lycopene bioaccessibility nor in tomato pulp, neither in oil/tomato mixtures. With regard to the heat treatments, the bioaccessibility of lycopene was only increased when tomato samples were treated at 120 °C for 20 min. When high pressure homogenization preceded the heat treatment, applying a temperature of 90 °C for 20 min seemed to be high enough to increase the bioaccessibility of lycopene in oil/tomato mixtures compared to the same samples that were only subjected to the heat treatment.

In the second part of the study, tomato pulp was splitted into different fractions in which lycopene is surrounded by a different amount of structural barriers. The different fractions were the large and small cell cluster fraction (lycopene in intact cells), the chromoplast fraction (lycopene in cell organelles) and lycopene in an o/w-emulsion (free lycopene). After the preparation, the fractions were subjected to heat treatments. The influence of the intensity of the treatments on the bioaccessibility was determined and the obtained bioaccessibility values were compared to those of the untreated fractions. The results revealed that lycopene release from the cell cluster fractions and the chromoplast fraction was rather low and about the same for the three fractions. This can be an indication that the main barrier for lycopene release was located in the chromoplast fraction. Another possibility is that the physical state of lycopene in the chromoplasts has an important impact on the release of lycopene. Lycopene in an o/w-emulsion reached the highest bioaccessibility compared to the lycopene bioaccessibility in the other tomato pulp fractions. After application of heat treatments, a decrease in lycopene bioaccessibility was observed in the cell cluster fractions as well as in the chromoplast fraction. Intense heating

(10 min at 175 °C) of lycopene, dissolved in olive oil which was used to prepare the o/w-emulsion, did not improve bioaccessibility of lycopene, whereas filtration of the lycopene dissolved in olive oil improved bioaccessibility of lycopene in the o/w-emulsion slightly.

This study shows that lycopene has to be solubilized in the oil-phase to gain a high bioaccessibility. Thermal treatments applied on individual fractions are not an efficient method to remove the structural barriers for the release of lycopene.

Lijst met gebruikte afkortingen

8-OHdB	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
AOC	Amount On Column
Car	Carotenoïden
Caco-2 cellen	Humane colon adenocarcinoma cellen
CVD	Cardiovasculaire ziekten
DMAPP	Dimethylallylpyrofosfaat
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
EDTA	Ethyleendiaminetetra-acetaat
EFSA	European food safety authority
GGPP	Geranylgeranyldifosfaat
HDL	Hoge dichtheid lipoproteïne
HPH	Hogedrukhomogenisatie
HPLC	Hoge performantie vloeistof chromatografie
IGF-I	Insulineachtige groeifactor I
IGFBP-I	Insulineachtige groeifactor bindingsproteïne I
IPP	Isopentenylpyrofosfaat
LDL	Lage dichtheid lipoproteïne
MAG	Monoacylglycerol
o/w-emulsie	Olie-in-wateremulsie
PEF	Gepulseerde elektrische velden
PET	Polyethyleentereftalaat
pO ₂	Partiële zuurstofconcentratie
PSA	Prostaat specifiek antigeen
sen	Sensibilisator
stdev	Standaardafwijking op steekproef
SR-BI	Scavenging receptor klasse B type I
TAG	Triacylglycerol
VLDL	Zeer lage dichtheid lipoproteïne
VZ	Vetzuur

Inhoudstafel

WOORD VOORAF	I
SAMENVATTING	II
ABSTRACT	IV
LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN	VI
INHOUDSTAFEL	VII
INLEIDING	IX
DEEL 1: LITERATUURSTUDIE	1
1. LYCOPEEN	1
1.1. CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN CAROTENOÏDEN EN LYCOPEEN	1
1.1.1. <i>Structuur van de belangrijkste carotenoïden</i>	1
1.1.2. <i>Isomeren van lycopene</i>	4
1.2. FYSISCHE EIGENSCHAPPEN VAN LYCOPEEN	5
1.2.1. <i>Oplosbaarheid</i>	5
1.2.2. <i>Lichtabsorptie</i>	6
1.3. CHEMISCHE REACTIES MET LYCOPEEN	6
1.3.1. <i>Isomerisatie en degradatiereacties van lycopene</i>	6
1.3.2. <i>Werking als antioxidant</i>	9
1.4. AANWEZIGHEID IN LEVENSMIDDELEN	11
1.5. OPNAME EN METABOLISME	12
1.6. GEZONDHEIDSBEVORDERENDE EFFECTEN VAN LYCOPEEN	13
2. BIOBESCHIKBAARHEID VAN LYCOPEEN	19
2.1. BIOBESCHIKBAARHEID EN BIOTOEGANKELIJKHEID	19
2.2. FACTOREN DIE INVLOED HEBBEN OP BIOTOEGANKELIJKHEID EN BIOBESCHIKBAARHEID	19
2.2.1. <i>Soort</i>	20
2.2.2. <i>Hoeveelheid</i>	21
2.2.3. <i>Voedselmatrix</i>	21
2.2.4. <i>Effectoren voor absorptie</i>	22
2.2.5. <i>Binding met andere moleculen</i>	24
2.3. EFFECT VAN PROCESVOERING OP DE BIOTOEGANKELIJKHEID	24
2.3.1. <i>Hittebehandelingen</i>	24
2.3.2. <i>Hogedrukhomogenisatie</i>	25
DEEL 2: EXPERIMENTELE STUDIE	27
3. INVLOED VAN PROCESVOERING OP DE BIOTOEGANKELIJKHEID VAN LYCOPEEN IN OLIE/TOMAAT MENSSELS	27
3.1. DOELSTELLING EN EXPERIMENTEEL ONTWERP	27
3.2. MATERIALEN EN GEBRUIKTE METHODEN	28
3.2.1. <i>Staalbereiding</i>	28
3.2.2. <i>Hittebehandelingen met de microgolfoven</i>	29
3.2.3. <i>Hogedrukhomogenisatie</i>	30
3.2.4. <i>Deeltjesgrootteverdeling</i>	31
3.2.5. <i>Lichtmicroscopie</i>	32

3.2.6	<i>Bepaling van de biotoegankelijkheid van lycopene door middel van een tweestaps in vitro verteringsprocedure</i>	32
3.2.7	<i>Bepaling van de concentratie aan lycopene</i>	33
3.2.8	<i>Statistische data analyse</i>	34
3.3.	RESULTATEN EN DISCUSSIE	34
3.3.1	<i>Veranderingen in lycopeneconcentratie</i>	34
3.3.2	<i>Effect van het type olie op de biotoegankelijkheid van lycopene</i>	39
3.3.1	<i>Effect van HPH op de biotoegankelijkheid van lycopene</i>	40
3.3.2	<i>Het effect van hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopene</i>	43
3.3.3	<i>Het gecombineerde effect van HPH en hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopene</i>	44
3.4.	BESLUIT	49
4.	INZICHT IN DE STRUCTURELE BARRIÈRES DIE DE BIOTOEGANKELIJKHEID VAN LYCOPEEN IN TOMATEN BEPALEN	51
4.1.	DOELSTELLING VAN HET EXPERIMENT	51
4.2.	MATERIALEN EN GEBRUIKTE METHODEN	53
4.2.1	<i>Staalbereiding</i>	53
4.2.2	<i>Hittebehandelingen in waterbad en oliebad</i>	54
4.2.3	<i>Bepaling van biotoegankelijkheid van lycopene door middel van een tweestaps in vitro verteringsprocedure</i>	55
4.2.4	<i>Bepaling van concentratie aan lycopene</i>	55
4.2.5	<i>Statistische data analyse</i>	58
4.3.	RESULTATEN EN DISCUSSIE	58
4.3.1	<i>Biotoegankelijkheid van lycopene in verschillende fracties geïsoleerd uit tomatenpulp</i>	58
4.3.2	<i>Invloed van intense hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopene in de fractie met grote en kleine celclusters</i>	59
4.3.3	<i>Invloed van milde en intense hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie</i>	61
4.3.4	<i>Invloed van intense hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopene in de met lycopene aangrijkte o/w-emulsie</i>	63
4.4.	BESLUIT	65
5.	ALGEMEEN BESLUIT	68
6.	BRONNEN	71

Inleiding

De huidige consument heeft steeds meer interesse in gezonde voeding. Zowel rauwe als verwerkte groenten en fruit spelen een belangrijke rol in een evenwichtig en gezond dieet omwille van hun nutritionele samenstelling.

Lycopen is als belangrijkste carotenoïde in tomaten verantwoordelijk voor de dieprode kleur ervan. Daarnaast bezit lycopen ook enkele belangrijke eigenschappen in het menselijke lichaam. Deze eigenschappen kunnen voornamelijk toegeschreven worden aan het antioxidante karakter ervan. Steeds meer studies tonen aan dat lycopen uit tomaten gezondheidsbevorderende eigenschappen bezit. Zo wordt lycopen- en tomatenconsumptie geassocieerd met een verlaagd risico op prostaatkanker. Andere studies tonen aan dat lycopeninname ook beschermt tegen cardiovasculaire ziekten (CVD), welke in 2008 verantwoordelijk waren voor 30% van het totaal aantal sterfgevallen wereldwijd. Hiermee zijn cardiovasculaire ziekten de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd.

Alhoewel lycopen in hoge concentratie aanwezig is in tomaten, verloopt de opname van deze fytochemische stof in het lichaam niet optimaal. Lycopen is sterk hydrofoob van aard, en de vertering en absorptie van dit carotenoïde verloopt analoog aan deze van lipiden. De aanwezigheid van een waterige tomatenmatrix en structurele barrières in de tomatencellen belemmert dus de vrijzetting van lycopen. Co-ingestie van oliën kan de vertering en vrijzetting van lycopen uit de tomatenproducten bevorderen. Naast de invloed van het toevoegen van olie kan lycopenvrijzetting ook vergemakkelijkt worden door de structurele barrières van de tomatenmatrix aan te tasten door bijvoorbeeld hittebehandelingen en mechanische procesvoering.

In dit thesisonderzoek worden verschillende mogelijkheden onderzocht om de vrijzetting van lycopen uit de tomatenpulp te beïnvloeden. Allereerst wordt de invloed van toevoegen van olie aan tomatenpulp onderzocht. Vervolgens wordt bestudeerd hoe hittebehandelingen, hogedruk-homogenisatie en combinaties van beiden een invloed kunnen uitoefenen op de vrijzetting van lycopen uit zowel tomatenpulp als olie/tomaatmengsels (Hoofdstuk 3). In Hoofdstuk 4 wordt dieper ingegaan op de invloed van structurele barrières (celwand, celmembraan en chromoplastmembraan) die de biotoegankelijkheid van lycopen beperken. Hiervoor wordt de tomatenpulp opgedeeld in fracties waarin lycopen omgeven wordt door een verschillend aantal barrières. Hierbij wordt ook onderzocht of hittebehandelingen de verschillende barrières kunnen aantasten en dus de biotoegankelijkheid van lycopen kunnen verhogen.

DEEL 1: LITERATUURSTUDIE

1. Lycoppeen

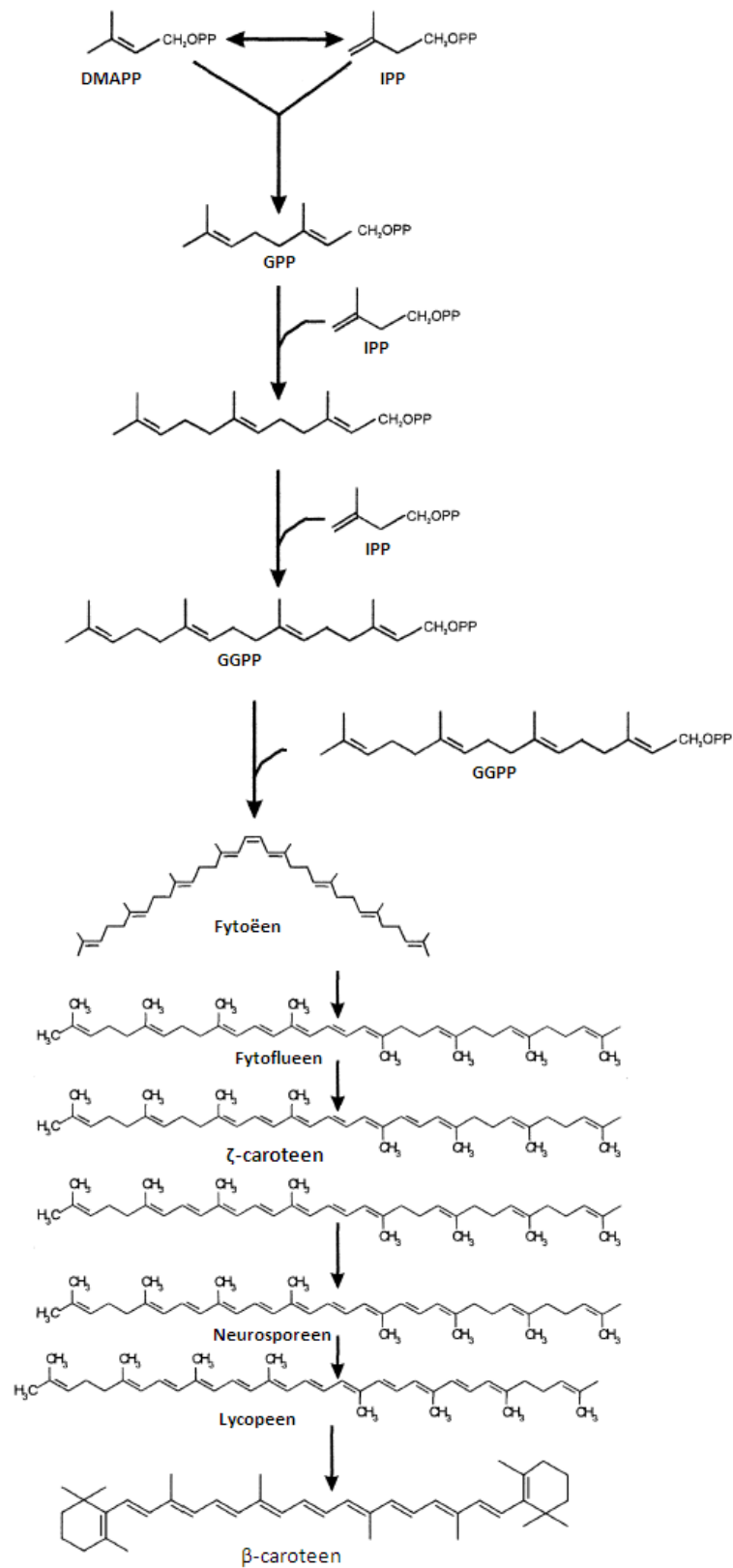
1.1. Chemische eigenschappen van carotenoïden en lycoppeen

1.1.1. Structuur van de belangrijkste carotenoïden

Lycoppeen is een biomolecule dat behoort tot de familie van de carotenoïden. Deze carotenoïden bestaan uit een groep rode, gele en oranje pigmenten. De basisstructuur waaruit de carotenoïden zijn opgebouwd is isopreen (C_5). Vier afgeleiden van isopreenmoleculen (2 dimethylallylpyrofosfaatmoleculen (DMAPP) en 2 isopentenylpyrofosfaatmoleculen (IPP)) kunnen door middel van kop-staartreacties onder invloed van het enzym geranylgeranyl-difosfaatsynthase een geranylgeranyldifosfaat (GGPP) (C_{20}) vormen. Twee GGPP-moleculen vormen fytoëen (C_{40}). Dit laatste vormt de ruggengraat van de carotenoïden. Vervolgens wordt het gevormde fytoëen gedesatureerd om uiteindelijk via de intermediären fytoflueen, ζ -caroteen en neurosporeen lycoppeen te vormen. In dit lycoppeenmolecule worden ten slotte twee β -iononerings gevormd door middel van het lycopceencyclase om zo β -caroteen te kunnen vormen (zie Figuur 1) (Armstrong en Hearst, 1996).

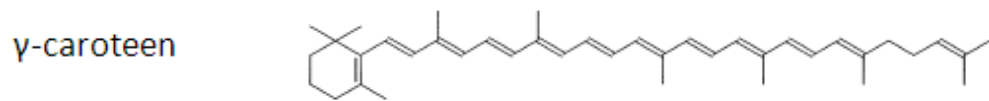
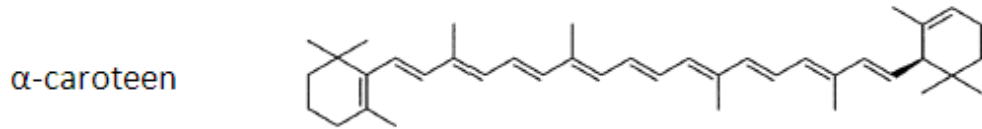
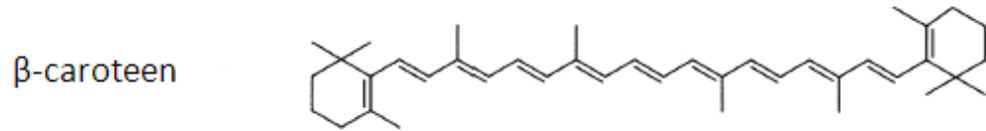
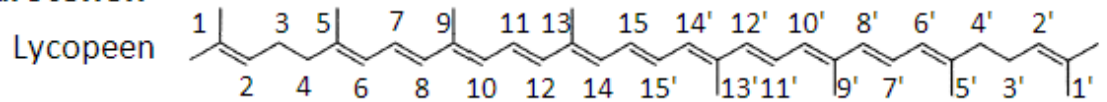
De carotenoïden worden in twee groepen onderverdeeld naar gelang de aanwezigheid van zuurstof. De eerste groep bestaat uit de xanthofielen zoals luteïne, zeaxanthine en kryptoxanthine (zie Figuur 2). Al deze moleculen bezitten minstens een zuurstofatoom (Armstrong en Hearst, 1996). De andere groep zijn de koolwaterstofcarotenoïden, ook wel carotenen genoemd. Deze bezitten geen zuurstofatomen. De belangrijkste vertegenwoordigers van deze laatste groep zijn α -, β - en γ -caroteen en lycoppeen (Shi en Le Maguer, 2000). Deze soort carotenoïden zijn vanwege hun hoge onverzadigde karakter en de afwezigheid van ingebouwde zuurstofatomen kwetsbaar voor oxidatie (Xianquan *et al.*, 2005).

Een andere manier om carotenoïden in te delen is op basis van hun provitamine A activiteit. Carotenoïden bezitten deze activiteit indien ze door middel van een enzymatische splitsing omgezet kunnen worden in vitamine A. Een voorwaarde om vitamine A te kunnen vormen is de aanwezigheid van een β -iononering op het uiteinde van de keten. α - en β -caroteen zijn de bekendste voorbeelden van carotenoïden met provitamine A activiteit (Story *et al.*, 2010).

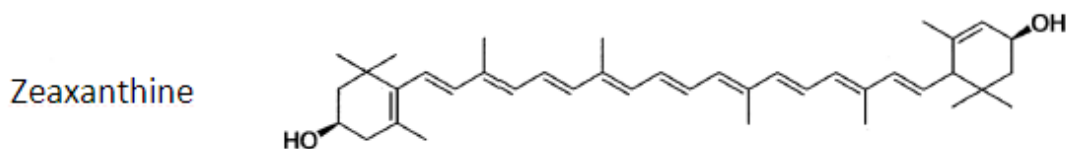
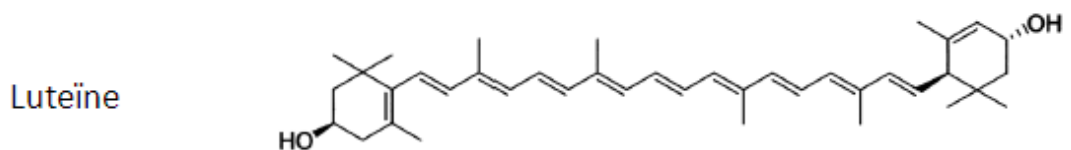
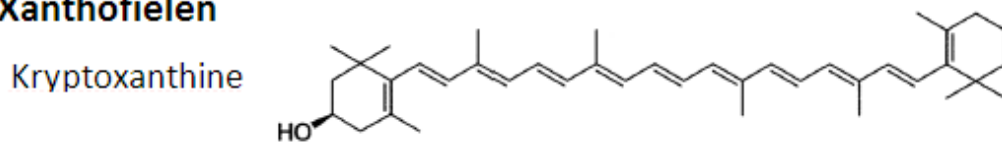


Figuur 1: Biosynthetische reactieweg voor vorming van carotenoïden (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Carotenen



Xanthofielen



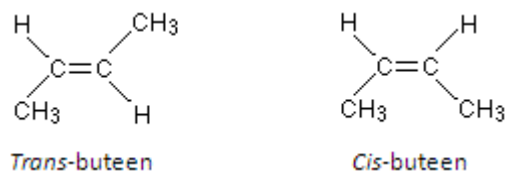
Figuur 2: Structuur van de belangrijkste carotenoïden (Shi en Le Maguer, 2000; Yonekura en Nagao, 2007)

Als carotenoïde is lycopene opgebouwd uit veertig koolstofatomen met dertien dubbele bindingen waarvan elf geconjugeerde en twee niet geconjugeerde. Lycopene heeft een symmetrische en vlakke structuur. De koolstofatomen worden genummerd van de uiteindes van de keten naar het symmetriecentrum toe (zie Figuur 2). Lycopene heeft tevens een acyclisch voorkomen in tegenstelling tot de meeste andere carotenen. Hier komt uit voort dat lycopene geen activiteit als provitamine A bezit (Rao *et al.*, 2006).

1.1.2 Isomeren van lycopeen

Isomeren zijn verbindingen met dezelfde brutoformule maar met een andere plaatsing van substituenten ten opzichte van de aanwezige dubbele binding. Aangezien geen vrije rotatie mogelijk is rond de dubbele binding is het niet mogelijk om isomeren in elkaar om te zetten zonder de dubbele binding te verbreken (Clark, 2007).

De substituenten kunnen zich ofwel aan dezelfde kant ten opzichte van deze dubbele binding bevinden, dit noemt men de *cis*-vorm of ook de Z-vorm (uit het Duits: zusammen) ofwel kunnen ze zich aan een verschillende kant ten opzichte van de dubbele binding bevinden, dit noemt men de *trans*-vorm of ook de E-vorm (uit het Duits: entgegen) (Weedon en Moss, 1994). Een voorbeeld van isomerie is weergegeven in Figuur 3.

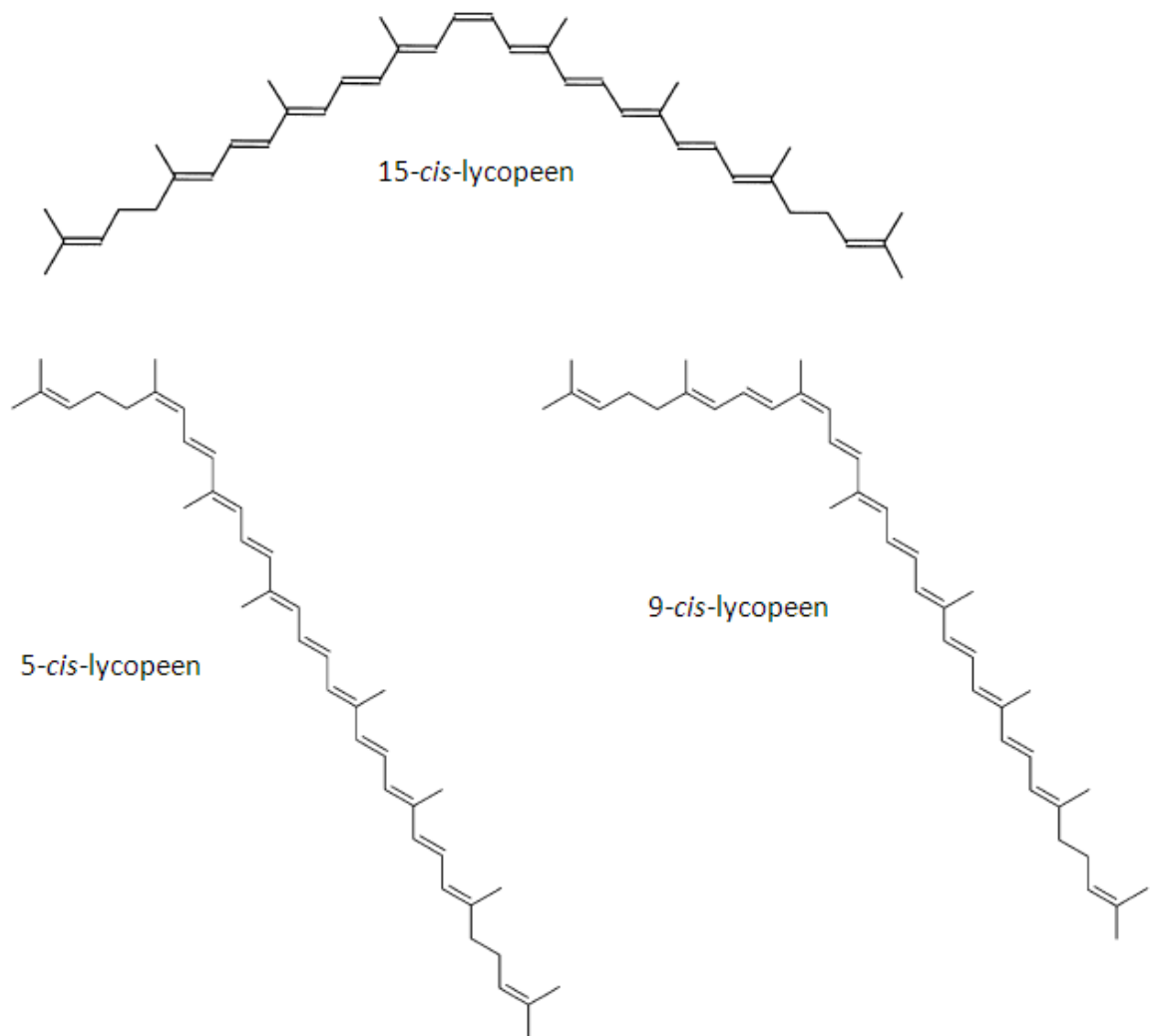


Figuur 3: *Cis*- en *Trans*-isomeren (Clark, 2007).

Lycopeen bevat elf geconjugeerde en twee niet geconjugeerde dubbele bindingen wat tot gevolg heeft dat lycopeen theoretisch kan voorkomen in 1056 verschillende stereoisomeren (Zechmeister, 1962). Nochtans is de meerderheid van deze isomeren te instabiel om in werkelijkheid voor te komen omwille van sterische hindering tussen methyleen en waterstofgroepen (Britton, 1995).

Het meest voorkomende isomeer van lycopeen is het zogenaamde all-*trans*-lycopeen (zie Figuur 2). Bij all-*trans*-lycopeen bevinden alle dubbele bindingen zich in de *trans*-vorm zodanig dat lycopeen een lineaire ruimtelijke structuur verkrijgt.

Naast all-*trans*-lycopeen komen ook, in mindere mate, 5-*cis*-, 9-*cis*- en 15-*cis*-lycopeen voor (zie Figuur 4) (Nguyen en Schwartz, 1998). All-*trans*-lycopeen is een zeer stabiel isomeer. Enkel 5-*cis*-lycopeen is nog stabiel (Chasse *et al.*, 2001).



Figuur 4: Structuur van 5-*cis*-, 9-*cis*- en 15-*cis*-lycopen (Story *et al.*, 2010).

1.2. Fysische eigenschappen van lycopen

1.2.1 Oplosbaarheid

De afwezigheid van polaire groepen zorgt ervoor dat lycopen een zeer apolair en hydrofoob molecule is. Lycopen is goed oplosbaar in chloroform, hexaan, benzeen en aceton (Shi en Le Maguer, 2000). Dit heeft tot gevolg dat lycopen in een waterig milieu zoals in het maagdarmsstelsel zich niet in de waterfase, maar in de oliefase bevindt. Vooral het all-*trans*-lycopen heeft een sterke drang om in waterig milieu neer te slaan als naaldvormige kristallen vanwege de lineaire moleculestructuur (Boon *et al.*, 2010). *Cis*-lycopen is in het algemeen meer polair dan all-*trans*-lycopen en heeft ook minder de neiging om te kristalliseren.

De oplosbaarheid van lycoppeen in olie is afhankelijk van de gebruikte olie en bedraagt ongeveer 0,22 mg/g olijfolie (Svelander *et al.*, 2011). *Cis*-lycoppeen is beter oplosbaar in olie dan *all-trans*-lycoppeen (Nguyen en Schwartz, 1999).

1.2.2 Lichtabsorptie

Carotenoïden worden hoofdzakelijk teruggevonden in celmembranen vanwege hun hydrofobiciteit (Britton, 1995). Aldaar hebben ze de taak om de plant te beschermen tegen fotosensitizatie gedurende de fotosynthese (Shi en Le Maguer, 2000). Ze kunnen met behulp van hun geconjugeerde bindingen licht absorberen zodat deze een hoger energetisch niveau bereiken. De energieinput die hiervoor nodig is, is relatief klein omdat de elektronen in dit geconjugeerd systeem sterk gedelokaliseerd zijn. Vandaar dat de meeste carotenoïden licht absorberen met een golflengte tussen 400 en 500 nm (Britton, 1995). Lycoppeen heeft de hoogste absorptie voor licht met een golflengte van 472 nm (Shi en Le Maguer, 2000).

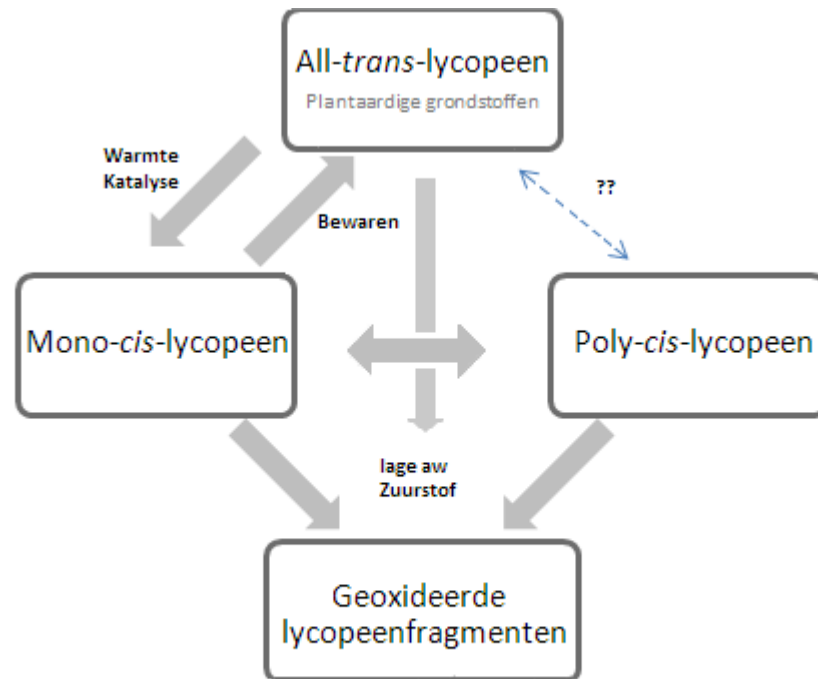
1.3. Chemische reacties met lycoppeen

1.3.1 Isomerisatie en degradatiereacties van lycoppeen

Omwille van het grote aantal dubbele bindingen is lycoppeen erg gevoelig voor isomerisatie en degradatiereacties (Xianquan *et al.*, 2005).

Zo kunnen de *trans*-dubbele bindingen geïsomeriseerd worden tot *cis*-dubbele bindingen (Xianquan *et al.*, 2005). Hierdoor ontstaan vanuit *all-trans*-lycoppeen verschillende isomeren met één (*mono-cis*) of meerdere (*poly-cis*) *cis*-dubbele bindingen (zie Figuur 5). Anderzijds bestaan er ook degradatiereacties, die oxidatief van aard zijn. Vooral bij lage wateractiviteit en aanwezigheid van zuurstof is lycoppeen vatbaar voor deze laatste reacties en ontstaan op deze manier geoxideerde lycoppeenfragmenten (ook wel lycopenoïden genoemd) (Bosković, 1979; Story *et al.*, 2010). De fragmenten die ontstaan zijn voornamelijk aceton, methylheptenon, levulinealdehyde en glyoxaal en deze veroorzaken verliezen in kleurintensiteit en gewijzigde geur- en smaakkenmerken (Xianquan *et al.*, 2005).

De belangrijkste factoren die een invloed uitoefenen op deze twee soorten reacties zijn warmte, licht en zuurstof.



Figuur 5: Isomerisatie- en degradatiereacties van lycopeen (Bosković, 1979).

- Hittebehandelingen

De aanwezigheid van de verschillende lycopeenisomeren kan gewijzigd worden door hittebehandelingen. Verschillende studies onderzochten het effect van hittebehandelingen op de concentraties aan lycopeenisomeren in tomatenpulp.

Shi *et al.* (2003) toonden aan dat lycopeen opgelost in olie met behulp van hittetebehandelingen bij 100 °C geïsomeriseerd kon worden, waardoor de concentratie aan *cis*-isomeren steeg.

Daarnaast merkten Lee en Chen (2002) op dat de concentratie aan *poly-cis*-lycopeen steeg wanneer lycopeen gedurende 18 uur bij 50 °C verbleef terwijl de concentratie aan *mono-cis*-lycopeen ongeveer constant bleef. Ze wezen dit toe aan een snellere omzetting van *mono-cis*-lycopeen naar *poly-cis*-lycopeen ten opzichte van de vorming van de eerste vanuit *all-trans*-lycopeen.

Een studie van Schierle *et al.* (1997) wees uit dat lycopeen in tomatenpasta bij hittebehandelingen bij 75 °C meer de neiging had om in een oliefase te isomeriseren dan in een waterfase.

Andere studies (Sharma en Le Maguer, 1996; Nguyen en Schwartz, 1998; Colle *et al.*, 2010b) ondervonden zeer kleine of geen verhoging van de concentraties aan *cis*-lycopeen in tomaten bij hittebehandelingen bij verschillende temperaturen.

De uiteenlopende effecten van hittebehandelingen op de isomeerconcentraties doen vermoeden dat het evenwicht tussen vorming en degradatie van *cis*-isomeren sterk afhankelijk is van de exacte procescondities.

Gedurende hittebehandelingen treden naast isomerisatiereacties ook degradatiereacties op. De snelheid waarmee deze reacties plaatsvinden is hoger bij hogere temperaturen en langere verhittingsduur (Shi *et al.*, 2003; Xianquan *et al.*, 2005). Over het algemeen geldt dat lycopene een goede weerstand heeft ten opzichte van degradatie bij hittebehandelingen in tegenstelling tot andere micronutriënten zoals bijvoorbeeld vitamine C (Georgé *et al.*, 2011).

Zo besloten Graziani *et al.* (2003) dat bij verwarming van gepelde tomaten bij 100 °C gedurende 2 uur geen significante lycopendegradatie voorkwam. Tevens suggereerde dit artikel dat tomatenschillen, die van nature rijk zijn aan carotenoïden, gedurende de hittebehandelingen fungeren als een carotenoïdenreservoir. Vrijzetting van carotenoïden uit de schil zou eerder langzaam gebeuren en zou op deze manier lycopendegradatie kunnen compenseren voor een bepaalde duur (Graziani *et al.*, 2003).

- Licht

Isomerisatiereacties kunnen ook veroorzaakt worden door bestraling met licht. Lee en Chen (2002) onderzochten het effect van lichtbestraling op de samenstelling van lycopene in hexaan. Ze vonden dat de totale concentratie aan lycopene gedurende het experiment daalde terwijl de concentraties van 5-,9-,13- en 15-*cis*-lycopene en ook di-*cis*-lycopene stegen in het begin van het experiment en achteraf daalden. Shi *et al.* (2002b) onderzochten tevens het effect van lichtbestraling op de samenstelling van lycopene, maar ditmaal in olie. Uit de resultaten van deze laatste studie kon geconcludeerd worden dat een grotere intensiteit van lichtbestraling gepaard gaat met een versnelde lycopenaafbraak.

- Zuurstof

De aanwezigheid van zuurstof is een derde element dat effect heeft op de stabiliteit van lycopene. Zuurstof is een sterk oxidans dat een sterke drang vertoont om lycopene te degraderen. Op deze wijze werkt zuurstof het ontstaan van korte lycopenefragmenten in de hand. Ax *et al.* (2003) elimineerden zuurstof in een o/w-emulsie waarin lycopene opgelost was en ondervonden dat hierdoor de snelheid van de lycopendegradatie drastisch verminderde ten opzichte van de degradatie in een emulsie waarin wel zuurstof aanwezig was. Ook Ribeiro *et al.* (2003) vonden dat verwijdering van zuurstof door middel van het glucose-oxidase enzym een sterke vermindering van lycopendegradatie veroorzaakte.

- Bewaren

De bewaaromstandigheden van lycopeenhoudende levensmiddelen hebben ook hun effect op isomerisatie en degradatiereacties. De eventueel na hittebehandeling gevormde of reeds aanwezige *cis*-isomeren van lycopeen kunnen terug omgezet worden in de *all-trans*-vorm van lycopeen aangezien deze over het algemeen stabiel is dan de *cis*-isomeren (Shi *et al.*, 2002a).

Hogere temperaturen en de aanwezigheid van zuurstof tijdens bewaring zorgen voor versnelde afbraak van lycopeen (Lovric *et al.*, 1970; Zanoni *et al.*, 2003). Anderzijds is de wateractiviteit ook een belangrijke factor tijdens de bewaring van lycopeen (Lovric *et al.*, 1970). Water blijkt immers een beschermende werking te bieden tegen degradatie. Inactivatie van metaalionen die als pro-oxidantia kunnen optreden, vertraging van de oxidatieve degradatiereactie door middel van waterstofbrugvorming met peroxyradicalen en de competitie van water ten opzichte van zuurstof op absorptieplaatsen van het hydrofobe fase zorgen voor een verminderde oxidatie (Lovric *et al.*, 1970).

1.3.2 Werking als antioxidant

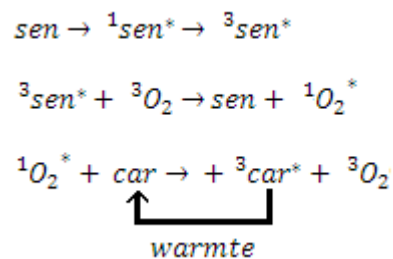
Lycopeen heeft net zoals de andere carotenoïden antioxidante eigenschappen. Een antioxidant is een stof die oxidatie vertraagt of inhibeert wanneer ze aanwezig is in kleine concentraties ten opzichte van het oxideerbare substraat (Young en Lowe, 2001). Dit kan doordat ze reactieve verbindingen met een oxiderende werking kunnen binden en vasthouden of omdat ze de reactieve verbindingen kunnen omzetten in minder sterk oxiderende stoffen. Bekende oxidantia zijn singletzuurstof ($^1\text{O}_2$), peroxyradicalen ($\text{ROO}\cdot$), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxyradicalen ($\text{OH}\cdot$), waterstofperoxide (H_2O_2), hypochloriet (ClO^-), stikstofmonoxid radicalen ($\text{NO}\cdot$) en stikstofperoxynitriet (ONOO^-) (Sies en Stahl, 1995). Deze stoffen veroorzaken weefselschade, schade aan celcomponenten zoals fosfolipiden, proteïnen en DNA. Humane cellen bezitten verscheidene verdedigingssystemen tegen deze sterke oxidantia zoals regulatie van enzymsystemen die antioxidante of pro-oxidante werking hebben (vooral gelokaliseerd in specifieke celcompartimenten) en laagmoleculaire stoffen die dienen als bouwstenen voor de enzymsystemen of die zelf een antioxidante activiteit bezitten (Sies, 2007).

De voorwaarde voor het kunnen uitoefenen van antioxidante eigenschappen is de aanwezigheid van een geconjugeerd systeem (Shi en Le Maguer, 2000). Van de bekende carotenoïden is lycopeen *in vitro* het krachtigste antioxidant (Di Mascio *et al.*, 1989).

Afhankelijk van de aanwezige oxiderende stof kunnen carotenoïden via volgende mechanismen optreden als antioxidant:

- **Singletzuurstof “quenchen” (1O_2)**

Singletzuurstof is een van de reactiefste verbindingen die gevormd kan worden in levende organismen. Het kan gevormd worden door reactie van tripletzuurstof (3O_2) met een sensibilisator (3sen). Deze sensibilisator is voordien geëxciteerd door overdracht van elektromagnetische energie ($h\nu$) (Edge *et al.*, 1997) (zie Figuur 6). Bekende sensibilisatoren zijn porfyryne, riboflavine en chlorofyl (Edge *et al.*, 1997). Het reactieve singletzuurstof kan onschadelijk gemaakt worden door te reageren met een carotenoïde (car) dat op zijn beurt geëxciteerd wordt tot de triplettoestand. Het gevormde triplet carotenoïde kan op twee manieren zijn energie verliezen, namelijk op een fysische of op een chemische wijze. Het kan zijn energie verliezen door deze te laten dissiperen onder de vorm van warmte. Dit wordt fysisch “quenchen” genoemd (Edge *et al.*, 1997). Het triplet carotenoïde kan anderzijds ook afgebroken worden tot carbonyl- en epoxidefragmenten zoals apo-6'-lycopenal, lycopene-5,6-epoxide en 2-methyl-2-heptenon (Ukai *et al.*, 1994; Garavelli, 1998). De structuur van het carotenoïde gaat verloren waardoor men deze laatste reactie ook een blekingsreactie noemt (Young en Lowe, 2001).

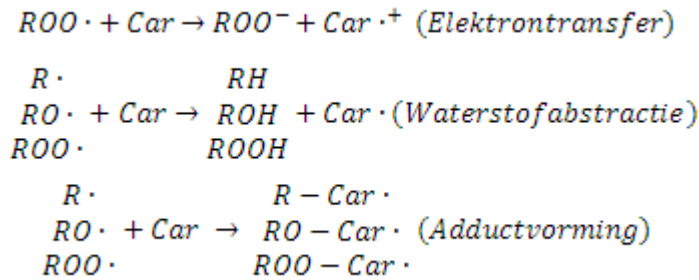


Figuur 6: Vorming van singletzuurstof en reactie met een carotenoïde (Edge *et al.*, 1997).

- **Vrije radicalen vanger**

Carotenoïden kunnen op drie manieren met vrije radicalen reageren. In Figuur 7 is een overzicht van de reacties weergegeven. De eerste manier is een elektrontransfer van het carotenoïde naar het radicaal waarbij deze laatste zijn radicalair karakter verliest. Een andere reactie die kan optreden is waterstofabstractie. Hierbij wordt een waterstof met vrij elektron overgebracht van het carotenoïde naar het vrij radicaal. Hierdoor verliest het radicaal zijn reactiviteit en ontstaat net zoals bij elektrontransfer een radicaal carotenoïde. Ook sterk geoxideerde metalen (zoals Fe^{3+}) kunnen op deze manier gereduceerd worden (Boon *et al.*, 2010). Een derde

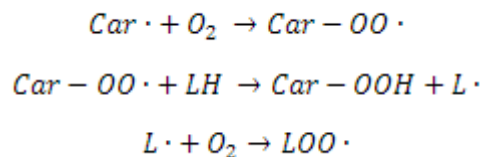
manier is adductvorming. Hierbij wordt een radicaal-carotenoïdecomplex gevormd dat een vrij elektron bezit (Young en Lowe, 2001; Boon *et al.*, 2010).



Figuur 7: Vangen van vrije radicalen door carotenoïden (Boon *et al.*, 2010; Young en Lowe, 2001)

De gevormde radicalaire carotenoïden kunnen met elkaar reageren of verder reageren met andere radicalen of zuurstof (Boon *et al.*, 2010). Truscott (1996) beweerde hieromtrent dat een soort antioxidantenreservoir in het menselijk lichaam aanwezig is dat bescherming biedt tegen radicalen. In dit systeem wordt het gevormde carotenoïderadicaal terug naar zijn grondtoestand gebracht door te reageren met ascorbinezuur en α -tocoferol.

Carotenoïden kunnen echter ook functioneren als pro-oxidant (Young en Lowe, 2001). Vooral de partiële zuurstofdruk (pO_2) speelt hierbij een belangrijke rol. Bij hogere pO_2 waarden kunnen de gevormde carotenoïderadicalen ($car\cdot$) reageren met zuurstof ter vorming van peroxyradicalen ($car-OO\cdot$). Deze laatste veroorzaken lipidenperoxidatie (zie Figuur 8) (Young en Lowe, 2001).



Figuur 8: Reacties van carotenoïden als pro-oxidantia (Young en Lowe, 2001).

Het is belangrijk om op te merken dat deze pro-oxidatieve werking enkel *in vitro* aangetoond werd bij extreme zuurstofconcentraties (zoals 1 atmosfeer) die *in vivo* nooit voorkomen (Young en Lowe, 2001).

1.4. Aanwezigheid in levensmiddelen

Lycopen komt voor in vele kleurrijke fruitsoorten zoals tomaten (0,7-20,0 mg/g), roze pomelmoezen (0,35-3,36 mg/g), watermeloenen (2,30-7,20 mg/g), papaja's (0,11-5,30 mg/g) en roze guava's (5,25-5,50 mg/g) (Nguyen en Schwartz, 1999; Shi en Le Maguer, 2000). De belangrijkste bron van lycopen in het Westers dieet zijn tomaten en afgeleide producten zoals puree, sauzen, sap en ketchup (Shi en Le Maguer, 2000).

De lycopeenconcentraties in tomaten zijn afhankelijk van de variëteit, weefseltype, rijpheid en de blootstelling aan zonlicht tijdens het rijpen (Shi en Le Maguer, 2000).

De aanmaak van lycopeen geschiedt vooral bij de transformatie van chloroplasten naar chromoplasten gedurende het rijpen van de tomaat. De plaatvormige chromoplasten, die zich in de buitenste zones van het pericarp bevinden, worden met microkristallijn lycopeen aangerijkt. Deze chromoplasten worden ook wel kristalloïden genoemd (Ben-Shaul en Naftali, 1969; Shi en Le Maguer, 2000). De meeste carotenoïden zijn *in vivo* vooral aanwezig in de vorm van een proteïne-carotenoïdecomplex in de kern van de membranen gezien hun hydrofoob karakter (Young en Lowe, 2001).

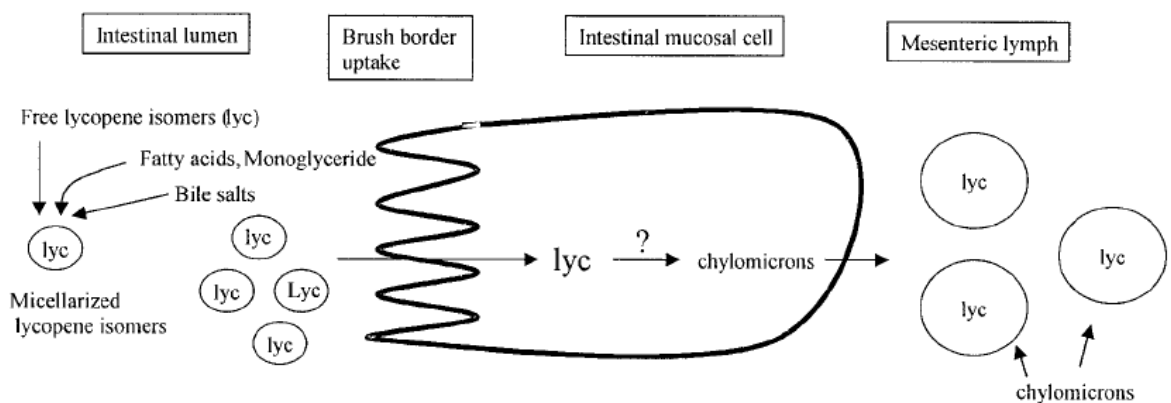
Bovenop de werking als antioxidant bezit lycopeen ook een kwalitatieve functie. Hoge lycopeenconcentraties in levensmiddelen gaan immers gepaard met een intense rode kleur en dit valt in de smaak bij consumenten (Shi en Le Maguer, 2000).

1.5. Opname en metabolisme

Aangezien lycopeen een hydrofoob molecule is, wordt het in het lichaam samen met lipiden opgenomen, verteerd en geabsorbeerd. Na inname is het van belang dat lycopeen vrijgezet wordt uit de voedselmatrix en opgenomen wordt in oliedruppels (emulsificatie) waarna het ingebouwd wordt in zogenaamde 'gemengde micellen' (solubilisatie). Deze vrijzetting begint in de maag met het inwerken van pepsine. Vervolgens werken proteases, lipases en amylases verder aan de vrijzetting van lycopeen in het duodenum (Borel, 2003). De gevormde micellen bevatten galzouten, cholesterol, triacylglycerolen, fosfolipiden, vetoplosbare vitaminen en apoproteïnen (Buyse, 2010). Door het amfifiele karakter van de micellen kunnen de hydrofobe nutriënten in oplossing blijven (During en Harrison, 2004). De gemengde micellen migreren vervolgens naar de apicale zijde van de enterocyten. Lycopeen kan zich op twee manieren doorheen de celmembranen van de enterocyten bewegen. Het kan zoals de meeste vetten door middel van passieve diffusie in het cytoplasma van de enterocyten migreren (Furr en Clark, 1997). Lycopeen kan anderzijds ook geabsorbeerd worden door een cholesterol membraantransporter, ook wel gekend als scavenger receptor klasse B type I (SR-BI). Dit laatste mechanisme werd slechts enkele jaren terug mede ontdekt door During *et al.* (2005). Dit cholesteroltransportproteïne is weinig substraatspecifiek. Zowel cholesterylesters, fosfolipiden, triacylglycerolen, plantensterolen als stanolen worden getransporteerd (Yonekura en Nagao, 2007). Mogelijk zijn naast SR-BI nog andere, onbekende transportproteïnen betrokken bij de absorptie van lycopeen (Story *et al.*, 2010).

Na absorptie wordt lycopeen verpakt in chylomicronen en worden deze laatsten vanuit de enterocyten gesecreteerd in het lymfatisch systeem. Deze chylomicronen zorgen voor de dis-

tributie van lipiden en carotenoïden naar verschillende weefsels alwaar ze vrijgezet worden door de werking van lipoproteïne lipase (Fernández-García *et al.*, 2011). Het gedeelte dat in de chylomicronen blijft, wordt samen met de chylomicronen opgenomen door de lever of herverpakt in zeer lage dichtheid lipoproteïnen (VLDL) en teruggestuurd naar het bloed. Omwille van hun hydrofobe karakter bevinden carotenen zoals lycopeen zich in de kern van de lipoproteïnen (chylomicronen, VLDL en lage dichtheid lipoproteïnen (LDL)) en worden ze bijgevolg bijna niet uitgewisseld met andere lipoproteïnen zoals hoge dichtheid lipoproteïnen (HDL). Hierdoor is de concentratie aan carotenen in LDL hoger ten opzichte van deze in HDL (Fernández-García *et al.*, 2011). Vermoed wordt dat carotenoïdeopname uit lipoproteïnen geschiedt via een LDL-receptor (Boileau *et al.*, 2002). Een schematische weergave van de vertering en de absorptie van lycopeen is weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9: Vertering en absorptie van lycopeen in de dunne darm (Boileau *et al.*, 2002).

De lycopeenconcentratie in menselijk serum varieert zeer sterk van persoon tot persoon (50-900 nM) (Bramley, 2000). De carotenoïden worden in de meeste menselijke organen teruggevonden maar ook hier variëren de concentraties zeer sterk. Lycopeen wordt waarschijnlijk ook afgebroken in het menselijk lichaam maar over de afbraakmechanismen van carotenoïden die *in vivo* plaatsvinden is nog niet veel geweten (Bramley, 2000).

1.6. Gezondheidsbevorderende effecten van lycopeen

De afgelopen jaren werden de gunstige effecten van lycopeen op het voorkomen van verschillende ziekten uitvoerig onderzocht. De effecten van lycopeen met betrekking tot kankerpreventie en het voorkomen van cardiovasculaire ziekten (CVD) werden het meest uitvoerig bestudeerd (Story *et al.*, 2010). Het is van belang om te weten of de grotendeels aanvaarde hypothese, over de gezondheidsbevorderende eigenschappen van lycopeen, gegrond is. Vandaar dat resultaten van enkele actuele epidemiologische onderzoeken hieronder besproken zullen worden.

- Lycopen en kanker

De relatie tussen lycopeninname en het risico op prostaatkanker werd in verschillende studies bestudeerd. Zo bestudeerden Giovannucci *et al.* (2002) het effect van de inname van minimaal 2 porties tomatensaus per week bij 47365 mannen op de ontwikkeling van prostaatkanker via een prospectief observationeel onderzoek aan de hand van voedingsfrequentie-equêtes. De groep die minimaal 2 porties tomatensaus per week consumeerde had een relatief risico op prostaatkanker van 0,77 ($P < 0,001$) ten opzichte van de groep die minder dan 1 portie tomatensaus consumeerde. De associatie tussen lycopeninname en het relatief risico was echter zwak van aard. Chen *et al.* (2001) toonden in een klinische studie aan dat dagelijkse consumptie van tomatensaus gedurende 3 weken de serumconcentratie aan prostaat specifiek antigeen (PSA) 20% liet dalen ($P < 0,001$). Ook de hoeveelheid 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH-dG) verminderde ten opzichte van de controlegroep (het risico daalde van 1,06 tot 0,76 ($P = 0,03$)). Deze dalingen wezen op een verminderd risico op prostaatkanker en verminderde oxidatieve stress.

Ook het effect van lycopen op de ontwikkeling van borstkanker werd onderzocht. Voskuil *et al.* (2008) legden het verband tussen het toedienen van 30 mg/dag tomatenextract (Lyc-o-Mato[®]) gedurende 2 maanden en een vermindering van 7% ($P < 0,05$) van de hoeveelheid vrije insulineachtige groeifactor-I (IGF-I). Deze IGF-I is een indicator voor een verhoogd risico op borstkanker bij premenopausale vrouwen (Hankinson *et al.*, 1998).

De invloed van lycopeninname op de ontwikkeling van longkanker is interessant aangezien longkanker sterk gerelateerd is met roken (Story *et al.*, 2010). Tevens is de partiële zuurstofconcentratie in longen hoger zodat lycopen daar eventueel werkzaam is als pro-oxidante stof en oxidatieve schade kan veroorzaken die op deze manier het ontstaan van kanker in de hand zou kunnen werken (Young en Lowe, 2001). Enkele voorgaande studies wezen al uit dat lycopen als pro-oxidante stof werkt bij aanwezigheid van hogere partiële zuurstofconcentraties (Young en Lowe, 2001). Gallicchio *et al.* (2008) voerden een meta-analyse uit om de invloed van lycopen op longkankerontwikkeling te bepalen. Vijf afzonderlijke klinische onderzoeken werden gebruikt om gegevens omtrent de relatie tussen lycopen en voorkomen van longkanker te verkrijgen. Uit de dosisresponsrelatie bleek dat lycopen een significante ($P < 0,001$) vermindering van het relatieve risico op de ontwikkeling van longkanker veroorzaakte. Deze vermindering was ook op te merken bij hoogste- versus laagste inname maar was hier echter niet significant ($P = 0,26$).

Indien de niet-rokers, rokers en voormalige rokers als aparte groepen beschouwd werden, werd een niet-significante daling van het relatieve risico op longkanker opgemerkt (-20%

voor niet-rokers, -17% voor rokers en -1% voor voormalige rokers). Zoals bij andere meta-analyses dienen ook hier enkele kanttekeningen gemaakt te worden. Zo is de besluitvorming van meta-analyses sterk afhankelijk van integratie en uitsluiting van artikels. Bovendien kan er ook opgemerkt worden dat de innames van carotenoïden tussen de verschillende studies zeer sterk verschilden. Rokers eten daarenboven over het algemeen minder gezond en consumeren minder carotenoïderijk voedsel (Alberg, 2002). Door dit laatste ontstaat een interactie aangezien roken sterk geassocieerd is met de ontwikkeling van longkanker en de carotenoïdeninname (Gallicchio *et al.*, 2008).

De invloed van lycopreeninname op de ontwikkeling van colorectale kanker werd onderzocht door Vrieling *et al.* (2007). In deze gerandomiseerde dubbel blinde placebo gecontroleerde studie werd aangetoond dat toediening van een lycopreenextract (Lyc-o-Mato[®]) (30 mg lycopreen per dag) de serumconcentratie aan insulineachtige groeifactor binding proteïne-1 (IGFBP-1) met 22% verhoogde bij de vrouwen (31 van de 71 proefpersonen) ($P = 0,01$). Ook de serumconcentratie aan IGFBP-2 steeg met 8,2% en 7,8% respectievelijk in mannen en vrouwen. Deze IGFBP moleculen binden en inactiveren insulineachtige groeifactoren (IGF) en spelen op deze manier een rol in de ontwikkeling van verschillende soorten kanker (Giles en Singh, 2003).

De anticarcinogene werking van lycopreen wordt verondersteld veroorzaakt te worden door het antioxidante karakter ervan (Giovannucci *et al.*, 1995). Vrije radicalen zouden verantwoordelijk zijn voor DNA schade van verschillende weefsels en zouden op deze wijze carcinogenese induceren. Antioxidanten verminderen oxidatieve stress, schade aan het DNA, proteïnen, lipiden en andere celcomponenten (Shi en Le Maguer, 2000). Een ander actiemechanisme van lycopreen is de verbetering van communicatie tussen cellen via de gap-junctie door verhoogde translatie van het connexin-43 gen. Connexin-43 is een gen dat codeert voor een belangrijk proteïne uit de gap-junctie (Zhang *et al.*, 1992). Het verlies aan celcommunicatie zou een belangrijke rol spelen tijdens de ontwikkeling van kankers (Shi en Le Maguer, 2000).

Het "Food and Drug Administration (FDA)" vermeldde echter in 2004 dat onvoldoende bewijs geleverd was die de associatie tussen lycopreeninname en verminderd risico op prostaat, long, colorectaal, borst, eierstok, endometriaal, pancreas en maagkanker ondersteunde (Kavanaugh *et al.*, 2007).

Ook het panel van het "European Food Safety Authority (EFSA)" dat bevoegd is voor dieetproducten, voeding en allergieën werd gevraagd om aan de hand van een aantal ingezonden studies een wetenschappelijke mening te geven over gezondheidsclaims waarmee lycopreen

in verband wordt gebracht met betrekking tot bescherming van DNA, proteïnen en lipiden ten opzichte van oxidatieve schade en een normale hartfunctie. De meerderheid van de ingezonden studies bleken met indicatoren te werken die ongeldig waren om een bewijs te leveren voor verminderde oxidatieve schade aan proteïnen bij toediening van lycopene. Het panel besloot hieruit dat onvoldoende bewijs een causaal verband tussen lycopeneconsumptie en bescherming van DNA, proteïnen en lipiden ondersteunde (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2011).

- Lycopene en cardiovasculaire ziekten (CVD)

Een van de kwantitatief belangrijkste doodsoorzaken in Westerse landen zijn de cardiovasculaire ziekten (CVD). CVD is een verzamelnaam voor diverse aandoeningen die veroorzaakt worden door een slechte bloedsomloop of verstoppingen van bloedkanalen. De belangrijkste oorzaken van CVD zijn een ongezond dieet, weinig fysieke activiteit, tabaksrook en alcohol. In 2008 stierven wereldwijd 17,3 miljoen mensen hieraan, goed voor een aandeel van 30% van het totaal aantal sterfgevallen en daarmee doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd (WHO, 2011).

De aanwezigheid van lycopene in het plasma wordt geassocieerd met een verminderd risico op CVD en vermindert ook de concentraties aan biomerkers voor CVD (Story *et al.*, 2010). Sesso *et al.* (2003) onderzochten de invloed van consumptie van tomaatgebaseerde producten op het risico op CVD en myocardiële infarcten. Het ging om een prospectieve cohortstudie waarin 38445 vrouwen deelnamen en ondervraagd werden met voedingsfrequentie enquêtes. Hoewel de associatie tussen lycopeneinname en risico op cardiovasculaire ziekten eerder zwak was, werd een verminderd risico op deze soort ziekten waargenomen tussen de hoogste en laagste kwintielen van de inname (Relatief Risico = 0,71, P = 0,029 tussen inname <1,5 portie tomaat per week en >10 portie tomaat per week).

In een andere studie, uitgevoerd op 1028 Finse mannen werd een inverse associatie waargenomen tussen de serum lycopeneconcentratie en de intima-mediadikte van de hoofdslagaders (Rissanen *et al.*, 2003). De dikte van intima en media van de hoofdslagaders is een maat voor beginnende atherosclerose. Bij een serum lycopeneconcentratie groter dan 0,04 $\mu\text{mol/l}$ daalde de dikte van intima en media van de hoofdslagaders significant ten opzichte van proefpersonen die minder dan 0,04 $\mu\text{mol/l}$ aan lycopene in hun serum bezaten.

Agarwal en Rao (1998) organiseerden een klinische studie die de invloed van lycopeneinname op de oxidatie van LDL onderzocht in 19 gezonde proefpersonen. Lycopene werd gedurende een week toegediend onder de vorm van tomatensap (50,4 mg lycopene/dag), spaghettisaus (39,2 mg lycopene/dag) en vetoplosbaar tomatenextract (75 mg lycopene/dag).

De hoeveelheid LDL cholesterol wordt geassocieerd met een verhoogd risico op lipoproteïnegeïnduceerde atherosclerose (Witztum en Steinberg, 1991). De serumconcentraties aan lycoppeen verdubbelden ten opzichte van de groep die een placebo toegediend kreeg. De oxidatie van LDL verminderde significant in de proefpersonen die de drie lycoppeenbronnen toegediend kregen ten opzichte van een groep die een placebo voorgeschoteld kreeg.

Het is belangrijk om te vermelden dat andere studies geen significante verschillen konden aantonen voor het risico op CVD en atherosclerose tussen proefpersonen met variërende lycoppeenconcentraties in het serum (Iribarren *et al.*, 1997; Klipstein-Grobusch *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006).

De beschermende werking van lycoppeen ten opzichte van de ontwikkeling van CVD wordt toegewezen aan de antioxidante eigenschappen. Lycoppeen verhindert de oxidatie van LDL. Geoxideerd LDL zou accumuleren in weefsels omwille van een moeizamere degradatie door macrofagen en beïnvloedt coagulatieprocessen. Bovendien zou het interfereren met verschillende intracellulaire enzymen en hierdoor de normale cellulaire processen verstoren en cytotoxisch zijn (Witztum en Steinberg, 1991). Hierdoor zou geoxideerde LDL cholesterol een belangrijke functie vervullen tijdens het ontstaan van atherosclerose.

Bij het EFSA werd in 2009 een claim ingediend door Cambridge teranostix ltd. Deze producent claimde dat een lycoppeen-wei complex (bevat 10% lycoppeen) plasma lipoproteïnen beschermt tegen oxidatieve schade en bijgevolg minder arteriële plaques en een verminderd risico op hartziekten, hartaanval en andere gevolgen van atherosclerose veroorzaakte. De claim werd niet toegekend omwille van de lage bewijskracht van zes humane interventiestudies (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2010).

Een andere claim (EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), 2011) werd ingediend om een wetenschappelijke opinie te vormen over het effect van lycoppeen op de cardiovasculaire gezondheid. Vele studies beschreven een associatie tussen serum lycoppeenconcentraties en verschillende factoren die afhankelijk zijn van cardiovasculaire gezondheid. Bij de meeste van deze studies ontbrak echter informatie over de lycoppeendosering waardoor het onduidelijk was of hoge serum lycoppeenconcentraties overeenkwamen met hoge lycoppeeninname of met andere, niet gedefiniëerde factoren. Studies die de lycoppeeninname wel vermeldden namen niet-significante effecten waar tussen de behandelde groep en de controlegroep proefpersonen. Hieruit besloot het panel dat er geen causaal verband is tussen lycoppeeninname en bescherming tegen oxidatiereacties van DNA, proteïnen en lipiden.

- Causaliteit

Na bovenstaande studies te hebben onderzocht blijven enkele essentiële vragen onbeantwoord. De belangrijkste vraag is of lycopen effectief gezondheidsbevorderende eigenschappen bezit. In vele studies wordt geen duidelijk onderscheid gemaakt tussen de effecten die veroorzaakt worden door lycopen en de effecten die veroorzaakt worden door tomaten in hun geheel (Giovannucci, 2005). Het is bovendien mogelijk dat meerdere constituenten in tomaten op een synergistische wijze een gezondheidsbevorderend effect bezitten. Tomaten bezitten naast lycopen ook nog andere bioactieve componenten zoals provitamine A, flavanoïden, vitamine C en vezels (Story *et al.*, 2010). Er bestaan aanwijzingen dat sommige van deze bioactieve componenten zoals flavanoïden gezondheidsbevorderende effecten bezitten (Wang *et al.*, 2003). Het is ook niet volledig duidelijk op welke manier lycopen zijn gezondheidsbevorderende eigenschappen uitoefent en of deze veroorzaakt worden door lycopen zelf, dan wel door bioactieve lycopenmetaboliëten (Story *et al.*, 2010).

Indien lycopen effectief de gezondheid bevordert door middel van zijn antioxidante werking is het noodzakelijk om de effecten van tekort of overmaat aan lycopen op het menselijk lichaam te bestuderen. Sommige door oxidatiereacties gevormde schadelijke afbraakproducten zijn immers *in vivo* verantwoordelijk voor immunoresponsen. In deze context zijn zuurstofradicalen van belang bij activatie van redoxgevoelige transcriptiefactoren die ontstekingsreacties in het lichaam activeren (Van Dierendonck, 2007). Indien te veel antioxidanten ingenomen worden zal het afwezig blijven van deze reacties hun gevolgen tonen voor de menselijke gezondheid.

2. Biobeschikbaarheid van lycoppeen

2.1. Biobeschikbaarheid en biotoegankelijkheid

In het kader van vertering en absorptie is het belangrijk om aan te halen dat de opname van lycoppeen in het lichaam niet efficiënt verloopt (Borel, 2003). Nochtans is voldoende lycoppeenopname noodzakelijk om fysiologische en eventuele gezondheidsbevorderende effecten te verkrijgen.

De fractie van een ingenomen nutriënt, die na vertering beschikbaar gesteld wordt voor absorptie in het maag-darmstelsel, zal een belangrijke invloed hebben op efficiëntie waarmee deze wordt opgenomen. Deze fractie wordt omschreven als de biotoegankelijkheid van een nutriënt (Parada en Aguilera, 2007). Biotoegankelijkheid wordt meestal *in vitro* gemeten en wordt voorafgegaan door een experiment dat het menselijk verteringsstelsel nabootst (Hedrén *et al.*, 2002).

Een andere belangrijke term in deze context is de biobeschikbaarheid. Deze wordt gedefinieerd als de fractie van een ingenomen nutriënt die na absorptie beschikbaar wordt gesteld en bruikbaar is voor fysiologische functies en metabole processen (Jackson, 1997). Het omvat de biotoegankelijkheid, het absorptieproces, metabolisme, transport en bioactiviteit van een voedingscomponent (Fernández-García *et al.*, 2011). De biobeschikbaarheid van een nutriënt wordt vaak *in vivo* bepaald door het meten van plasmaconcentraties na inname van een nutriënt (Parada en Aguilera, 2007).

Andere technieken om biobeschikbaarheid te meten zijn: het gebruik van diermodellen, isotopisch merken en het gebruik van humane colon adenocarcinomacellen (Caco-2) celculturen (Abdel-Aal en Akhtar, 2006).

2.2. Factoren die invloed hebben op biotoegankelijkheid en biobeschikbaarheid

Verschillende factoren hebben invloed op de biobeschikbaarheid van lycoppeen. Over het algemeen is de efficiëntie waarmee de absorptie van carotenoïden uit levensmiddelen plaatsvindt afhankelijk van de voorafgaande behandeling van het voedsel (rauw, hittebehandelingen, etc.), de samenstelling van het ingenomen voedsel, de activiteiten van de verteringsenzymen en de transportefficiëntie van de enterocyten (Borel, 2003).

De eerste letters van enkele factoren die geacht worden een aanzienlijk effect uit te oefenen op de biobeschikbaarheid van carotenoïden werden in het geheugensteuntje "SLAMENGHI" gegoten (Castenmiller en West, 1998).

Deze factoren zijn:

- Soort carotenoïde (Species)
- Binding met andere moleculen (Linkage)
- Hoeveelheid ingenomen carotenoïden (Amount)
- Voedselmatrix waarin het carotenoïde zich bevindt (Matrix)
- Aanwezigheid van absorptie- en bioconversieëffectoren (Effectors)
- Nutritionele toestand van de gastheer (Nutrient status)
- Genetische factoren (Genetic factors)
- Gastheergerelateerde factoren (Host)
- Interacties veroorzaakt door combinaties van bovenstaande factoren (mathematical Interactions)

Hieronder volgt een omschrijving van enkele factoren die de biotoegankelijkheid van lycopene in tomaten beïnvloeden. Naast de beschreven factoren zijn er ongetwijfeld nog tal van andere elementen die de opname van lycopene beïnvloeden zoals gastheergerelateerde factoren en genetische factoren maar deze worden in het kader van dit werk buiten beschouwing gelaten. De factoren worden in aflopende mate van belang voor de biotoegankelijkheid weergegeven.

2.2.1 Soort

De hydrofobiciteit van carotenoïden is een belangrijke soortafhankelijke eigenschap van carotenoïden die een invloed heeft op de biobeschikbaarheid en biotoegankelijkheid. De hydrofobiciteit is omgekeerd gerelateerd met de biobeschikbaarheid (Huo *et al.*, 2007).

Ook de geometrische configuratie waarin lycopene zich bevindt, bepaalt de biobeschikbaarheid. Ongeveer 50% van het lycopene dat aanwezig is in weefsels van mensen en dieren bestaat uit *cis*-isomeren terwijl 90% van het lycopene dat zich in het dieet bevindt bestaat uit *all-trans*-lycopene (Boileau *et al.*, 1999; Boileau *et al.*, 2002). Hierdoor ontstond de hypothese dat de *cis*-isomeren beter ingebouwd worden in micellen waardoor ze ook beter geabsorbeerd worden door de enterocyten (zie paragraaf 1.2.1). Mogelijk is dit effect te wijten aan het feit dat *all-trans*-lycopene eerder de neiging heeft om te aggregeren en kristallen te vormen (Britton, 1995), en dat *cis*-lycopene gemakkelijker dan *all-trans*-lycopene in de chylomicronen ingebouwd kan worden (Boileau *et al.*, 1999; Boileau *et al.*, 2002). Recent onderzoek (Richelle *et al.*, 2010) toonde echter aan dat het isomeerprofiel in de gemengde micellen gelijk is aan dat van het geconsumeerde tomatenproduct en dat de iso-

merisatie van all-*trans*-lycopeen naar verschillende *cis*-lycopeen isomeren enkel plaatsvindt binnenin de enterocyten. Hieruit werd besloten dat isomerisatie in de enterocyten een belangrijke oorzaak is voor de verhoogde ratio aan *cis*-isomeren in de chylomicronen en weefsels.

2.2.2 Hoeveelheid

De meeste studies die onderzoek voeren naar de absorptie van carotenoïden gaan uit van een dosisresponsrelatie alhoewel hier nog maar weinig onderzoek naar gevoerd is. In een studie van Devaraj *et al.* (2008), uitgevoerd op 67 gezonde volwassenen, werd het effect van toediening van verschillende lycopeenconcentraties (0, 6,5, 15 en 30 mg/dag in capsulevorm), gedurende 8 weken, op de plasma lycopeenconcentratie onderzocht. De proefpersonen werden aan de start van de studie onderworpen aan een lycopeenvrij dieet om standaardisatie te bekomen. De hoogste plasma lycopeenconcentraties werden bekomen bij toediening van 15 en 30 mg lycopeen/dag terwijl bij toediening van 6,5 mg/dag gelijkaardige plasma lycopeenconcentraties bekomen werden als voor de uitwasperiode. Statistische analyse van de dosisresponsrelatie ontbrak echter in deze studie. Ook Rao en Shen (2002) onderzochten de invloed van toediening van verschillende dosissen lycopeen op de concentratie van deze stof in het serum van mensen. In deze laatste studie zorgde toediening van minimaal 5 mg/dag voor een significante toename van de lycopeenconcentratie in het serum, waarbij deze laatste parameter echter niet significant verschilde bij toediening van 5, 10 of 20 mg/dag aan lycopeen. Stahl *et al.* (2002) maakten hieromtrent de opmerking dat de absorptiecapaciteit van carotenoïden bij een inname van meer dan 30 mg/dag begrensd wordt omwille van fysiologische redenen zoals de beperkte capaciteit waarmee micellen, enterocyten en chylomicronen carotenoïden kunnen opnemen gedurende de spijsvertering.

2.2.3 Voedselmatrix

De voedselmatrix van groenten en fruit bestaat uit een groot, continu medium dat opgebouwd is uit cellen en waarin de nutriënten zich bevinden. Deze nutriënten kunnen op verschillende grootteordes van afstand interageren met componenten en structuren uit de voedselmatrix. De voedselmatrix waarin carotenoïden zich bevinden heeft een zeer sterke invloed op biotoegankelijkheid aangezien ze in de eerste plaats uit de voedselmatrix vrijgezet moeten worden alvorens ze geabsorbeerd kunnen worden door de enterocyten (Borel, 2003). De lage biotoegankelijkheid van lycopeen kan grotendeels toegeschreven worden aan het insluiten van kristallen in chromoplasten (Parada en Aguilera, 2007).

Het kauwen van voedsel is *in vivo* de eerste en belangrijkste stap voor de transformatie van de voedselmatrix. Hierdoor wordt de deeltjesgrootte van het voedsel kleiner en vergroot de specifieke oppervlakte zodat het voedsel beter bereikbaar is voor verteringsenzymen en de absorptie door de darmwand verbetert (Suzuki *et al.*, 2005).

2.2.4 Effectoren voor absorptie

Carotenoïden worden op dezelfde manier als lipiden geabsorbeerd. Dit heeft tot gevolg dat een hydrofobe lipidenfase door carotenoïden gebruikt kan worden als transportmiddel. Lipiden verhogen vooral de biobeschikbaarheid van sterk hydrofobe carotenoïden zoals lycopene (Yonekura en Nagao, 2007). De aanwezigheid van lipiden in de maaltijd zorgt voor een verhoogde galzoutsecretie door de galblaas en daarmee samenhangend een grotere hoeveelheid aan micellen. Ook de oplosbaarheid van carotenoïden in micellen en de productie van chylomicronen worden gestimuleerd door de aanwezigheid van lipiden in het maagdarmsstelsel (Hofmann, 1963; Borel, 2003).

Een klinische studie (Brown *et al.*, 2004) concludeerde dat inname van salades waaraan canolaolie werd toegevoegd de chylomicronconcentratie aan carotenoïden significant ($P < 0,02$) deed stijgen ten opzichte van inname van een salade waaraan minder olie werd toegevoegd. Ook een *in vitro* studie uitgevoerd door Hornero-Méndez en Mínguez-Mosquera (2007) onderzocht de invloed van toevoegen van 0, 5 en 10% olijfolie op de bio toegankelijkheid van carotenoïden in zowel gekookte als niet-gekookte wortels. Hoewel de resultaten niet statistisch geanalyseerd werden, werd een verhoging van de hoeveelheid naar de gemengde micellen getransfereerde carotenoïden (α - en β -caroteen) waargenomen bij stijgende olieconcentraties.

De mate waarin lipiden de bio toegankelijkheid en biobeschikbaarheid van lycopene verhogen is afhankelijk van de hoeveelheid aan lipiden, de soort vetzuren veresterd aan glycerol, de soort en hoeveelheid amfipatische lipiden en de mate waarin lipiden een emulsie kunnen vormen (Borel, 2003).

Uit enkele studies (Hollander en Ruble, 1978; Huo *et al.*, 2007; Colle *et al.*, 2012) blijkt dat de bio toegankelijkheid van lycopene afhankelijk is van de lengte van de vetzuren aanwezig in triacylglycerolen (TAG's) maar niet van de graad van onverzadiging. TAG's met langeketenvetzuren verhogen de bio toegankelijkheid effectiever dan middenlangeketen en korteketen vetzuren (Huo *et al.*, 2007). Dit effect wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat hydrolyseproducten van langeketenvetzuren hydrofober zijn dan die van korteketen vetzuren. Op deze manier ontstaan hydrofobere micellen waarin carotenen gemakkelijker kun-

nen oplossen (Huo *et al.*, 2007). Tevens is het zwelvermogen van gemengde micellen opgebouwd uit langeketenvetzuren en langeketenmonoacylglycerolen (MAG's) groter in vergelijking met micellen bestaande uit korteketenvetzuren (Porter *et al.*, 2004).

Naast de soort is ook de hoeveelheid toegevoegde lipiden van belang voor de biotoegankelijkheid. Zo ondervonden Colle *et al.* (2012) dat bij toevoegen van TAG's, die voornamelijk uit middenlange- en langeketenvetzuren bestonden, aan tomatenpulp een optimum ontstond voor de *in vitro* biotoegankelijkheid van lycopene in functie van de hoeveelheid toegevoegde lipiden terwijl de biotoegankelijkheid bij toevoegen van TAG's met middellangeketenvetzuren bleef stijgen in functie van de hoeveelheid toegevoegde lipiden. In dezelfde studie werd wel opgemerkt dat toevoegen van langeketenvetzuren met hoge graad van onverzadiging een eerder lage biotoegankelijkheid van lycopene veroorzaakte ten opzichte van het toevoegen van andere lipiden. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de tragere hydrolyse van TAG's die polyonverzadigde vetzuren bevatten (Mu en Høy, 2004).

Deze resultaten liggen in lijn met die van Borel *et al.* (1998). In deze laatste studie werd de concentratie aan β -caroteen in de chylomicronen gemeten na inname van een testmaaltijd (120 mg β -caroteen per maaltijd) in combinatie met enerzijds 40 g TAG's die middenlangeketenvetzuren bevatten en anderzijds 40 g TAG's die langeketenvetzuren bevatten. Deze studie wees uit dat de β -caroteenconcentraties in de chylomicronen na inname van de testmaaltijd gecombineerd met TAG's die langeketenvetzuren bevatten significant ($P < 0,05$) groter waren dan na inname van een testmaaltijd in combinatie met TAG's die middenlangeketenvetzuren bevatten.

Naast toevoegen van olie kan co-ingestie van proteïnen en lecithine zorgen voor een stabilisatie van de lipide emulsies en de vorming van micellen in het gastrointestinaal stelsel in de hand werken (Castenmiller en West, 1998).

Anderzijds is het ook mogelijk dat effectoren de biotoegankelijkheid negatief beïnvloeden. Een bekend voorbeeld zijn dieetvezels in groenten en fruit. Deze zijn in staat om de biotoegankelijkheid van lycopene aanzienlijk te verlagen (Erdman *et al.*, 1993). Zo toonden Rock en Swendseid (1992) aan dat pectine de absorptie van carotenoiden verlaagde. De carboxylresidu's van pectine verhogen de viscositeit van de bolus waardoor de opname van lycopene verlaagt. In een recente studie van Lemmens *et al.* (2009) werd gevonden dat de eigenschappen van pectine niet enkel de hardheid maar ook de biobeschikbaarheid van carotenen in wortels beïnvloedden. Deze laatste studie besloot dat hardheid en biotoegankelijkheid van β -caroteen invers gecorreleerd zijn.

Een ander effect van dieetvezel is de interactie met galzouten. Hierdoor verlaagt de hoeveelheid gevormde gemengde micellen en bijgevolg daalt de absorptie van lipiden, cholesterol en carotenoïden (Castenmiller en West, 1998). Ten slotte zorgt dieetvezel voor inhibitie van lipasen waardoor de vrijzetting van carotenoïden zoals lycopene uit lipidedruppels verlaagt en dus ook de biotoegankelijkheid (Borel, 2003).

Ook de inname van sucrose polyester, een veelgebruikte niet-absorbeerbaar vetanaloog, veroorzaakt een vermindering van de biotoegankelijkheid van carotenoïden. Na inname van deze stof werden verlaagde plasma carotenoïdeconcentraties waargenomen (Weststrate en van het Hof, 1995). Dit is te wijten aan het feit dat sucrose polyester niet gehydrolyseerd kan worden door lipasen maar wel een deel van de carotenoïden opneemt waardoor ook deze niet biobeschikbaar worden (Yonekura en Nagao, 2007).

2.2.5 Binding met andere moleculen

Lycopene in plantaardig materiaal kan, zoals hierboven reeds beschreven, voorkomen in de vorm van proteïne-carotenoïdecomplexen. Carotenoïden kunnen enkel in vrije vorm geabsorbeerd worden. Hierdoor speelt de complexering een rol in de biotoegankelijkheid (Borel, 2003).

2.3. Effect van procesvoering op de biotoegankelijkheid

Zoals hierboven reeds vermeld wordt de opname van lycopene in het menselijk lichaam beïnvloed door zowel productgebonden (voedselmatrix, toevoegen van olie,...) als gastheerge-relateerde factoren (leeftijd, ziektes,...). Deze opname van lycopene uit rauwe levensmiddelen verloopt van nature niet efficiënt en kan verhoogd worden door procesvoering (Porrini *et al.*, 1998; Graziani *et al.*, 2003). Het effect van hittebehandelingen en hogedrukhomogenisatie op de biotoegankelijkheid van lycopene wordt hieronder besproken.

2.3.1 Hittebehandelingen

Het verwarmen van lycopenehoudende levensmiddelen zoals tomaat heeft belangrijke gevolgen voor de biotoegankelijkheid van lycopene. Enkele studies (Stahl en Sies, 1992; Gartner *et al.*, 1997; Colle *et al.*, 2010b) besloten dat hittebehandelingen een stijging van de biotoegankelijkheid of biobeschikbaarheid van lycopene veroorzaakten. Gartner *et al.* (1997) namen waar dat inname van tomatenpuree (hittebehandeld) (23 mg lycopene/dosis) de concentratie aan lycopene in de chylomicronen significant verhoogde ($P < 0,05$) in vergelijking met de inname van rauwe tomaten (23 mg lycopene/dosis). In een andere studie (Stahl en Sies, 1992) ontdekte men gelijkaardige resultaten. Het koken van

tomatensap gedurende 1 uur in aanwezigheid van 1% maïsolie veroorzaakte een significante stijging van de biobeschikbaarheid van lycopene in tomatensap. In de studie van Colle *et al.* (2010b) werd echter geen verhoogde *in vitro* bio toegankelijkheid waargenomen na thermische behandelingen van tomatenpulp met een duurtijd van 30 minuten bij temperaturen lager dan 130 °C. Ook Tibäck *et al.* (2009) vonden geen significante stijging van het percentage bio toegankelijk lycopene na hittebehandelingen van 8 minuten bij 95 °C en 20 minuten bij 100 °C. Deze laatste studies doen vermoeden dat intensieve hittebehandelingen noodzakelijk zijn om de bio toegankelijkheid van lycopene te optimaliseren.

Hittebehandelingen kunnen op verschillende manieren de bio toegankelijkheid van lycopene verhogen. Zo heeft verwarmen vermoedelijk invloed op de vrijzetting van lycopene door denaturatie van proteïne-carotenoïdecomplexen (Thane en Reddy, 1997). Hierdoor wordt de fractie vrij lycopene groter. Ook de celwandstructuur kan aangetast worden door hittebehandelingen waardoor lycopene uit de cel kan vrijgezet worden (Stahl en Sies, 1992). Op deze manier kan lycopene gemakkelijker in contact komen met verteringsenzymen en micellaire componenten wat leidt tot een hogere bio toegankelijkheid (Stahl en Sies, 1992).

Na hittebehandelingen worden ook verhoogde hoeveelheden *cis*-isomeren van lycopene teruggevonden in lycopenehoudende stalen (zie paragraaf 1.3.1). Indien de hypothese die stelt dat *cis*-lycopene beter oplosbaar is in gemengde micellen (Britton, 1995) correct is, zou het verhogen van de fractie aan *cis*-isomeren een verhoogde bio toegankelijkheid tot gevolg hebben.

2.3.2 Hogedrukhomogenisatie

Een veelgebruikte manier om olie-in-water-emulsies (o/w-emulsies) te stabiliseren is hogedrukhomogenisatie. Tegelijkertijd wordt de viscositeit van de mengsels verhoogd en worden micro-organismen gedeeltelijk geïnactiveerd door middel van verlies van hun celintegriteit (Popper en Knorr, 1990).

Hogedrukhomogenisatie leidt onder bepaalde condities tot desaggregatie van cellen uit het plantenweefsel en het verlies van de celstructuur (Lopez-Sanchez *et al.*, 2010). Celdisruptie wordt veroorzaakt door cavitatie, verhoogde afschuifkrachten en verhoogde turbulentie gedurende de homogenisatie (Stang *et al.*, 2001).

Door het verlies van celstructuur kan lycopene gemakkelijker vrijgezet worden uit de voedselmatrix wat volgens sommige studies geacht wordt een hogere bio toegankelijkheid te veroorzaken (Gartner *et al.*, 1997; van het Hof *et al.*, 2000a; Parada en Aguilera, 2007).. An-

dere studies vonden dat hogedrukhomogenisatie van tomatenpulp en olie/tomaat-emulsies geen significante stijgingen voor de biotoegankelijkheid van lycopene teweeg brachten (Colle *et al.*, 2010c; Svelander *et al.*, 2011). Bovendien beschreven de resultaten van Colle *et al.* (2010c) een daling van de fractie biotoegankelijk lycopene in functie van de homogenisatiedruk. Als hypothese wordt gesteld dat hogedrukhomogenisatie niet enkel effect heeft op de vrijzetting van lycopene maar ook een verhoging van de viscositeit van de tomatenpulp tot gevolg heeft (Thakur *et al.*, 1995). Mogelijk wordt deze viscositeitsverhoging veroorzaakt door het versterkte vezelnetwerk dat ontstaat uit celwandmateriaal van de afgebroken cellen (Bayod *et al.*, 2007). Een sterk vezelnetwerk kan lycopene dat vrijgekomen is na celafbraak vasthouden en ervoor zorgen dat lycopene minder toegankelijk is voor verteringsenzymen en galzouten (McClements *et al.*, 2009).

DEEL 2: EXPERIMENTELE STUDIE

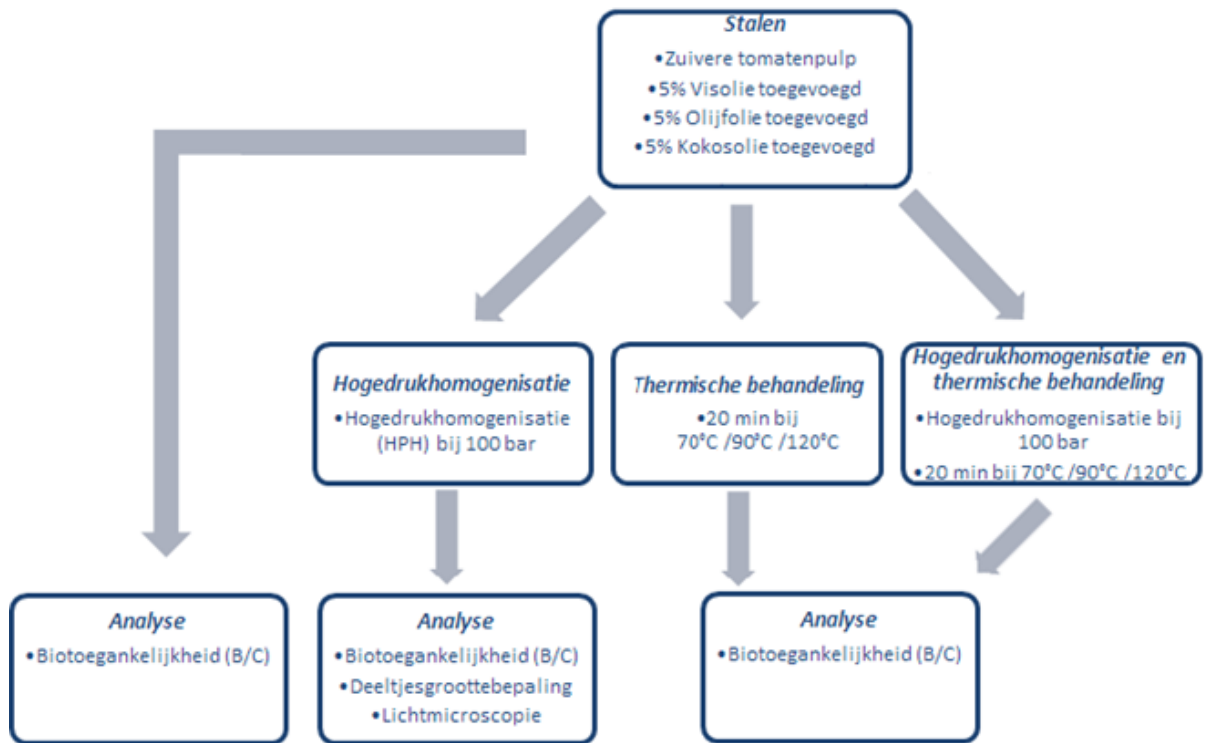
3. Invloed van procesvoering op de biotoegankelijkheid van lycoppeen in olie/tomaat mengsels

3.1. Doelstelling en experimenteel ontwerp

Omwille van zijn lipofiel karakter verloopt de absorptie van lycoppeen in het menselijk lichaam niet efficiënt. Deze microconstituent heeft bijgevolg een lage biotoegankelijkheid wanneer deze dient opgenomen te worden uit rauwe groenten en fruit.

De invloed van procesvoering op de biotoegankelijkheid van lycoppeen is in het verleden reeds onderzocht. Zo bleek uit de studie van Colle *et al.* (2010b) dat hittebehandelingen van zuivere tomatenpulp enkel in beperkte mate de biotoegankelijkheid van lycoppeen doen stijgen. Hogedrukhomogenisatie van tomatenpulp had zelfs een negatieve invloed op de bio-toegankelijkheid van lycoppeen (Colle *et al.*, 2010c). Anderzijds zorgde de aanwezigheid van lipiden in de rauwe tomatenpulp voor een verhoogde bio-toegankelijkheid van lycoppeen (Huo *et al.*, 2007; Yonekura en Nagao, 2007; Colle *et al.*, 2012).

In dit experiment werd de invloed van de aanwezigheid van lipiden in combinatie met procesvoering op de bio-toegankelijkheid van lycoppeen onderzocht (zie Figuur 10). Hiervoor werd 5% vis-, olijf- en kokosolie aan de tomatenpulp toegevoegd. In een eerste luik van het experiment werd de bio-toegankelijkheid van de onbehandelde stalen bepaald. In het tweede en derde luik werd de invloed van hogedrukhomogenisatie en hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid van lycoppeen bestudeerd. In het laatste luik werd het gecombineerd effect van hogedrukhomogenisatie en hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid onderzocht. Naast de bio-toegankelijkheid werd ook de deeltjesgrootte en celintegriteit van de emulsies, die na hogedrukhomogenisatie gevormd werden, bepaald.



Figuur 10: Experimenteel ontwerp voor onderzoek naar de invloed van procesvoering op biotoegankelijkheid van lycopene in olie/tomaatmengsels.

3.2. Materialen en gebruikte methoden

3.2.1 Staalbereiding

De gebruikte tomaten (Patrona, Spanje, september 2010) werden in 4 delen gesneden en ingevroren in vloeibare stikstof. Hierna werden ze bewaard in een diepvriezer bij $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tot ze voor gebruik in de experimenten ontdooid werden. Vervolgens werden de tomatenstalen verwerkt tot pulp (3 x 5 s mixen) (Büchi Mixer B-400, Büchi, Flawil, Zwitserland). De tomatenpulp werd hierna over een gestandaardiseerde zeef met mazen van 1 mm ontdaan van schil en pitten.

Aan een deel van de tomatenpulp werd 5% visolie, olijfolie of kokosolie toegevoegd. Deze verschillende soorten olie werden aangeleverd door Vandemoortele (Gent, België). De vetzamenstellingen van deze soorten olie worden in Tabel 1 weergegeven. Deze oliën werden voor toevoegen verwarmd in een waterbad bij $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dit was noodzakelijk om de kokosolie in vloeibare toestand te krijgen.

Tabel 1: Vetzuursamenstellingen van de gebruikte olieën, nd = niet bepaald.

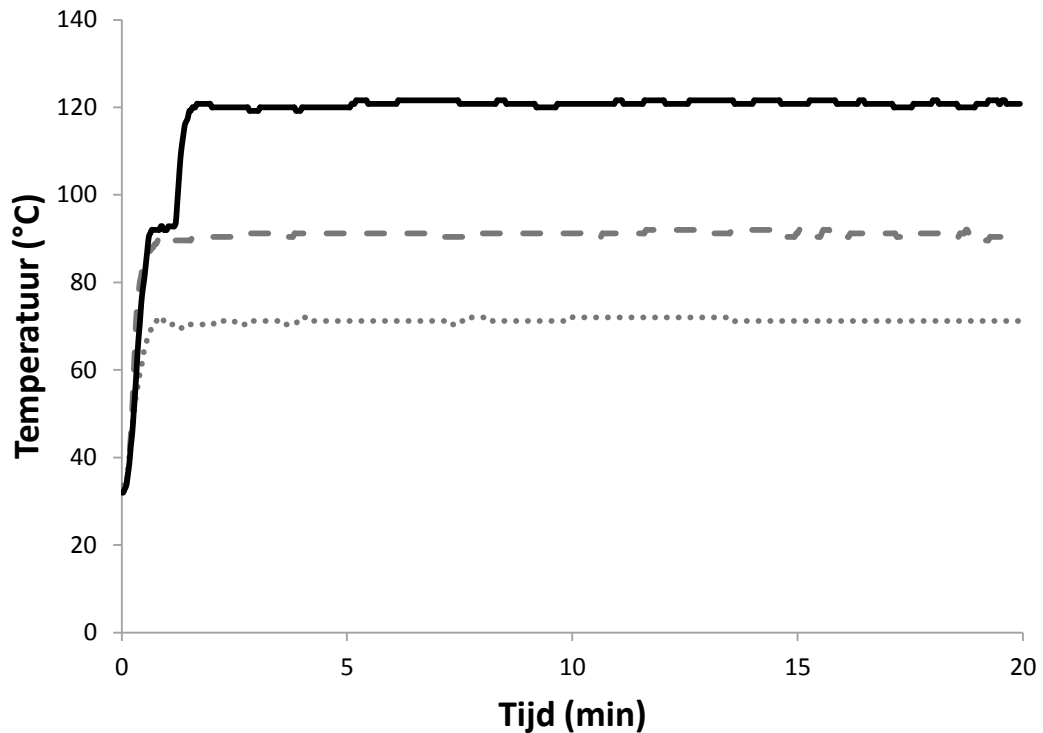
Vetzuur (VZ) (%)	Visolie ¹	Olijfolie ²	Kokosolie ²
C8:0	nd	nd	7,0
C10:0	nd	nd	6,0
C12:0	nd	0,0	46,0
C14:0	5,6	0,0	19,0
C16:0	15,4	11,4	9,0
C18:0	3,3	2,9	3,0
C18:1	13,9	74,4	7,5
C18:2	1,6	8,9	2,0
C18:3	1,0	0,6	nd
C20:0	1,8	0,5	nd
C20:1	5,3	0,3	nd
C20:5	9,4	nd	nd
C22:0	1,4	0,2	nd
C22:6	13,5	nd	nd
Andere	27,8	0,8	0,5

Verzadigde VZ	29,1	15,0	90,0
Mono-onverzadigde VZ	17,3	75,0	8,0
Poly-onverzadigde VZ	26,9	10,0	2,0

1: Bepaald via gaschromatografie na vetzuur methylering (uitgevoerd door Microbiële en Moleculaire Systemen, Kulak, Kortrijk, België) 2: Zoals vermeld door de leverancier.

3.2.2 Hittebehandelingen met de microgolfoven

Vier afsluitbare reageerbuizen werden gevuld met 12 g staal. Vier andere reageerbuizen fungeerden als thermische ballast en werden gevuld met 12 g van een 1,5% tyloseoplossing. Alle gevulde reageerbuizen werden gedurende 10 min bij 37 °C geëquilibreerd. Vervolgens werden de buizen met tyloseoplossing alternerend tussen de andere reageerbuizen in de rotor van de microgolfoven (StartE, Milestone, Sorisole, Italië) geplaatst. Het vermogen dat nodig was om de gewenste procestemperatuur te bereiken en te behouden werd op voorhand geprogrammeerd in functie van de tijd. Hierbij werd gezorgd dat de opkومتijd kleiner was dan 2 min en dat de temperatuur na de opkومتijd maximaal 2 °C afweek van de gewenste procestemperatuur. Een typisch temperatuursverloop voor hittebehandelingen bij 70, 90 en 120 °C is weergegeven in Figuur 11.



Figuur 11: Voorbeelden van temperatuursprofielen in de microgolfoven.

Na de hittebehandeling werden de reageerbuizen onmiddellijk uit de microgolfoven verwijderd en gedurende 5 min gekoeld in een ijsbad. Ten slotte werden de stalen gedurende 5 min terug in een warmwaterbad bij 37 °C geplaatst teneinde alle verschillende soorten olie terug vloeibaar te maken. Alle behandelingen werden in viervoud uitgevoerd.

3.2.3 Hogedrukhomogenisatie

- Principe

Hogedrukhomogenisatie of “High Pressure Homogenization” (HPH) is een techniek die onder andere gebruikt wordt om olie/watermengsels om te vormen tot een emulsie. Hierbij worden de aanwezige oliedruppels verkleind tot een grootteorde van enkele micrometer en zodoende wordt de emulsie gestabiliseerd (GEA Niro Soavi, 2011). Gehomogeniseerde producten hebben een betere smaak, bewaartijd en verteerbaarheid (Diels, 2006).

Anderzijds veroorzaakt HPH celdisruptie. Mogelijke mechanismen voor celdisruptie zijn: turbulentie, cavitatie en botsingen van cellen (APV, 2009).

HPH bestaat uit drie opeenvolgende stappen. Allereerst wordt het influent op hoge druk gebracht met een volumetrische pomp (typisch 100 à 1400 bar (Kielczewska *et al.*, 2003)). Vervolgens wordt de vloeistof door een kleine opening gestuurd en zorgt dit voor een sterke versnelling van de vloeistof terwijl de druk sterk verlaagt. Door het plots verhogen

van de snelheid ontstaan wrijvingskrachten, turbulentie en cavitatie. De sterke wrijvingskrachten geven aanleiding tot een temperatuurstijging van de emulsie met ongeveer 2 °C per 100 bar. Na de passage langs de kleine opening wordt de druk geleidelijk weer verhoogd tot atmosferische druk en verlaagt de stromingssnelheid. Hierdoor vallen partikels of druppels uit elkaar en ontstaan gestabiliseerde suspensies en emulsies (Popper en Knorr, 1990; GEA Niro Soavi, 2011).

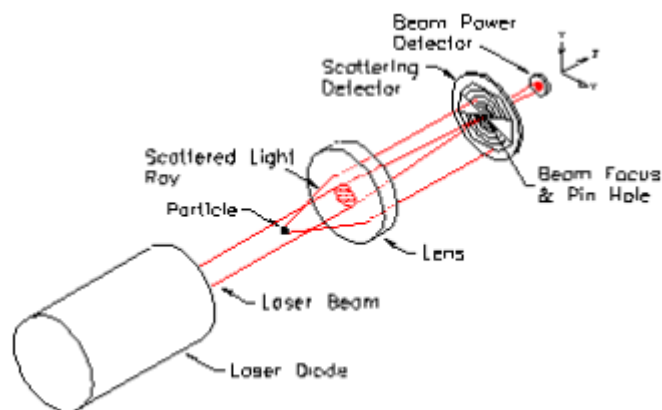
- Werkwijze

HPH werd uitgevoerd met een Panda 2K (GEA Niro Soavi, 2008, Mechelen, België). De te homogeniseren tomatenpulp werd in een verwarmde (37 °C) cilindervormige trechter gebracht en in de homogenisator gevoerd met behulp van een pneumatische aandrukker (3 à 4 bar). De positie van het homogenisatieventiel werd met een kraan ingesteld zodat de druk voor het ventiel ongeveer 100 bar bedroeg. De valve head was van het type “spherical impact head”. Na de homogenisatie werd de emulsie door een warmtewisselaar ($T_{in} = 37$ °C) geleid. Alle homogenisaties werden per conditie in viervoud uitgevoerd.

3.2.4 Deeltjesgrootteverdeling

- Principe

De bepaling van de deeltjesgrootteverdeling van een emulsie werd uitgevoerd met behulp van laserdiffractie. Afhankelijk van de grootte van de deeltjes in de emulsie zullen deze het licht onder een bepaalde hoek verstrooien. Het lichtverstrooiingspatroon wordt met behulp van een reeks fotodetectoren, die elk bij verschillende hoeken ten opzichte van het staal geplaatst werden, gemeten. Bij de bepaling van de deeltjesgrootteverdeling wordt verondersteld dat de deeltjes een sferische vorm bezitten en dat de deeltjes sterk verdund in de oplossing aanwezig zijn zodat secundaire lichtverstrooiing verwaarloosbaar is (Malvern, 2012). De opbouw van een laserdiffractor is in Figuur 12 weergegeven.



Figuur 12: Opbouw van een laserdiffractor (Malvern, 2012).

- Werkwijze

De grootte van de deeltjes werd bepaald met behulp van een Malvern mastersizer S long bench (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Verenigd Koninkrijk). Het tomaat-olie-mengsel werd verdund in een waterbad dat gevuld was met gedeïoniseerd water tot een obscuriteit van ongeveer 14% bereikt werd. Het verdunde mengsel werd door de meetcel gepompt alwaar een laserstraal met golflengte van 633 nm inviel. De aanwezige deeltjes verstrooiden het laserlicht afhankelijk van hun grootte. De verstrooide laserstraal werd gedetecteerd met behulp van een “42 element composite solid state detector array”, die de intensiteit van het verstrooide licht bepaalde. Deze meetwaarden worden verder verwerkt door gebruik te maken van de Mie-theorie en worden weergegeven als volumefractie in functie van de deeltjesgrootte.

3.2.5 Lichtmicroscopie

- Principe

Om de structuur van tomatenpulp of een olie/tomaat-emulsie te visualiseren werd gebruik gemaakt van lichtmicroscopie. Hierbij wordt toluidineblauw als kleurstof gebruikt. Deze stof kleurt vooral gecarboxyleerde polysachariden zoals bijvoorbeeld pectine in de celwand (Guinel, 1997).

- Werkwijze

Van het al dan niet gehomogeniseerde tomatenstaal werd 1 ml genomen. Hieraan werd 4 ml gedeïoniseerd water en vervolgens 5 ml toluidineblauw (0,01%) toegevoegd. Het mengsel werd gemengd en enkele druppels werden op een dekglasje gebracht en onderzocht met de microscoop (Olympus BX-41, Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) bij een vergroting van 10x.

3.2.6 Bepaling van de biotoegankelijkheid van lycopene door middel van een tweestaps *in vitro* verteringsprocedure

- Principe

De biotoegankelijkheid van lycopene werd onderzocht aan de hand van een tweestaps *in vitro* verteringsprocedure die gebaseerd is op de methode van Hedrén *et al.* (2002). Het doel van deze procedure was om op een vereenvoudigde, gestandaardiseerde wijze de menselijke vertering te simuleren. De simulatie bestond uit een maagfase, die in twee stappen verdeeld werd, gevolgd door een dunne darmfase.

Aangezien lycopene lichtgevoelig is, werden de stalen gedurende de procedure zo veel mogelijk tegen licht beschermd. Ook werd tijdens de procedure de aanwezige zuurstof uit de headspace verwijderd alvorens de stalen te incuberen om te verhinderen dat oxidatie zou plaatsvinden.

Uiteindelijk werd de verhouding van de concentratie aan lycopene in de gevormde gemengde micellen op de totale concentratie in het overeenkomstig staal berekend. Deze verhouding werd gedefinieerd als de biotoegankelijkheid van lycopene.

- Werkwijze

Het te analyseren staal (5,0 g) werd gemengd met 5 ml NaCl/ascorbinezuuroplossing (0,9 g NaCl; 1,0 g ascorbinezuur in 100 ml gedeïoniseerd water) en 5 ml elektrolytoplossing (3,00 g NaCl; 1,06 g KCl; 1,47 g CaCl₂; 0,47 g KH₂PO₄; 0,74 g MgCl₂·6H₂O in 1 l gedeïoniseerd water). De zuurtegraad van het mengsel werd naar pH 4 ± 0,05 gebracht door toevoegen van 1 M NaHCO₃ of 1 M HCl. Hierna werd 5 ml pepsineoplossing (0,26 g pepsine in 50 ml elektrolytoplossing) toegevoegd. De headspace van de stalen werd gedurende 15 sec verzadigd met stikstofgas. Hierna werd het mengsel gedurende 30 min roterend geïncubeerd bij 37 °C. Na deze incubatie werd het mengsel op pH 2 ± 0,05 gebracht door middel van 1 M HCl en werd de headspace opnieuw gedurende 15 sec verzadigd met stikstofgas. Vervolgens werd het mengsel opnieuw gedurende 30 min roterend geïncubeerd bij 37 °C. Daarna werd het mengsel op pH 6,9 ± 0,05 gebracht met behulp van 1 M NaHCO₃. Vervolgens werd 3 ml van een pancreatine/galzoutoplossing (0,10 g lipase; 0,20 g pancreatine; 1,25 g galzoutextract, 0,25 g pyrogallol, 0,50 g α-tocoferol in 50 ml gedeïoniseerd water) toegevoegd. Ook nu werd de headspace gedurende 15 sec verzadigd met stikstofgas. Het mengsel werd gedurende 2 uur roterend geïncubeerd bij 37 °C. Vervolgens werd een fractie van het staal gecentrifugeerd (L7 Ultracentrifuge, Beckman, Namen, België) gedurende 1u05 bij 164685 g en een temperatuur van 4 °C. Hierna werd het supernatans uit het buisje verwijderd en gefilterd (0,2 μm poriegrootte) over een Chromafil PET filter (Machery-Nagel, Düren, Duitsland). Uit het gefilterde supernatans werd vervolgens het aanwezige lycopene geëxtraheerd. Bij de bepaling van de lycopeneconcentratie werd rekening gehouden met de fractie van het mengsel dat overgebracht werd in de centrifugebuis.

3.2.7 Bepaling van de concentratie aan lycopene

- Principe

De lycopeneconcentratie in een staal werd bepaald door het aanwezige lycopene te extraheren met hexaan. Vervolgens werd spectrofotometrisch de concentratie aan lycopene in

de hexaanfase bepaald en teruggerekend naar de totale concentratie aan lycoppeen per gram tomatenpulp.

- Werkwijze

In een bruine erlenmeyer met stop werd 0,5 g NaCl afgewogen waarna 2,0 g lycoppeenhou- dend staal werd toegevoegd. Vervolgens werd 50 ml extractiesolvent (2 g butylhydroxytolueen, 500 ml aceton, 500 ml ethanol en 1 l hexaan) aan de bruine erlenmeyer toegevoegd waarna het mengsel 20 min lang bij 4 °C gemengd werd. Vervol- gens werd 15 ml HPLC-zuiver water (soortelijke weerstand: 18.2 MΩ cm) toegevoegd en werd het geheel nog 10 min gemengd bij 4 °C. Daarna werden de twee gevormde onoplos- bare fasen van elkaar gescheiden in een scheidrechter.

De lycoppeenconcentratie werd bepaald door de absorbantie van de hexaanfase te meten bij $\lambda = 472$ nm met behulp van de Ultrospec2100 pro (GE Healthcare, Diegem, België). De concentratie in het staal werd met behulp van de wet van Lambert-Beer berekend.

3.2.8 Statistische data analyse

Voor elke conditie werd van de 4 behandelde stalen de gemiddelde biotoegankelijkheid \pm standaardafwijking berekend. Alle resultaten werden paarsgewijs vergeleken met elkaar en significante verschillen tussen de condities werden aangetoond met behulp van een Tukey- test (SAS 9.3, SAS institute, Cary (NC), Verenigde Staten) waarbij $P < 0,05$.

3.3. Resultaten en discussie

3.3.1 Veranderingen in lycoppeenconcentratie

In Figuur 13 is de concentratie aan lycoppeen per behandelingswijze (hittebehandelingen, HPH en toevoegen van verschillende soorten olie) weergegeven. Alle concentraties worden relatief weergegeven ten opzichte van de lycoppeenconcentratie in het overeenkomstige onbehandelde staal zodat variaties in lycoppeen die te wijten zijn aan afwijkende begincon- centraties geëlimineerd worden.

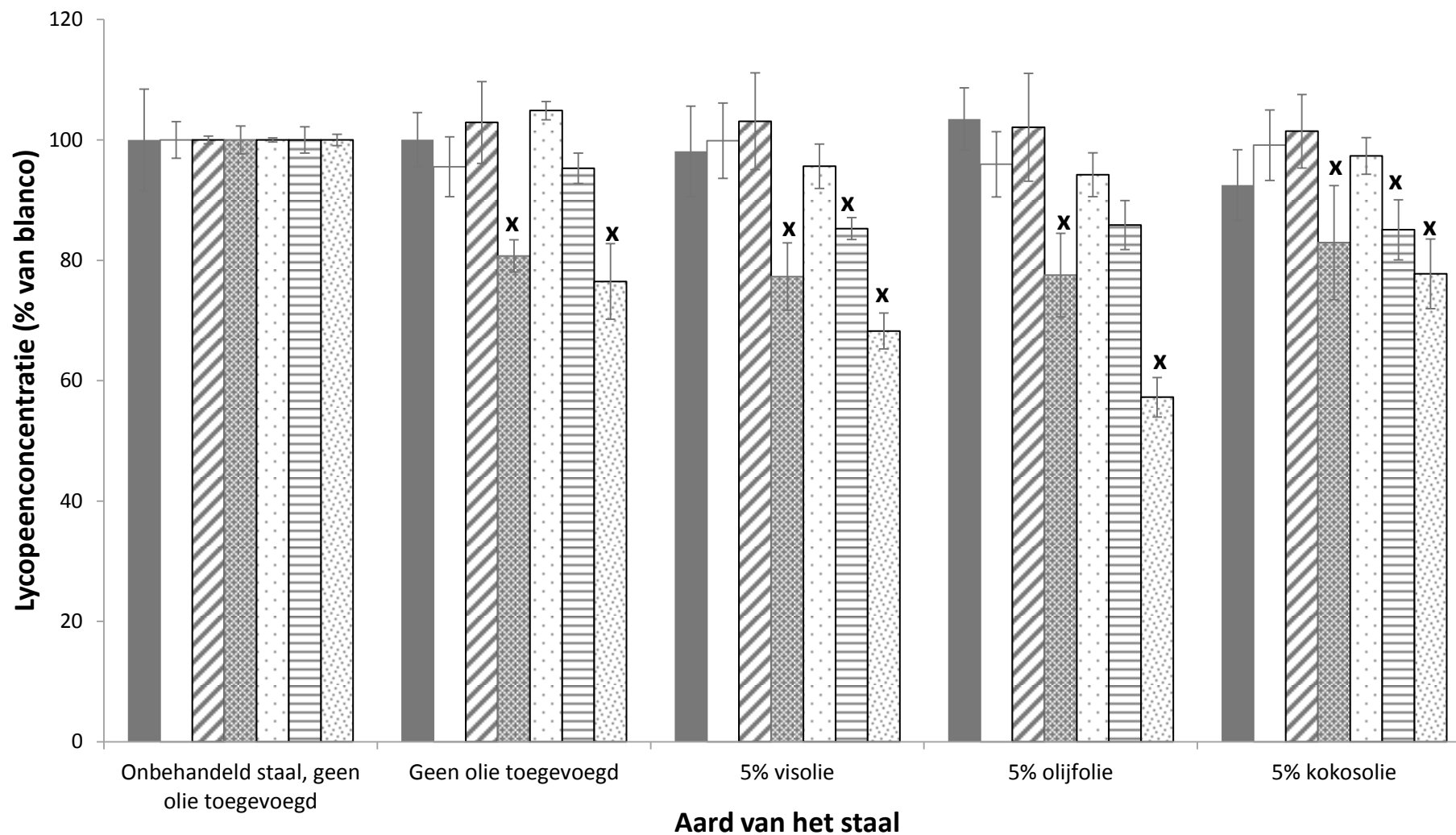
De figuur toont significante dalingen in lycoppeenconcentratie voor hittebehandelingen bij 120 °C, al dan niet voorafgegaan door HPH. Ook HPH in combinatie met een hittebehande- ling bij 90 °C veroorzaakte significante dalingen in lycoppeenconcentratie wanneer visolie en kokosolie toegevoegd werden. Voor olijfolie was deze daling echter niet significant ($P = 0,0617$). De resultaten van de hittebehandelde zuivere tomatenpulp liggen in lijn met deze van Colle *et al.* (2010b) waar enkel significante veranderingen in lycoppeenconcentratie voorkwamen bij hittebehandelingen vanaf 130 °C gedurende 30 min. Ook Ax *et al.* (2003)

en Shi *et al.* (2003) observeerden een uitgesproken lycopenedegradatie bij hittebehandelingen van respectievelijk lycopeen in een o/w-emulsie en zuivere tomatenpulp bij 150 °C terwijl lycopeen een goede hittebestendigheid vertoonde bij behandelingen bij 100 °C.

De bekomen resultaten suggereren dat een voorafgaande hogedrukhomogenisatie de lycopenedegradatie gedurende hittebehandelingen kan bevorderen. HPH veroorzaakt celdisruptie (Figuur 16). Lycopeen, dat grotendeels vastgehecht is aan celmembranen, wordt hierdoor minder beschermd door de cellulaire structuur. Dit heeft tot gevolg dat lycopeen meer vatbaar wordt voor degradatie bij hoge temperaturen en in de aanwezigheid van zuurstof. Indien homogenisatie in combinatie met hittebehandelingen bij 90 °C en 120 °C in de aanwezigheid van olie uitgevoerd werd, was de lycopenedegradatie meer uitgesproken dan wanneer zuivere tomatenpulp dezelfde behandeling onderging. Dit is mogelijk te wijten aan het feit dat HPH de tomatencellen, die lycopeen bevatten, stukmaakt waardoor lycopeen beter in de lipiden opgelost kan worden. Lycopeen in olie blijkt gevoeliger te zijn voor degradatiereacties (Schierle *et al.*, 1997).

De bekomen resultaten zijn in overeenstemming met deze uit de studies van Pérez-Conesa *et al.* (2009) en Colle *et al.* (2010c). De auteurs van deze studies besloten immers dat HPH gecombineerd met hittebehandelingen (30 min bij 90 °C en 40 sec bij 98 °C) geen significante invloed hadden op de lycopenconcentratie in zuivere tomatenpulp.

De resultaten tonen geen duidelijk effect van verschillende vetzuursamenstellingen van de aanwezige oliën op de daling in het lycopengehalte in functie van de procesvoering.



Figuur 13: Relatieve lycopeenconcentraties (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) in zuivere tomatenpulp en in tomaat-oliemengsels, gehomogeniseerd bij 100 bar (■), verhit gedurende 20 min bij 70 °C (□), 90 °C (▨) en 120 °C (▩) en gehomogeniseerd (100 bar) gevolgd door verhitte gedurende 20 min bij 70 °C (□), 90 °C (▨) en 120 °C (▩). Gemiddelden die significant verschilden ten opzichte van het onbehandeld staal werden aangeduid met een "X" (Tukey-test, $P < 0,05$).

De verkregen lycopenedegradatie uit Figuur 13 kan voorspeld worden aan de hand van kinetische parameters met een kinetisch model op basis van het tijd-temperatuursverloop van de hittebehandelingen. Colle *et al.* (2010a) hebben in hun studie een dergelijk model opgesteld voor lycopenedegradatie in een olijfolie/tomaat-emulsie, bekomen na HPH bij 100 bar, tijdens hittebehandelingen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een fractioneel conversiemodel (Vergelijking 1 en Vergelijking 2).

$$\frac{dX}{dt} = -k (X - X_{f(T)}) \quad \text{Vergelijking 1}$$

$$X = X_{f(T)} + (X_0 - X_{f(T)}) \exp(-kt) \quad \text{Vergelijking 2}$$

Waarbij volgens de wet van Arrhenius (Vergelijking 3) k afhankelijk is van de temperatuur en de activeringsenergie een maat is voor deze afhankelijkheid:

$$k = k_{T_{ref}} \cdot \exp \left[\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T_t} \right) \right] \quad \text{Vergelijking 3}$$

Met:

- t = Behandelingstijd (min)
- X_0 = Lycopenconcentratie aan de start van de hittebehandeling (100%)
- X = Lycopenconcentratie op tijdstip t (% van X_0)
- $X_{f(T)}$ = Lycopenconcentratie bij een oneindig lange hittebehandeling (% van X_0)
- k = Snelheidsconstante bij temperatuur T (min^{-1})
- $k_{T_{ref}}$ = Snelheidsconstante bij referentietemperatuur (min^{-1})
- E_a = Activeringsenergie voor de degradatiereactie (J/mol)
- R = Universele gasconstante (8,314 J/mol K)
- T_t = Absolute temperatuur op tijdstip t (K)
- T_{ref} = Referentietemperatuur (K)

De geschatte parameters waren $k_{T_{ref}} = 0,15 \text{ min}^{-1}$ met $T_{ref} = 383 \text{ K}$ en $E_a = 28115 \text{ J/mol}$. Bovendien werd het volgend verband gevonden tussen temperatuur T en $X_{f(T)}$:

$$X_{f(T)}(\%) = -0,6801 T + 314,63 \quad \text{Vergelijking 4}$$

Met behulp van dit model kan de lycopenconcentratie na hittebehandelingen uit het huidige experiment voorspeld worden. Dit werd op twee manieren benaderd. In de eerste manier werd aangenomen dat het proces isotherm verloopt. Door deze vereenvoudiging door te voeren blijft de snelheidsconstante van de lycopenedegradatie, die temperatuursafhankelijk is, constant in functie van de tijd. Met behulp van deze kinetische parameters kan de lycopenconcentratie aan het einde van de 20 minuten durende hittebehandeling

voorspeld worden. Praktisch worden Vergelijking 2, Vergelijking 3 en Vergelijking 4 gebruikt om de residuele lycopenconcentratie te bepalen.

Het is echter ook mogelijk om de dynamische condities tijdens verhitten in rekening te brengen. Uit Figuur 11 blijkt immers dat de temperatuur niet onmiddellijk gelijk was aan de behandelingstemperatuur (opkomtijd). Met behulp van dit temperatuurprofiel kan voor elke gemeten temperatuur de ogenblikkelijke waarde van de snelheidsconstante bepaald worden.

Na substitutie van de Arrheniusvergelijking (Vergelijking 3 in Vergelijking 1) bekomt men:

$$\frac{dX}{dt} = -k_{T_{ref}} \cdot \exp\left(\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T_t}\right)\right) \cdot (X - X_{f(T)}) \quad \text{Vergelijking 5}$$

dX kan vervolgens benaderd worden door:

$$\Delta X = -k_{T_{ref}} \left(\frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T_t}\right)\right) \cdot (X - X_{f(T)}) \cdot \Delta t \quad \text{Vergelijking 6}$$

met $\Delta t = 2$ sec

De residuele fractie aan lycopen kan dan berekend worden via:

$$X(t) = X(t - 1) + \Delta X \quad \text{Vergelijking 7}$$

In Tabel 2 wordt de gemeten lycopendegradatie vergeleken met de theoretisch voorspelde lycopendegradatie onder zowel isotherme als dynamische condities. Het valt op dat het verschil tussen de voorspelde waarden onder isotherme en dynamische condities zeer klein is. Hieruit blijkt dat de invloed van de opkomtijd op de uiteindelijke lycopenconcentratie eerder gering is. Over het algemeen liggen de gemeten lycopenconcentraties hoger dan de voorspelde waarden voor zowel isotherme als dynamisch veronderstelde condities. Deze verschillen kunnen eventueel verklaard worden door een verschil in tomaatenvariëteit en verschillen in detectiemethode. Colle *et al.* (2010a) bepaalden de totale lycopenconcentratie immers aan de hand van "Hoge Performantie Vloeistof Chromatografie" (HPLC) (som van alle isomeren) terwijl in dit experiment de totale lycopenconcentratie spectrofotometrisch bepaald werd.

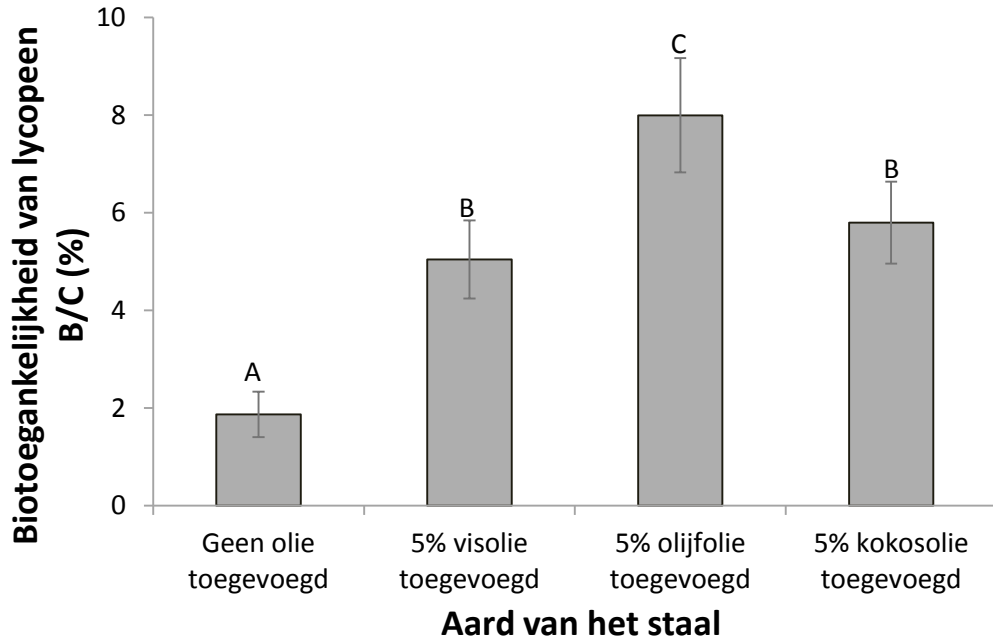
Tabel 2: Vergelijking van de lycopendegradatie zoals gemeten in deze studie met de voorspelde lycopendegradatie op basis van kinetische parameters (Colle *et al.*, 2011b).

5% olijfolie			Gemeten		Voorspeld	
	20 min				Isotherm	Dynamisch
HPH (bar)	T (°C)	X (%)	STDEV(X)	X (%)	X (%)	X (%)
100	70	94,4	3,9	87,7	87,5	
100	90	85,9	4,2	72,8	72,7	
100	120	58,0	2,9	48,5	48,6	

3.3.2 Effect van het type olie op de biotoegankelijkheid van lycopene

In Figuur 14 wordt de biotoegankelijkheid van lycopene weergegeven in functie van de soort olie die aan de tomatenpulp werd toegevoegd. De olie/tomaatmengsels werden in dit experiment niet behandeld. Uit de resultaten blijkt dat lycopene meer biotoegankelijk is na toevoegen van olie. Dit kan vooral waargenomen worden na toevoegen van 5% olijfolie, en in mindere mate na toevoegen van visolie en kokosolie. Mogelijk is dit te verklaren aan de hand van het verschil in vetzuursamenstelling. Olijfolie bestaat grotendeels uit C18:1 terwijl kokosolie het meeste C8:0, C10:0 en C12:0 bevat. Visolie bevat van de drie onderzochte oliën het meeste C20:5, C22:6 maar ook een aanzienlijke fractie aan C16:0 en C18:1. Huo *et al.* (2007) stelden vast dat de biotoegankelijkheid van lycopene hoger was in aanwezigheid van olie die bestond uit TAG's met langeketenvetzuren ten opzichte van olie die TAG's met middenlangeketenvetzuren bevatte. Ook Borel *et al.* (1996) toonden aan dat fosfolipide-TAG-emulsies, waarbij de TAG's voornamelijk langeketenvetzuren bevatten, zorgden voor een hogere oplosbaarheid van lycopene in de micellen. Ook dit laatste effect zou een bijdrage kunnen leveren tot een verhoogde biotoegankelijkheid van lycopene.

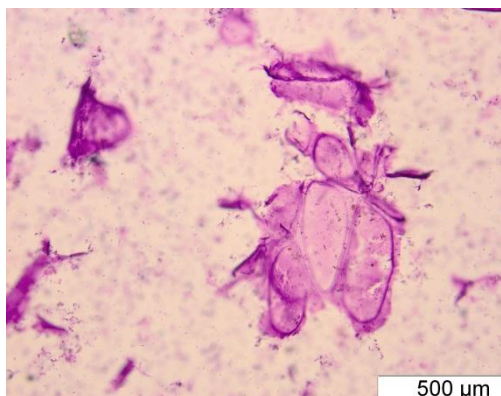
De huidige resultaten bevestigen de voorspellingen uit de literatuur. Enkel de biotoegankelijkheid van lycopene in tomatenpulp waar 5% visolie aan toegevoegd was, is lager dan verwacht volgens de voorspelling. Een mogelijke oorzaak is dat visolie naast C20:5 en C22:6 vetzuren ook een aanzienlijk deel C16:0 vetzuren bevat wat een lagere biotoegankelijkheid tot gevolg heeft. Ook het feit dat pancreas lipase *in vitro* minder goed in staat is om C20:5 en C22:6 te hydrolyseren kan invloed hebben op de biotoegankelijkheid (Mu en Høy, 2004).



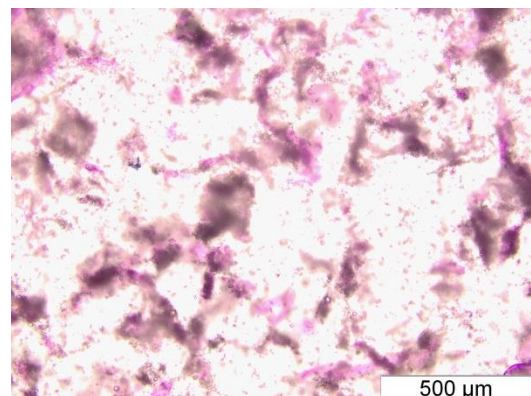
Figuur 14: Biotoegankelijkheid (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) van lycopene in onbehandelde stalen. Gemiddelden met dezelfde letter verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

3.3.1 Effect van HPH op de biotoegankelijkheid van lycopene

Om het resultaat van hogedrukhomogenisatie op de tomatenpulp en olie/tomaatmengsels goed te kunnen inschatten werden de structurele kenmerken van de stalen onderzocht met behulp van lichtmicroscopie en aan de hand van de bepaling van de deeltjesgrootteverdeling. Figuur 15 toont een microscopisch beeld van onbehandelde tomatenpulp. Hierin is een cluster te zien die bestaat uit verschillende tomatencellen die grotendeels intact zijn. De met olie gehomogeniseerde tomatenpulp werd eveneens bestudeerd onder de microscoop (Figuur 16). De figuur toont duidelijk het verlies van celintegriteit. HPH blijkt te zorgen voor een uniforme verdeling van celfragmenten in de olie/tomaat-emulsie.

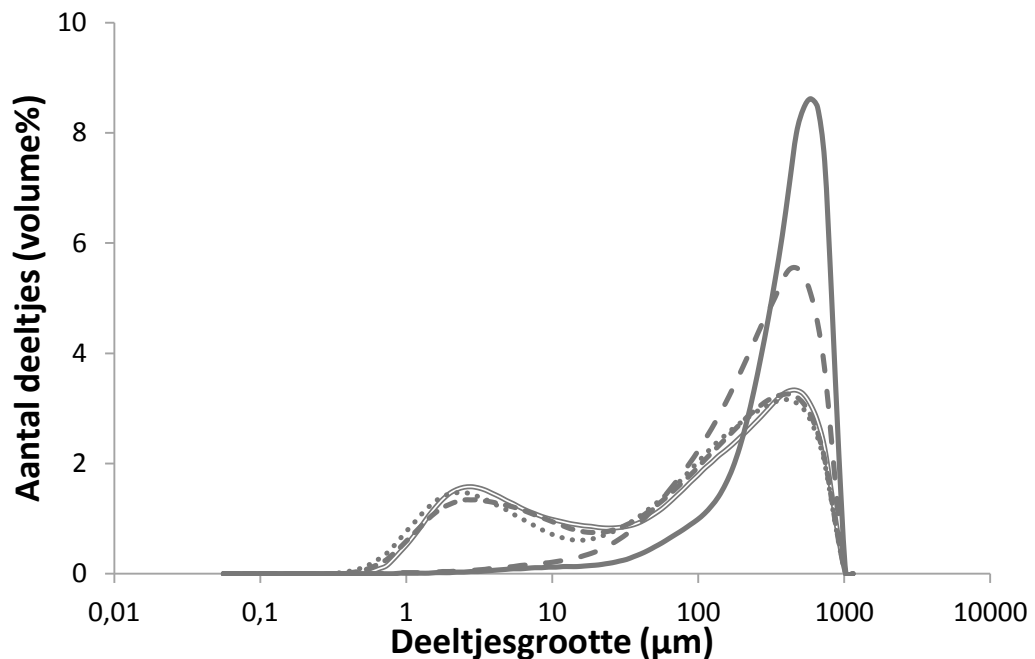


Figuur 15: Microscopisch beeld van een tomatencelcluster in onbehandelde tomatenpulp.



Figuur 16: Microscopisch beeld van tomatencelfragmenten in een olijfolie/tomaat-emulsie die bij 100 bar gehomogeniseerd werd.

In Figuur 17 is de deeltjesgrootteverdeling weergegeven van de onbehandelde tomatenpulp, de gehomogeniseerde tomatenpulp en de gehomogeniseerde olie/tomaatemulsies. Hieruit kan afgeleid worden dat HPH bij 100 bar leidt tot een lichte verkleining van de deeltjesgrootte van de tomatendeeltjes. Het aanmaken van een olie/tomaatemulsie zorgt voor een fijne verdeling ($\phi = 1-10 \mu\text{m}$) van de oliedruppeltjes. Gelijkaardige waarnemingen werden gedaan door Colle *et al.* (2010c).



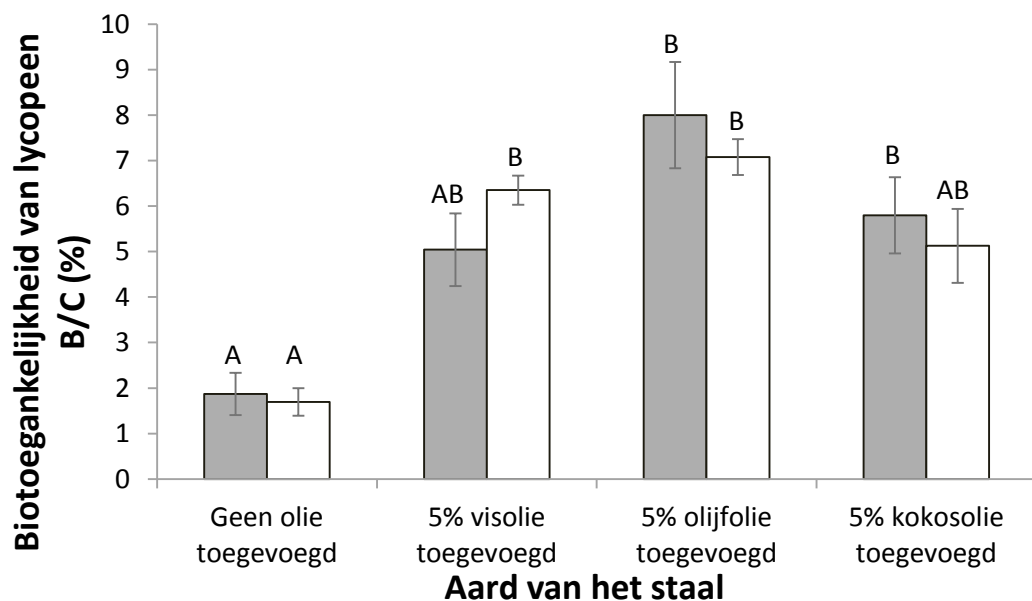
Figuur 17: Deeltjesgrootteverdeling van niet gehomogeniseerde tomatenpulp (—), gehomogeniseerde tomatenpulp, 100 bar (---) en gehomogeniseerde tomatenpulp waaraan 5% visolie (.....), 5% olijfolie (- - - -) en 5% kokosolie (—) werd toegevoegd.

In Figuur 18 wordt de biotoegankelijkheid van lycopene in zuivere tomatenpulp en olie/tomaatmengsels in de onbehandelde stalen vergeleken met deze in de stalen die een hogedrukhomogenisatie ondergingen. Uit de resultaten blijkt dat verschillen in samenstelling van de toegevoegde olie geen significante invloed hebben op de biotoegankelijkheid van lycopene. Uit de resultaten kan afgeleid worden dat olijfolie ook na HPH bij 100 bar leidt tot de hoogste biotoegankelijkheid van lycopene.

Uit deze grafiek toont aan dat hogedrukhomogenisatie van zowel zuivere tomatenpulp als van tomatenpulp waaraan olie is toegevoegd niet leidt tot een significante stijging of daling in biotoegankelijkheid van lycopene. Dit is niet in overeenstemming met wat verwacht werd op basis van de resultaten van de structurele waarnemingen. HPH zorgt immers voor celdisruptie waardoor lycopene in principe gemakkelijker uit de cellen vrijgezet zou kunnen worden.

Enkele studies (Thakur *et al.*, 1995; Colle *et al.*, 2011a) toonden echter aan dat HPH de viscositeit van tomatenpulp doet stijgen. Deze stijging werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van fijnverdeeld cellulair materiaal zoals suikers, organische zuren, wateroplosbare polymeren, celclusters, individuele cellen, celfragmenten en onoplosbare vezels (Van Buggenhout *et al.*, 2010). Bovendien stelden Colle *et al.* (2011a) een inverse relatie vast tussen de biotoegankelijkheid van lycopene en de viscositeit van tomatensoep. Deze resultaten steunen de hypothese van McClements *et al.* (2009), die stelt dat lycopene in een voedselmatrix met hoge viscositeit minder toegankelijk is voor verteringsenzymen en galzouten waardoor de biotoegankelijkheid vermindert.

Huidige resultaten zijn ook in overeenstemming met deze van Svelander *et al.* (2011) die observeerden dat de biotoegankelijkheid van lycopene in tomatenpulp onveranderd bleef na het uitvoeren van HPH. Daarenboven toonden Colle *et al.* (2010c) zelfs aan dat de biotoegankelijkheid van lycopene in tomatenpulp daalde in functie van de homogenisatie-druk (80-1300 bar). Mogelijk was de gebruikte homogenisatie-druk in deze studie te laag om te resulteren in een significant lagere biotoegankelijkheid van lycopene.

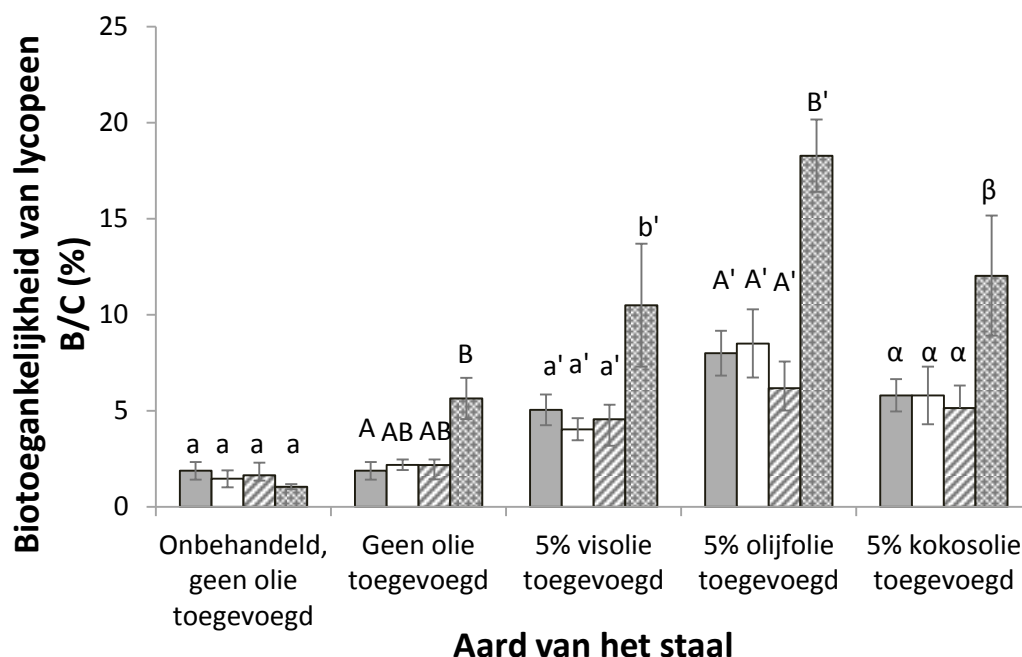


Figuur 18: Biotoegankelijkheid van lycopene (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) in zuivere tomatenpulp en tomaat/oliemengsels die niet gehomogeniseerd (□) en gehomogeniseerd werden bij 100 bar (■). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

3.3.2 Het effect van hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopeen

Figuur 19 toont het effect van de intensiteit van de hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid van lycopeen in aanwezigheid en afwezigheid van olie. De resultaten tonen dat enkel hittebehandelingen bij 120 °C in staat zijn om de biotoegankelijkheid van lycopeen in tomaten en olie/tomaatmengsels significant te doen stijgen ten opzichte van onbehandelde tomaten waaraan dezelfde soort olie werd toegevoegd. De biotoegankelijkheid van lycopeen in stalen waaraan olie werd toegevoegd en welke behandeld werden bij 120 °C bereikt waarden tussen 10 en 17%. Dit is in tegenstelling tot de eerder lage biotoegankelijkheid (5%) van de zuivere tomatenpulp die onderworpen werd aan een hittebehandeling bij 120 °C. De resultaten tonen dat het toevoegen van olie en het toepassen van een intense hittebehandeling elk de biotoegankelijkheid van lycopeen kunnen verhogen.

De resultaten uit Figuur 19 bevestigen deze uit Figuur 14 wat betreft het effect van het toevoegen van olie op de biotoegankelijkheid van lycopeen in tomatenpulp. Hittebehandelingen van olijfolie/tomaatmengsels resulteren in een hogere biotoegankelijkheid dan in afwezigheid van olie of in aanwezigheid van visolie of kokosolie.



Figuur 19: Biotoegankelijkheid van lycopeen (gemiddelde ± standaardafwijking) (n = 4) in onbehandelde tomatenpulp (■) en tomatenpulp die gedurende 20 min bij 70 °C (□), 90 °C (▨) en 120 °C (▩) behandeld werd. Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, P < 0,05).

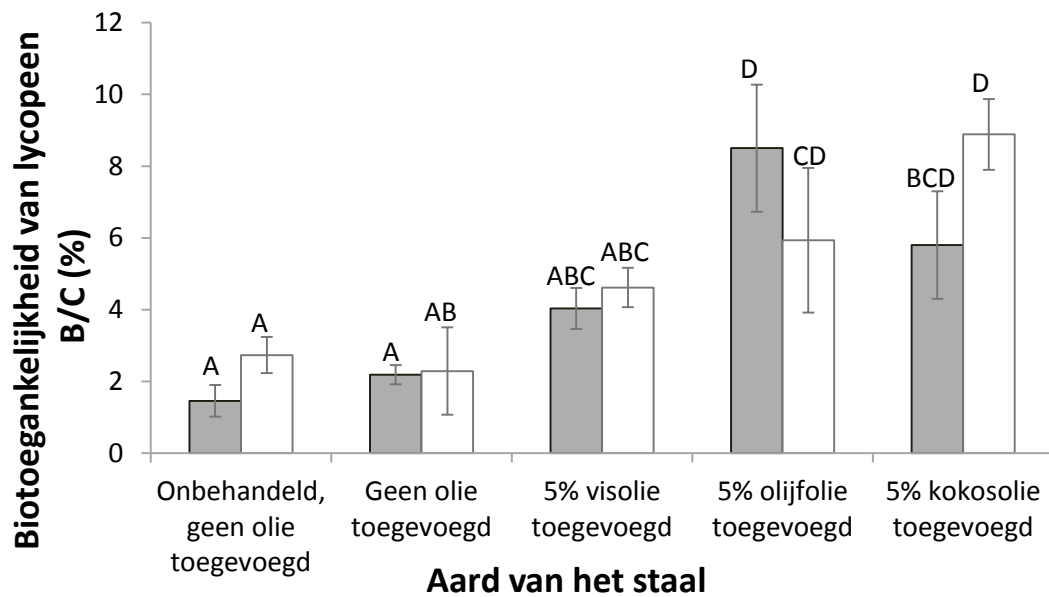
De resultaten van dit experiment sluiten aan bij de studie van Karakaya en Yilmaz (2007). Hieruit bleek dat lichte hittebehandelingen zoals pasteurisatie gedurende 15 tot 20 min bij 85 tot 90 °C de *in vitro* biobeschikbaarheid, gemeten na diffusie door een dialysemem-

braan, van lycoppeen in tomaten niet verhoogde. In een andere studie (Stahl en Sies, 1992) werd de invloed van intense hittebehandelingen onderzocht. Hieruit bleek dat het behandelen van tomatenpulp gedurende 1 uur bij 100 °C in de aanwezigheid van 1% maïsolie voldoende was om de biobeschikbaarheid van lycoppeen significant te doen stijgen. Tibäck *et al.* (2009) en Svelander *et al.* (2010) namen echter geen verhoogde biotoegankelijkheid van lycoppeen in tomatenpulp waar. Uit deze studies bleek dat koken van zuivere tomatenpulp (100 °C) gedurende 20 min geen significante stijging van de biotoegankelijkheid van lycoppeen veroorzaakte. Huidige resultaten bevestigen het resultaat van laatste twee studies. De resultaten komen ook overeen met deze van Colle *et al.* (2010b), waar enkel hittebehandelingen bij temperaturen vanaf 130 °C gedurende 30 min een significant verhoogde biotoegankelijkheid van lycoppeen in zuivere tomatenpulp tot gevolg hadden.

3.3.3 Het gecombineerde effect van HPH en hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid van lycoppeen

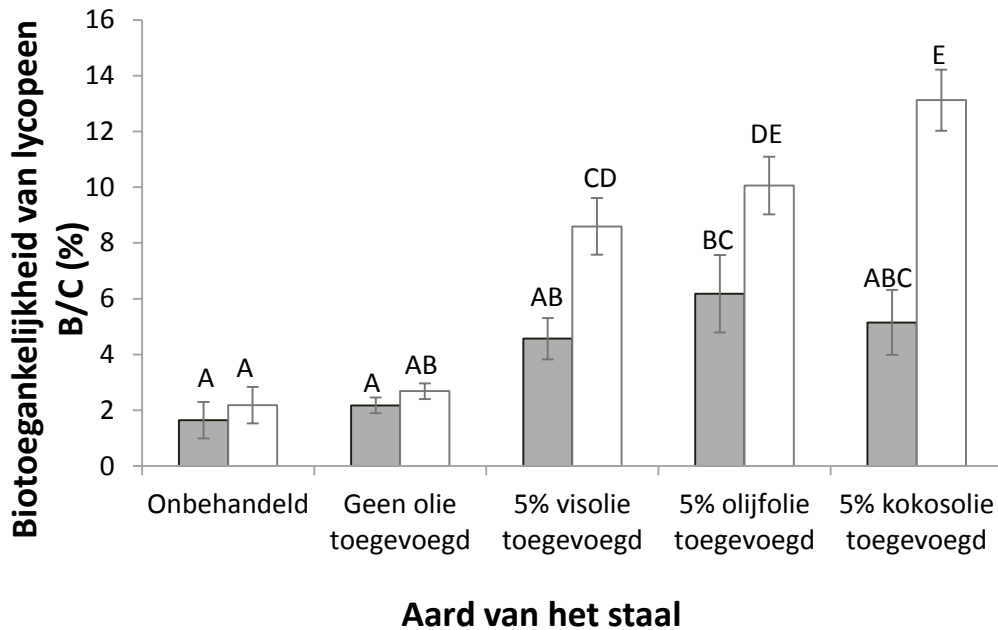
Na het afzonderlijk toepassen van hogedrukhomogenisatie en hittebehandelingen werd onderzocht of hogedrukhomogenisatie, toegepast voor een hittebehandeling de bio-toegankelijkheid van lycoppeen nog meer kan verhogen dan wanneer enkel een hittebehandeling doorgevoerd werd. De resultaten hiervan worden in Figuur 20, Figuur 21 en Figuur 22 weergegeven.

Uit Figuur 20 kan afgeleid worden dat HPH bij 100 bar, gevolgd door een hittebehandeling bij 70 °C, zowel voor stalen waar geen olie aan toegevoegd werd als stalen waaraan olie werd toegevoegd, geen extra verhoging van de biotoegankelijkheid van lycoppeen veroorzaakte.



Figuur 20: Biotoegankelijkheid van lycopene (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) in tomatenpulp die gedurende 20 min bij 70 °C behandeld werd (■) en in tomatenpulp die gehomogeniseerd werd bij 100 bar en vervolgens gedurende 20 min bij 70 °C behandeld werd (□). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

Wanneer de intensiteit van de hittebehandeling na de hogedrukhomogenisatie opgevoerd werd tot 90 °C, leidde dit tot een significante verhoging van de biotoegankelijkheid van lycopene ten opzichte van de stalen die enkel een hittebehandeling ondergingen (Figuur 21). Dit verschil werd echter enkel waargenomen wanneer 5% olie toegevoegd werd. De bio-toegankelijkheid van deze stalen stijgt hier van 4 à 6% naar 8 à 13%.

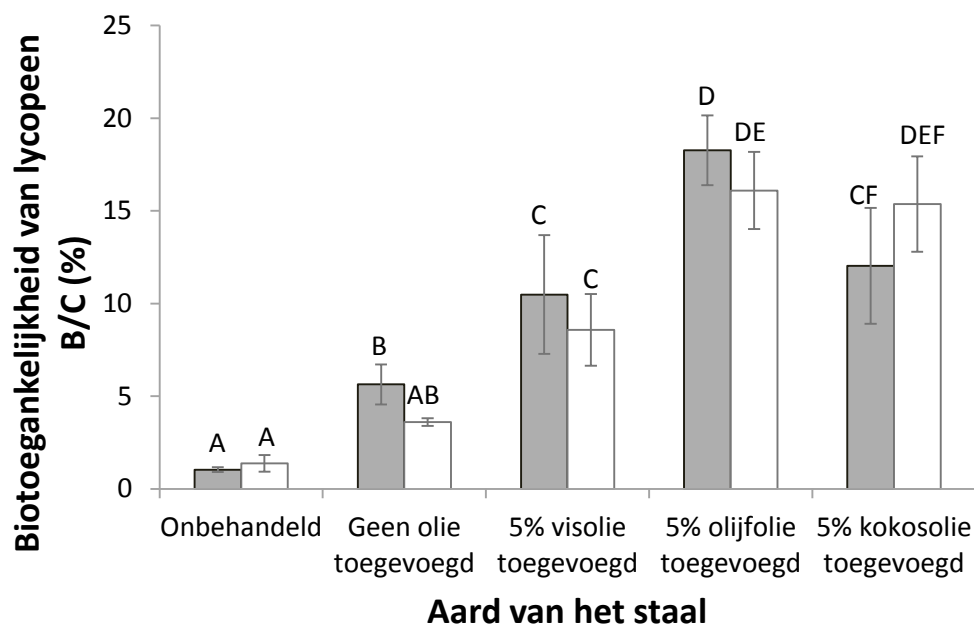


Figuur 21: Biotoegankelijkheid van lycopene (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) in tomatenpulp die gedurende 20 min bij 90 °C behandeld werd (■) en in tomatenpulp die gehomogeniseerd werd bij 100 bar en vervolgens gedurende 20 min bij 90 °C behandeld werd (□). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

In Figuur 22 wordt de impact van hittebehandelingen bij 120 °C, voorafgegaan door een hogedrukhomogenisatie, op de biotoegankelijkheid van lycopene weergegeven. De resultaten tonen dat hogedrukhomogenisatie geen significant effect heeft op de biotoegankelijkheid.

Wanneer Figuur 21 en Figuur 22 met elkaar vergeleken worden, valt op dat de biotoegankelijkheid van lycopene bij stalen die behandeld werden bij 120 °C nog steeds groter is dan de biotoegankelijkheid van lycopene bij stalen die bij 90 °C behandeld werden, voorafgegaan door HPH bij 100 bar.

Wanneer de invloed van de aard van de toegevoegde olie op de biotoegankelijkheid van lycopene na de HPH en hittebehandelingen bestudeerd wordt, blijken er geen duidelijke trends waarneembaar (Figuur 20, Figuur 21 en Figuur 22). De biotoegankelijkheid van lycopene is in de meeste gevallen het hoogste wanneer 5% olijfolie aan de tomatenpulp toegevoegd werd.



Figuur 22: Biotogankelijkheid van lycopene (gemiddelde \pm standaardafwijking) ($n = 4$) in tomatenpulp die gedurende 20 min bij 120 °C behandeld werd (■) en in tomatenpulp die gehomogeniseerd werd bij 100 bar en vervolgens gedurende 20 min bij 120 °C behandeld werd (□). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

Svelander *et al.* (2011) onderzochten in hun studie het gecombineerd effect van HPH bij 100 bar en een hittebehandeling gedurende 40 min bij 90 °C op de biotogankelijkheid van lycopene in tomatenpulp. Uit hun resultaten blijkt dat het toepassen van een extra homogenisatie niet leidt tot een significante verhoging van de biotogankelijkheid. Dit komt overeen met de waarneming voor het behandelde staal waar geen olie aan toegevoegd werd (Figuur 20). In de studie van Svelander *et al.* (2011) werden echter wel de behandelingen in omgekeerde volgorde toegepast. Eerst werden de in stukjes gesneden tomaten onderworpen aan een hittebehandeling waarna ze gemixt werden en werden vervolgens gehomogeniseerd bij 100 bar.

Colle *et al.* (2010c) bestudeerden de invloed van een hittebehandeling gedurende 30 min bij 90 °C, voorafgegaan door HPH bij verschillende drukken. Ook hier bleek de voorafgaande homogenisatie geen stijging te veroorzaken in biotogankelijkheid. In deze laatste studie is de volgorde van de behandelingen gelijk aan deze gebruikt in huidige studie. Ook in deze studie werd enkel het effect van de behandeling op de biotogankelijkheid van lycopene in zuivere tomatenpulp beschouwd.

van het Hof *et al.* (2000) bestudeerden het effect van intense hittebehandelingen in combinatie met HPH op de biobeschikbaarheid van lycopene uit tomaten. Gepasteuriseerde (55 min bij 100 °C) tomaten werden hierbij onderworpen aan HPH bij 200 bar. Hierna werd de tomatenpulp verhit gedurende 1 uur bij 100 °C. Uit de studie bleek dat het

uitvoeren van HPH voor de hittebehandeling niet leidde tot een significante verhoging van de biobeschikbaarheid van lycopene. Deze waarneming wordt bevestigd door de resultaten uit Figuur 22.

In tegenstelling tot huidige studie observeerden Colle *et al.* (2011a) een significante daling voor de vrijzetting van lycopene uit de voedselmatrix wanneer tomatenpulp waaraan 5% olijfolie werd toegevoegd achtereenvolgens onderworpen werd aan een UHT-hittebehandeling gedurende 90 sec bij 120 °C en HPH bij 100 bar. De resultaten van Colle *et al.* (2011a) staan in contrast met de resultaten uit Figuur 22. De volgorde van de behandelingen in deze laatste studie was echter omgekeerd aan deze gebruikt in huidige studie. Dit kan mogelijk de tegengestelde resultaten verklaren.

Algemeen kan dus gesteld worden dat in de huidige studie HPH gecombineerd met hittebehandelingen bij 90 °C en 120 °C in staat was om de bio-toegankelijkheid van lycopene te doen stijgen. Ook de aanwezigheid van olie in de tomatenpulp zorgt voor een verhoogde bio-toegankelijkheid van lycopene. In de literatuur werden verschillende studies gevonden die het effect van HPH gecombineerd met hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid of biobeschikbaarheid van lycopene in tomatenpulp beschreven. De procesparameters (volgorde van behandelen, aanwezigheid van olie, behandelingsduur en temperatuur) waren vaak erg verschillend wat het vergelijken met huidige studie moeilijk maakt.

3.4. Besluit

Algemeen is geweten dat de biotoegankelijkheid van lycopene afhankelijk is van de samenstelling van het voedsel en de procesvoering die het ingenomen voedsel ondergaan heeft (Borel, 2003).

Hoewel de opname van carotenoïden uit fruit en groenten eerder laag is kan de incorporatie van deze nutriënten in gemengde micellen sterk bevorderd worden door absorptieëffectoren zoals olie (Castenmiller en West, 1998; Brown *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2007). Ook de resultaten van huidige studie tonen een verhoogde biotoegankelijkheid van lycopene aan bij toevoegen van 5% olie. Alhoewel drie verschillende soorten oliën met verschillende vetzuursamenstelling gebruikt werden, bleek dit niet te resulteren in significante verschillen voor de biotoegankelijkheid wanneer geen behandeling of enkel HPH beschouwd werden. Wanneer de olie/tomaatmengsels een hittebehandeling ondergingen, leek het type olie wel bepalend te zijn voor de biotoegankelijkheid. Algemeen kan gesteld worden dat het toevoegen van 5% olijfolie voor de grootste biotoegankelijkheid zorgde.

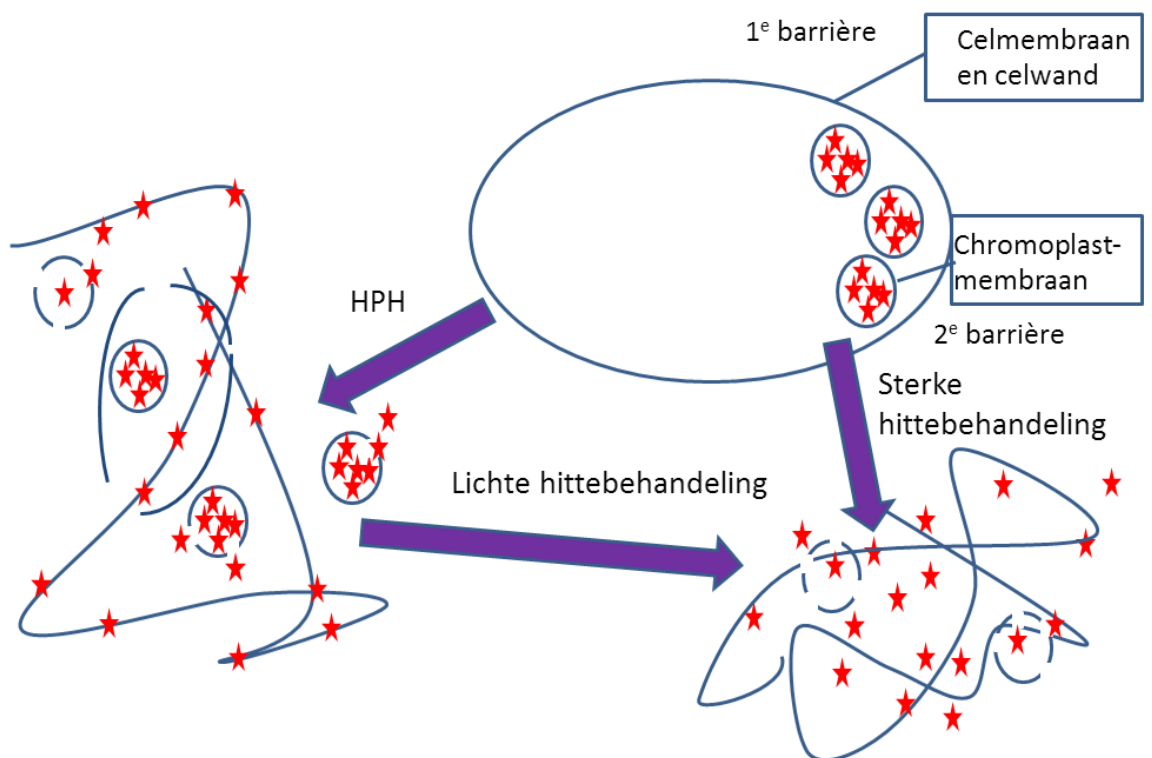
Wanneer de voedselmatrix mechanisch behandeld wordt, zou dit in principe de biotoegankelijkheid van carotenoïden ten goede moeten komen (Castenmiller en West, 1998). Resultaten uit huidige studie wijzen echter uit dat dit niet altijd zo is. Een mogelijke oorzaak hiervoor was de omvorming van de tomatencellen tot een viskeus netwerk (Colle *et al.*, 2010c) wat ervoor zorgde dat verteringsenzymen en galzouten moeilijker het lycopene dat zich in de tomatenmatrix bevond konden bereiken en waardoor de opname in gemengde micellen verminderde.

Uit de resultaten blijkt ook dat het toepassen van milde hittebehandelingen (20 min bij 70 °C en 20 min bij 90 °C) op zowel zuivere tomatenpulp als olie/tomaatmengsels geen verhoogde biotoegankelijkheid van lycopene tot gevolg had. Wanneer hittebehandelingen intenser werden (20 min bij 120 °C), tonen de resultaten echter wel aan dat dit de biotoegankelijkheid van lycopene in zowel olie/tomaatmengsels als tomatenpulp verhoogt. De resultaten sluiten aan bij deze van Colle *et al.* (2010b), waarin gesteld werd dat enkel intense hittebehandelingen in staat zijn om de celwand van tomatencellen te doorbreken waardoor lycopene uit de cellen beter vrijgezet kan worden. Dit stelt verteringsenzymen en galzouten in staat om op een effectievere wijze lycopene in de voedselmatrix te benaderen (Stahl en Sies, 1992, van het Hof *et al.*, 2000).

Wanneer hittebehandelingen bij verschillende temperaturen voorafgegaan werden door HPH, was een hittebehandeling bij 90 °C reeds intens genoeg om de biotoegankelijkheid van lycopene in olie/tomaatmengsels te verhogen ten opzichte van mengsels die enkel de hitte-

behandeling ondergingen. Wanneer HPH gevolgd werd door een hittebehandeling bij 120 °C was de bio-toegankelijkheid het hoogst, maar werd dit gecombineerd effect van HPH en hitte echter niet meer waargenomen. De verschillende waarnemingen kunnen mogelijk verklaard worden aan de hand van volgende hypothese:

In tomatencellen is lycopene vooral gelokaliseerd in de chromoplasten. Dit maakt dat twee belangrijke barrières de opname van lycopene in de gemengde micellen verhinderen: de celwand/celmembraan barrière, en de chromoplastmembraan barrière. Lycopene kan enkel in voldoende mate vrijgezet worden wanneer deze twee barrières deels verwijderd zijn. Alvorens de chromoplastmembranen doorgebroken kunnen worden dient de celwand stukgemaakt te worden. Dit kan met behulp van HPH. Wanneer de celwand doorbroken is, volstaan hittebehandelingen bij 90 °C om het chromoplastmembraan stuk te maken en lycopene vrij te zetten. Anderzijds is het mogelijk om beide barrières ineens aan te tasten door middel van intense hittebehandelingen (120 °C). Een ander effect dat plaatsvindt is de denaturatie van carotenoïde-proteïestructuren. Deze twee fenomenen zorgen voor een betere vrijzetting van lycopene uit de cellen. Een hittebehandeling bij 70 °C of een combinatie van HPH bij 100 bar en een hittebehandeling bij 70 °C is niet intens genoeg om de celwand en chromoplaststmembranen stuk te maken. Een schematische weergave van deze hypothese wordt in Figuur 23 voorgesteld.



Figuur 23: Schematische voorstelling van de hypothese die stelt dat de opname van lycopene wordt verhinderd wordt door twee barrières (★ = lycopene).

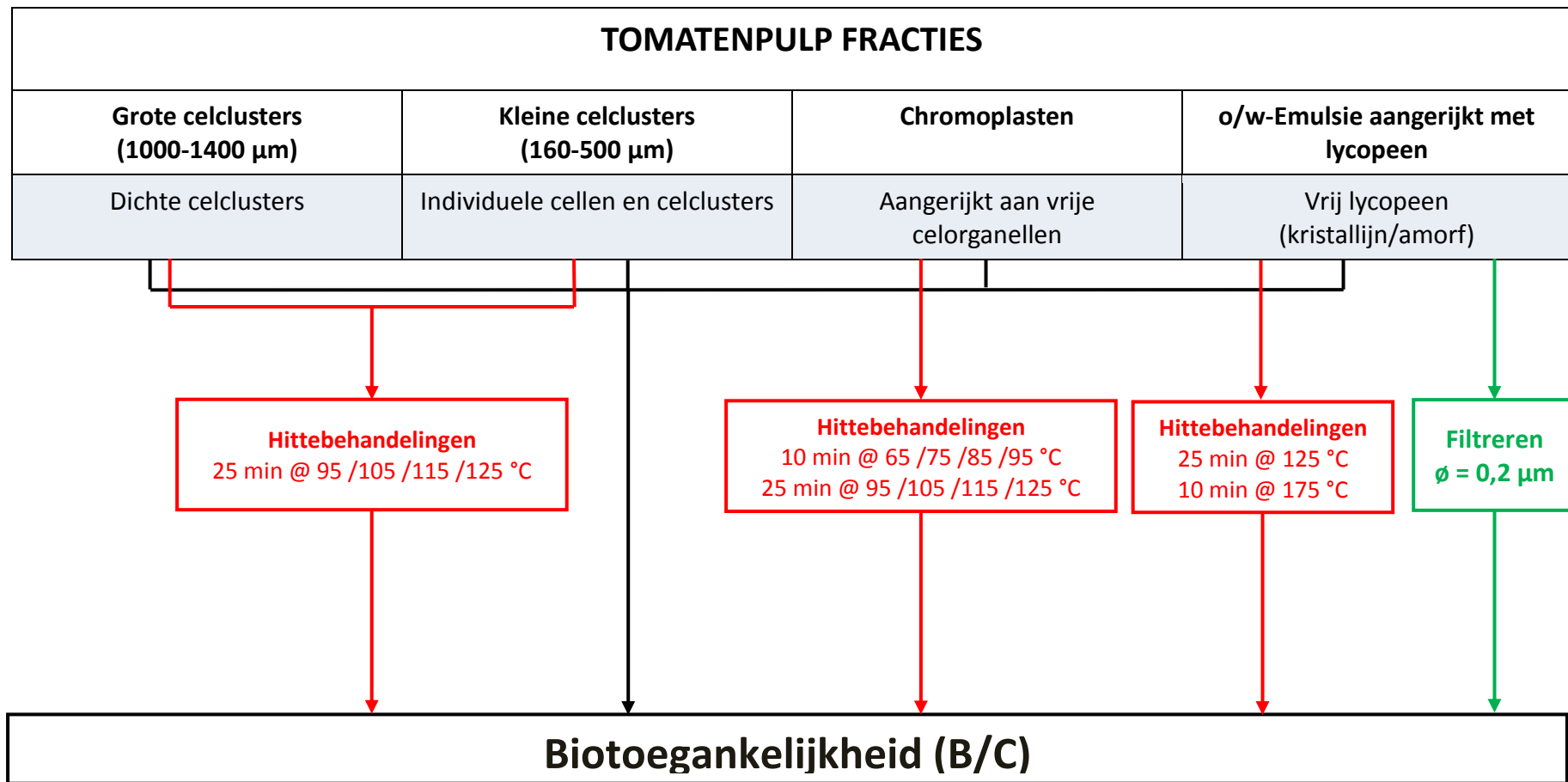
4. Inzicht in de structurele barrières die de biotoegankelijkheid van lycoppeen in tomaten bepalen

4.1. Doelstelling van het experiment

Op basis van het vorige deel werd gesteld dat lycoppeen in tomatencellen twee belangrijke barrières kent die de opname van dit carotenoïde in gemengde micellen verhinderen. Een eerste barrière die doorbroken moet worden is de celwand en celmembraan van de tomatencel. De tweede barrière is het chromoplastmembraan. Naast deze twee barrières wordt de incorporatie van lycoppeen in gemengde micellen vermoedelijk ook bemoeilijkt door de aanwezigheid van kristallijn lycoppeen. In dit deel wordt aan de hand van experimenten de invloed van deze barrières op de biotoegankelijkheid lycoppeen verder onderzocht.

Het doel van dit experiment is om de biotoegankelijkheid van lycoppeen in verschillende tomatenpulpfracties te onderzoeken. Hiervoor werd tomatenpulp gescheiden in grote en kleine celclusterfracties, een fractie die aangerijkt werd met chromoplasten en een o/w-emulsie die aangerijkt werd met lycoppeen. Deze fracties bezitten een verschillend aantal structurele barrières die verhinderen dat lycoppeen wordt vrijgesteld. Er wordt in dit experiment onderzocht of deze veronderstelling overeenkomt met de observaties en bijgevolg resulteert in verminderde biotoegankelijkheid van lycoppeen voor fracties met meer barrières.

In een later stadium wordt getracht om de barrières voor elke fractie volledig of gedeeltelijk weg te nemen. De celwanden, celmembraan en chromoplastmembranen kunnen beïnvloed worden door hittebehandelingen. Ook de kristallijne toestand van lycoppeen kan gewijzigd worden door lycoppeenkristallen te laten smelten of te verwijderen door filtratie. De invloed van deze behandelingen op de biotoegankelijkheid van lycoppeen wordt ook hier onderzocht. Een experimentele proefopstelling wordt in Figuur 24 weergegeven.



Figuur 24: Experimenteel ontwerp voor onderzoek naar de invloed van structurele barrières op biotoegankelijkheid van lycoppeen in tomaten.

4.2. Materialen en gebruikte methoden

4.2.1 Staalbereiding

Om de grote en kleine celclusterfractie te bekomen werden diepgevroren (- 40 °C) tomaten (Patrona, Spanje, september 2010) ontdooid. Vervolgens werd de schil van de tomaten verwijderd en werden ze 3x gedurende 5 sec gemixt (Büchi Mixer B-400, Büchi, Flawil, Zwitserland). Door middel van nat zeven werd de tomatenpulp opgedeeld in fracties. De gebruikte maasgrootte van de zeven werd bepaald door de celgrootte van een tomatencel (ongeveer 200 à 500 µm zoals uit Figuur 15 kan afgeleid worden). De tomatenpulfracitie met grootte tussen 1000 en 1400 µm werd afgescheiden en verzameld als de fractie met grote celclusters. De fractie met grootte tussen 160 en 500 µm werd afgescheiden en verzameld als de kleine celclusterfractie.

De opzuivering van de chromoplastfractie is gebaseerd op de methode beschreven door Barsan *et al.* (2010). De fractie werd bereid door diepgevroren tomaten (Patrona, Spanje, september 2010) te ontdooien en te ontpellen. Aan 300 g van deze tomaten werd 300 g 0,05 M Na₂EDTA-oplossing toegevoegd en het geheel werd op lage snelheid gedurende 5 sec gemixt met een mixer bij 9500 tr/min (Ultra-turrax t25, Janke & Kunkel, Staufen, Duitsland). Het bekomen pulpmengsel werd vervolgens gefiltreerd over een dubbelgevouwen kaasdoek en het filtraat werd gedurende 30 min bij 4 °C gecentrifugeerd bij 27200 g (Beckman J2-hs, Beckman, Namen, België). De gevormde pellet werd ten slotte in 100 ml gedeioniseerd water opgelost.

Het aanmaken van een met lycopene aangerijkte o/w- emulsie werd uitgevoerd zoals beschreven door Colle *et al.* (2011b). Hiervoor werden diepgevroren tomaten (Patrona, Spanje, september 2010) ontdooid en 3x gedurende 5 sec gemixt (Büchi Mixer B-400, Büchi, Flawil, Zwitserland). De pulp werd vervolgens gezeefd (maasdiameter 1 mm) om de schil en pitten te verwijderen. Hierna werd 30 g van de bekomen pulp gedurende 5 uur gemengd met 6 g olijfolie. Daarna werd de olie terug afgescheiden door het mengsel gedurende 15 min bij 8740 g en 4 °C te centrifugeren (Beckman J2-hs, Beckman, Namen, België) en de oliefase af te scheiden. Van de aangeijkte olie werd een 5% o/w-emulsie bereid door deze olie toe te voegen aan een 1% fosfatidylcholineoplossing. De aangerijkte olie en fosfatidylcholineoplossing werden gedurende 10 min gemixt (Ultra-turrax t25, IKA Janke & Kunkel, Staufen, Duitsland). Ten slotte werd de bekomen emulsie met behulp van hogedrukhomogenisatie (Panda 2K, GEA Niro Soavi, Parima, Italië) bij 1000 bar gestabiliseerd.

Omdat de aanwezigheid van olie kan leiden tot een hogere biotoegankelijkheid in de aangerijkte o/w-emulsie, werd aan de andere fracties (grote en kleine celclusters en chromoplasten) hetzelfde volume aan o/w-emulsie (5% zuivere olijfolie in 1% fosfatidylcholineoplossing) toegevoegd als het volume dat gebruikt werd voor de bio-toegankelijkheidsbepaling van lycoppeen in de aangerijkte o/w-emulsie. De afgewogen massa van de fracties, die gebruikt werden om de bio-toegankelijkheid te bepalen, werd aangepast aan de lycoppeenconcentratie van deze fracties terwijl de hoeveelheid toegevoegde olie in o/w-emulsie constant bleef. Hierdoor werd steeds eenzelfde verhouding olie/lycopeen bekomen als in de met lycoppeen aangerijkte o/w-emulsie.

4.2.2 Hittebehandelingen in waterbad en oliebad

- **Temperaturen tot 95 °C**

Uit vorige deel is gebleken dat chromoplastmembranen waarschijnlijk door middel van een lichte hittebehandeling doorbroken kunnen worden, waardoor lycoppeen meer bio-toegankelijk wordt. Een van de doelen van het onderzoek in dit deel was om de chromoplastfractie te onderwerpen aan lichte hittebehandelingen.

Hittebehandelingen bij 65, 75, 85 en 95 °C werden uitgevoerd in een warmwaterbad. De behandelingen duurden 10 min. Na elke hittebehandeling werd het staal gedurende 5 min in ijswater (0 °C) geplaatst.

- **Temperaturen vanaf 95 °C**

Resultaten uit vorig deel deden vermoeden dat het doorbreken van celwand intense hittebehandelingen vereist. Vandaar dat gekozen werd om de kleine en grote celclusterfractie en de chromoplastfractie aan een intense hittebehandeling te onderwerpen. Hiernaast werd ook onderzocht of een intense hittebehandelingen een effect hebben op de bio-toegankelijkheid van lycoppeen in de chromoplastfractie. Intensere hittebehandelingen (10 min bij 175 °C) kunnen ook gebruikt worden om lycoppeen kristallen te doen smelten in de met lycoppeen aangerijkte o/w-emulsie.

Deze hittebehandelingen werden uitgevoerd in een oliebad. De behandelingen bij 95, 105, 115 en 125 °C duurden 25 min. Om lycoppeen kristallen te smelten werden de stalen gedurende 10 min bij 175 °C behandeld. Na elke hittebehandeling werd het staal gedurende 5 min in ijswater (0 °C) geplaatst.

4.2.3 Bepaling van biotoegankelijkheid van lycopene door middel van een tweestaps *in vitro* verteringsprocedure

De biotoegankelijkheid van lycopene werd bepaald volgens de methode die beschreven werd in paragraaf 4.2.3 met enkele aanpassingen. Een groter volume (6 ml) pancreatine/galzoutoplossing werd toegevoegd aangezien dit belangrijk kan zijn wanneer grote hoeveelheden olie in de stalen aanwezig waren.

In tegenstelling tot in het eerste deel, werd de concentratie van lycopene in het staal en in de gemengde micellen bepaald aan de hand van HPLC.

4.2.4 Bepaling van concentratie aan lycopene

HPLC analyse

HPLC is een scheidingsmethode die gebruikt wordt om chemische stoffen op basis van hun polariteit te scheiden. Het HPLC systeem bestaat uit een apolaire kolom als stationaire fase die voorafgegaan wordt door een guard kolom. De mobiele fase (eluens) en het staal worden over de stationaire fase gepompt, waarbij het eluens een meer polair karakter heeft ten opzichte van de stationaire fase. Verschillende chemische componenten uit het te analyseren staal bezitten elk een verschillende affiniteit voor de stationaire fase en zullen zich bijgevolg met verschillende snelheid doorheen de kolom verplaatsen. De eerder apolaire stoffen vertonen meer affiniteit met de stationaire fase en zullen hierdoor trager elueren ten opzichte van de meer polaire stoffen aanwezig in de te analyseren oplossing. Detectie gebeurde met behulp van een "Diode Array Detector". Deze mat de absorptie van het in het eluens opgeloste staal bij verschillende golflengten. De concentraties van de verschillende componenten kunnen bepaald worden aan de hand van ijklijnen bij de golflengte waarbij de component maximaal straling absorbeert.

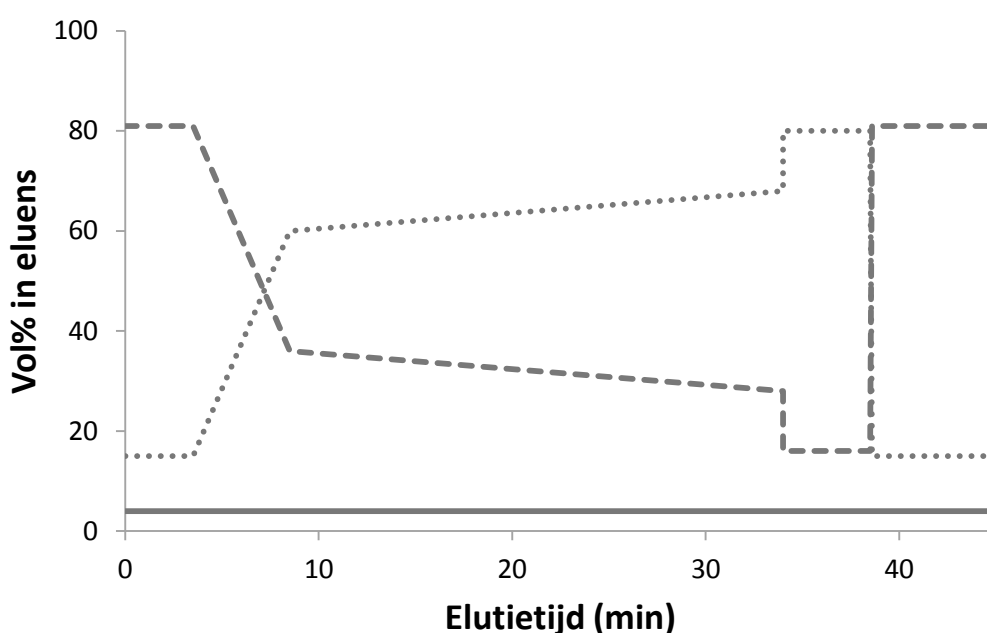
- **Werkwijze**

Deze procedure verloopt analoog aan de werkwijze beschreven in paragraaf 3.2.7. Na de extractie werd 5 ml van de hexaanfase in een proefbuis gedaan. Hieraan werd 300 µl van een β-apo-carotenaloplossing (ongeveer 4 µg/ml hexaan) toegevoegd. Het mengsel in de proefbuis werd gedurende 35 min bij 30 °C verdampt in een rotavap (RVC 2-18, Christ, Osterode, Duitsland). De bekomen semi-vaste stof werd hierna opgelost in 400 µl hexaan-dichloromethaanmengsel (4:1). De oplossing werd geanalyseerd met behulp van HPLC. De concentratie van lycopene en β-apo-carotenal konden bepaald worden met behulp van ijklijnen.

HPLC analyse

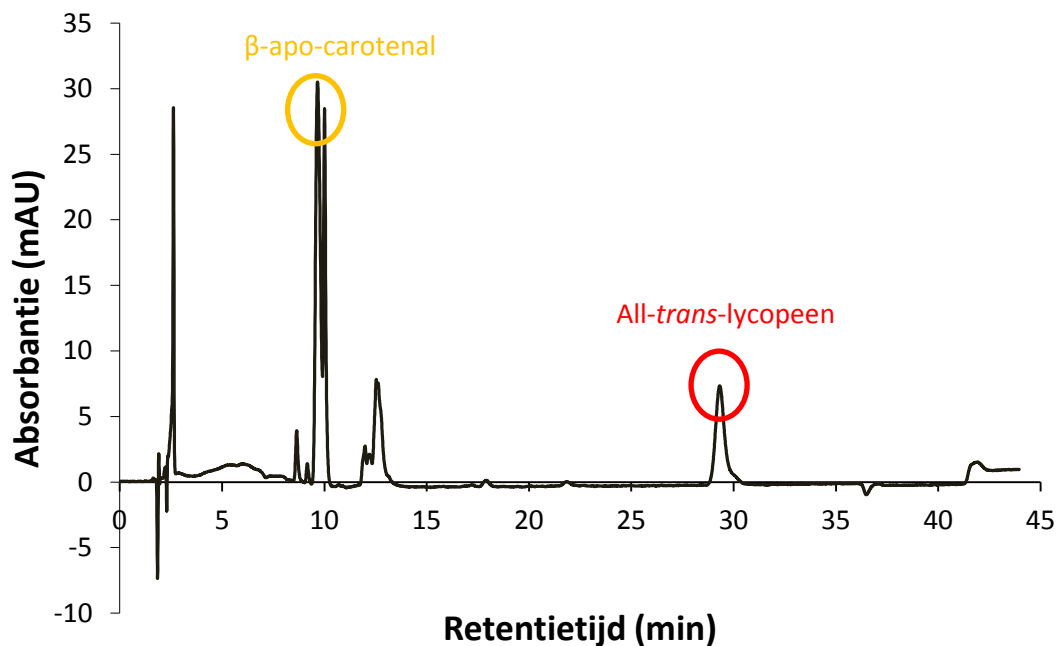
Het HPLC systeem (Agilent Technologies 1200 series, Diegem, België) bevatte een C₃₀-kolom (150 mm x 4.6 mm, 3 µm partikelgrootte) (YMC-Europe, Zulte, België), uitgerust met een guardkolom ((10 mm x 4,0 mm, 3 µm partikelgrootte) (YMC-Europe, Zulte, België)) als stationaire fase waarover een mengsel van methanol/methyl-*tert*-butylether/HPLC-zuiver water als eluens vloeide. De kolom en de stalen werden gedurende de analyse op constante temperatuur gehouden (respectievelijk 25 °C en 4 °C).

In de analyseprocedure werd gebruik gemaakt van gradiëntelutie, het verloop van de eluentsamenstelling in functie van de elutietijd wordt in Figuur 25 weergegeven.

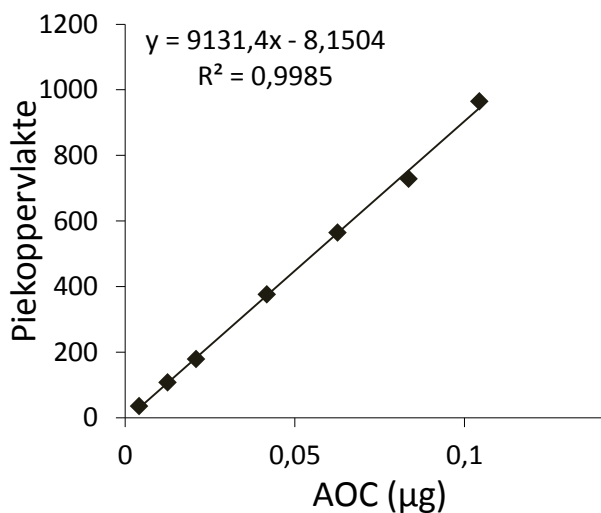


Figuur 25: Samenstelling van het eluens in functie van de elutietijd. HPLC-zuiver water (—), methanol (— — —), methyl-*tert*-butylether (*****).

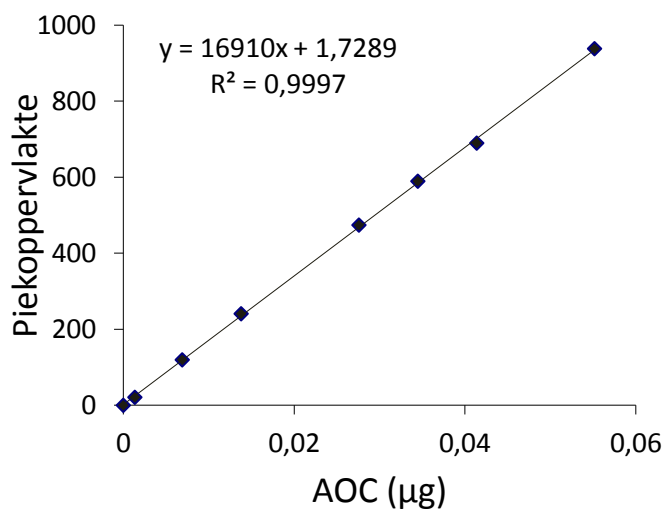
Na analyse werd een chromatogram bekomen zoals in Figuur 26 weergegeven is. In dit werk werden enkel de concentratie aan all-*trans*-lycopeen en β -apo-carotenal in de te analyseren stalen beschouwd. Deze kwamen overeen met de pieken bij een retentietijden van respectievelijk 29 en 10 min.



Figuur 26: Typisch chromatogram dat bekomen werd na analyse van een lycopenrijk staal bij $\lambda = 472$ nm.



Figuur 27: Ijklijn van β -apo-carotenal bij $\lambda = 472$ nm.



Figuur 28: Ijklijn van all-*trans*-lycopen bij $\lambda = 472$ nm.

Kwantificatie

De concentratie aan all-*trans*-lycopen werd bepaald aan de hand van een ijklijn (Figuur 28) waarbij het piekkoppervlak uitgezet werd ten opzichte van de "Amount On Column" (AOC). Voor het opconcentreren dient een concentratiefactor in rekening gebracht te worden. Deze kan bepaald worden uit de verhouding van de concentratie inwendige standaard voor opconcentreren (dit werd spectrofotometrisch bepaald) ten opzichte van de concentratie van de inwendige standaard na opconcentreren. De concentratie aan inwendige standaard

na opconcentreren werd met behulp van een ijklijn van deze component met HPLC bepaald (Figuur 27).

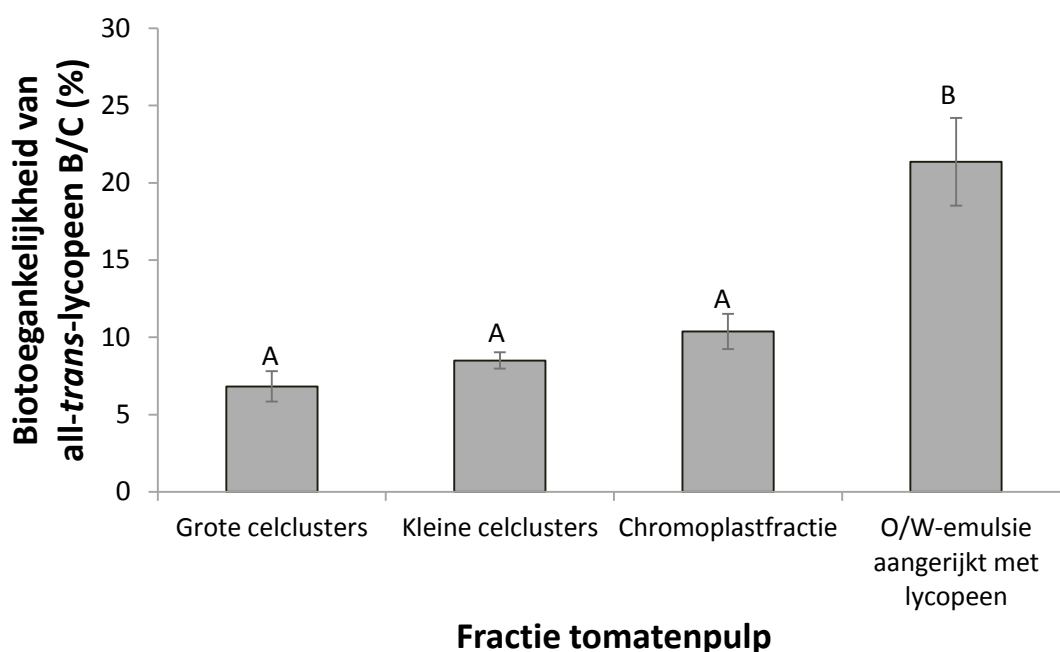
4.2.5 Statistische data analyse

Elke biotoegankelijkheidsbepaling werd per behandeling in drievoud uitgevoerd. Hieruit werd de gemiddelde biotoegankelijkheid \pm standaardafwijking berekend. Per fractie werden alle behandelingen paarsgewijs met elkaar vergeleken en significante verschillen tussen de condities werden aangetoond met behulp van een Tukey-test waarbij $P < 0,05$.

4.3. Resultaten en discussie

4.3.1 Bio-toegankelijkheid van lycopene in verschillende fracties geïsoleerd uit tomatenpulp

Figuur 29 toont de bio-toegankelijkheid van lycopene in de verschillende, onbehandelde fracties. Hieruit kan afgeleid worden dat enkel de bio-toegankelijkheid van lycopene dat zich vrij in een o/w-emulsie bevindt een significant verhoogde waarde vertoont ten opzichte van de bio-toegankelijkheid van lycopene in de andere fracties. De bio-toegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie was iets hoger dan deze in de celclusterfracties, maar dit verschil was niet significant.



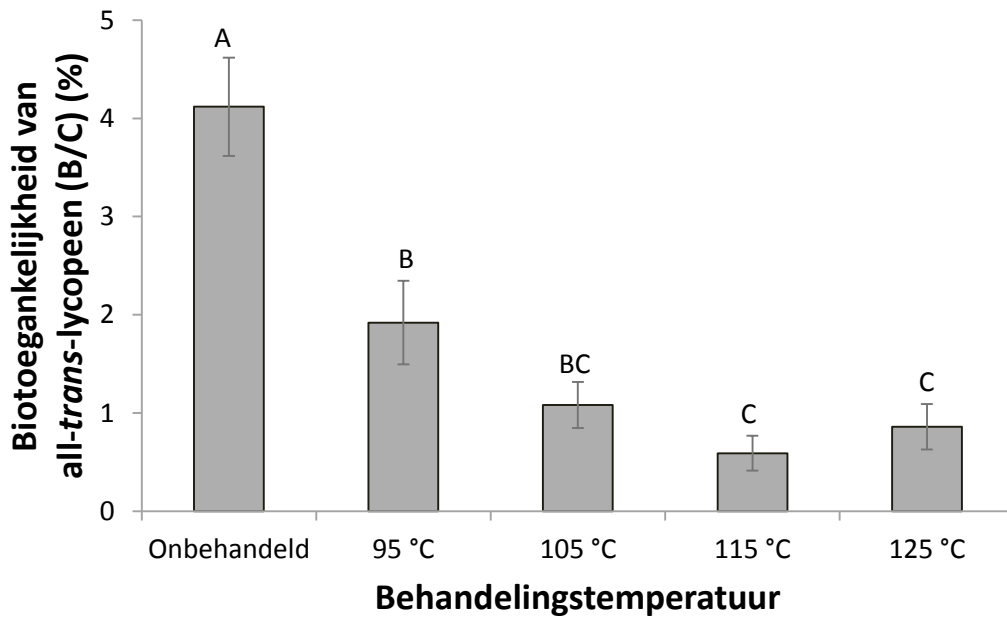
Figuur 29: Bio-toegankelijkheid van lycopene (gemiddelden \pm standaardafwijking) ($n=3$) in de onbehandelde fracties die geïsoleerd werden uit tomatenpulp. Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

In Figuur 29 worden de tomatenpulpfracties gerangschikt naar afnemend aantal barrières. De voorspelling was dat een kleiner aantal barrières aanleiding geeft tot een hogere bio-toegankelijkheid. Uit de resultaten kan afgeleid worden dat enkel de met lycopeen aange-rijkte o/w-emulsie een hogere bio-toegankelijkheid vertoont ten opzichte van de andere fracties. Opvallend is dat de bio-toegankelijkheid van lycopeen in de chromoplastfractie niet significant verschilt ten opzichte van deze in de celclusterfracties. Op basis van de hypo- these rond de barrières uit vorig deel zou nochtans verwacht worden dat lycopeen in cel- clusters, omwille van de extra barrière (celwand/celmembraan) die aanwezig is, een ver- laagde bio-toegankelijkheid heeft ten opzichte van lycopeen dat zich in chromoplasten be- vindt waarin het enkel omringd wordt door een chromoplastmembraan. Dit deed vermoeden dat de lokalisatie en fysische toestand van lycopeen in de chromoplasten een belang- rijke rol speelt in het vrijzetten van lycopeen. Kristallijn lycopeen is immers in aanzienlijke hoeveelheden aanwezig in de chromoplasten (Harris en Spurr, 1969) en heeft een lagere bio-toegankelijkheid dan amorf lycopeen. Amorf lycopeen, dat zich vrij in een o/w-emulsie heeft hierdoor een hogere bio-toegankelijkheid.

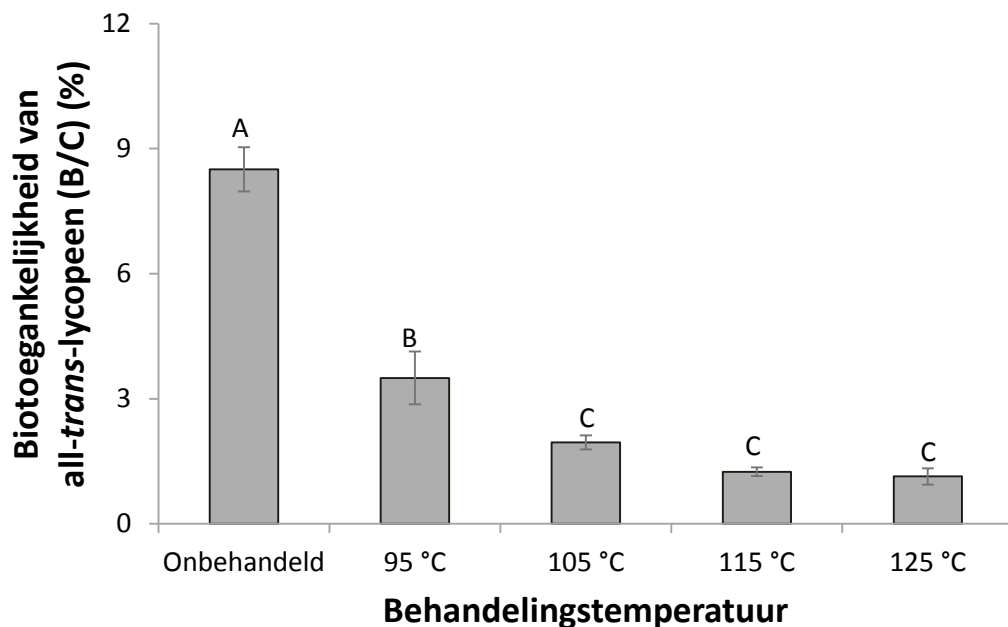
De resultaten uit Figuur 29 werden bevestigd door de observaties uit paragrafen 3.3.2 en 3.3.3. Hierin werd opgemerkt dat de bio-toegankelijkheid in zuivere tomatenpulp enkel ver- hoogde na toepassen van een intense hittebehandeling. Deze laatste geeft aanleiding tot disruptie van zowel celwand, celmembraan als organelmembranen (Waldron, 2003). Toepassen van HPH zorgt ervoor dat enkel de celwand en celmembraan stukgemaakt wor- den, terwijl waarschijnlijk een groot deel van de chromoplastmembranen intact blijft. In vo- rig deel werd aangetoond dat celdisruptie door HPH geen effect heeft op de bio-toeganke- lijkheid van lycopeen.

4.3.2 Invloed van intense hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid van lycopeen in de fractie met grote en kleine celclusters

Figuur 30 en Figuur 31 geven de invloed weer van de intensiteit van hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid van lycopeen in de grote en kleine celclusterfractie. Uit de figuren kan afgeleid worden dat de bio-toegankelijkheid van lycopeen in zowel de grote als de kleine celclusterfractie daalt in functie van de intensiteit van de toegepaste hittebehande- ling.



Figuur 30: Biotoegankelijkheid van lycopeen (gemiddelden \pm standaardafwijking) (n=3) in de grote celclusterfractie na hittebehandeling (25 min bij aangegeven temperatuur). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).



Figuur 31: Biotoegankelijkheid van lycopeen (gemiddelden \pm standaardafwijking) (n=3) in de kleine celclusterfractie na hittebehandeling (25 min bij aangegeven temperatuur). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

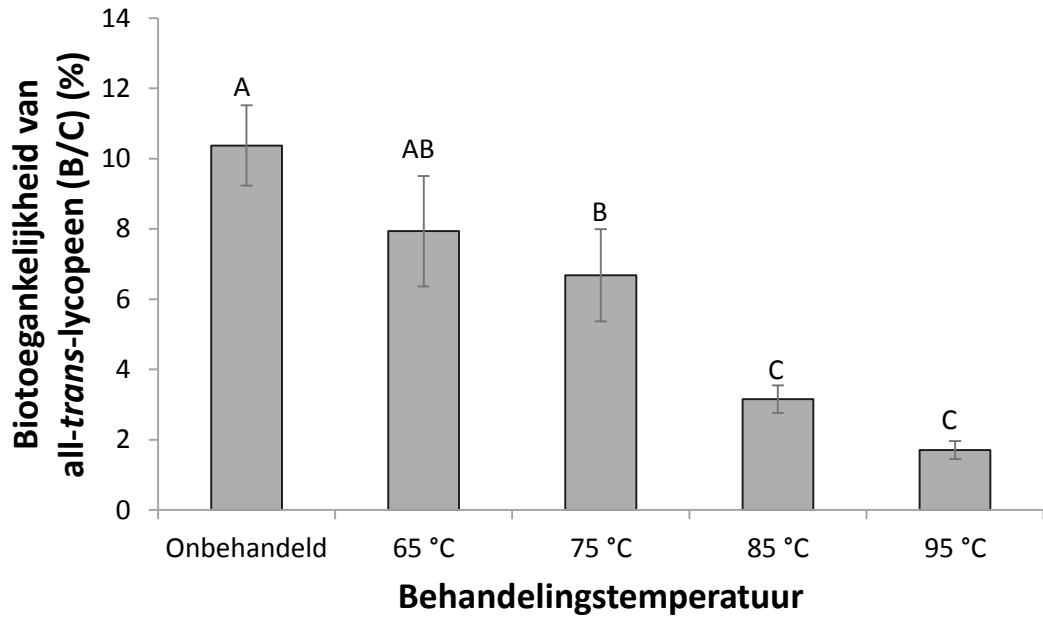
Het verloop van de biotoegankelijkheid in functie van de intensiteit van de hittebehandelingen is tegen de verwachtingen in. In Figuur 21 werd immers aangetoond dat een hittebehandeling gedurende 20 min bij 120 °C de biotoegankelijkheid van lycopeen in zuivere tomatenpulp significant deed stijgen. Ook Colle *et al.* (2010b) beschreven een verhoging van

de biotoegankelijkheid van lycopene in tomatenpulp na intense hittebehandelingen. Uit deze studies werd besloten dat enkel intense hittebehandelingen in staat zijn om alle membraansystemen van tomatencellen doorbreken. Het doorbreken van celwand, celmembraan en chromoplastmembraan zou op deze manier leiden tot een verhoogde bio-toegankelijkheid.

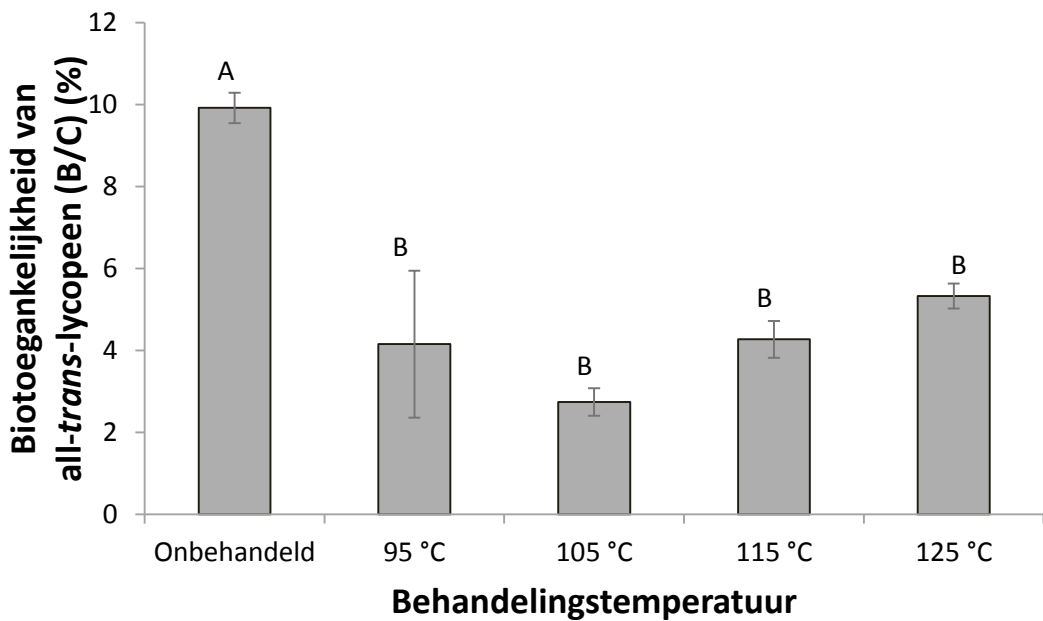
Het experiment in huidige studie heeft echter betrekking op een ander soort tomatenmatrix. Een fractionering impliceert dat welbepaalde componenten uit tomatenpulp geëlimineerd werden. Mogelijk hebben hittebehandelingen een specifieke invloed op deze componenten, wat kan zorgen voor een verhoogde bio-toegankelijkheid van lycopene in deze componenten. Zoals reeds aangetoond in de literatuur is de voedselmatrix een factor die een belangrijk effect kan uitoefenen op de bio-toegankelijkheid van carotenoïden (Castenmiller en West, 1998; Borel, 2003; Yonekura en Nagao, 2007). De dalende bio-toegankelijkheid in functie van de intensiteit van de hittebehandelingen kan mogelijk veroorzaakt worden door veranderingen in de celwand of het celmembraanstructuur. Een voorbeeld van een belangrijke celwandcomponent is pectine. Dit polymeer is mede verantwoordelijk voor de textuur van groenten en fruit. Van Buggenhout *et al.* (2009) toonden reeds aan dat intense hittebehandelingen de pectinestructuur in de celwand kunnen aantasten. Dit kan leiden tot uitloging van pectinefragmenten, die op hun beurt een soort netwerk vormen. Dit netwerk kan invloed hebben op de viscositeit van groenten- en fruitpulp wat op zich de verlaagde bio-toegankelijkheid van lycopene in de hittebehandelde celclusterfracties kan verklaren (Colle *et al.*, 2010c).

4.3.3 Invloed van milde en intense hittebehandelingen op de bio-toegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie

Ook de chromoplastfractie werd onderworpen aan zowel milde als intense hittebehandelingen (Figuur 32 en Figuur 33). Ook hier zorgde verhitting voor een lagere bio-toegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie ten opzichte van deze in de onbehandelde fractie. Milde hittebehandelingen veroorzaken een lagere bio-toegankelijkheid naarmate de behandelingstemperatuur stijgt. Intense hittebehandelingen zorgden ook voor een verlaagde bio-toegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie (Figuur 33) maar bij deze laatste behandelingen kon geen significant verschil waargenomen worden tussen de stalen die behandeld werden bij verschillende intensiteiten.



Figuur 32: Biotoegankelijkheid van lycopene (gemiddelden \pm standaardafwijking) (n=3) in de chromoplastfractie na milde hittebehandeling (10 min bij aangegeven temperatuur). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).



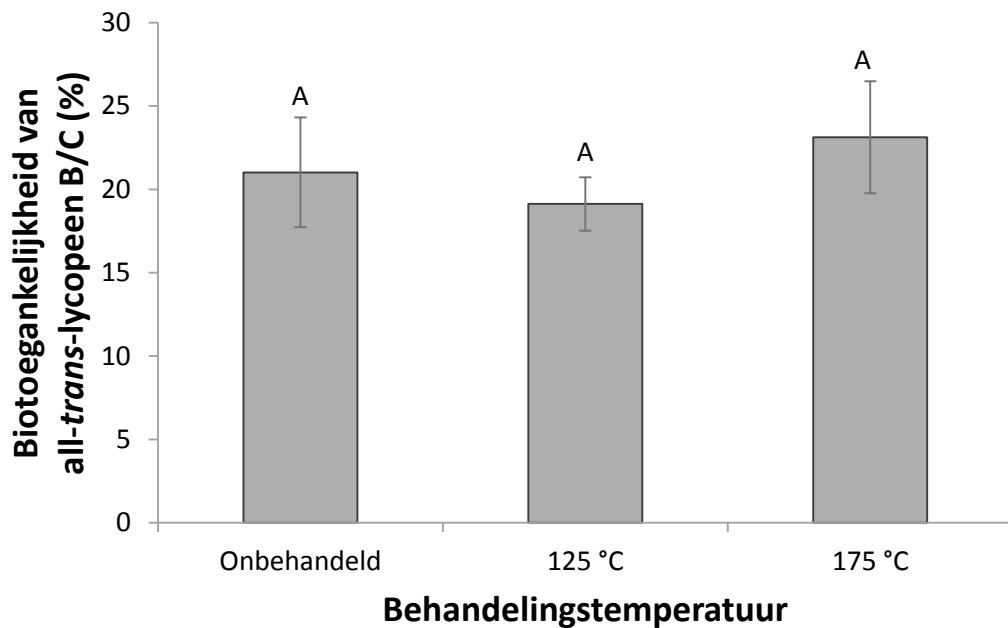
Figuur 33: Biotoegankelijkheid van lycopene (gemiddelden \pm standaardafwijking) (n=3) in de chromoplastfractie na intense hittebehandeling (25 min bij aangegeven temperatuur). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

De resultaten tonen opnieuw aan dat hitte een negatieve invloed heeft op de biotoegankelijkheid van lycopene in de chromoplastfractie terwijl een verhoogde biotoegankelijkheid verwacht werd. Deze resultaten kunnen net zoals in de vorige paragraaf te wijten zijn aan de aard het onderzochte tomatenstaal. Mogelijk werd ook hier door thermische behande-

lingen een nieuw soort netwerk gevormd door uitloging van specifieke componenten uit de fractie. Dit netwerk kan aanleiding geven tot een moeilijkere vrijzetting van lycopene uit de chromoplastfractie tijdens de vertering.

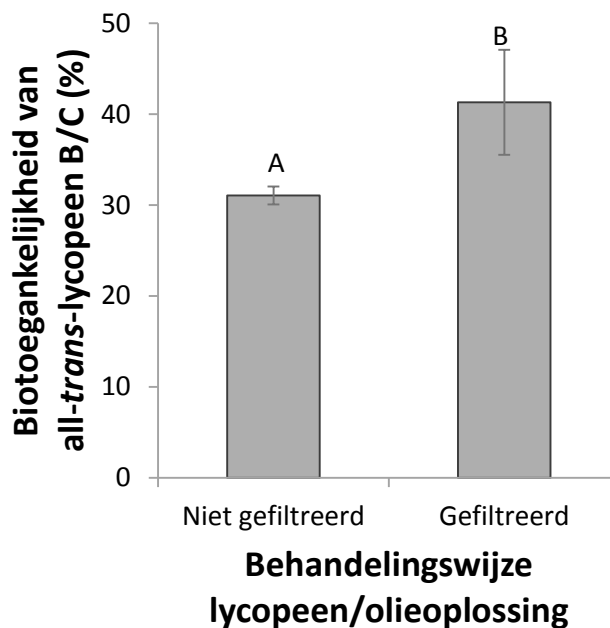
4.3.4 Invloed van intense hittebehandelingen op de bio toegankelijkheid van lycopene in de met lycopene aangerijkte o/w-emulsie

In dit experiment werd de invloed van intense hittebehandelingen op de bio toegankelijkheid van lycopene in een o/w-emulsie onderzocht (Figuur 34). De resultaten tonen dat de bio toegankelijkheid van lycopene in de o/w-emulsie die gemaakt werd met een hittebehandelde lycopene/olieoplossing niet significant verschilt van de bio toegankelijkheid van lycopene in de o/w-emulsie waarbij de lycopene/olieoplossing niet behandeld werd. Een kleine, niet significante stijging in bio toegankelijkheid van lycopene is waar te nemen tussen de hittebehandelde (175 °C) o/w-emulsie en deze in de onbehandelde stalen.



Figuur 34: Bio toegankelijkheid van lycopene (gemiddelden \pm standaardafwijking) (n=3) in de met lycopene aangerijkte o/w-emulsie na hittebehandeling (25 min bij 125 °C en 10 min bij 175 °C). Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

In Figuur 35 wordt het effect van filtratie (poriegrootte = 0,2 μm) van de lycopene/olieoplossing, die gebruikt werd om de aangerijkte o/w-emulsie te maken, op de bio toegankelijkheid van lycopene in deze emulsie onderzocht. Uit de resultaten kan afgeleid worden dat de bio toegankelijkheid van lycopene steeg na filtratie.



Figuur 35 Bio toegankelijkheid van lycopeen (gemiddelden \pm standaardafwijking) ($n=3$) in de met lycopeen aangerijkte o/w-emulsie ten opzichte van een emulsie die gemaakt werd met gefiltreerde (poriegrootte 0,2 μm) lycopeen/olieoplossing. Gemiddelden met dezelfde letters verschillen niet-significant van elkaar (Tukey-test, $P < 0,05$).

Uit de resultaten blijkt dat hittebehandelingen geen significant effect hebben op de bio toegankelijkheid van lycopeen in een o/w-emulsie. Filtratie van de met lycopeen aangerijkte olie voor het aanmaken van de o/w-emulsie zorgde echter wel voor een significant hogere bio toegankelijkheid. Kristallijn lycopeen kan uit de olie verwijderd worden door het te filteren of te smelten bij 175 °C (Shi en Le Maguer, 2000). Het kristallijne karakter van lycopeen bemoeilijkt de opname van dit carotenoïde in de gemengde micellen (Faulks en Southon, 2005). Hieruit kan verwacht worden dat het verwijderen van de lycopeenkristallen leidt tot een verhoogde bio toegankelijkheid. Een kleine stijging werd enkel waargenomen na verwijdering van de kristallen door middel van filtratie. Mogelijk werd gedurende de aanmaak van de met lycopeen aangerijkte olijfolie voor het grootste deel amorf lycopeen uit de tomatenpulp opgenomen. Dit zorgde ervoor dat het verwijderen van de fractie kristallijn lycopeen slechts tot een kleine verhoging van de bio toegankelijkheid van lycopeen leidde. Uit de figuur blijkt ook dat de bio toegankelijkheid van lycopeen dat zich vrij in o/w-emulsie bevindt nog steeds relatief laag is aangezien lycopeen hier niet omringd wordt door een structurele barrière. Ook na het toepassen van hittebehandelingen bij 175 °C bleef de bio toegankelijkheid op een lagere waarde. Een mogelijke oorzaak hiervoor is dat de gebruikte verteringsprocedure niet geoptimaliseerd was voor het analyseren van stalen met veel olie aanwezig. De soort en activiteit van de gebruikte verteringsenzymen, galzoutconcentratie en de soort en concentratie van de gebruikte emulgator in de o/w-emulsie zijn

voorbeelden van factoren in de procedure die een sterke invloed op de absolute waarden van de biotoegankelijkheid kunnen uitoefenen.

4.4. Besluit

In dit deel werd getracht om de invloed van structurele barrières op de biotoegankelijkheid van lycopene in tomatenpulp te onderzoeken en deze barrières met behulp van hittebehandelingen weg te nemen.

Uit de resultaten van het eerste experiment kan besloten worden dat de biotoegankelijkheid van lycopene in de kleine en grote celclusterfractie niet verschilt ten opzichte van deze van de chromoplastfractie. Dit deed vermoeden dat de belangrijkste barrière voor de vrijzetting van lycopene gelokaliseerd is in de chromoplasten. Mogelijk vormt de aanwezigheid van lycopenekristallen in de chromoplasten de belangrijkste barrière voor de vrijzetting van lycopene uit de tomatenmatrix. Dit werd ondersteund door het feit dat lycopene dat zich vrij in een o/w-emulsie bevond een sterk verhoogde biotoegankelijkheid vertoonde.

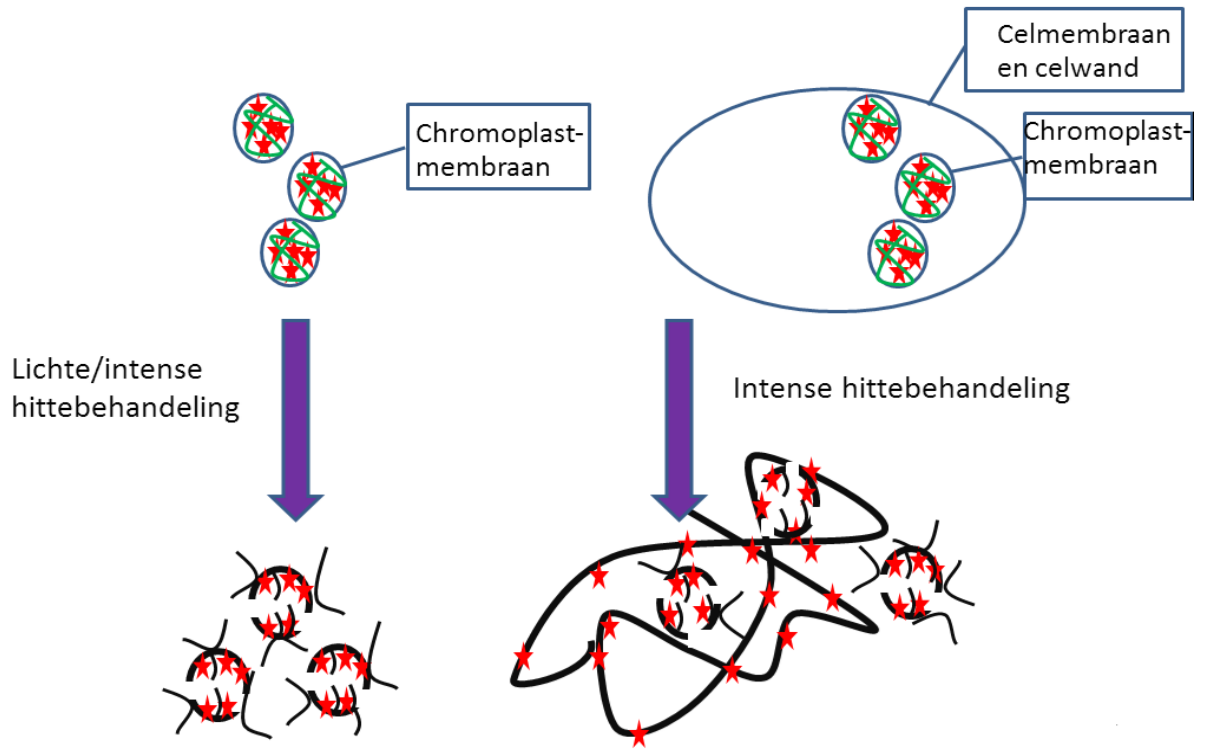
In een volgend experiment werden de tomatenpulfracaties onderworpen aan hittebehandelingen. Wanneer zowel de kleine en grote celclusterfractie als de chromoplastfractie behandeld werden bleek dat de biotoegankelijkheid van lycopene hierin lager was dan in de onbehandelde fracties. De biotoegankelijkheid van lycopene in de hittebehandelde fracties daalde of bleef gelijk in functie van de intensiteit van de hittebehandelingen. Deze trend werd niet verwacht op basis van de resultaten uit vorig deel. Hieruit werd immers besloten dat intense hittebehandelingen van tomatenpulp leiden tot een verhoogde biotoegankelijkheid van lycopene. Een verklaring hiervoor kan liggen in de fractionering van de tomatenpulp, die ervoor zorgt dat welbepaalde componenten uit tomatenpulp geëlimineerd werden. Mogelijk hebben hittebehandelingen een specifieke invloed op deze componenten, wat kan zorgen voor een verhoogde biotoegankelijkheid van lycopene. De dalende biotoegankelijkheid van lycopene bij stijgende intensiteit van de hittebehandelingen is mogelijk toe te schrijven aan uitloging van specifieke celwand- en chromoplastmembraancomponenten zoals bijvoorbeeld pectine in het geval van uitloging van de celwand. Deze membraancomponenten kunnen op hun beurt een netwerk vormen dat aanleiding geeft tot een viscositeitsverhoging in de fracties. Deze viscositeitsstijging kan een verlaagde biotoegankelijkheid van lycopene veroorzaken.

Verder werd waargenomen dat intense hittebehandelingen van de met lycopene aangerijkte olie geen duidelijke invloed hadden op de biotoegankelijkheid van lycopene in de o/w-emulsie. Filtratie van de aangerijkte olie veroorzaakte anderzijds wel een lichte stijging van de bio-toegankelijkheid van lycopene in de emulsie. Mogelijk bevond het grootste deel van het met

olijfolie geëxtraheerde lycopeen zich in de amorfe toestand waardoor het smelten of filteren van het kristallijn lycopeen slechts een gering effect had op de biotoegankelijkheid.

Verder lijkt de aanwezigheid van een oliefase tijdens hittebehandelingen een belangrijk effect uit te oefenen op de biotoegankelijkheid van lycopeen. De aanwezigheid van een waterige tomatenmatrix maakt de vrijzetting van lycopeen als hydrofoob molecuul erg moeilijk. Mogelijk zorgen intense hittebehandelingen voor een snellere transfer van lycopeen naar de oliefase waardoor een grotere hoeveelheid lycopeen zich reeds in de oliefase bevindt alvorens de olie/tomaatmengsels verteerd worden. Dit wordt bevestigd door het feit dat lycopeen in o/w-emulsie een verhoogde biotoegankelijkheid heeft.

Uit de besluiten van dit deel kan ten slotte een nieuwe hypothese opgesteld worden. Deze stelt dat de vrijzetting van lycopeen uit de tomatenmatrix verhinderd wordt door twee belangrijke soorten structurele componenten. Enerzijds zijn er de barrières die reeds aanwezig zijn in de verschillende fracties zoals celwand, celmembraan en chromoplastmembraan. Ook de vrijzetting van kristallijn lycopeen uit de tomatenmatrix verloopt moeilijk en vormt een fysieke barrière. Anderzijds zijn er ook structurele barrières die tot stand komen tijdens hittebehandelingen. Hitte kan invloed uitoefenen op celwandcomponenten zoals bijvoorbeeld pectine waardoor dit polymeer in fragmenten vrijkomt en een nieuw netwerk vormt. Deze uitloging kan leiden tot een verhoogde viscositeit van de fractie wat aanleiding kan geven tot een verlaagde biotoegankelijkheid van lycopeen. In Figuur 36 is een schematische voorstelling van de hypothese gegeven.



Figuur 36: Schematische voorstelling van de hypothese die stelt dat hittebehandelingen van celclusterfracties en chromoplastfracties resulteren in de vorming van een nieuw structureel netwerk waardoor de biotoegankelijkheid van lycopeen daalt.

5. Algemeen besluit

Met dit thesisonderzoek werd getracht om in de eerste plaats de invloed van intrinsieke en extrinsieke factoren op de biotoegankelijkheid van lycoppeen in tomatenpulp te onderzoeken. Hieruit werd een hypothese afgeleid die stelde dat verschillende structurele barrières de vrijzetting van lycoppeen uit de voedselmatrix tijdens de vertering kunnen verhinderden. Vervolgens werd deze hypothese aan de hand van enkele specifieke experimenten in een tweede deel verder onderzocht. Hiervoor werden fracties met een verschillend aantal structurele barrières voor de vrijzetting van lycoppeen aangemaakt. De mogelijkheid om deze barrières te beïnvloeden door hittebehandelingen werd hierin onderzocht.

Zoals in andere studies reeds aangetoond werd, zorgt het toevoegen van olie ervoor dat lycoppeen beter geïncorporeerd kan worden in de micellen. Olie kan, door zijn hydrofobe aard, fungeren als een transportmedium voor lycoppeen tussen de hydrofiele tomatenmatrix en de micelfase. Bijkomend zorgt het toevoegen van olie *in vivo* voor een verhoogde galzoutsecretie. De resultaten van de huidige studie tonen dat toevoegen van 5% vis-, olijf- en kokosolie resulteert in een verhoogde biotoegankelijkheid van lycoppeen. Het vetzuurprofiel van olijfolie bleek het meest geschikt om de biotoegankelijkheid van lycoppeen te doen stijgen. Dit is mogelijk te wijten aan de grote hoeveelheid langeketenvetzuren die aanwezig zijn in dit type olie. Visolie bevat ook langeketenvetzuren met hierin een aanzienlijke fractie aan C20:5 en C22:6- vetzuren. Pancreas lipase is echter minder goed in staat om deze laatste soorten vetzuren af te breken wat resulteert in een lagere biotoegankelijkheid van lycoppeen in visolie/tomaatmengsels dan in olijfolie/tomaatmengsels.

De voedselmatrix is een tweede belangrijke factor die invloed heeft op de biotoegankelijkheid van lycoppeen. Hittebehandelingen hebben een invloed op de structuur van de voedselmatrix en hierdoor ook op de biotoegankelijkheid van lycoppeen in het tomatenstaal. Uit dit onderzoek is gebleken dat het effect van hittebehandelingen sterk afhankelijk is van het staal dat beschouwd wordt. De biotoegankelijkheid van lycoppeen in verschillende soorten tomatenstalen (zuivere tomatenpulp, olie/tomaatmengsels, geïsoleerde tomatenpulpfracties) blijkt op een andere manier beïnvloed te worden door hittebehandelingen.

Wat betreft zuivere tomatenpulp en olie/tomaatmengsels blijken enkel intense hittebehandelingen (20 min bij 120 °C) de biotoegankelijkheid van lycoppeen te kunnen verhogen ten opzichte van de biotoegankelijkheid van lycoppeen in de onbehandelde stalen. Intense hittebehandelingen zorgen voor een verlies van integriteit voor celwand, celmembraan en chromoplastmembranen. Zo werd lycoppeen het beste vrijgezet uit de tomatenpulp waaraan 5% olie werd toegevoegd en die behandeld werd bij 120 °C. De hittebehandeling veroorzaakt

naast celdisruptie waarschijnlijk ook een snellere massatransfer van lycopene vanuit de tomatenpulp naar de oliefase toe. Het oplossen van lycopene in de oliefase is een belangrijke vereiste gebleken voor het bekomen van een hoge bio-toegankelijkheid. Ook de resultaten uit het tweede deel tonen aan dat vrij lycopene opgelost in olie, die gebruikt werd om een o/w-emulsie te maken, aanleiding geeft tot een hoge bio-toegankelijkheid. Deze resultaten tonen aan dat in olie opgelost lycopene beter opgenomen wordt door de gemengde micellen.

Hittebehandelingen kunnen ook aanleiding geven tot een verlaagde bio-toegankelijkheid van lycopene. Dit effect werd vooral opgemerkt in de geïsoleerde tomatenpulpfracties. Een verklaring hiervoor kan liggen in de fractionering van de tomatenpulp, die ervoor zorgt dat welbepaalde componenten uit tomatenpulp geëlimineerd werden. Mogelijk hebben hittebehandelingen een specifieke invloed op deze componenten, wat kan zorgen voor een verhoogde bio-toegankelijkheid van lycopene in deze componenten. Wanneer de intensiteit van de hittebehandelingen stijgt verlaagt de bio-toegankelijkheid van lycopene in de celclusterfracties en de chromoplastfractie. Een mogelijke oorzaak hiervoor was de uitloging van specifieke celwandcomponenten. Deze vormen op hun beurt door interacties een nieuw netwerk waardoor ze aanleiding geven tot een verhoogde viscositeit van de tomatenstalen en de bio-toegankelijkheid van lycopene daalt.

Ook de invloed van mechanische procesvoering op de bio-toegankelijkheid van lycopene in zuivere tomatenpulp en olie/tomaatmengsels werd onderzocht. Uit microscopische analyse bleek dat hogedrukhomogenisatie bij 100 bar aanleiding gaf tot verlies van integriteit van celwand en celmembraan. De bepaling van de deeltjesgrootteverdeling toonde aan dat de oliefase na HPH fijn werd gedispergeerd in de tomaatfase. De homogenisatie op zich leidde niet tot een verhoogde bio-toegankelijkheid van lycopene. Mogelijk wordt de tomatencelstructuur hier omgevormd tot een viskeus netwerk van celfragmenten waardoor verteringsenzymen en galzouten minder goed op de voedselmatrix kunnen inwerken wat leidt tot een verlaagde bio-toegankelijkheid van lycopene in de gehomogeniseerde stalen. Wanneer homogenisatie gevolgd werd door een minder intense hittebehandeling (20 min bij 90 °C) bleek dit reeds voldoende te zijn om de bio-toegankelijkheid van lycopene in olie/tomaatmengsels te doen stijgen. Mogelijk vergemakkelijkt de fijnverdeelde olie en de celdisruptie de transfer van lycopene naar de oliefase waardoor minder energie in de vorm van hitte vereist is om deze transfer te verwezenlijken. Milde hittebehandelingen kunnen anderzijds ook het na de homogenisatie gevormde netwerk aantasten en hierdoor zorgen voor een verhoogde vrijgave van lycopene uit de voedselmatrix.

Op basis van de toegepaste procescondities in dit onderzoek, kunnen optimale condities geïdentificeerd worden die leiden tot een verhoogde vrijzetting van lycopene tijdens de verticing. Dit is zeer relevant met oog op het potentieel gezondheidsbevorderend effect van lycopene. De resultaten uit dit thesisonderzoek tonen aan dat lycopene de hoogste biotoegankelijkheid kent wanneer 5% olijfolie aan tomatenpulp werd toegevoegd en het mengsel gedurende 20 min bij 120 °C verhit werd.

Uit dit thesisonderzoek is gebleken dat de aard van het staal in sterke mate de biotoegankelijkheid van lycopene bepaalt en ook het effect van hittebehandelingen op de biotoegankelijkheid. Het is duidelijk dat meer onderzoek in deze context noodzakelijk is om de soms tegenstrijdige resultaten beter te kunnen begrijpen.

Het kan ook interessant zijn om de biotoegankelijkheid van lycopene in tomaten te optimaliseren door middel van nieuwe procesvoeringstechnieken. Zo zijn gepulseerde elektrische velden (PEF) een recente techniek die als alternatief voor hittebehandelingen en HPH gebruikt kan worden om celdisruptie te bekomen (Angersbach *et al.*, 1999). Deze techniek kan mogelijk gebruikt worden om met beperkte hitteschade cellen te permeabiliseren en zou hierdoor mogelijk tot verbeterde vrijzetting van lycopene uit de voedselmatrix kunnen leiden waarbij de lycopene degradatie beperkt blijft.

6. Bronnen

- Abdel-Aal, E.S.M. en Akhtar, M.H. (2006). Recent advances in the analyses of carotenoids and their role in human health. *Current Pharmaceutical Analysis*, Vol(2): 195-204.
- Agarwal, S. en Rao, A.V. (1998). Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*, Vol(33): 981-984.
- Alberg, A. (2002). The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*, Vol(180): 121-137.
- Angersbach, A., Heinz, V., en Knorr, D. (1999). Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. *Biotechnology progress*, Vol(15): 753.
- APV. (2009). Cell disruption by homogenization.[on line]. SPX corporation. Beschikbaar op http://www.apv.com/pdf/catalogs/Cell_Disruption_by_Homogenization_3006_01_06_2008_US.pdf. [Datum van opzoeking: 2 april 2012].
- Armstrong, G.A. en Hearst, J.E. (1996). Carotenoids .2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal*, Vol(10): 228-237.
- Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., en Schubert, H. (2003). Stability of lycopene in oil-in-water emulsions. *Engineering in life sciences*, Vol(3): 199-201.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., Zouine, M., Latché, A., Bouzayen, M., en Pech, J. (2010). Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *Journal of Experimental Botany*, Vol(61): 2413-2431.
- Bayod, E., Mansson, P., Innings, F., Bergenstahl, B., en Tornberg, E. (2007). Low shear rheology of concentrated tomato products. Effect of particle size and time. *Food biophysics*, Vol(2): 146-157.
- Ben-Shaul, Y. en Naftali, Y. (1969). The development and ultrastructure of lycopene bodies in chromoplasts of *Lycopersicum esculentum*. *Protoplasma*, Vol(67): 333-344.
- Boileau, A.C., Merchen, N.R., Wasson, K., Atkinson, C.A., en Erdman, J.W. (1999). Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *Journal of nutrition*, Vol(129): 1176-1181.
- Boileau, T.W., Boileau, A.C., en Erdman, J.W., Jr. (2002). Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, Vol(227): 914-919.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J., en Decker, E.A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol(50): 515-532.
- Borel, P. (2003). Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol(41): 979-94.
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., en Azais-Braesco, V. (1996). Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J Lipid Res*, Vol(37): 250-61.
- Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., en Azaïs-Braesco, V. (1998). Chylomicron β -carotene and retinyl palmitate responses are dramatically

- diminished when men ingest β -carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *Journal of nutrition*, Vol(128): 1361-1367.
- Bosković, M.A. (1979). Fate of lycopene in dehydrated tomato products: carotenoid isomerization in food system. *Journal of food science*, Vol(44): 84-86.
- Bramley, P.M. (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, Vol(54): 233-236.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*, Vol(9): 1551-1558.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., en White, W.S. (2004). Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(80): 396-403.
- Buyse, J. (2010). Hoofdstuk: Lipiden. In: *Voedingsleer*. Kasteelpark Arenberg 30, 3001 Heverlee.
- Castenmiller, J.J.M. en West, C.E. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, Vol(18): 19-38.
- Chasse, G.A., Mak, M.L., Deretey, E., Farkas, I., Torday, L.L., Papp, J.G., Sarma, D.S.R., Agarwal, A., Chakravarthi, S., Agarwal, S., en Rao, A.V. (2001). An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, Vol(571): 27-37.
- Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., van Breemen, R., Ashton, D., en Bowen, P.E. (2001). Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol(93): 1872-1879.
- Clark, J. (2007). Geometric (cis/trans) isomerism.[on line]. Clark, Jim. Beschikbaar op <http://www.chemguide.co.uk/basicorg/isomerism/geometric.html>. [Datum van opzoeking: 6 november 2011].
- Colle, I.J.P., Andrys, A., Grundelius, A., Lemmens, L., Löfgren, A., van Buggenhout, S., van Loey, A., en Hendrickx, M. (2011a). Effect of pilot-scale aseptic processing on tomato soup quality parameters. *Journal of food science*, Vol(76): C714-C723.
- Colle, I.J.P., Lemmens, L., Tolesa, G.N., Van Buggenhout, S., De Vleeschouwer, K., Van Loey, A.M., en Hendrickx, M.E. (2010a). Lycopene degradation and isomerization kinetics during thermal processing of an olive oil/tomato emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol(58): 12784-12789.
- Colle, I.J.P., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., en Hendrickx, M. (2010b). Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. *Journal of food science*, Vol(75): C753-C759.
- Colle, I.J.P., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., en Hendrickx, M. (2011b). Modeling lycopene degradation and isomerization in the presence of lipids. *Food and Bioprocess Technology*, 1-10.

- Colle, I.J.P., Van Buggenhout, S., Lemmens, L., Van Loey, A.M., en Hendrickx, M.E. (2012). The type and quantity of lipids present during digestion influence the in vitro bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Research International*, Vol(45): 250-255.
- Colle, I.J.P., Van Buggenhout, S., van Loey, A., en Hendrickx, M. (2010c). High pressure homogenization followed by thermal processing of tomato pulp: Influence on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Research International*, Vol(43): 2193-2200.
- Devaraj, S., Mathur, S., Basu, A., Aung, H., Vasu, V.T., Meyers, S., en Jialal, I. (2008). A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol(27): 267-273.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., en Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, Vol(274): 532-538.
- Diels, A.M.J. (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical reviews in microbiology*, Vol(32): 201.
- During, A., Dawson, H.D., en Harrison, E.H. (2005). Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *Journal of nutrition*, Vol(135): 2305-2312.
- During, A. en Harrison, E.H. (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, Vol(430): 77-88.
- Edge, R., McGarvey, D.J., en Truscott, T.G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, Vol(41): 189-200.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA).(2010). Lycopene-whey complex (bioavailable lycopene) and risk of atherosclerotic plaques.
- EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific opinion of the substantiation of health claims related to lycopene and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage, protection of the skin from UV-induced damage, contribution to normal cardiac function, and maintenance of normal vision pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, Vol(9): 2031-2059.
- Erdman, J.W., Fahey, G.C., en White, C.B. (1993). Absorption and transport of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol(691): 76-85.
- Faulks, R.M. en Southon, S. (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, Vol(1740): 95-100.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., en Hornero-Méndez, D. (2011). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, Vol(46): 438-450.
- Furr, H.C. en Clark, R.M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of nutritional biochemistry*, Vol(8): 364-377.
- Gallicchio, L., Boyd, K., Matanoski, G., Tao, X., Chen, L., Lam, T.K., Shiels, M., en Hammond, E. (2008). Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(88): 372-383.

- Garavelli, M. (1998). DFT study of the reactions between singlet-oxygen and a carotenoid model. *Journal of the American Chemical Society*, Vol(120): 10210-10222.
- Gartner, C., Stahl, W., en Sies, H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(66): 116-122.
- GEA Niro Soavi. (2011). High Pressure Homogenization Technology.[on line]. GEA Group. Beschikbaar op <http://www.nirosoavi.com/high-pressure-homogenization-technology.asp>. [Datum van opzoeking: 19/02/2012].
- Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., en Caris-Veyrat, C. (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, Vol(124): 1603-1611.
- Giles, E. en Singh, G. (2003). Role of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in breast cancer proliferation and metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, Vol(20): 481-487.
- Giovannucci, E. (2005). Tomato products, lycopene, and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. *Journal of nutrition*, Vol(135): 2030S-2031S.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., en Willet, W.C. (1995). Intake of carotenoids and retino in relation to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol(87): 1767-1776.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Liu, Y., Stampfer, M.J., en Willet, W.C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol(94): 391-398.
- Graziani, G., Pernice, R., Lanzuise, S., Vitaglione, P., Anese, M., en Fogliano, V. (2003). Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin olive oil systems. *European food research and technology*, Vol(216): 116-121.
- Guinel, C. (1997). Toluidine blue.[on line]. Beschikbaar op <http://www.bio.net/bionet/mm/plant-ed/1997-October/002467.html>. [Datum van opzoeking: 3 april 2012].
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., en Michaud, D.S. (1998). Circulating concentrations of insulin-like growth factor I and risk of breast cancer. *The lancet*, Vol(351): 1393-1396.
- Harris, W.M. en Spurr, A.R. (1969). Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *American journal of botany*, Vol(56): 380-389.
- Hedrén, E., Diaz, V., en Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, Vol(56): 425-430.
- Hofmann, A.F. (1963). The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *Biochemical journal*, Vol(89): 57-68.
- Hollander, D. en Ruble, P.E. (1978). Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*, Vol(235): G686-G691.

- Hornero-Méndez, D. en Mínguez-Mosquera, M.I. (2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol(8): 407-412.
- Huo, T., Ferruzzi, M.G., Schwartz, S.J., en Failla, M.L. (2007). Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol(55): 8950-8957.
- Iribarren, C., Folsom, A.R., Jacobs, D.R., Gross, M.D., Belcher, J.D., en Eckfeldt, J.H. (1997). Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol(17): 1171-1177.
- Jackson, M.J. (1997). The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. *European Journal of Clinical Nutrition*, Vol(51): S1-S2.
- Karakaya, S. en Yilmaz, N.(2007). Lycopene content and antioxidant activity in fresh and processed tomatoes and *in vitro* bioavailability of lycopene. Vol(87): 2342-2347.
- Kavanaugh, C.J., Trumbo, P.R., en Ellwood, K.C. (2007). The US Food And Drug administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol(99): 1074-1085.
- Kielczewska, K., Kruk, A., Czerniewicz, M., Warminska, M., en Haponiuk, E. (2003). The effecto of high-pressure homogenization on changes in milk colloidal and emulsifying systems. *Polish journal of food and nutrition sciences*, Vol(12): 43-46.
- Klipstein-Grobusch, K., Launer, L.J., Geleijnse, J.M., Boeing, H., Hofman, A., en Wittemen, J.C.M. (2000). Serum carotenoids and atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Atherosclerosis*, Vol(148): 49-56.
- Lee, M.T. en Chen, B.H. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, Vol(78): 425-432.
- Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Oey, I., Van Loey, A., en Hendrickx, M. (2009). Towards a better understanding of the relationship between the β -carotene *in vitro* bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. *Food Research International*, Vol(42): 1323-1330.
- Lopez-Sanchez, P., Svelander, C.A., Bialek, L., Schumm, S., en Langton, M. (2010). rheology and microstructure of carrot and tomato emulsions as a result of high-pressure homogenization conditions. *Journal of food science*, Vol(76): 130-140.
- Lovric, T., Sablek, Z., en Boskovic, M. (1970). Cis-trans isomerisation of lycopene and colour stability of foam—mat dried tomato powder during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol(21): 641-647.
- Malvern. (2012). Laser Diffraction Technology.[on line]. Beschikbaar op http://www.malvern.com/ProcessEng/systems/laser_diffraction/technology/technology.htm. [Datum van opzoeking: 31 maart 2012].
- McClements, D.J., Decker, E.A., en Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol(49): 48-67.

- Mu, H. en Høy, C.E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, Vol(43): 105-133.
- Nguyen, M.L. en Schwartz, S.J. (1998). Lycopene stability during food processing. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Vol(218): 101-105.
- Nguyen, M.L. en Schwartz, S.J. (1999). Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology*, Vol(53): 38-44.
- Parada, J. en Aguilera, J.M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, Vol(72): R21-R32.
- Paterson, E., Gordon, M.H., Niwat, C., George, T.W., en Parr, L. (2006). Supplementation with fruit and vegetable soups and beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of oxidative stress or cardiovascular risk factors. *Journal of nutrition*, Vol(136): 2849-2855.
- Pérez-Conesa, D., García-Alonso, J., García-Valverde, V., Iniesta, M.D., Jacob, K., Sánchez-Siles, L.M., Ros, G., en Periago, M.J. (2009). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol(10): 179-188.
- Popper, L. en Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, Vol(44): 84-89.
- Porrini, M., Riso, P., en Testolin, G. (1998). Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *British Journal of Nutrition*, Vol(80): 353-361.
- Porter, C.J.H., Kaukonen, A.M., Taillardat-Bertschinger, A., Boyd, B.J., O'Connor, J.M., Edwards, G.A., en Charman, W.N. (2004). Use of *in vitro* lipid digestion data to explain the *in vivo* performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: Studies with halofantrine. *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol(93): 1110-1121.
- Rao, A.V., Ray, M.R., en Rao, L.G. (2006). Lycopene. *Advances in food and nutrition research*, Vol(51): 99-164.
- Rao, A.V. en Shen, H. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, Vol(22): 1125-1131.
- Ribeiro, H.S., Ax, K., en H., S. (2003). Stability of lycopene emulsions in food systems. *Journal of food science*, Vol(68): 2730-2734.
- Richelle, M., Sanchez, B., Tavazzi, I., Lambelet, P., Bortlik, K., en Williamson, G. (2010). Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *British Journal of Nutrition*, Vol(103): 1800-1807.
- Rissanen, T.H., Voutilainen, S., Nyyssonen, K., Salonen, R., Kaplan, G.A., en Salonen, J.T. (2003). Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(77): 133-138.
- Rock, C.L. en Swendseid, M.E. (1992). Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(55): 96-99.

- Schierle, J., Bretzel, W., Bühler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., en Schüep, W. (1997). Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chemistry*, Vol(59): 459-465.
- Sesso, H.D., Liu, S., Gaziano, J.M., en Buring, J.E. (2003). Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *Journal of nutrition*, Vol(133): 2336-2341.
- Sharma, S.K. en Le Maguer, M. (1996). Kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Research International*, Vol(29): 309-315.
- Shi, J. en Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Biotechnol*, Vol(20): 293-334.
- Shi, J., Le Maguer, M., en Bryan, M.(2002a). Lycopene from tomatoes. *CRC Press*, Vol(2): 135-167.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M., en Kakuda, Y. (2003). Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *Journal of Food Process Engineering*, Vol(25): 485-498.
- Shi, J., Wu, Y., Bryan, M., en Le Maguer, M. (2002b). Oxidation and isomerization of lycopene under thermal treatment and light irradiation in food processing. *Journal of Food Science and Nutrition*, Vol(7): 179-183.
- Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *Journal of nutrition*, Vol(137): 1493-1495.
- Sies, H. en Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(62): 1315-1321.
- Stahl, W. en Sies, H. (1992). Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *Journal of nutrition*, Vol(122): 2161-2166.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R.M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F.J., M., C.P., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., en Astley, S.B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol(23): 39-100.
- Stang, M., Schuchmann, H., en Schubert, H. (2001). Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in life sciences*, Vol(1): 151-157.
- Story, E.N., Kopec, R.E., Schwartz, S.J., en Harris, G.K. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual revision of food science and technology*, Vol(1): 189-210.
- Suzuki, H., Fukushima, M., Okamoto, S., Takahashi, O., Shimbo, T., Kurose, T., Yamada, Y., Inagaki, N., Seino, Y., en Fukui, T. (2005). Effects of thorough mastication on postprandial plasma glucose concentrations in nonobese Japanese subjects. *Metabolism, clinical and experimental*, Vol(54): 1593-1599.
- Svelander, C.A., Lopez-Sanchez, P., Pudney, P.D.A., Schumm, S., en Alminger, M.A.G. (2011). High pressure homogenization increases the in vitro bioaccessibility of a- and b-carotene in carrot emulsions but not of lycopene in tomato emulsions. *Journal of food science*, Vol(76): 215-225.

- Svelander, C.A., Tibäck, E.A., Ahrné, L.M., Langton, M.I.B.C., Svanberg, U.S.O., en Alminger, M.A.G. (2010). Processing of tomato: impact on in vitro bioaccessibility of lycopene and textural properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol(90): 1665-1672.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., en Handa, A.K. (1995). Effect of homogenization pressure on consistency of tomato juice. *Journal of food quality*, Vol(18): 389-396.
- Thane, C. en Reddy, S. (1997). Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition & food science*, Vol(97): 58-65.
- Tibäck, E.A., Svelander, C.A., Colle, I.J.P., Altskär, A.I., Alminger, M.A.G., en Hendrickx, M.E.G. (2009). Mechanical and thermal pretreatments of crushed tomatoes: Effects on consistency and in vitro accessibility of lycopene. *Journal of food science*, Vol(74): E386-E395.
- Truscott, T.G. (1996). β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, Vol(35): 233-235.
- Ukai, N., Kazuo, I., en Yukio, I. (1994). Photosensitized oxygenation of lycopene. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Vol(58): 1718-1719.
- Van Buggenhout, S., Alminger, M.A.G., Lemmens, L., Colle, I., Knockaert, G., Moelants, K., Van Loey, A., en Hendrickx, M. (2010). In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in food science and technology*, Vol(21): 607-618.
- Van Buggenhout, S., Sila, D.N., Duvetter, T., Van Loey, A., en Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part III—texture engineering. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Vol(8): 105-117.
- Van Dierendonck, J.H. (2007). Antioxidant overschat. Bèta Publishers b.v. Vol,(6): p. 16-17.
- van het Hof, K.H., de Boer, B.C.J., Tijburg, L.B.M., Lucius, B.R.H.M., Zijp, I., West, C.E., Hautvast, J.G.A.J., en Weststrate, J.A. (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *Journal of nutrition*, Vol(130): 1189-1196.
- Voskuil, D., Vrieling, A., Korse, C.M., Beijnen, J.H., en Bonfrer, J.M.C. (2008). Effects of lycopene on the insulin-like growth factor (IGF) system in premenopausal breast cancer survivors and women at high familial breast cancer risk. *Nutrition and cancer*, Vol(60): 342-353.
- Vrieling, A., voskuil, D., Bonfrer, J.M.C., Korse, C.M., en van Doorn, J. (2007). Lycopene supplementation elevates circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 and-2 concentrations in persons at greater risk of colorectal cancer. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(86): 1456-1462.
- Waldron, K.W. (2003). Plant cell walls and food quality. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Vol(2): 128.
- Wang, S., DeGroff, V.L., en Clinton, S.K. (2003). Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro

- via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase. *Journal of nutrition*, Vol(133): 2367-2376.
- Weedon, B.C.L. en Moss, G.P. (1994). Chapter 3: structure and nomenclature. In: *Carotenoids: volume 1A: isolation and analysis*. G. Britton, S. Liaaen-jensen, and H. Pfander. Birkhäuser, Basel, p. 34-37.
- Weststrate, J.A. en van het Hof, K.H. (1995). Sucrose polyester and plasma carotenoid concentrations in healthy subjects. *The American journal of clinical nutrition*, Vol(62): 591-597.
- WHO. (2011). Cardiovascular diseases.[on line]. World Health Organization Media Centre. Beschikbaar op <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. [Datum van opzoeking: 5 november 2011].
- Witztum, J.L. en Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*, Vol(88): 1785-1792.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y., en Yueming, J. (2005). Stability of lycopene during food processing and storage. *J Med Food*, Vol(8): 413-22.
- Yonekura, L. en Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular nutrition and food research*, Vol(51): 107-115.
- Young, A.J. en Lowe, G.M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, Vol(385): 20-27.
- Zanoni, B., Pagliarini, E., Giovanelli, G., en Lavelli, V. (2003). Modelling the effects of thermal sterilization on the quality of tomato puree. *Journal of food engineering*, Vol(56): 203-206.
- Zechmeister, L. (1962). Number and Types of *cis* Carotenoids. Steric Hindrance. In: *Cis-trans isomeric carotenoids vitamins A and arylpolyenes*. Springer-Verlag, Wenen, p. 11-17.
- Zhang, L.X., Cooney, R.V., en Bertram, J.S. (1992). Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer research*, Vol(52): 5707-5712.