



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Tove G. Devold

Antinæringsstoffer i planteprodukter – effekt av prosess

Antinutrients in plant materials
– effects of processing

Ingrid Røstad

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble skrevet i forbindelse med en toårig masterutdannelse i Matvitenskap – retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Oppgaven ble skrevet som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture. Laboratoriearbeid i forbindelse med oppgaven ble utført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap våren 2019.

Først og fremst vil jeg takke hovedveileder Tove G. Devold for konstruktive tilbakemeldinger og god kunnskap. Jeg vil også takke biveileder Tora Asledottir som har hjulpet meg med praktisk gjennomførelse av de ulike analysene, samt vært til god hjelp for resultatbehandling. Jeg vil takke Irene Comi, Tone-Inger Eliassen og Lidia Montull som har vært hjelpsomme på laboratoriet. Jeg vil også rette en stor takk til FoodProFuture for økonomisk støtte og for at jeg har fått vært en del av forskningsprosjektet, samt til Nofima som har gitt meg prøvene som er blitt analysert.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter for god støtte, motivasjon og samhold de siste månedene.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, mai 2019

Ingrid Røstad

Sammendrag

Med en sterk økende befolkning vil det i fremtiden bli et stadig større behov for høyverdig protein. Animalsk protein i form av melk, kjøtt og egg er generelt ressurskrevende å produsere og bidrar til betydelige klimagassutslipp. Alternative proteinkilder som planteproteiner bør utnyttes i større grad for å sikre bærekraftig produksjon av tilstrekkelig med protein. Belgvekster er kjent for å ha et høyt proteininnhold, og utgjør en viktig proteinkilde for store deler av verdens befolkning. Utnyttelse av planteproteiner i konvensjonell mat er likevel relativt begrenset, og mesteparten av planteproteinene som produseres i dag benyttes til dyrefôr. På grunn av høyt innhold av proteiner, vitaminer, mineraler og kostfiber vil konsum av belgvekster bidra med positive helseeffekter og det anbefales generelt et høyere inntak av belgvekster hos nordmenn. Belgvekster har imidlertid også et betydelig innhold av ulike antinæringsstoffer som kan forårsake uønskede fysiologiske effekter ved konsum. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekt av ulike prosessering på innhold av tre utvalgte antinæringsstoffer i planteprodukter. Det ble utført analyser av fytinsyre, galaktosyl-oligosakkarider (GOS) og trypsininhibitorer i ulike fraksjoner av erter og fababønner, samt i uprosesserte planteingredienser og ekstruderte planteprodukter produsert under ulike prosesseringsbetingelser.

Resultatene viste at fytinsyre ble akkumulert i proteinfraksjonen hos erter og fababønner, og det ble avdekket sterk positiv korrelasjon mellom innhold av protein og fytinsyre. De grove stivelsesfraksjonene av erter og fababønner fikk målt lavt innhold av fytinsyre. Avskalling av erter og fababønner medførte oppkonsentrering av fytinsyre. Verken ekstrudering eller ekstruderingstemperatur ble vist å ha signifikant effekt på fytinsyreinnhold. Ertefraksjonene hadde et innhold av GOS på ca. 6% tørrstoff (DM) eller høyere, mens de tilsvarende fababønnefraksjonene fikk målt et signifikant lavere GOS-innhold. De fine, proteinrike fraksjonene av erter og fababønner hadde signifikant høyere innhold av GOS sammenlignet med de grove, stivelsesrike fraksjonene. Det ble målt relativt likt innhold av GOS i den ikke-ekstruderte prøven og de ekstruderte produktene, som varierte mellom 3,9 og 4,7% DM. Ekstruderingstemperatur ble ikke vist å ha signifikant effekt på GOS-innhold. Alle plantematerialene viste generelt høy trypsininhibering ved at det ble målt relativt lav trypsinaktivitet, selv hvor det ble benyttet lave proteinmengder av plantematerialene. Det ble observert en økning i trypsininhibering med økende proteinmengde, men økningen var relativt lav tatt i betraktning at proteinmengdene ble doblet. Det ble ikke observert en effekt av verken avskalling eller ekstrudering på trypsininhibering.

Abstract

The world's population is increasing rapidly, and in the future, there will be an even higher demand for high-quality protein. Generally, production of animal proteins like milk, meat and egg is resource-demanding and also contributes substantially to emission of greenhouse gases. To ensure sustainable production of sufficient amounts of protein, alternative sources of protein should be utilized to a greater degree. Legumes have a high content of proteins and constitute a considerable source of proteins for a large segment of the population in the world. However, the utilization of plant proteins in conventional foods is still limited, and most of the plant proteins produced is used as animal feed. Due to high contents of proteins, vitamins, minerals and dietary fibre, consumption of legumes is associated with health benefits, and Norwegians are recommended to include more legumes in their diets. On the other hand, legumes also contain substantial amounts of antinutrients which can cause adverse physiological effects by consumption. The aim of the thesis was to investigate the effect of different processing methods on the contents of three selected antinutrients in plant products. Analysis of phytic acid, galactosyl-sucrose oligosaccharides (GOS) and trypsin inhibitors were carried out in different fractions of peas and faba beans, as well as in unprocessed plant materials and extruded plant products produced under different conditions.

The results showed that phytic acid was accumulated in the protein fractions of peas and faba beans, and it was found a strong positive correlation of protein content and phytic acid. The coarse starch fractions of peas and faba beans had a low content of phytic acid. Dehulling increased the concentration of phytic acid. Neither extrusion nor extrusion temperature showed significant effect of the content of phytic acid. The fractions of peas had a content of GOS of approximately 6% dry matter (DM) or more, while the corresponding fractions of faba beans contained significant lower amounts of GOS. The fine protein fractions of peas and faba beans contained significant higher amounts of GOS compared to the coarse starch fractions. The contents of GOS in the non-extruded sample and the extruded products were shown to be comparatively similar, varying between 3,9 and 4,7% DM. Extrusion temperature did not exhibit significant effect on the contents of GOS. In general, the plant materials demonstrated high trypsin inhibitory activity, even at low protein concentrations. An increase in inhibitory activity was observed with increasing protein concentration, but the increase was relatively low considering the protein concentrations were doubled. Dehulling and extrusion did not exhibit effect of the inhibition of trypsin.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	VII
1 Innledning	1
1.1 Utnyttelse av plantebaserte proteinkilder	1
1.2 Hensikt med oppgaven	2
2 Teori	5
2.1 Næringsinnhold i belgvekster	5
2.2 Dyrking av belgvekster i Norge	6
2.3 Erter	7
2.4 Fababønner	8
2.5 Havre	9
2.6 Antinæringsstoffer i belgvekster	9
2.6.1 Fytinsyre	10
2.6.2 Oligosakkarider	11
2.6.3 Proteaseinhibitorer	13
2.6.4 Effekt av prosessering på innhold av antinæringsstoffer	14
3 Materialer og metoder	17
3.1 Produktene benyttet i oppgaven	17
3.2 Analyse av fytinsyreinnhold	19
3.3 Analyse av galaktosyl-sukrose oligosakkarider	22
3.4 Analyse av proteinløselighet	24
3.5 Analyse av trypsininhibitorer	26
3.6 Resultatbehandling og statistisk analyse	29
4 Resultater	31
4.1 Innhold av fytinsyre i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter	32
4.2 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter	38
4.3 Analyse av proteinløselighet	40
4.4 Analyse av trypsininhibitorer i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter	42
5 Diskusjon	45
5.1 Innhold av fytinsyre	45

5.1.1	Mel og fraksjoner av erter og fababønner	46
5.1.2	Ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser	48
5.2	Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider.....	51
5.2.1	Mel og fraksjoner av erter og fababønner	51
5.2.2	Ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser	54
5.3	Analyse av proteinløselighet.....	57
5.4	Analyse av trypsininhibitorer.....	59
5.5	Oppsummering.....	63
6	Til ettertanke og videre forskning.....	65
7	Litteraturliste.....	67
	Vedlegg.....	i

Vedlegg på minnebrikke

1. Analyser av fytinsyre
2. Analyser av raffinose og fritt D-galaktose
3. Analyser av proteinløselighet
4. Analyser av trypsininhibitorer

Forkortelser

ALP	Alkalisk fosfatase
ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk; analysis of variance)
BCA	Biochoninsyre
BSA	Bovint serumalbumin
$\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$	Enverdig/toverdig kobberion
DB	Avskallede fababønner (dehulled bean)
DB-CF	Avskallede fababønner, grov fraksjon (dehulled bean, coarse fraction)
DB-FF	Avskallede fababønner, fin fraksjon (dehulled bean, fine fraction)
DM	Tørrstoff (fra engelsk; dry matter)
DP	Avskallede erter (dehulled pea)
DP-CF	Avskallede erter, grov fraksjon (dehulled pea, coarse fraction)
DP-FF	Avskallede erter, fin fraksjon (dehulled pea, fine fraction)
FoodProFuture	Food Protein Future (fullt prosjektnavn; innovativ og bærekraftig utnyttelse av planteproteiner i fremtidsmat)
GOS	Galaktosyl-sukrose oligosakkarider
HB	Fababønneskall (bean hull)
HCl	Saltsyre
HM-HSNA	Ikke-ekstrudert prøve
HP	Erteskall (pea hull)
HPLC	Høypresisjonsvæskeskromatografi (fra engelsk; High Performance Liquid Chromatography)
InsP ₆	Myo-inositol heksafosforsyre (fytinsyre)
mM	Millimolar
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	Kjernemagnetisk resonans (fra engelsk; Nuclear Magnetic Resonance)

R ²	Korrelasjonskoeffisient
UV	Ultrafiolett (fra engelsk; ultraviolet)
WB	Hele fababønner (whole bean)
WB-CF	Hele fababønner, grov fraksjon (whole bean, coarse fraction)
WB-FF	Hele fababønner, fin fraksjon (whole bean, fine fraction)
WP	Hele erter (whole pea)
WP-CF	Hele erter, grov fraksjon (whole pea, coarse fraction)
WP-FF	Hele erter, fin fraksjon (whole pea, fine fraction)

1 Innledning

1.1 Utnyttelse av plantebaserte proteinkilder

Plantevekster har alltid vært en del av menneskets kosthold som en kilde til energi og næringsstoffer. Planteproteiner er en relativt billig proteinkilde sammenlignet med animalsk protein og finnes dessuten i større mengder. Utnyttelse av planteproteiner i konvensjonell mat er likevel relativt begrenset, og i dag brukes mesteparten av planteproteinene som produseres til dyrefôr for å produsere animalsk protein i form av melk, kjøtt og egg (Day, 2013). Omdanningen fra planteprotein til animalsk protein er imidlertid lite effektiv, og det er rapportert at mindre enn 15% av planteproteinene i fôret blir omdannet til animalsk protein (Aiking, 2011; Pimentel & Pimentel, 2003).

Produksjon av animalsk protein utgjør en stor belastning på miljøet. Først og fremst legges det beslag på store landarealer som følge av dyrking av planter til bruk i fôr (Day, 2013). Det er rapportert at dersom planteproteiner hadde gått direkte til menneskelig konsum istedenfor til dyrefôr for produksjon av samme mengde kjøttprotein, hadde det krevd mindre enn 10% av landarealet (de Boer & Aiking, 2011). Produksjon av animalsk protein krever også høyt forbruk av ferskvann, og det trengs ca. hundre ganger så mye vann som ved produksjon av planteproteiner (Pimentel & Pimentel, 2003).

Med en sterk økende befolkning vil det i fremtiden bli et stadig større behov for høyverdig protein. Siden animalsk protein er ressurskrevende å produsere og dessuten bidrar til betydelige klimagassutslipp vil det ikke være bærekraftig å basere proteininntaket på kun animalsk protein. Dessuten er det begrenset hvor mye animalsk protein som kan produseres grunnet begrenset tilgang på landareal og ferskvann. Alternative proteinkilder som planteproteiner bør utnyttes i større grad for å sikre bærekraftig produksjon av tilstrekkelig med protein.

De viktigste plantene til bruk i menneskemat er korn og belgvekster, inkludert oljevekster. Belgfrukter inkluderer erter, bønner og linser og er kjent for å ha et relativt høyt proteininnhold på mellom 18-32% (Boye et al., 2010). Belgfrukter har imidlertid begrenset innhold av de svovelholdige aminosyrene metionin og cystein, men av disse er det kun metionin som er essensiell og må tilføres gjennom kosten (Iqbal et al., 2006). Ved å kombinere belgfrukter med korn vil aminosyreprofilen bli mer komplett. Belgfrukter er en vanlig komponent i kostholdet til mennesker i hele verden. Det utgjør en viktig proteinkilde for store deler av verdens

befolkning, spesielt i områder hvor konsum av animalsk protein er begrenset, enten på grunn av lav tilgjengelighet eller religiøse og kulturelle skikker (Boye et al., 2010).

En fordel med dyrking av belgvekster er at de har evne til nitrogenfiksering, som vil si at de kan nyttiggjøre seg nitrogen fra luften ved hjelp av symbiose med bakterier på røttene. Atmosfærisk nitrogen (N_2) blir omgjort til ammonium (NH_4^+) ved hjelp av enzymkomplekset nitrogenase (UiO, 2018). Dette gjør at belgvekster i motsetning til andre matplanter ikke krever nitrogen gjødsling for optimal avling.

Noe av årsaken til at planteproteiner fremdeles er lite utnyttet til menneskemat skyldes at de isolert sett har lavere næringsverdi sammenlignet med animalsk protein, utfordringer i funksjonalitet som følge av høye molekylvekter og redusert vannløselighet, samt økonomiske aspekter knyttet til isolering og utvinning av proteinfraksjoner (Day, 2013). Det er gjort mye forskning og utvikling av næringsmessige og funksjonelle egenskaper hos planteproteiner. Soyaprotein er den mest brukte plantebaserte proteinkilden, men andre kornarter, belgvekster og grønnsaker blir i stadig større grad utnyttet som proteinkilder i matprodukter (Asgar et al., 2010). Det finnes mange teknologiske muligheter for produksjon av ulike produkter fra belgfrukter. For eksempel kan fraksjonering av belgfrukter benyttes til å skille enkeltkomponenter som protein, stivelse og fiber fra hverandre. Disse ingrediensene kan benyttes til å supplere andre matprodukter for å øke deres næringsverdi (Muzquiz et al., 2012).

1.2 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven er skrevet som en del av det tverrfaglige forskningsprosjektet FoodProFuture. Målet med prosjektet er å utvikle en kunnskapsplattform for optimal produksjon og utnyttelse av norske planteressurser til smakfulle, sunne og attraktive plantebaserte produkter med høyt proteininnhold. Kunnskap fra plattformen vil gi bedre forutsetning for matindustrien til å produsere plantebaserte alternativer til animalsk protein med høy kvalitet og fra bærekraftig produksjon. Prosjektet har som visjon å øke produksjon og utnyttelse av planteproteiner i matprodukter, som kan gi en ønsket endring mot et mer plantebasert kosthold som vil gi positiv innvirkning på miljøet, samt større utvalg av bærekraftig mat for forbrukere og verdiskaping i den sirkulære bioøkonomien. Prosjektet tar for seg hele verdikjeden fra dyrking av matplanter i Norge, prosessering og utvikling av plantebaserte produkter, til forbrukere, innovasjon og marked. I tillegg inngår analyse av miljø- og ressursmessig bærekraft av plantebaserte proteinkilder.

Prosjektet jobber blant annet med norskdyrkede belgvekster som erter og fababønner, samt med havre. Hensikten med denne oppgaven er å undersøke antinæringsstoffer i ulike mel og fraksjoner av erter og fababønner, samt i ekstruderte snacksprodukter laget av ertestivelse, havrefiber og erteprotein. Antinæringsstoffene som vil bli analysert omfatter fytinsyre, spesifikke oligosakkarider kalt galaktosyl-sukrose oligosakkarider (GOS) og trypsininhibitorer. Erter og fababønner er blitt fraksjonert på ulike måter, og det er ønskelig å undersøke hvilken effekt ulik fraksjonering har på innhold av antinæringsstoffer. De ekstruderte produktene har lik sammensetning bestående av ertestivelse, havrefiber og erteprotein, men er produsert med ulik dysetemperatur og fuktighetsinnhold under ekstruderingen. Det er ønskelig å undersøke om disse produksjonsvariablene har en effekt på innhold av antinæringsstoffer.

Dette er nyttig å undersøke siden antinæringsstoffer er kjent for å ha uønskede effekter i kroppen. Ved å analysere innhold i uprosesserte og prosesserte planteråstoffer kan det undersøkes om noen typer prosesseringer bidrar til å redusere innholdet av antinæringsstoffer, som vil være en fordel ved produksjon av plantebaserte matprodukter. Denne informasjonen kan videre benyttes til å utvikle optimale prosesseringsmetoder for planteråstoffer med tanke på reduksjon av antinæringsstoffer.

Antinæringsstoffene vil analyseres ved hjelp av ulike kit fra Megazyme og Abnova. Dette er relativt enkle analysemetoder sammenlignet med analysemetoder som tradisjonelt benyttes for å analysere disse komponentene. Noe av hensikten med oppgaven er å teste ut disse metodene og vurdere om de er egnet til å analysere de ulike antinæringsstoffene i mel av fababønner og erter og i de oppmalte ekstruderte produktene.

2 Teori

2.1 Næringsinnhold i belgvekster

Belgvekster er generelt en god kilde til proteiner (ca. 18-25%), karbohydrater, vitaminer og mineraler, og har et lavt innhold av fett og kalorier (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Karbohydrater utgjør en stor del av belgfrukter, og utgjør inntil 70% av frøene. Belgfrukter er gode kilder til kostfiber, både løselige og uløselige. Basert på næringsmessige og fysiologiske egenskaper klassifiseres karbohydrater som tilgjengelige og utilgjengelig, avhengig av om de fordøyes og absorberes i kroppen eller om de fraktes ufordøyd til tykktarmen hvor de metaboliseres av bakterier. Belgfrukter har generelt lav glykemisk indeks (GI), som skyldes høyere innhold av ufordøyelige karbohydrater som kostfiber, resistent stivelse og oligosakkarider. Disse har prebiotisk virkning og stimulerer vekst av bifidobakterier og laktobasiller i tykktarmen, som gir økt produksjon av korte fettsyrer, organiske syrer og gasser og bidrar med flere helsefordeler (Singh et al., 2017).

Næringsverdien til ulike proteiner bestemmes i stor grad av konsentrasjon og tilgjengelighet av essensielle aminosyrer og totalt nitrogen. De fleste animalske proteinkilder har en balansert og komplett aminosyresammensetning, som inneholder alle de essensielle aminosyrene. De fleste planteproteiner har derimot en ufullstendig aminosyresammensetning. Lysin er en essensiell aminosyre som generelt finnes i mindre mengder i planteproteiner sammenlignet med animalsk protein. I tillegg inneholder belgvekster generelt mindre mengder av svovelholdige aminosyrer (metionin og cystein) sammenlignet med animalske proteinkilder fra melk, egg og kjøtt. Ved å kombinere belgvekster med korn vil proteinkvaliteten imidlertid bli mer komplett ved at disse råvarene utfyller hverandre, slik at planteproteiner alene kan utgjøre en fullverdig proteinkilde (Day, 2013).

Belgvekster er imidlertid også forbundet med antinæringsstoffer, som er komponenter som generelt reduserer fordøyelse eller biotilgjengelighet av næringsstoffer i kroppen. Det finnes en rekke forskjellige antinæringsstoffer med ulike virkningsmekanismer. Noen antinæringsstoffer kan være giftige eller forårsake uønskede fysiologiske effekter ved konsum. Antinæringsstoffer er derimot ikke utelukkende negativt for helsen. I de senere år er det blitt vist at flere antinæringsstoffer kan ha positive effekter på helsen, og de omtales da ofte som bioaktive komponenter (Muzquiz et al., 2012). Antinæringsstoffer regnes ikke som næringsstoffer, men

kan ha metabolske effekter i menneskekroppen ved konsum (Singh et al., 2017). Antinæringsstoffer finnes blant annet i form av proteiner (proteaseinhibitorer, α -amylaser og lektiner), glykosider (α -galaktosider, vicin og convicin), tanniner, saponiner, alkaloider og fytinsyre. De ulike komponentene finnes i ulike mengder i belgfrukter og medfører ulike fysiologiske effekter. Noen antinæringsstoffer er viktige i planter som forsvarsmekanismer mot rovdyr eller miljømessige forhold, mens andre fungerer som reservelagre som akkumuleres i frø i beredskap for spiring (Muzquiz et al., 2012).

Antinæringsstoffer i matplanter kan altså utøve både positive og negative helseeffekter, og eksisterende data tyder på at balansen mellom deres fordelaktige og uønskede effekter avhenger av komponentenes kjemiske struktur, konsentrasjon, eksponeringstid og interaksjon med andre komponenter i kosten (Muzquiz et al., 2012).

2.2 Dyrking av belgvekster i Norge

Norge ligger på nordgrensen for dyrking av belgvekster, og det er hovedsakelig erter og fababønner som dyrkes til modning i Norge (Serikstad, 2013). Frø av belgvekster er viktige proteinkilder i kraftfôrproduksjon, hvor de mest brukte belgvekstene omfatter soya, lupiner, fababønner og erter. Både soya og lupiner er lite egnet for dyrking i Norge, blant annet på grunn av sen modning, samt at lupiner har svak konkurransevne mot ugress (Frøseth, 2017). Både erter og fababønner er ettårige kjernebelgvekster i erteblomstfamilien. Hos kjernebelgvekster er frukten en belg som hos villformene åpner seg når frøene er modne, mens dyrkede former er selektert for at belgen skal holde på frøene i overmoden tilstand. Frøene er store og næringsrike, og ofte det viktigste produktet ved dyrkingen (Frøseth, 2009). Erter kan dyrkes over store deler av Østlandet og i Trøndelag, hvor det bør dyrkes sorter med god stråstyrke og kort veksttid (Frøseth, 2017). Fababønner egner seg best til dyrking i de beste klimatiske områdene på Østlandet, og det dyrkes fababønner til fôr i Vestfold, Østfold og Follo (Serikstad, 2013). Fababønneslekten har tre varieteter med ulik frøstørrelse, og det er kun varieteten med de minste frøene (*Vicia faba* var. *minor*) som er aktuell for dyrking til frømodning i Norge. Norskdyrkede fababønner brukes hovedsakelig til kraftfôr (Frøseth, 2009). Både erter og fababønner egner seg godt som vekstskifte i områder hvor det dyrkes mye korn (Serikstad, 2013).

2.3 Erter

Erter (*Pisum Sativum*) er en planteslekt som tilhører erteblomstfamilien (*Fabaceae*), og dyrkes i store deler av verden. Produksjonen av erter utgjør den femte største blant belgvekster dyrket til mat etter soyabønner, peanøtter, hagebønner og kikerter. Canada er den største produsenten og eksportøren av åkererter, med en årlig produksjon på nesten tre millioner tonn i 2015 (Shen et al., 2016).

Erter har et høyt innhold av protein og karbohydrater, relativt høyt innhold av kostfiber og lavt fettinnhold (Day, 2013). I tillegg har erter et betydelig innhold av vitaminer og mineraler. Erter inneholder mellom 21-32% protein (Kotlarz et al., 2011), og proteininnholdet varierer mellom ulike arter, sorter og enkeltplanter (Day, 2013). Erter har også en relativ høy antioksidantaktivitet, og er kjent for å ha kolesterolreducerende effekt (Kotlarz et al., 2011). Erter har blitt mye brukt som en viktig kilde til proteiner og er mer brukt kommersielt til proteinfraksjoner enn andre belgvekster, noe som blant annet skyldes at erter kan dyrkes over hele verden og at belgen er lett å fjerne (Day, 2013).

Erter brukes hovedsakelig som proteinkilde da erter har en unik proteinprofil. Erteprotein er kjent for å ha god fordøyelighet (90-95%) og medfører få allergifremkallende reaksjoner og negative helseeffekter. Erter inneholder ikke glutenproteiner. Erteprotein har lavt innhold av svovelholdige aminosyrer (metionin og cystein), men er rik på lysin som er den begrensede aminosyren i de fleste planteprodukter (Kotlarz et al., 2011). Sammenlignet med korn som er mangelfull på lysin har erter et vesentlig høyere lysininnhold som utgjør ca. 7% av proteininnholdet (Shen et al., 2016). Kjemisk innhold i erter varierer med sort og miljømessige faktorer som blant annet dyrkingssted, jordsmonn, nedbør, relativ fuktighet, lyseksponering og temperatur. I tillegg vil ulike prosesseringsmetoder som blant annet avskalling, varmebehandling, bløtlegging, spiring og ekstrudering kunne påvirke det kjemiske innholdet i erter (Kotlarz et al., 2011).

Proteinfraksjonen er en av de mest verdifulle ingrediensene fra erter, som kan bli konsentrert og rensset til proteinkonsentrat og proteinisolat. Fram til nå har proteinisolat hovedsakelig blitt brukt som en funksjonell ingrediens deriblant som emulgator, fortykningsmiddel og skumdanner (Sandberg, 2011). Tre ulike erteproteiningredienser som produseres kommersielt er ertemel, erteproteinkonsentrat og erteproteinisolat. Ertemel produseres ved tørrformaling av avskallede erter. Erteproteinkonsentrat produseres ved tørrfraksjonering, mens erteproteinisolat produseres ved våtfraksjonering enten ved bruk av syre- eller baseoppløsning etterfulgt av

isoelektrisk utfelling, eller gjennom ultrafiltreringsprosess som gir en proteinfraksjon med et høyere proteininnhold på 85-95% (Day, 2013). Erter og erterproteinkonsentrat kan brukes som erstatning for soyaprodukter i fôr til slaktegris og fjærfe (Kotlarz et al., 2011).

2.4 Fababønner

Fababønner (*Vicia faba*) er en ettåring art som tilhører erteblomstfamilien. Som menneskemat benyttes hovedsakelig frøkornet, mens belgen brukes til fôr. Fababønner kan konsumeres både rå og i prosesserte former (Multari et al., 2015). I 2011 utgjorde dyrkingsarealet av fababønner 1,2% av det totale dyrkingsarealet for belgvekster i verden, og verdensproduksjonen av fababønner er på sjuendeplass blant belgvekster. Landene med størst produksjon av fababønner (2011) er Kina etterfulgt av Etiopia, Storbritannia, Australia og Frankrike, som til sammen hadde 72% av verdensproduksjonen av fababønner i 2011 (Duc, 2015).

Fababønner kan dyrkes i et bredt geografisk område; både i regioner med kort vekstsesong og i høyereliggende områder. Fababønner trenger kjølige temperaturer for best utvikling, derfor plantes den vanligvis om våren i den nordlige halvkule og om vinteren i varmere områder. Fababønner har evne til å fikse mer nitrogen enn andre belgvekstarter under samme jordsmonnforhold, og er en vanlig avling å bruke under vekstskifte i korndominerte områder. Nitrogenfiksering skjer gjennom symbiose med *Rhizobium* bakterier, og vil redusere behovet for nitrogengjødsel i jordbruket (Multari et al., 2015).

Fababønnefrø består hovedsakelig av protein, stivelse og fiber (Duc et al., 1999). Fababønner har et høyt proteininnhold, som varierer mellom 17,6 - 34,5% av frøets tørrvekt (Duc, 2015) og ligger vanligvis på i underkant av 30% (Frøseth, 2009). Protein fra fababønner har lavt innhold av svovelholdige aminosyrer og tryptofan, men inneholder i likhet med erter relativt mye lysin (Frøseth, 2009). Fababønner har et stivelsesinnhold som utgjør 33,2 - 53,4% av frøets tørrvekt (Duc, 2015).

2.5 Havre

Havre (*Avena sativa*) tilhører gressfamilien (*Gramineae*). Havre er den sjuende mest produserte kornarten i verden, men regnes likevel som en mindre kornart da den utgjør mindre enn 1% av verdens kornproduksjonen (Mäkinen, 2016). Havre egner seg godt til dyrking i nordlige områder, da den vokser optimalt ved moderate temperaturer med lang daglengde. Havre er en robust plante som tåler fuktige forhold og sur jord godt. De største produsentene av havre er Russland, Canada, Polen og de nordiske landene (Mäkinen, 2016). Europa dyrker mer enn 60% av verdens havreproduksjon, og havre er den femte mest dyrkede kornavlingen i Europa etter hvete, bygg, mais og rughvete (Marshall, 2013). I Norge er havre den tredje viktigste kornarten etter hvete og bygg (Callisen, 2005).

Havre skiller seg fra andre kornarter med et høyere innhold av protein (15-20%), umettede fettsyrer, løselige fiber, hovedsakelig i form av β -glukan, og antioksidanter (Mäkinen, 2016). Det er godt dokumentert at β -glukan virker reduserende på kolesterolet, og har positiv effekt på hjerte- og karsykdommer. Havre har en mer gunstig aminosyresammensetning sammenlignet med andre kornarter på grunn av et høyere innhold av lysin (Callisen, 2005). Havre inneholder heller ikke glutenproteiner. Havre inneholder relativt mye antioksidanter, deriblant tokoferoler og tokotrienoler, som er vitamin E-forbindelser, i tillegg til fenoler. Antioksidanter beskytter fett mot harskning, og virker positivt på smak, lukt, farge og tekstur. Inntak av antioksidanter er gunstig da de kan nøytralisere frie radikaler i kroppen (Callisen, 2005).

Havre blir i stor grad benyttet som dyrefôr, og benyttes i mindre grad til menneskemat (Marshall, 2013). De siste årene har imidlertid bruk av havre til mat økt som følge av økt bevissthet rundt havrens positive helseeffekter. Havre brukes tradisjonelt i form av mel eller gryn. I nyere tid er det blitt utviklet teknologier for fraksjonering av ingredienser fra havre, deriblant av β -glukan og protein (Mäkinen, 2016). Både fiberrike og proteinrike fraksjoner fra havre kan dermed benyttes til å berike matprodukter med næringsstoffer.

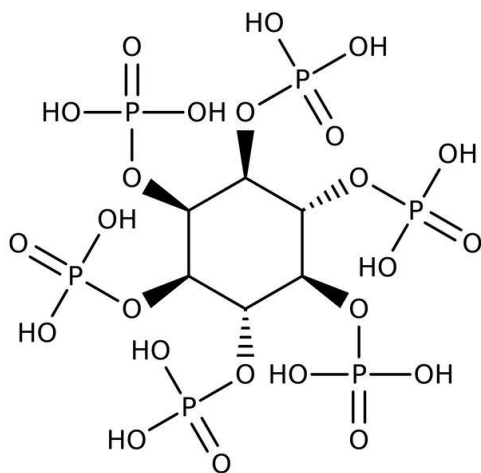
2.6 Antinæringsstoffer i belgvekster

Erter, fababønner og havre inneholder i likhet med andre belgvekster og kornarter en rekke ulike antinæringsstoffer som bidrar til å redusere deres næringsverdi. Antinæringsstoffer som finnes i erter og fababønner inkluderer fytinsyre, oligosakkarider, proteaseinhibitorer, lektiner, saponiner og alkaloider (Multari et al., 2015; Sandberg, 2011). De to hovedantinæringsstoffene som finnes i fababønner er tanniner og de to pyrimidin glukosidene vicin og convicin (Duc et

al., 1999), men disse vil ikke bli omtalt videre. I dette avsnittet vil fytinsyre, oligosakkarider og proteaseinhibitorer beskrives nærmere, da det er disse antinæringsstoffene som vil analyseres i denne oppgaven.

2.6.1 Fytinsyre

Fytinsyre er en myo-inositol heksafosforsyre (InsP₆) hvor hver av de seks hydroksylgruppene er bundet til fosfat (Multari et al., 2015). Strukturen til fytinsyre er fremstilt i figur 1. Saltene av fytinsyre kalles fytat. Fytinsyre finnes naturlig i korn, frø, oljefrø og nøtter (Nikmaram et al., 2017). Fytinsyre er hovedformen for lagring av fosfor i plantefrø og utgjør 60-90% av det totale fosforinnholdet i planter. Fytinsyre dannes under frømodningen, og i frø av belgvekster er fytat lokalisert i proteinlagre i endospermen (Multari et al., 2015). I de enfrøbladete plantene innenfor ris og hvete finnes fytat i aleuron- og klilaget, og kan enkelt fjernes under oppmalingsprosessen ved å fjerne det ytre laget (inkludert kli og frøskall) fra frøene. Avhengig av oppmalingsgrad og fordeling av fytat i frøet vil det oppnås melprodukter med ulikt innhold av fytat (Nikmaram et al., 2017).



Figur 1. Kjemisk struktur av fytinsyre. Hentet 18.04.19 fra Fisher Scientific: <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/inositol-hexaphosphoric-acid-40-50-wt-aqueous-solution-acros-organics-3/p-148591>.

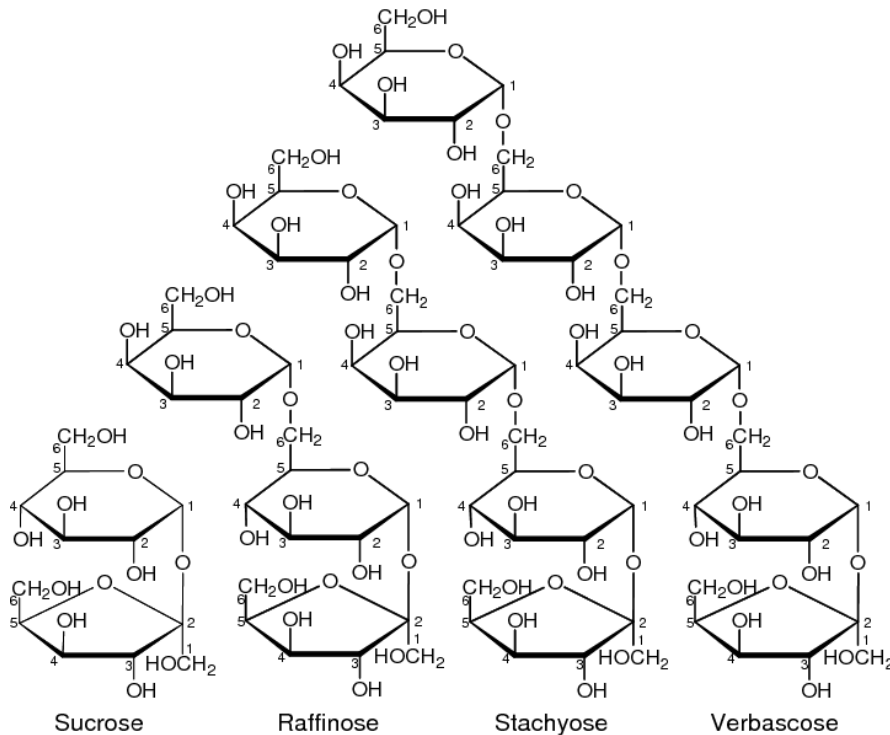
Fosfor i form av fytinsyre er utilgjengelig for absorpsjon av enmagede dyr som følge av mangel på endogene fytaser som er spesifikke for defosforisering av fytinsyre (McKie & McCleary, 2016). Fytinsyre regnes ofte som et antinæringsstoff på grunn av sin evne til å binde mineraler, proteiner og stivelse og danne uløselige komplekser, som følgelig vil redusere biotilgjengeligheten av næringsstoffer. Interaksjon mellom fytinsyre og protein gir dannelse av

uløselige komplekser som er lite utsatt for enzymatisk nedbrytning under fordøyelse og medfører lavere biotilgjengelighet av protein. Belgvekster utgjør en god kilde til flere mineraler og proteiner, men de chelatdannende egenskapene til fytinsyre reduserer deres biotilgjengelighet. Fytinsyreinnholdet i fababønner varierer med sorten, men utgjør ca. 1% av frøets tørrvekt (Multari et al., 2015). Hos mennesker er fytinsyre rapportert å inhibere absorpsjon av jern, sink og kalsium. Overdrevent inntak av fytinsyre i kostholdet kan medføre mangel på disse næringsstoffene som følge av lav eller utilstrekkelig absorpsjon fra mage-tarmkanalen (Multari et al., 2015).

Fytinsyre kan imidlertid også bidra med positive effekter, deriblant ved å redusere biotilgjengeligheten av giftige tungmetaller som kadmiom og bly i kostholdet. I tillegg kan fytinsyre utøve antioksidantaktivitet ved chelatering av jern og kobber (Multari et al., 2015). Fytat er rapportert å kunne forebygge diabetes, hjertesykdommer og nyrestein, som kan skyldes antioksidantaktiviteten fytinsyre utviser (Nikmaram et al., 2017). Dyrestudier har vist at fytinsyre virker beskyttende mot noen former for kreft, men mekanismene involvert er lite forstått. Det er foreslått at denne virkningen kan skyldes antioksidantaktivitet som følge av chelatering av jern og kobber (Miller, 2007).

2.6.2 Oligosakkarider

Oligosakkarider består av mellom tre og ti monosakkarider bundet sammen med glykosidbindinger (Muzquiz et al., 2012). Belgvekster er kjent for å ha det høyeste innholdet av noen typer oligosakkarider av alle avlinger. De mest vanlige oligosakkaridene i planteriket er α -galaktosider som karakteriseres av $\alpha(1\rightarrow6)$ bindinger mellom galaktoseenheter (Singh et al., 2017). I planter er raffinosefamilien av oligosakkarider den mest utbredte gruppen innen α -galaktosider. Raffinosefamilien inkluderer raffinose (trisakkarid), staktyose (tetrasakkarid), verbaskose (pentasakkarid) og ajugose (heksasakkarid). Disse omtales også som galaktosylsukrose oligosakkarider grunnet deres struktur som består av sukrose bundet til henholdsvis en, to eller tre galaktoseenheter. Figur 2 illustrerer kjemisk struktur av raffinose, staktyose og verbaskose. Raffinose finnes i alle deler av belgfruktens plante, men akkumuleres i frøet og rotsystemet under utviklingen. Det finnes betydelig innhold av raffinose-oligosakkarider i kikerter, linser, lupiner, bønner, erter og fababønner (0,4 - 16,1% i tørrstoff), men det er stor variasjon i innhold mellom ulike belgfrukter. De fleste tørkeresistente belgvekstene har et høyere raffinoseinnhold, som kan være med på å bidra til deres toleranse. Både raffinose og staktyose er vist å være delaktig i frosttoleranse hos planter (Muzquiz et al., 2012).



Figur 2. Struktur til raffinosefamilien av oligosakkarider; raffinose, stakyose og verbaskose, som er mono-, di- og tri-galaktosyl derivater av sukrose. Hentet fra Obendorf, R. L. a. K., Suzanne M. (2011). *Soluble Carbohydrates in Soybean. I: Ng, T.-B. (red.) Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, s. 201-228. Rijeka, Croatia: InTech.*

α -galaktosider er kjent som antinæringmessige faktorer ved at de forårsaker tarmgass ved konsum. Det oppstår tarmgass som følge av at pattedyr mangler α -galaktosidase i tarmslimhinnene, som er et nødvendig enzym for å kunne hydrolysere disse komponentene. α -galaktosider går derfor ufordøyd videre til tykktarmen hvor bakterier fermenterer disse komponentene og produserer hydrogen, karbondioksid og noe metangass. I tillegg til tarmgass kan det oppstå diare og magesmerter ved høyere inntak av α -galaktosider. Manglende fordøyelse av α -galaktosider kan påvirke veksten negativt hos enmagede husdyr som har disse oligosakkaridene i fôret. Fordøyelse av α -galaktosider kan imidlertid forbedres ved å supplere dietter med eksogent α -galaktosidase (Muzquiz et al., 2012).

Til tross for at α -galaktosider ikke fordøyes bidrar de likevel med positive egenskaper hos mennesker og enmagede dyr. α -galaktosider virker som kostfiber og kan i tillegg utvise samme effekt som prebiotika. Den prebiotiske effekten skyldes at fermentering av α -galaktosider av gassproduserende bakterier øker antallet bifidobakterier i tarmen. Bifidobakterier er kjent for å bidra positivt til menneskehelsen ved å forhindre forråtnelse i tarmen, redusere forstoppelse og diare, stimulere immunsystemet og øke resistensen mot infeksjoner (Muzquiz et al., 2012).

Mulige metoder for å redusere innholdet av oligosakkarider inkluderer ultrafiltrering, tilsetning av α -galaktosidase enzymer eller fermentering med mikroorganismer som produserer α -galaktosidase (Sandberg, 2011).

2.6.3 Proteaseinhibitorer

Enzyminhibitorer forsinket eller inhiberer den katalytiske virkningen til enzymer (Nikmaram et al., 2017). Proteaseinhibitorer i belgfrukter kan ha stor innvirkning på frøets næringsverdi, da de inhiberer funksjonen til fordøyelsesenzymer, deriblant trypsin og chymotrypsin, ved kompetitiv binding på disse enzymene. Trypsin- og chymotrypsininhibitorer er noen av de vanligste enzyminhibitorer tilstede i belgfrukter. Trypsin er en endopeptidase som hydrolyserer store polypeptider til kortere kjeder. Videre nedbrytning av protein skjer ved hjelp av eksopeptidaser (Page & Di Cera, 2008). Trypsin har blitt identifisert i alle dyr, inkludert pattedyr, insekter og fisk. Trypsin fra ulike kilder kan ha noe ulik aktivitet, men det vanlige substratet for trypsin er peptider som inneholder lysin og arginin. Spesifisiteten til trypsin gjør at det innehar funksjoner knyttet til både fordøyelse og regulering. Som fordøyelsesenzym virker det ved å degradere store polypeptider til mindre fragmenter. Som en regulatorisk protease virker det ved å aktivere andre proteiner gjennom proteolyse ved spesifikke lysin- og argininbindinger (Baird, 2017).

Proteaseinhibitorer kan inndeles i to ulike familier; Kunitz familien og Bowman-Birk familien. Proteaseinhibitorer fra begge familiene er blitt funnet i belgfrukter, og begge har evne til å inhibere trypsin og chymotrypsin. Det har blitt funnet ulike isoformer av Bowman-Birk inhibitorer i soyabønner med ulike egenskaper avhengig av deres kjemiske struktur. Det har også blitt funnet at type isoformer av trypsininhibitor tilstede i belgvekster varierer både med art og sort (Muzquiz et al., 2012).

Trypsininhibitorer er lavmolekylære proteiner som finnes i en rekke matvarer, inkludert belgfrukter. Trypsininhibitorer virker på serinproteaser som er en gruppe proteolytiske enzymer og inkluderer trypsin og chymotrypsin (Savage & Morrison, 2003). Trypsininhibitorer har evne til å binde til aminosyrene lysin og arginin i trypsin og dermed redusere enzymaktiviteten til svært lave nivåer. På denne måten reduseres proteinfordøyeligheten (Shi et al., 2017). Konsum av mat som inneholder trypsininhibitor kan medføre redusert vekst og forstyrre proteinfordøyelsen, som kan gi forstørrelse av bukspyttkjertelen og metabolsk forstyrrelse av svovel- og aminosyreutnyttelsen. Når en proteaseinhibitor binder til en protease vil

proteinfordøyelsen i tynntarmen reduseres og protein vil lettere skilles ut fra kroppen. Dette forårsaker lavere biotilgjengeligheten av svovelholdige aminosyrer i belgvekster (Nikmaram et al., 2017).

Proteaseinhibitorer har de siste årene blitt knyttet til helsefremmende egenskaper, og regnes som bioaktive komponenter. Proteaseinhibitorer kan virke antikarsinogent, og det er vist at Bowman-Birk inhibitorer kan være effektive i forebygging eller undertrykking av karsinogenindusert forandring *in vitro* og utvikling av kreft i dyreforsøk (Muzquiz et al., 2012).

Kunitz typer proteaseinhibitorer er termolabile, mens Bowman-Birk type inhibitorer er stabile under normale betingelser ved varmebehandling (Damodaran, 2007). Siden det er vanlig å varmebehandle belgfrukter før konsum utgjør ikke nødvendigvis innhold av proteaseinhibitorer en helsemessig utfordring for mennesker (Muzquiz et al., 2012). I tillegg til varmebehandling kan proteaseinhibitorer inaktiveres ved våtfraksjonering og ved fremstilling av proteinisolater (Singh et al., 2017).

2.6.4 Effekt av prosessering på innhold av antinæringsstoffer

Det er mulig å selektere for innhold av antinæringsstoffer i planter, men dette kan påvirke resistensen for plantesykdommer (Sandberg, 2011). Det er derfor fordelaktig å utvikle prosesseringsmetoder som reduserer innholdet av antinæringsstoffer etter innhøsting. Innhold av antinæringsstoffer i belgvekster og korn kan påvirkes av flere vanlige forbehandlingsmetoder som varmebehandling, bløtlegging, spiring, fermentering, strålebehandling og enzymbehandling. Effekten av forskjellige prosesseringer på ulike antinæringsstoffer avhenger av egenskapene til de ulike komponentene. Noen antinæringsstoffer er for eksempel varmelabile, mens andre påvirkes i liten grad av varmebehandling. Varmebehandling vil generelt øke fordøyeligheten av planteproteiner (Boye et al., 2010). I tillegg vil ulike mekaniske behandlinger som skallfjerning og oppmaling kunne redusere innholdet av antinæringsstoffer, avhengig av hvordan antinæringsstoffene er fordelt i ulike belgfrukter. Mekaniske behandlinger vil imidlertid også kunne fjerne ønskede næringsstoffer som vitaminer og mineraler. Varmebehandling ved høy temperatur over lengre tid kan medføre uønskede endringer i proteiner, stivelse og andre varmelabile komponenter i spiselige frø. I de senere årene har nyere teknikker som høytrykksprosessering (HPP), mikrobølger og ekstrudering blitt introdusert som alternative metoder for å redusere innholdet av antinæringsstoffer. Disse prosesseringsmetodene kan gi sluttprodukter med betydelig bedre

ernæringsmessig kvalitet sammenlignet med tradisjonelle metoder. Dessuten forventes de nye prosesseringsmetodene å gi fordelaktige endringer i funksjonelle egenskaper hos belgvekster og korn (Nikmaram et al., 2017).

Ekstrudering er en fullt automatisert teknologi som gir mer effektiv energibruk under varmebehandlingen og bedre prosesskontroll. Tradisjonelle prosesseringsmetoder som tar i bruk høye temperaturer har ofte en negativ effekt på den ernæringsmessige kvaliteten. Ekstrudering er i så måte et bedre alternativ, da teknologien innebærer bruk av høy temperatur i kort tid slik at næringsstoffene bevares bedre. Råstoffet som ekstruderes utsettes for kraftig mekanisk skjærkraft som bidrar til nedbrytning av bindinger og strukturer i råstoffet, hvilket påvirker teksturen på sluttproduktet. Ekstrudering bidrar til positive effekter på råstoffet i form av stivelsegelatinisering, reduksjon av lipidoksidering, økning i løselig kostfiber og reduksjon av antinæringsstoffer (Nikmaram et al., 2017). Ekstruderingsteknologi er blitt tilpasset til å produsere en rekke matprodukter, deriblant pasta, frokostblandinger, kjeks, babymat, snacksprodukter, teksturert vegetabilsk protein, modifisert stivelse og dyrefôr.

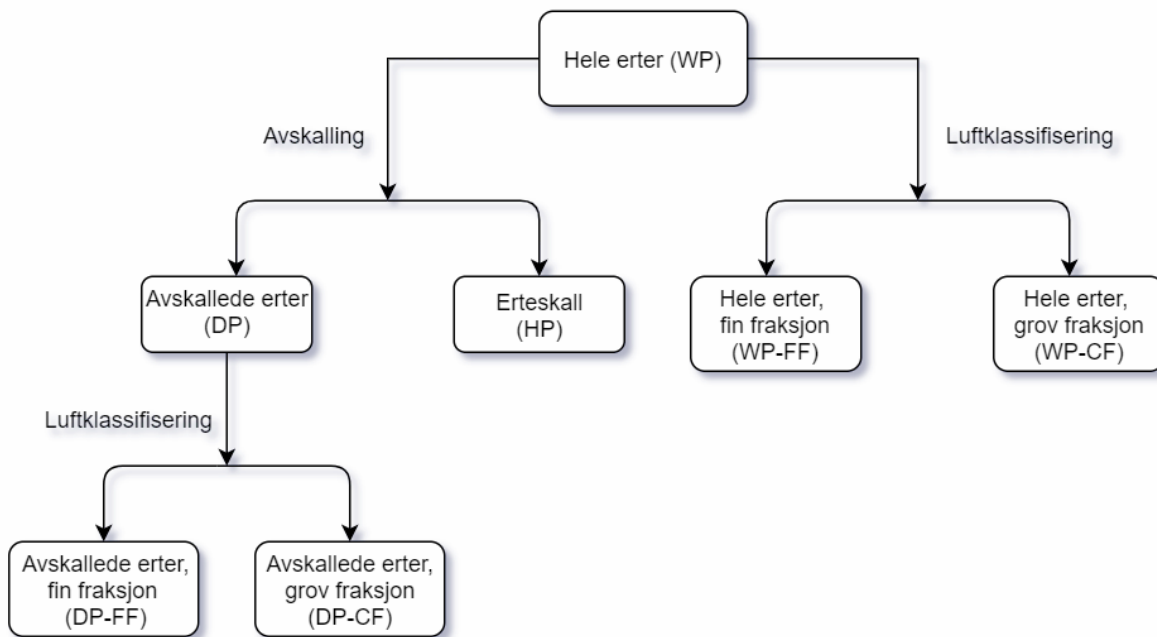
3 Materialer og metoder

3.1 Produktene benyttet i oppgaven

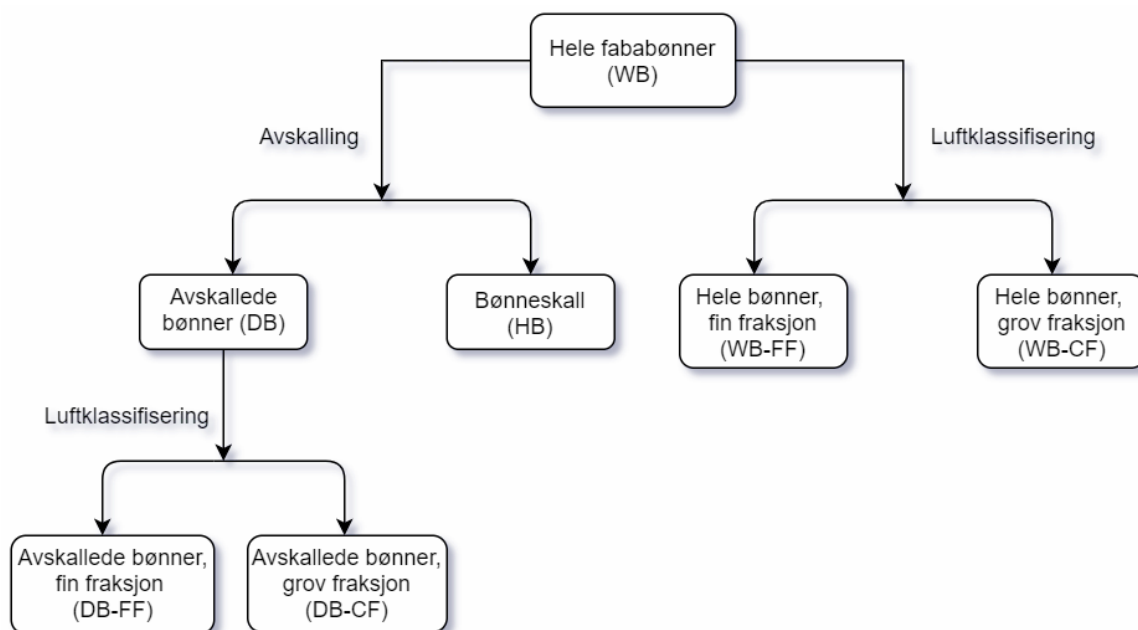
I denne oppgaven har det blitt benyttet mel og fraksjoner av erter og fababønner. Både avskallede og hele erter og fababønner ble oppmalt (pinnemølle) og luftklassifisert ved VTT Technical Research Centre i Finland. Luftklassifisering skilte protein fra stivelse og fiber, slik at det ble oppnådd en fin fraksjon med relativt høyt proteininnhold og lavt stivelsesinnhold, og en grov fraksjon med relativt høyt stivelsesinnhold og lavt proteininnhold. Luftklassifisering ble utført på både hele og avskallede erter og fababønner. Tabell 1 viser oversikt over de ulike fraksjonene av erter og fababønner som er blitt analysert, mens figur 3 og 4 viser flytskjema for produksjon av de ulike melene og fraksjonene av henholdsvis erter og fababønner.

Tabell 1. Oversikt over de ulike fraksjonene av erter og fababønner som ble analysert i oppgaven, samt forklaring på deres navn. For enkelhets skyld er fababønner benevnt som bønner.

Fraksjon	Forklaring (engelsk)	Forklaring (norsk)
WP	Whole pea	Hele erter
DP	Dehulled pea	Avskallede erter
HP	Pea hull	Erteskall
WP-FF	Whole pea, fine fraction	Hele erter, fin fraksjon
WP-CF	Whole pea, coarse fraction	Hele erter, grov fraksjon
DP-FF	Dehulled pea, fine fraction	Avskallede erter, fin fraksjon
DP-CF	Dehulled pea, coarse fraction	Avskallede erter, grov fraksjon
WB	Whole bean	Hele bønner
DB	Dehulled bean	Avskallede bønner
HB	Bean hull	Bønneskall
WB-FF	Whole bean, fine fraction	Hele bønner, fin fraksjon
WB-CF	Whole bean, coarse fraction	Hele bønner, grov fraksjon
DB-FF	Dehulled bean, fine fraction	Avskallede bønner, fin fraksjon
DB-CF	Dehulled bean, coarse fraction	Avskallede bønner, grov fraksjon



Figur 3. Flytskjema for produksjon av de ulike melene og fraksjonene av erter. Alle de sju ulike fraksjonene er blitt benyttet i oppgaven.



Figur 4. Flytskjema for produksjon av de ulike melene og fraksjonene av fababønner. For enkelhets skyld er fababønner benevnt som bønner. Alle de sju ulike fraksjonene er blitt benyttet i oppgaven.

I tillegg har det blitt benyttet 11 ekstruderte produkter laget av 50% ertestivelse, 40% havrefiber og 10% erteprotein produsert ved Nofima i Ås. Dette var en type sunnere snacksprodukt. I forkant av analysene ble produktene oppmalt til fine mel, også utført ved Nofima. Blandingen som ble ekstrudert ble også undersøkt i uprosessert form, kalt HM-HSNA, i tillegg til havrefiber

som ble benyttet som ingrediens i de ekstruderte produktene. Havrefiber er produsert av Lantmännen. Produktene ble ekstrudert under ulike dysetemperaturer og med ulikt fuktighetsinnhold i blandingen. Tabell 2 viser oversikt over hvilke prosesseringsbetingelser som ble benyttet til de ulike ekstruderte prøvene, samt fuktighetsinnhold i de uprosesserte ingrediensene.

Tabell 2. Oversikt over hvilke dysetemperaturer (°C) og fuktighetsinnhold som ble benyttet under ekstrudering av de ulike produktene, samt fuktighetsinnhold i blandingen før ekstrudering og i havrefiberingrediensen.

Prøve	Dysetemperatur (°C)	Fuktighetsinnhold (%)
HSNA-1-160	160	16,8
HSNA-2-160	160	14,0
HSNA-3-160	160	11,2
HSNA-4-170	170	16,0
HSNA-5-170	170	12,0
HSNA-6-174.5	174,5	14,0
HSNA-7-145.9	145,9	14,0
HSNA-8-150	150	16,0
HSNA-9-150	150	12,0
HSNA-10-160	160	14,0
HSNA-11-160	160	14,0
HM-HSNA	-	10,04
Havrefiber	-	9,66

3.2 Analyse av fytinsyreinnhold

Til analyse av fytinsyre i prøvene ble det benyttet Phytic acid (Total Phosphorus) Assay Kit (Megazyme, Ireland). Phytic acid (Total Phosphorus) Assay Kit er en analysemetode for å måle innhold av totalt tilgjengelig fosfor i uprosesserte næringsmidler utviklet av Megazyme. Metoden innebærer syreekstrahering av fytinsyre og lavere former for myo-inositol fosfater fra prøvematerialet. Enzymet fytase tilsettes, som vil defosforilere fytinsyre til lavere myo-inositol fosfatformer og frigi uorganisk fosfat. Deretter tilsettes alkalisk fosfatase (ALP) som bidrar til videre defosforilering av myo-inositol fosfater til myo-inositol og uorganisk fosfat. ALP sikrer frigivelse av den siste andelen fosfat fra myo-inositol monofosfat (InsP₁) som er relativt

motstandsdyktig for virkningen av fytase. Tilsetning av en fargereagens som inneholder ammoniummolybdat gir reaksjon mellom uorganisk fosfat og ammoniummolybdat, som danner 12-molybdofosforsyre. 12-molybdofosforsyre vil under sure betingelser reduseres til molybdenblått. Mengden molybdenblått dannet i denne reaksjonen er proporsjonal med mengden uorganisk fosfat tilstede i prøven, og måles som økning i absorpsjon ved 655 nm. Uorganisk fosfat kvantifiseres til fosfor ved hjelp av en kalibreringskurve som er laget ved hjelp av standarder med kjent konsentrasjon av fosfor. Fytinsyreinnhold i prøven kan videre beregnes ved å anta at mengden fosfor i prøven utelukkende er frigitt fra fytinsyre, og anta at fosfor utgjør 28,2% av fytinsyre (McKie & McCleary, 2016).

Det henvises til protokollen (Megazyme, 2017) for fullstendig beskrivelse av fremgangsmåten. Det ble tillaget to reagensløsninger som ble blandet sammen til en fargereagens. Fargereagensen besto av 10% askorbinsyre (VWR Chemicals, USA) iblandet destillert vann og 95-97% konsentrert svovelsyre, samt 5% ammoniummolybdat i destillert vann. Denne løsningen ble tillaget samme dag som den skulle anvendes ved å tilsette én del ammoniummolybdatløsning til fem deler askorbinsyreløsning.

Det ble tillaget fem standardløsninger av fosfor med konsentrasjoner på 0, 0,5, 2,5, 5,0 og 7,5 µg/mL i 15 mL Falconrør (15 ml CELLSTAR® Polypropylene Tube, Greiner Bio-One International GmbH, Germany) etter protokollens instruksjoner.

Til prøveekstraheringen ble prøvematerialet tilsatt 0,66 M HCl og rørt med magnetrører (RET basic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Germany) over natten. Prøveekstraheringen ble utført med to replikater. 1 mL av prøveekstraktet ble overført til et 2,0 mL eppendorfrør (Microtubes MCT-200-C, Axygen®, Mexico) og sentrifugert i sentrifuge (Micromax, IEC, USA) ved 13 000 rpm i 10 minutter. 0,5 mL av supernatanten ble pipettert over i et nytt eppendorfrør og tilsatt 0,5 mL 0,75 M NaOH.

Under den enzymatiske defosforyleringsreaksjonen ble det benyttet to replikater fra hver av prøveekstraheringene, slik at hver prøve ble analysert med til sammen fire replikater. Hver prøve ble analysert for innhold av både fritt og totalt fosfor. I den enzymatiske reaksjonen ble det i tillegg til reagensene som medfulgte kitet benyttet en 50% løsning av trikloreddiksyre (Merck KGaA, Germany) for å stoppe reaksjonen. Underveis i reaksjonen ble prøvene blandet sammen med vortexmikser (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) etter tilsetning av reagenser og inkubert i vannbad (LCB0726-12-0012, Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Germany) ved 40°C. Etter terminering av reaksjonen ble prøvene sentrifugert ved 13 000

rpm i 10 minutter, og supernatanten ble benyttet videre. Til kolorimetrisk bestemmelse av fosfor i prøvene ble supernatanten tilsatt fargereagens, og inkubert i vannbad ved 40°C i én time. De fem standardløsningene med fosfor ble i likhet med prøvene tilsatt fargereagens og inkubert i vannbad. Etter inkuberingen ble prøvene og standardløsningene overført til 1,5 mL kyvetter (Semi-micro cuvette, PS, 1,5 ml, Brand GMBH + Co KG, Germany) og målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved 655 nm innen tre timer.

Standardløsningene ble benyttet til å lage en standardkurve som viste sammenhengen mellom fosforkonsentrasjon og absorbans. Absorbansmålingen fra standardløsningen som ikke inneholdt fosfor ble trukket fra absorbansmålingene fra de øvrige standardløsningene, og disse korrigerte verdiene ble benevnt ΔA_{fosfor} . For hver standardløsning, med unntak av standard 0 som ikke inneholdt fosfor, ble det beregnet en M-verdi ved å dividere fosformengden i standarden med tilhørende verdi for ΔA_{fosfor} . Det ble beregnet gjennomsnittlig verdi for M på bakgrunn av standardene, og $M_{\text{gjennomsnitt}}$ ble benyttet til utregning av fosforinnhold i prøvene.

Det ble beregnet standardavvik til målingene av fritt og totalt fosfor for hver prøve. Målinger som viste avvik på mer enn to standardavvik fra gjennomsnittsverdien ble utelatt fra datasettet. Det ble beregnet ΔA_{fosfor} i prøvene ved å trekke fra absorbans av fritt fosfor fra absorbans av totalt fosfor. Konsentrasjon av fosfor i prøvene ble deretter beregnet ved hjelp formelen nedenfor.

$$\text{Konsentrasjon} = \frac{M_{\text{gjennomsnitt}} * 20 * F}{10\,000 * 1,0 * v} * \Delta A_{\text{fosfor}} \text{ [g/100g]}$$

20 = volum av prøveekstrakt (mL). F = fortynningsfaktor. 10 000 = omregning fra $\mu\text{g/g}$ til g/100g. 1,0 = vekt av utveid prøvemateriale. v = prøvevolum benyttet til spektrofotometrisk måling.

For å beregne fytinsyreinnhold basert på fosforinnhold ble det antatt at all fosfor som er detektert er frigitt fra fytinsyre, og at fosfor utgjør 28,2% av fytinsyre. Formelen presentert nedenfor ble benyttet til beregning av fytinsyreinnhold.

$$\text{Konsentrasjon av fytinsyre} = \frac{\text{fosfor [g/100g]}}{0,282} \text{ [g/100g]}$$

3.3 Analyse av galaktosyl-sukrose oligosakkarider

Til analyse av GOS-innhold i prøvene ble det benyttet Raffinose/D-galactose Assay Kit fra Megazyme (Megazyme, Ireland). Metoden egner seg for å analysere innhold av GOS (raffinose, staktyose og verbaskose) og fritt D-galaktose i oppmalt prøvemateriale fra belgfrukter. Metoden utføres ved å ekstrahere GOS fra prøvematerialet ved bruk av vann eller alkoholblanding som løsningsmiddel. Under ekstraheringen blir endogent α -galaktosidase og invertase inaktivert for å forhindre at disse enzymene bryter ned oligosakkaridene i prøven. Det ekstraherte prøvematerialet tilsettes α -galaktosidase som vil hydrolysere raffinose, staktyose og verbaskose til D-galaktose og sukrose. Tilsetning av enzymet galaktose mutarotase vil katalysere mutarotasjon av D-galaktose fra α - til β -form. β -D-galaktose vil oksideres av NAD^+ til D-galakturonsyre ved tilsetning av β -galaktose dehydrogenase ved pH 8,6. NAD^+ reduseres til NADH, og mengden NADH dannet i reaksjonen vil være støkiometrisk med mengden frigitt D-galaktose. Mengden NADH måles ved økning i absorbans ved 340 nm, og brukes til å kvantifisere innhold av D-galaktose i prøven, som videre benyttes til å beregne innhold av GOS i prøvematerialet (Megazyme, 2018).

Prøveopparbeidelsen ble utført som beskrevet i protokollen under alternativ ekstraheringsmetode for oppmalte, proteinholdige frø. I forkant av ekstraheringen ble det tillaget to løsninger kalt Carrez I og Carrez II. Carrez I løsning ble laget ved å løse opp 3,60 g kalium hexacyanoferrat (VWR Chemicals, USA) i 100 mL destillert vann, mens Carrez II løsning ble tilberedt ved å løse opp 4,49 g sinksulfat monohydrat (Honeywell Fluka, Germany) i 100 mL destillert vann. Ekstraheringen ble utført ved å tilsette 6 mL etanol (96%) til 1,00 g utveid prøvemateriale i en målekolbe, som ble satt i kokende vannbad i 20 minutter. Det ble ikke benyttet replikater under prøveopparbeidelsen. Deretter ble det tilsatt 30 mL destillert vann, 3 mL Carrez I løsning, 3 mL Carrez II løsning og 6 mL 100 mM NaOH. Målekolben ble tilsatt destillert vann til et volum på 50 mL. Løsningen ble filtrert ved bruk av filterpapir (Disposable syringe filter unit, Advantec MFS, Inc., Japan), og filtratet ble benyttet som prøvemateriale i analysen.

For å gi best mulige resultat burde mengden raffinose i hver reaksjon ligge mellom 12-250 μg , noe som tilsvarer en raffinosekonsentrasjon på 0,2-1,25 g/L i prøveekstraktet. For noen av prøvene var det nødvendig å fortynne filtratet for å komme innenfor denne konsentrasjonen, og disse prøvene ble fortynnet med destillert vann.

For å analysere innhold av raffinose + fritt D-galaktose og fritt D-galaktose i prøvene ble hver prøve analysert for disse komponentene separat, hvor analysen av raffinose ble tilsatt enzymet α -galaktosidase i tillegg. Analysen ble utført i 2,5 mL UV-kyvetter (Brand GMBH + Co KG, Germany). Det ble benyttet blanke prøver for henholdsvis raffinose + fritt D-galaktose og fritt D-galaktose under analysering av prøvene. Prøvene og blanke prøver ble analysert i duplikater. Reagensene som medfulgte kitet ble tilsatt til prøvene i bestemt rekkefølge og i bestemte volum. Prøvene ble målt i spektrofotometer (UV-160A UV-visible recording spectrophotometer, Shimadzu Europa GMBH) ved 340 nm både før og etter terminert reaksjon. Etter første måling av absorbans ble den endelige reaksjonen påbegynt ved å tilsette D-galaktose dehydrogenase + galaktose mutarotase suspensjon til alle prøvene, før de ble inkubert ved 40°C i varmeblokk (Thermolyne Type 17600 Dri-Bath, Barnstead/Thermolyne, USA) i 20 minutter. Etter inkuberingen ble prøvene målt spektrofotometrisk med jevne mellomrom helt til absorbansverdiene sluttet å øke og mer eller mindre stabiliserte seg. Ved dette tidspunktet var reaksjonen antatt terminert. Prøvene ble inkubert i varmeblokken ved 40°C mellom hver måling. For nærmere beskrivelse av hvordan analysen ble utført henvises det til protokollen (Megazyme, 2018).

For beregning av fritt D-galaktose og raffinose i prøvene ble det først beregnet absorbansdifferanse mellom første og andre måling av absorbans, det vil si før og etter reaksjonen. Absorbansdifferansen for de blanke prøvene ble deretter subtrahert fra absorbansdifferansen for de tilhørende prøvene. Begge disse utregningene er vist i formelen nedenfor.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{prøve}} - (A_2 - A_1)_{\text{blank}}$$

$\Delta A_{\text{raffinose + fritt D-galaktose}}$ ble beregnet fra prøven «raffinose + fritt D-galaktose», mens $\Delta A_{\text{fritt D-galaktose}}$ ble beregnet fra prøven «fritt D-galaktose».

$\Delta A_{\text{raffinose}}$ ble beregnet ved hjelp av følgende formel vist nedenfor.

$$\Delta A_{\text{raffinose}} = \Delta A_{\text{raffinose + fritt D-galaktose}} - \Delta A_{\text{fritt D-galaktose}}$$

For å beregne konsentrasjon av fritt D-galaktose og raffinose i prøvene ble følgende formel benyttet:

$$c = \frac{V * mw}{\epsilon * d * v} * \Delta A * F \quad [\text{g/L}]$$

$V = \text{sluttvolum} = 2,62 \text{ mL}$. $M_w = \text{molekylvekt til komponenten (D-galaktose/raffinose)}$ (g/mol). $\epsilon = \text{ekstinksjonskoeffisient til NADH ved } 340 \text{ nm} = 6300 \text{ (x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}$. $d = \text{lysvei} = 1 \text{ cm}$. $v = \text{prøvevolum} = 0,2 \text{ mL}$. $\Delta A = \Delta A_{\text{raffinose}}$ for raffinose og $\Delta A_{\text{fritt D-galaktose}}$ for fritt D-galaktose. $F = \text{fortynningsfaktor for prøveekstraktene}$.

For å regne om konsentrasjon av fritt D-galaktose og raffinose til innhold i g/100g ble formelen nedenfor benyttet, hvor beregnet konsentrasjon av fritt D-galaktose og raffinose ble satt inn for å beregne innhold av henholdsvis fritt D-galaktose og raffinose.

$$\text{Innhold} = \frac{c \text{ [g/L]}}{\text{vekt}_{\text{prøve}} \text{ [g/L]}} * 100 \quad [\text{g/100g}]$$

Selv om det regnes ut raffinoseinnhold i prøven vil dette innholdet være overestimert siden andre α -galaktosider i prøven som staktyose og verbaskose også vil hydrolyseres og friggi D-galaktose. Siden belgvekster ofte har et betydelig innhold også av staktyose og verbaskose vil derfor raffinoseinnholdet overestimeres ved denne metoden. I denne oppgaven er raffinoseinnholdet derfor valgt å betegnes som innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider. Raffinoseinnholdet er utregnet på bakgrunn av molekylvekten til raffinose (504,5 g/mol), men staktyose og verbaskose har en del høyere molekylvekter enn raffinose på henholdsvis 666,6 og 828,7 g/mol. Selv om det ikke blir helt sammenlignbart å benytte molekylvekten til raffinose for å beregne innhold av GOS er det nok en tilnærming som kan gi et omtrentlig estimat av faktisk GOS-innhold i prøvene.

3.4 Analyse av proteinløselighet

I forkant av analyser av trypsininhibitorer ble det målt proteinløselighet i prøvene ved hjelp av Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Micro BCA Protein Assay Kit er en metode for kolorimetrisk detektering og kvantifisering av totalt protein. Metoden bruker bionchoninsyre (BCA) til å detektere Cu^+ som dannes når Cu^{2+} reduseres av protein under basiske betingelser. To molekyler av BCA vil danne et lillafarget kompleks med enverdig kobberion. Komplekset gir høy absorpsjon ved 562 nm som øker lineært med økende proteinkonsentrasjon. Ved hjelp av en standardkurve basert på kjente proteinkonsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA) kan det beregnes proteinkonsentrasjon i proteinholdige prøver (*Micro BCA Protein Assay Kit*).

Hensikten med å måle proteinløselighet i prøvene var å beregne den faktiske proteinkonsentrasjonen i ekstraheringer av prøvene. Det var nødvendig å vite proteinkonsentrasjon i ekstraheringene av de ulike prøvene til analyse av trypsininhibitorer, hvor en bestemt mengde protein skulle benyttes i hver reaksjon. For fullstendig beskrive av fremgangsmetoden henvises det til Thermo Fisher Scientific.

Til prøveopparbeidelse ble det tillaget buffer bestående av 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol) (VWR Chemicals) og 750 mM NaCl (Merck KGaA). Bufferen ble tilsatt konsentrert HCl til det ble oppnådd en pH på 8,76.

Det ble beregnet mengde prøvemateriale som ville gi en proteinkonsentrasjon på 10 mg/mL i 3 mL buffer. Beregningen var basert på tidligere analyser av proteininnhold i prøvene. Hver prøve ble veid ut i 5 mL eppendorfrør (Eppendorf AG, Germany) i duplikater, og tilsatt 3 mL av ovennevnte buffer. Rørene ble sentrifugert i sentrifuge (Beckman J2-MC Centrifuge, USA) ved 10 000 rpm i 10 minutter. Deretter ble 2 mL av supernatanten overført til et nytt eppendorfrør og sentrifugert på nytt under samme betingelser. 1,5 mL av supernatanten ble så overført til et nytt eppendorfrør og fortynnet 500x med destillert vann. Dette ville gi en proteinkonsentrasjon på $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ i prøvene. De fortynnede prøvene ble benyttet som prøvemateriale under analysen.

Det ble tillaget ni standardløsninger med ulik proteinkonsentrasjon (0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 40 og 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) av BSA. Micro BCA Working Reagent ble tillaget ved å blande sammen Micro BCA Reagent MA, Micro BCA Reagent MB og Micro BCA Reagent MC i forholdet 25:24:1 samme dag som løsningen ble benyttet.

Analysen ble utført i mikroplater (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, Nunc, Denmark), hvor det ble benyttet 6 replikater per prøve. De fortynnede prøvene ble pipettert i sine respektive brønner og tilsatt working reagent. Tilsvarende ble gjort for standardløsningene, hvor det ble benyttet tre replikater per standardløsning. Mikroplaten ble inkubert ved 37°C i to timer i inkuberingskap (Termaks, Norway), og deretter avkjølt til romtemperatur. Mikroplaten ble målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved 562 nm.

Til resultatbehandling ble det laget en standardkurve ved hjelp av standardløsningene som viste sammenhengen mellom absorbans og BSA-konsentrasjon. Standardkurven ble videre benyttet til å beregne proteinkonsentrasjon og -løselighet i prøvene.

3.5 Analyse av trypsininhibitorer

Prøvene ble analysert for trypsininhibitorer ved hjelp av Protease Activity Assay Kit (Abnova, Taiwan). Metoden kan benyttes til å undersøke proteaseaktivitet i prøvematerialer. Metoden benytter et rødt fluorescerende kaseinkonjugat som fungerer som substrat for et bredt spekter av proteaser, deriblant trypsin og chymotrypsin. Når substratet er intakt vil kaseinet være sterkt merket med et fluorogen som vil redusere fluorescensintensiteten betydelig på grunn av quenching. Proteasekatalysert hydrolyse av substratet vil frigi den fluorescensreduserende effekten ved at det dannes sterkt fluorescerende, korte peptider. Økningen i fluorescensintensitet er direkte proporsjonal med proteaseaktiviteten, og signalet kan leses av ved $Ex/Em = 540/590$ nm (Abnova). Tilstedeværelse av trypsininhibitorer vil gi redusert proteaseaktivitet og følgelig redusere fluorescensintensiteten.

Til prøveopparbeidelse ble det utveid en mengde prøvemateriale som ville gi en proteinkonsentrasjon på $2 \mu\text{g/mL}$ i 3 mL buffer. Det ble benyttet samme buffer som ble brukt under analysering av proteinløselighet. Etter tilsetning av buffer ble prøvene ristet på risteapparat (Biosan OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia) i én time ved romtemperatur. Prøvene ble videre opparbeidet som beskrevet under analyse av proteinløselighet, bortsett fra at den siste supernatanten ikke ble fortynnet, men ble benyttet direkte som prøvemateriale under analysen. Hver prøve ble ekstrahert i duplikat.

Det ble benyttet tre proteinmengder av hver prøve under analysen, henholdsvis 40, 80 og 160 μg protein per reaksjon. De ekstruderte prøvene og havrefiber fikk imidlertid beregnet en lav proteinløselighet, slik at det kun ble benyttet to proteinmengder under analysen. Tabell 3 viser oversikt over hvilke proteinmengder av de ulike prøvene som ble benyttet under analysen.

Tabell 3. Oversikt over hvilke proteinmengder av de ulike prøvene som ble benyttet under analyse av trypsininhibitorer.

Proteinmengder (μg)	Prøver
40, 80 og 160	WP, DP, HP, WP-FF, WP-CF, DP-FF, DP-CF, WB, DB, HB, WB-FF, WB-CF, DB-FF, DB-CF, HM-HSNA.
40 og 80	HSNA-1-160, HSNA-2-160, HSNA-3-160, HSNA-9-150, HSNA-10-160, HSNA-11-160, havrefiber.
20 og 40	HSNA-4-170, HSNA-5-170, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9, HSNA-8-150.

Prøvene ble analysert ifølge protokoll B som undersøkte proteaseinhibitorer i prøvematerialet ved hjelp av rensset enzym, som står beskrevet i instruksjonene fra Abnova. Det henvises til protokoll B fra Abnova for nærmere beskrivelse av hvordan analysen ble utført.

Trypsin ble benyttet som protease under analysen, og ble fortynnet etter protokollen til en enzymkonsentrasjon på 0,1 U/ μl . I tillegg til analyse av prøvene ble det også benyttet ulike kontroller, henholdsvis proteinkontroll, positiv kontroll, negativ kontroll og substratkontroll.

Til proteinkontroll ble det benyttet BSA (Sigma Life Science) som ble oppløst i Milli-Q vann til en konsentrasjon på 3,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Proteinkontroll ble benyttet for å undersøke om tilstedeværelse av protein vil fungere som et ekstra substrat i reaksjonen og derfor påvirke måling av proteaseaktivitet, selv om det ikke er proteaseinhibitorer tilstede. Det ble benyttet 50 μl proteinløsning i hver brønn, noe som ga en proteinmengde på 160 μg per reaksjon i proteinkontrollbrønnene. Positiv kontroll var tilsatt 1x assay buffer, trypsinløsning og proteasesubstratløsning, og er forventet å gi maksimal proteaseaktivitet da det ikke er tilsatt noe som skal kunne inhibere trypsin. Det ble også benyttet negativ kontroll som var tiltenkt å gi maksimal inhibering av proteaseaktivitet, og dermed gi en slags minimumsverdi for proteaseaktivitet. Til negativ kontroll ble enzyminhibitoren Pefabloc (Pefabloc® SC 76307, Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Germany) benyttet, og det ble tilsatt ca. 300 μg Pefabloc per brønn for å sikre maksimal inhibering. Substratkontroll ble også benyttet, hvor det kun ble tilsatt 1x assay buffer i brønnene, i tillegg til proteasesubstratløsning. Substratkontroll benyttes som blank, og det forventes ingen fluorescens fra disse brønnene.

Alle brønnene, både med prøvemateriale og de ulike kontrollene, ble tilsatt 1x assay buffer, trypsinløsning og proteasesubstratløsning, bortsett fra substratkontrollene som ikke ble tilsatt trypsin. Det ble benyttet seks replikater av hver prøve med ulik proteinkonsentrasjon, og tre

replikater av de ulike kontrollene. Tabell 4 viser oversikt over hvilke reagenser som ble tilsatt de ulike brønnene.

Tabell 4. Oversikt over reagenser som ble benyttet til de ulike brønnene.

Substratkontroll	Positiv kontroll	Negativ kontroll	Proteinkontroll	Prøve
1x assay buffer Proteasesubstrat	1x assay buffer Trypsinløsning Proteasesubstrat	1x assay buffer Trypsinløsning Proteasesubstrat Pefabloc	1x assay buffer Trypsinløsning Proteasesubstrat BSA-løsning	1x assay buffer Trypsinløsning Proteasesubstrat Prøveekstrakt

Prøvene ble målt i mikroplater (96-well microplates for fluorescence-based assays, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved Ex/Em 540/590 nm i én time, hvor målinger ble gjort hvert minutt. Mikroplatene ble ristet underveis i målingen.

Rådata fra analysen bestod i 60 absorbansmålinger målt over én time for hver prøve og kontroll. På bakgrunn av målingene ble det laget grafer for hver av prøvene og kontrollene som viste endring i absorbansmåling over tid. Ikke-lineære deler av grafene ble utelatt. Målinger gjort fra og med minutt 12 til og med minutt 50 ble benyttet til de endelige grafene. Dette tidsintervallet ble benyttet for alle prøvene for å sikre mest mulig nøyaktige og sammenlignbare resultater. For hver graf og derav prøve/kontroll ble det laget en lineær regresjonsligning. Stigningstallet til regresjonsligningen for hver enkelt prøve under hver proteinkonsentrasjon ble benyttet videre til å beregne trypsininhibering i de ulike prøvene.

Under hver kjøring av analysen ble det i tillegg til prøvene benyttet substratkontroll og positiv kontroll. Substratkontroll ble benyttet som blank siden det ikke forventes noe fluorescens fra disse brønnene, og beregnet stigningstall til substratkontroll ble trukket fra de beregnede stigningstallene til de tilhørende prøvene og positiv kontroll. Positiv kontroll forventes å gi maksimal proteaseaktivitet, da den ikke tilsettes noe som skal kunne inhibere trypsin. Stigningstallet til positiv kontroll fra hver kjøring ble derfor definert som 100% trypsinaktivitet, og den relative trypsinaktiviteten til prøvene med ble deretter beregnet på bakgrunn av denne verdien, se formel nedenfor.

$$\text{Relativ trypsinaktivitet (\%)} = \frac{\text{Stigningstall}_{\text{prøve}}}{\text{Stigningstall}_{\text{positiv kontroll}}} * 100\%$$

I dette tilfellet er det trypsininhibering som er av interesse, slik at den relative trypsinaktiviteten ble omregnet til relativ trypsininhibering ved hjelp av formelen nedenfor. I dette tilfellet ble positiv kontroll definert å utvise ingen trypsininhibering.

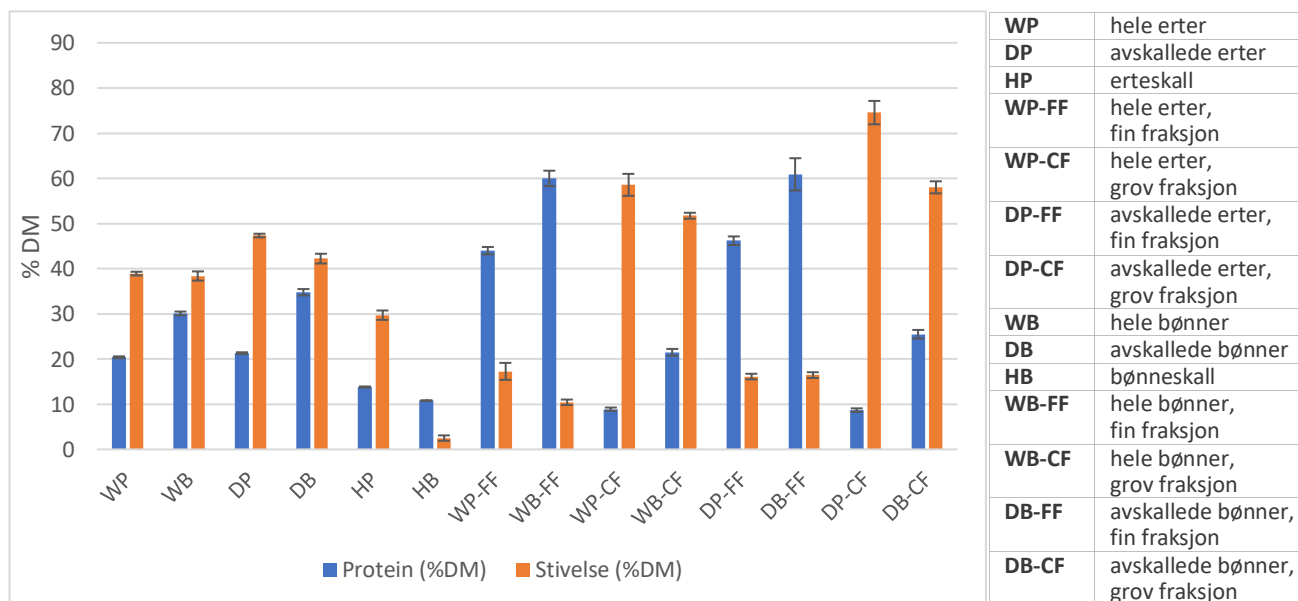
$$\text{Relativ trypsininhibering (\%)} = 100\% - \text{trypsinaktivitet (\%)}$$

3.6 Resultatbehandling og statistisk analyse

Microsoft Office Excel (2016) ble benyttet til databehandling og fremstilling av resultater i figurer. Rådata og utregninger fra analysene er vist i vedlagt minnebrikke. Statistisk analyse ble utført i R Commander, hvor det ble benyttet enveis variansanalyse (ANOVA) for å undersøke eventuell signifikans mellom prøvene forårsaket av én variabel, mens toveis ANOVA ble benyttet for å undersøke eventuelle interaksjonseffekter. Tukey test ble benyttet for å avdekke signifikans mellom prøvene for de ulike responsene. Det ble benyttet signifikansnivå på $P < 0,05$. Output fra statistiske analyser er vist i vedlegg.

4 Resultater

Fababønner og erter ble avskallet og luftklassifisert ved VTT Technical Research Centre i Finland. Analyser av protein- og stivelsesinnhold i de ulike fraksjonene ble utført på Nofima i Ås, og er presentert i figur 5. Figuren viser stor variasjon i innhold av både protein og stivelse i de ulike fraksjonene. Proteininnholdet varierer mellom 8,7 og 60,9% i tørrstoff (DM). Hele og avskallede erter og fababønner har proteininnhold mellom 20,4 og 34,8% DM, hvor det kan sees et noe høyere proteininnhold i de avskallede melene. Generelt har skallfraksjonene av erter og bønner og de grove fraksjonene av hele og avskallede erter lavest proteininnhold. De fine fraksjonene av hele og avskallede erter og fababønner har høyere proteininnhold enn de øvrige prøvene, som ligger mellom 44 og 61% DM. Generelt har fraksjonene av fababønner høyere proteininnhold enn fraksjonene av erter.



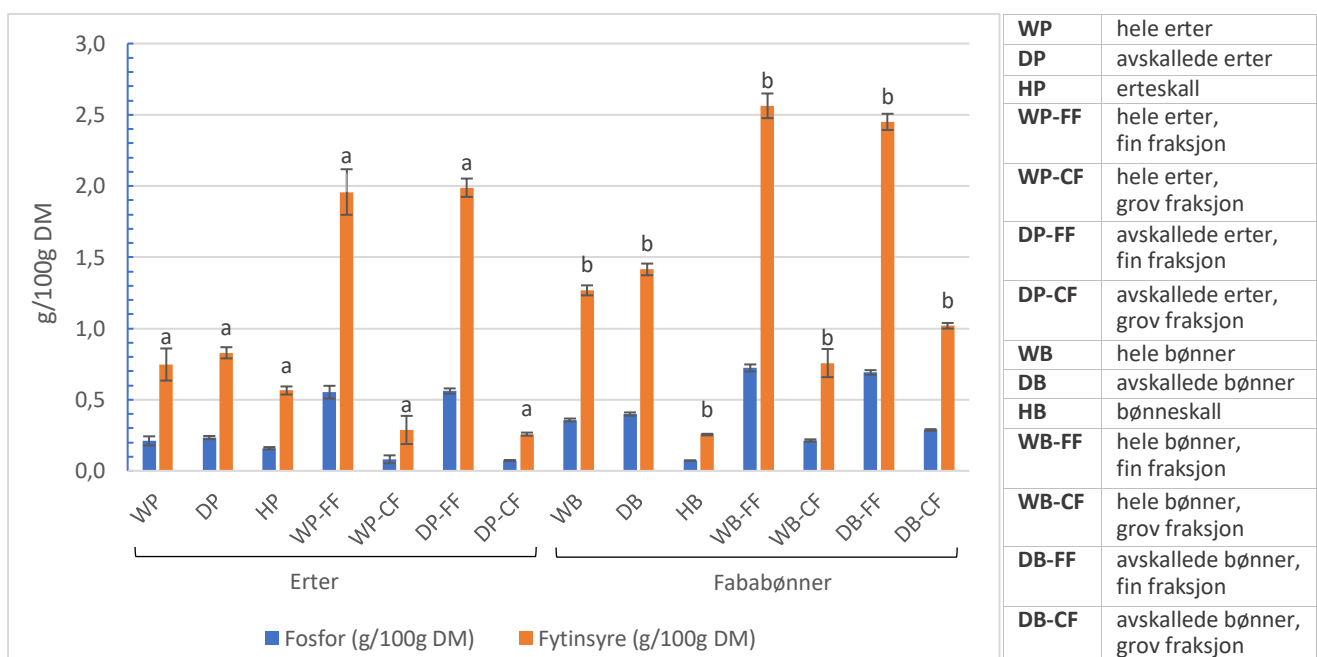
Figur 5. Innhold av protein og stivelse (%DM) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner.

Mel av hele og avskallede erter og fababønner har relativt likt stivelsesinnhold som ligger på ca. 40% DM. Erteskall har betydelig høyere stivelsesinnhold enn fababønneskall som har lavest innhold av alle melene (2,5% DM). De fine fraksjonene av hele og avskallede erter og fababønner har et stivelsesinnhold mellom 10 og 20% DM. De grove fraksjonene av hele og avskallede erter og fababønner skiller seg ut med høyest stivelsesinnhold som varierer mellom

52 og 75% DM. Generelt har fraksjonene av erter noe høyere stivelsesinnhold enn de tilsvarende fraksjonene av fababønner.

4.1 Innhold av fytinsyre i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter

De ulike fraksjonene av erter og fababønner ble analysert for innhold av både fritt og totalt fosfor ved kolorimetrisk bestemmelse. Resultatene fra de spektrofotometriske målingene ble videre benyttet til å beregne innhold av fosfor og fytinsyre i prøvene. Figur 6 viser beregnet innhold av fosfor og fytinsyre i fraksjoner av erter og fababønner, oppgitt i g/100 g DM.



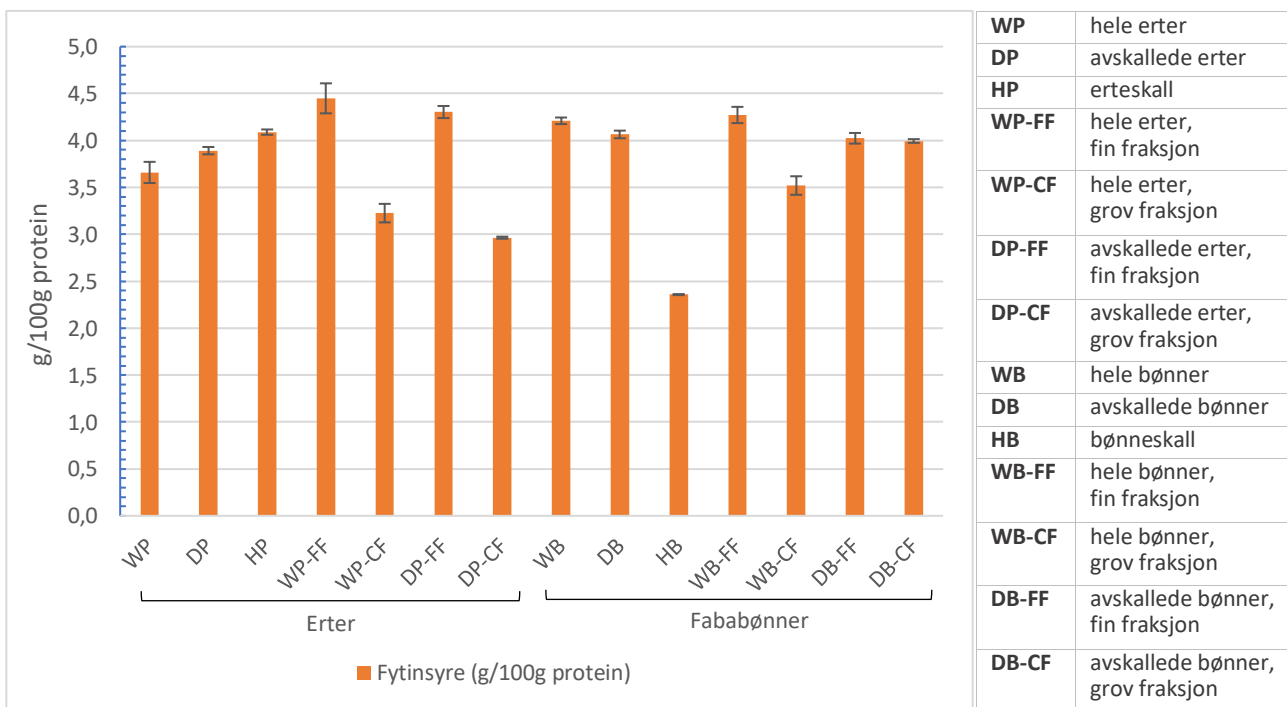
Figur 6. Innhold av fosfor og fytinsyre (g/100 g DM) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller.

Figur 6 viser at fosforinnholdet i prøvene varierer mellom 0,072 (HB) og 0,723 (WB-FF) g/100g DM, og tilsvarende varierer fytinsyreinnholdet i prøvene mellom 0,255 og 2,563 g/100 g DM. Dersom samme type fraksjoner av erter og fababønner sammenlignes kan det ses at bønnefraksjonene generelt har et høyere innhold av fosfor og fytinsyre, bortsett fra HB som har lavere innhold enn HP. Melene av avskallede erter og bønner har noe høyere innhold av fosfor og fytinsyre enn melene av hele erter og bønner. De fine fraksjonene av både hele og avskallede erter og fababønner skiller seg ut med høyere innhold av fosfor og fytinsyre enn de øvrige prøvene. De grove fraksjonene av hele og avskallede erter og bønner har derimot noe lavere

innhold av fosfor og fytinsyre enn de tilsvarende melene laget av hele og avskallede erter og bønner.

For å undersøke om det var signifikante forskjeller i fytinsyreinnhold mellom prøvene ble det utført enveis ANOVA i R Commander. Analysen viste at melene av bønner hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn melene av erter (p -verdi $< 0,05$), se vedlegg 1. Type fraksjon av erter og bønner (hel, avskallet, skall) ble også vist å ha signifikant effekt på fytinsyreinnhold (p -verdi $< 0,05$), hvor Tukey test viste at både hele og avskallede erter og bønner ble funnet å ha signifikant høyere fytinsyreinnhold enn skallfraksjoner av erter og bønner, se vedlegg 2. Det ble også undersøkt om det var effekt av luftklassifisering på fytinsyreinnhold i fine og grove fraksjoner. Enveis ANOVA viste at de fine fraksjonene hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn de grove fraksjonene (p -verdi $\ll 0,001$), se vedlegg 3.

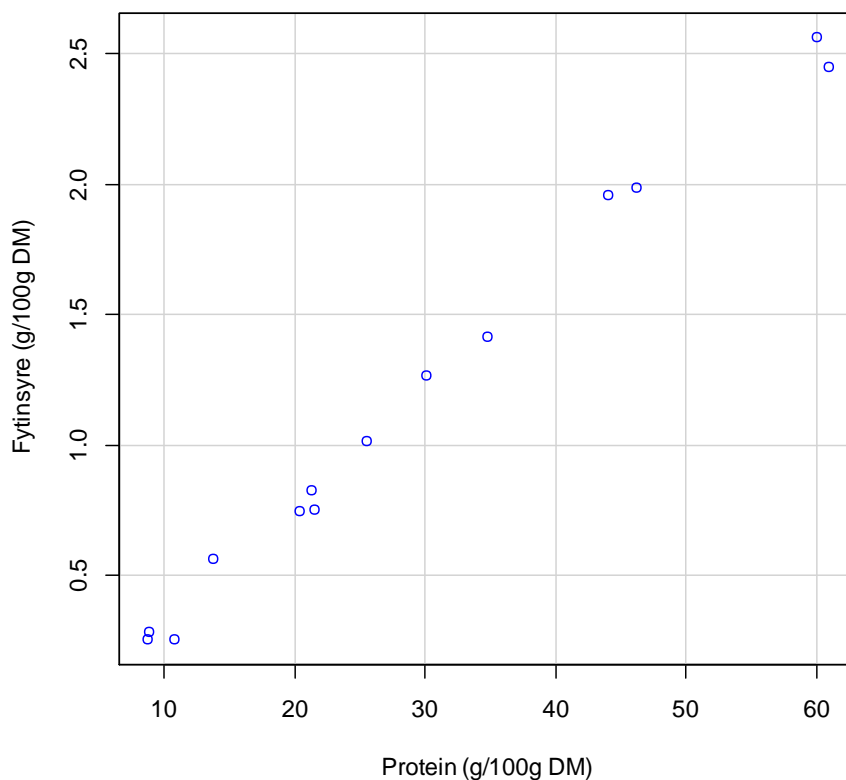
Siden de ulike fraksjonene av erter og fababønner hadde varierende proteininnhold ble det beregnet fytinsyreinnhold i g/100g protein hos disse prøvene. Dette er fremstilt i figur 7. Fosforinnhold i prøvene er utelatt da det er samme forhold mellom fosfor- og fytinsyreinnhold i alle prøvene.



Figur 7. Innhold av fytinsyre (g/100g protein) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner.

Som figur 7 viser er innholdet av fytinsyre per protein relativt likt mellom de ulike prøvene, som hovedsakelig varierer mellom 3,5 og 4,5 g/100g protein. HB har lavest fytinsyreinnhold per protein (2,4 g/100g protein). De grove fraksjonene av hele og avskallede erter har også noe lavere innhold av fytinsyre per protein enn de øvrige prøvene.

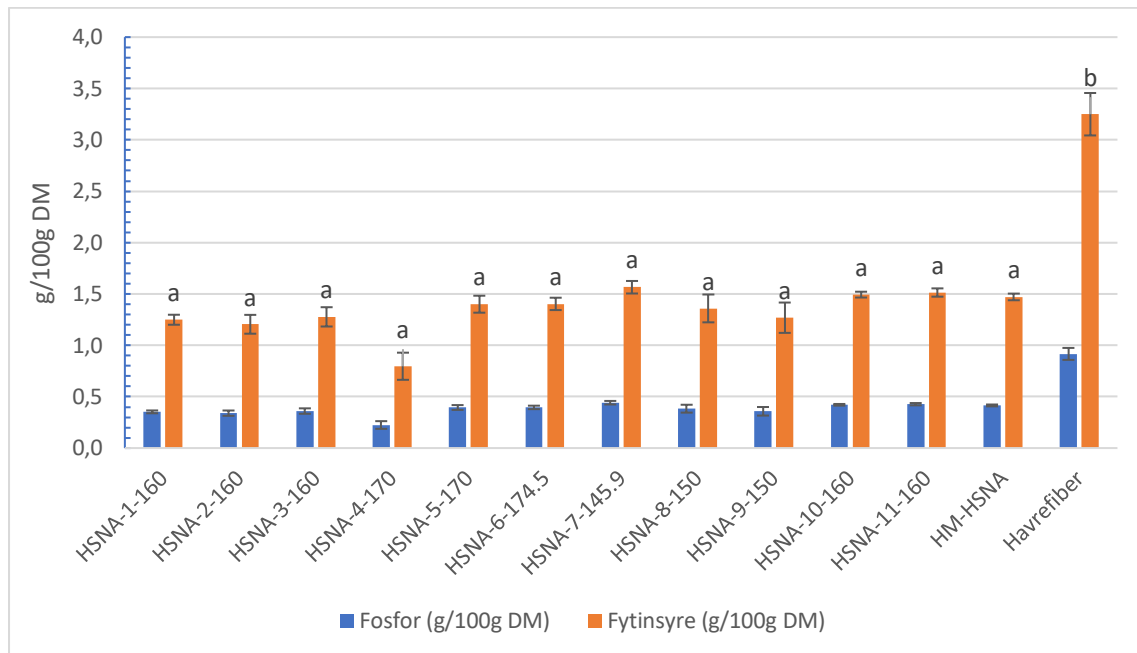
For å bedre illustrere sammenhengen mellom fytinsyreinnhold og proteininnhold i prøvene ble det laget et scatterplot i R Commander, se figur 8. Scatterplottet viser en tilnærmet lineær sammenheng mellom fytinsyre- og proteininnhold i prøvene av erter og fababønner. Det ble utført lineær regresjon i R Commander som viste at proteininnhold signifikant predikerer fytinsyreinnhold (p-verdi $\ll 0,001$), hvor korrelasjonskoeffisienten ble beregnet til å være 0,9923.



Figur 8. Sammenheng mellom innhold av fytinsyre (g/100g DM) og protein (g/100g DM) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner. $R^2 = 0,9923$.

For de ekstruderte prøvene og de uprosesserte prøvene HM-HSNA og havrefiber ble det også beregnet innhold av fosfor og fytinsyre i tørrstoff, se figur 9. De ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven (HM-HSNA) har relativt likt innhold av fosfor, som ligger på ca. 0,4 g/100g DM. HSNA-4-170 skiller seg imidlertid ut med noe lavere fosforinnhold. Fytinsyreinnholdet i de ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven ligger mellom 1,21 og 1,57 g/100g DM, bortsett fra HSNA-4-170 som har et lavere fytinsyreinnhold på ca. 0,8

g/100g DM. Havrefiber har det høyeste innholdet av fosfor og fytinsyre på henholdsvis 0,916 og 3,25 g/100g DM.



Figur 9. Innhold av fosfor og fytinsyre (g/100g DM) i ekstruderte prøver, ikke-ekstrudert prøve og havrefiber. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller.

For å undersøke om det var signifikante forskjeller i fytinsyreinnhold mellom de ekstruderte prøvene, ikke-ekstrudert prøve og havrefiber ble det utført enveis ANOVA i R Commander. Enveis ANOVA viste at havrefiber hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn de øvrige prøvene som inneholdt ertestivelse, havrefiber og erteprotein (p -verdi $\ll 0,001$), se vedlegg 4. Det ble ikke funnet signifikant effekt av ekstrudering på fytinsyreinnhold (p -verdi = 0,186). Ekstruderingsstemperatur ble vist å ha signifikant effekt på fytinsyre (p -verdi $< 0,01$), hvor påfølgende Tukey test viste at prøver ekstrudert ved 145,9°C, 160°C og 174,5°C hadde signifikant høyere fytinsyreinnhold enn HSNA-4-170 og HSNA-5-170 ekstrudert ved 170°C, se vedlegg 5. Dersom HSNA-4-170, som fikk målt et betydelig lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige prøvene, ble utelatt fra datasettet ble det ikke vist signifikant effekt av ekstruderingsstemperatur (p -verdi = 0,81). Tabell 5 viser beregnet gjennomsnittsinhold av fytinsyre hos de ekstruderte prøvene med ulik ekstruderingsstemperatur.

Tabell 5. Gjennomsnittlig innhold av fytinsyre (g/100g) med standardavvik for prøver ekstrudert under ulike temperaturer. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikans.

Ekstruderings-temperatur (°C)	Prøver	Gjennomsnittlig fytinsyreinnhold (g/100g)
145,9	HSNA-7-145.9	1,4 ± 0,06 ^a
150	HSNA-8-150, HSNA-9-150	1,16 ± 0,14 ^{ab}
160	HSNA-1-160, HSNA-2-160, HSNA-3-160 HSNA-10-160 HSNA-11-160	1,24 ± 0,13 ^a
170	HSNA-4-170, HSNA-5-170	0,97 ± 0,31 ^b
174,5	HSNA-6-174.5	1,24 ± 0,06 ^a

Fuktighetsinnhold under ekstrudering ble også vist å ha signifikant effekt på fytinsyreinnhold (p-verdi < 0,001), se vedlegg 6. Tukey test viste at det kun ble avdekket signifikant forskjell mellom prøver ekstrudert ved 14 og 16% fuktighet (p-verdi < 0,05), hvor prøver med 14% fuktighetsinnhold (HSNA-2-160, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9, HSNA-10-160 og HSNA-11-160) hadde signifikant høyere fytinsyreinnhold sammenlignet med prøver med 16% fuktighetsinnhold (HSNA-4-170 og HSNA-8-150). Dersom HSNA-4-170, som fikk målt et betydelig lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige prøvene, ble utelatt fra datasettet ble det ikke detektert signifikans mellom prøver med ulikt fuktighetsinnhold.

Ved hjelp av toveis ANOVA ble det undersøkt for interaksjonseffekt av ekstruderingsstemperatur og fuktighetsinnhold på fytinsyreinnhold, se vedlegg 7. Analysen avdekket signifikant interaksjonseffekt (p-verdi < 0,001), og tabell 6 viser gjennomsnittsinhold av fytinsyre for prøver ekstrudert under ulik temperatur og fuktighetsinnhold.

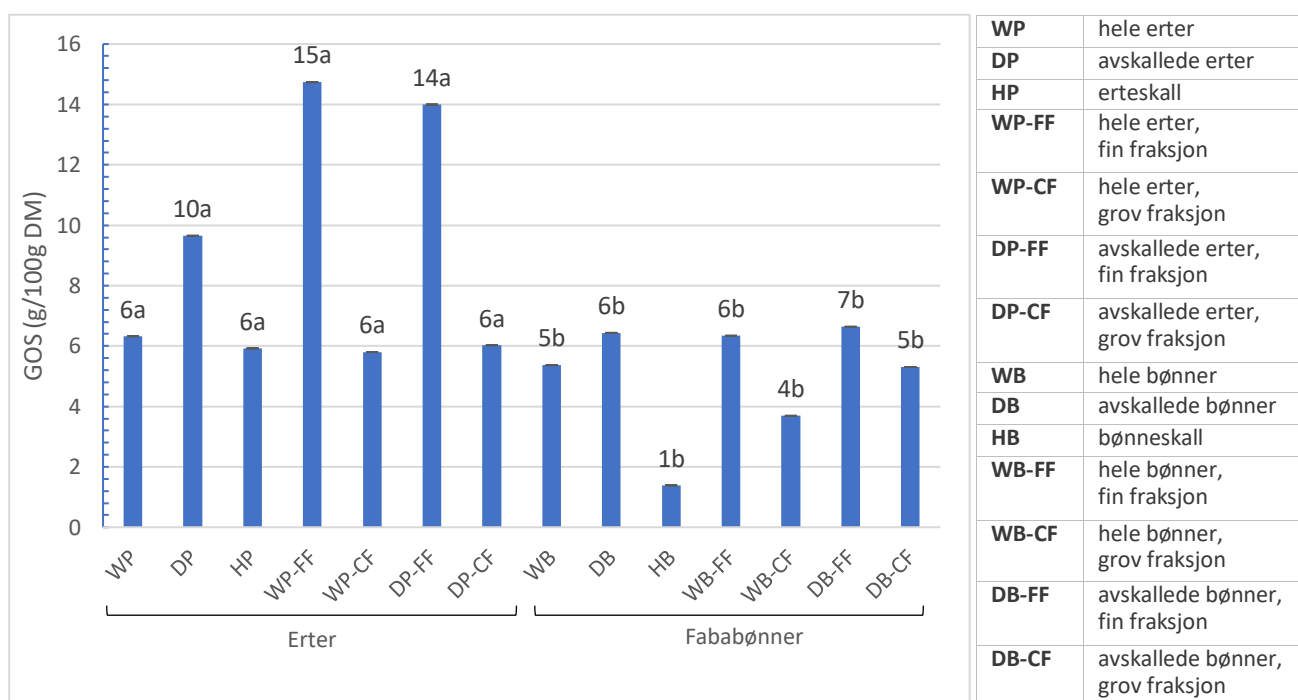
Tabell 6. Gjennomsnittlig innhold av fytinsyre (g/100g) med standardavvik for prøver ekstrudert under ulike temperaturer og fuktighetsinnhold. Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikans.

Temperatur (°C) og fuktighetsinnhold (%)	Prøver	Gjennomsnittlig fytinsyreinnhold (%)
145,9 : 14	HSNA-7-145.9	1,38 ± 0.06 ^a
160 : 14	HSNA-2-160 HSNA-10-160 HSNA-11-160	1,28 ± 0,12 ^{ab}
170 : 12	HSNA-5-170	1,25 ± 0.08 ^{ab}
174,5 : 14	HSNA-6-174.5	1,24 ± 0.06 ^{ab}
150 : 16	HSNA-8-150	1,20 ± 0.14 ^{ab}
160 : 11,2	HSNA-3-160	1,15 ± 0.09 ^{ab}
150 : 12	HSNA-9-150	1,14 ± 0.15 ^{ab}
160 : 16,8	HSNA-1-160	1,10 ± 0.05 ^b
170 : 16	HSNA-4-170	0,70 ± 0.13 ^c

Tabell 6 viser at HSNA-4-170 med fuktighetsinnhold på 16% fikk målt et signifikant lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige ekstruderte produktene. Dersom HSNA-4-170, som fikk målt et betydelig lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige prøvene, ble utelatt fra datasettet ble det kun avdekket signifikant høyere fytinsyreinnhold i HSNA-7-145.9 med 14% fuktighet sammenlignet med HSNA-1-160 med 16,8% fuktighet (p-verdi < 0,05).

4.2 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter

Til analysering av GOS i prøvene ble det benyttet Raffinose/D-galactose Assay Kit fra Megazyme. Figur 10 viser beregnet innhold av GOS i de ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner. Figuren viser at de fleste prøvene har et relativt likt innhold av GOS på mellom 5-7 g/100g DM. WP-FF og DP-FF skiller seg ut med høyere GOS-innhold på henholdsvis 14,7 og 14,0 g/100 g DM, mens HB skiller seg ut med lavt GOS-innhold (1,4 g/100g DM).

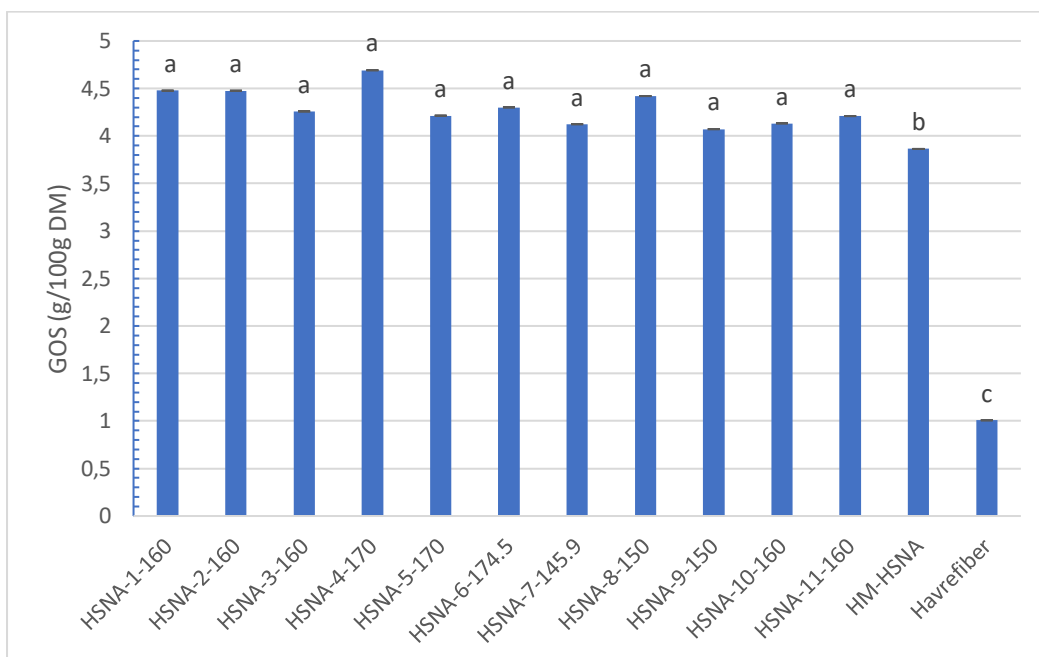


Figur 10. Innhold av GOS (g/100g DM) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller.

Det ble også beregnet innhold av fritt D-galaktose i prøvene, og resultatene viste at denne komponenten fantes i betydelig mindre mengder sammenlignet med GOS. Det ble funnet relativ stor variasjon i innhold av D-galaktose mellom de ulike prøvene. I fem av prøvene (DP-FF, WB, DB, WB-CF og DB-CF) ble det ikke detektert D-galaktose. I de fleste prøvene lå innholdet på mellom 12,4 – 29,2 mg/100g DM. DP og WB-FF skilte seg ut med høyest innhold av D-galaktose (henholdsvis 45,8 og 49,9 mg/100g DM), mens WP-CF hadde lavest detektert innhold på 2,0 mg/100g DM.

For å undersøke om det var signifikante forskjeller i GOS-innhold mellom prøvene ble det utført enveis ANOVA i R Commander. Enveis ANOVA viste at melene av erter hadde signifikant høyere innhold av GOS enn melene av fababønner (p -verdi $< 0,01$), se vedlegg 8. Enveis ANOVA viste også at luftklassifisering hadde signifikant effekt på innhold av GOS, hvor fine fraksjoner hadde signifikant høyere innhold av GOS enn grove fraksjoner (p -verdi $< 0,01$), se vedlegg 9. Type fraksjon (hel, avskallet, skall) hadde ikke signifikant effekt på innhold av GOS, og det ble ikke funnet korrelasjon mellom stivelsesinnhold og GOS i prøvene.

Figur 11 viser beregnet innhold av GOS i tørrstoff i de ekstruderte prøvene, ikke-ekstrudert prøve (HM-HSNA) og havrefiber.



Figur 11. Innhold av GOS (g/100g DM) i ekstruderte prøver, ikke-ekstrudert prøve og havrefiber. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller.

Som figur 11 viser har de ekstruderte prøvene (HSNA-1-160 - HSNA-11-160) relativt likt innhold av GOS på mellom 4,07 – 4,69 g/100g DM. Den ikke-ekstruderte prøven har et noe lavere GOS-innhold (3,86 g/100g DM), mens havrefiber skiller seg ut med et betydelig lavere innhold av GOS på 1,0 g/100g DM.

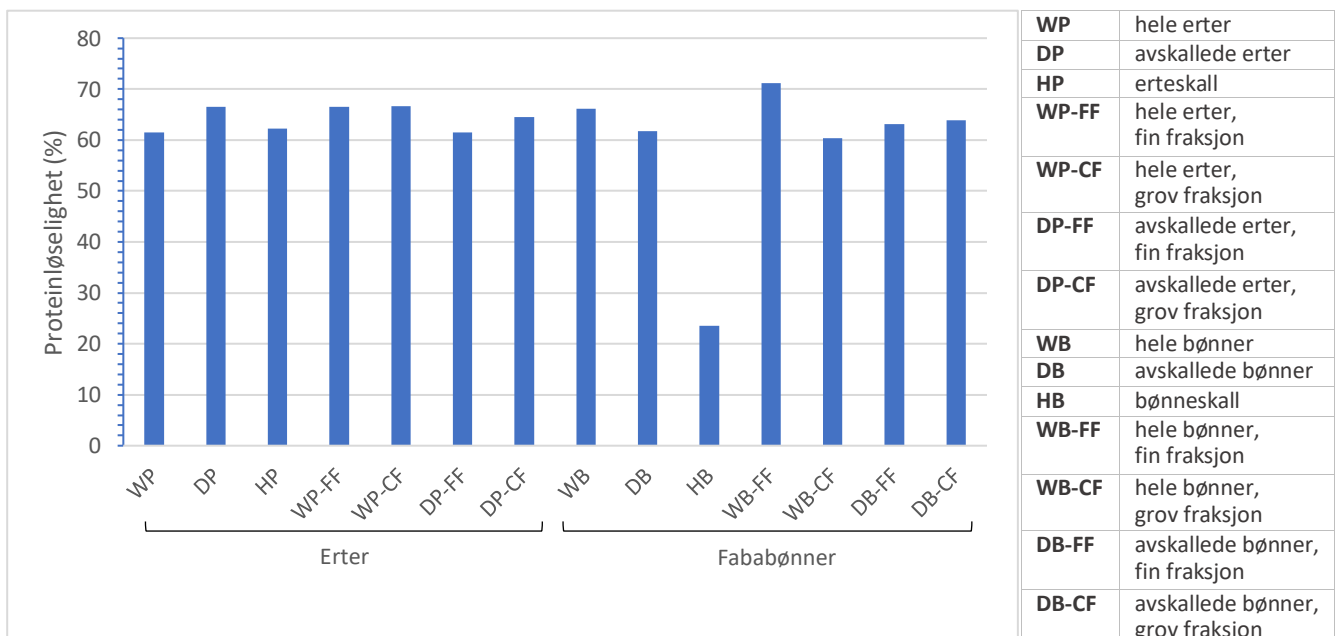
Blant de ekstruderte prøvene, ikke-ekstrudert prøve og havrefiber ble det kun detektert D-galaktose i to av prøvene; HSNA-7-145.9 og HSNA-8-150. D-galaktoseinnholdet ble beregnet til henholdsvis 32,7 og 12,8 mg/100g DM i disse prøvene.

For å undersøke om det var signifikante forskjeller i innhold av GOS mellom de ulike ekstruderte prøvene og uprosessert råstoff benyttet til ekstrudering, ble det utført enveis ANOVA i R Commander. Analysen viste at havrefiber hadde signifikant lavere innhold av GOS enn de ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven (p-verdi $\ll 0,001$), se vedlegg 10. De ekstruderte prøvene ble vist å ha signifikant høyere innhold av GOS enn den ikke-ekstruderte prøven (p-verdi $< 0,01$), se vedlegg 11. Det ble ikke funnet signifikant effekt av ekstruderingsstemperatur på innhold av GOS.

4.3 Analyse av proteinløselighet

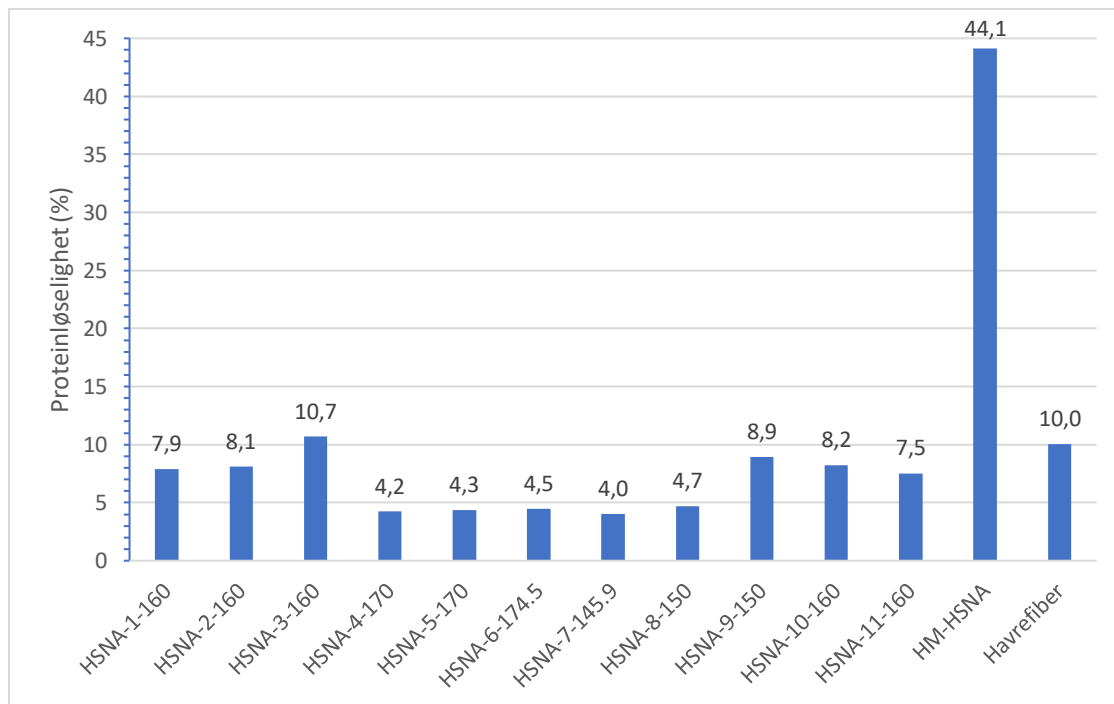
Det ble målt proteinløselighet i prøvene ved hjelp av Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit. Selv om proteininnholdet til hver prøve var kjent var det ønskelig å beregne proteinkonsentrasjon i ekstraheringer gjort av prøvene, siden prøvene ble ekstrahert i forkant av analysing av trypsininhibitorer.

Det ble beregnet proteinløselighet i prøvene basert på kjent proteinkonsentrasjon til prøvene og målt proteininnhold ved hjelp av kitet. Beregnet proteinløselighet i mel og fraksjoner av erter og fababønner, samt i ekstruderte prøver, ikke-ekstrudert prøve og havrefiber er presentert i figur 12 og 13.



Figur 12. Beregnet proteinløselighet (%) i mel og fraksjoner laget av erter og fababønner.

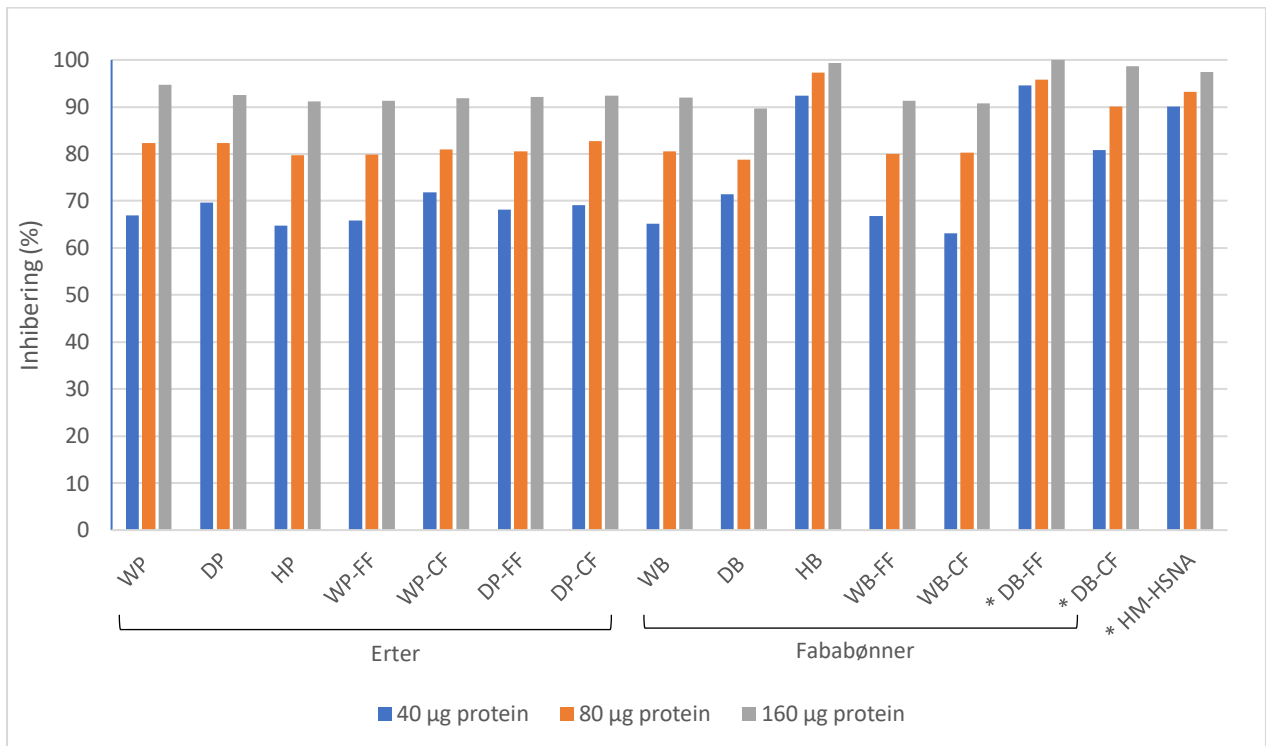
Figur 12 viser at de ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner fikk beregnet en relativ proteinløselighet som varierte mellom 60,4 og 71,1%. Unntaket var imidlertid HB som fikk beregnet en betraktelig lavere proteinløselighet på 23,5%. Figur 13 viser at de ekstruderte prøvene fikk beregnet relativt lave proteinløseligheter, som varierte mellom 4,0 og 10,7%. HM-HSNA ble derimot beregnet å ha en betraktelig høyere proteinløselighet på 44,1%.



Figur 13. Beregnet proteinløselighet (%) i ekstruderte prøver, ikke-ekstruderte prøve og havrefiber.

4.4 Analyse av trypsininhibitorer i planteråvarer og ekstruderte planteprodukter

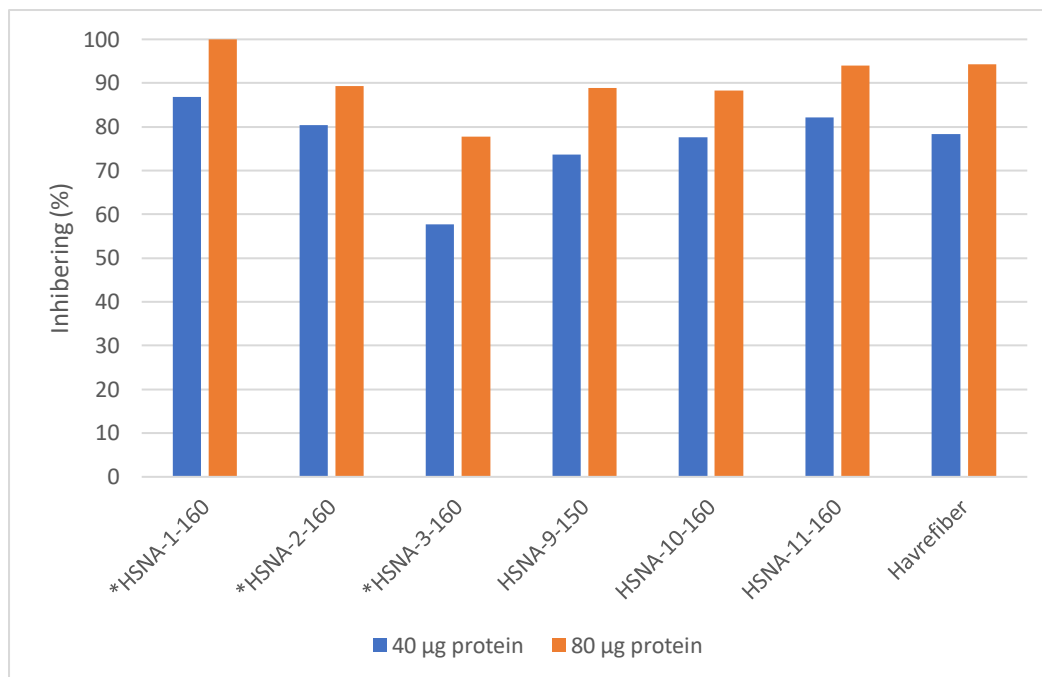
For å undersøke tilstedeværelse av trypsininhibitorer i prøvene ble det benyttet Protease Activity Assay Kit fra Abnova. Figur 14 fremstiller trypsininhibering (%) i mel og fraksjoner av erter og fababønner, samt i ikke-ekstrudert prøve, hvor det er benyttet 40, 80 og 160 µg protein per reaksjon.



Figur 14. Trypsininhibering (%) i mel og fraksjoner av erter og fababønner og i ikke-ekstrudert prøve, hvor det er benyttet proteinmengder på 40, 80 og 160 µg protein per reaksjon. * Prøver merket med stjerne har blitt korrigert for vha. gjennomsnitt av positiv kontroll.

For de fleste prøvene kan det sees en tydelig effekt av proteinmengde på trypsininhibering, hvor en høyere proteinmengde resulterer i høyere trypsininhibering. De fleste prøvene har en trypsininhibering som ligger mellom 60 og 95% for de ulike proteinmengdene. HB, DB-FF og HM-HSNA skiller seg ut med høy trypsininhibering på mellom 90 og 100% ved alle proteinmengdene.

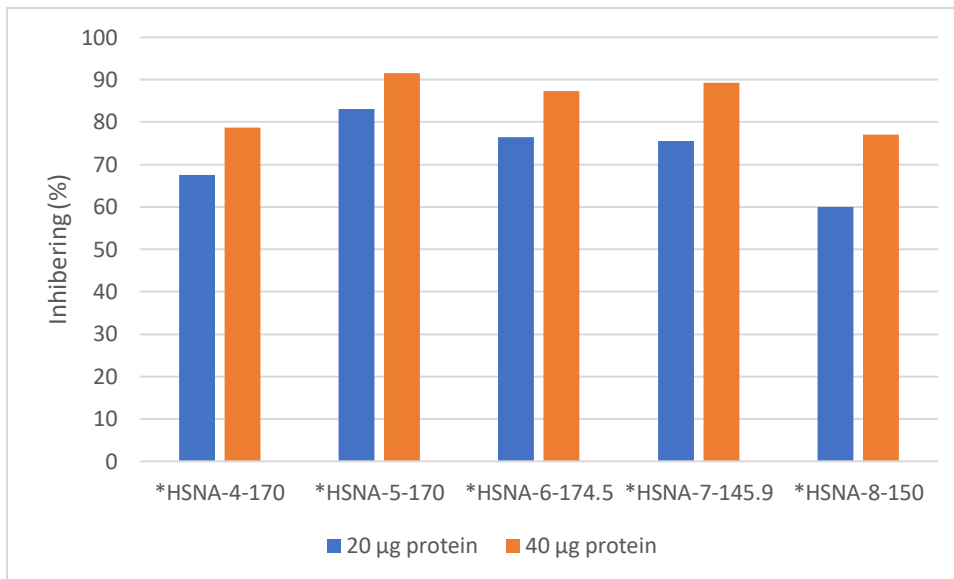
Figur 15 fremstiller trypsininhibering i noen av de ekstruderte prøvene og i havrefiber, hvor det ble benyttet proteinmengder på 40 og 80 µg protein per reaksjon.



Figur 15. Trypsininhibering (%) i ekstruderte prøver og havrefiber, hvor det er benyttet proteinmengder på 40 og 80 µg protein per reaksjon. * Prøver merket med stjerne har blitt korrigert for vha. gjennomsnitt av positiv kontroll.

Hos alle prøvene er det en tydelig effekt av proteinmengde, hvor en høyere proteinmengde medfører høyere trypsininhibering. De fleste prøvene har relativ lik trypsininhibering ved samme proteinmengde, som hovedsakelig varierer mellom 73 og 94%. HSNA-3-160 skiller seg ut med noe lavere trypsininhibering enn de øvrige prøvene ved samme proteinmengde, mens HSNA-1-160 har høyest trypsininhibering av alle prøvene ved både 40 og 80 µg protein på henholdsvis 87 og 100% ved disse proteinmengdene.

Figur 16 viser trypsininhibering i de øvrige ekstruderte prøvene, hvor det ble benyttet proteinmengder på 20 og 40 µg protein per reaksjon. I likhet med de øvrige prøvene viser også disse prøvene en effekt av proteinmengde på trypsininhibering. Prøvene utviser relativ lik trypsininhibering ved samme proteinmengde, men HSNA-4-170 og HSNA-8-150 viser noe lavere trypsininhibering enn de øvrige prøvene. Ved 20 µg protein varierer inhiberingen mellom 60 og 83%, mens ved 40 µg protein ligger inhiberingen på mellom 77 og 92%.



Figur 16. Trypsininhibering (%) i HSNA-4-170, HSNA-5-170, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9 og HSNA-8-150, hvor det er benyttet proteinmengder på 20 og 40 µg protein per reaksjon. * Prøver merket med stjerne har blitt korrigert for vha. gjennomsnitt av positiv kontroll.

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble innhold av antinæringsstoffer undersøkt i ulike fraksjoner av erter og fababønner, samt i uprosesserte og prosesserte planteprodukter. Hensikten med oppgaven var å undersøke effekt av prosessering på innhold av antinæringsstoffer i ulike plantematerialer. Oppgaven er skrevet som en del av FoodProFuture, som har som mål å utvikle en kunnskapsplattform for optimal produksjon og utnyttelse av norske planteressurser til sunne og attraktive produkter med høyt proteininnhold. Tre ulike typer antinæringsstoffer ble undersøkt, henholdsvis fytinsyre, galaktosyl-sukrose oligosakkarider og trypsininhibitorer. Komponentene ble undersøkt ved hjelp av relativt enkle analysemetoder i form av kits, og noe av hensikten med oppgaven var å undersøke om disse analysemetodene egner seg til analysering av antinæringsstoffer i plantematerialer.

Generelt ønskes det lavt innhold av antinæringsstoffer i matprodukter, da de kan medføre negative helseeffekter i kroppen. Plantematerialer er kjent for å ha et høyt innhold av antinæringsstoffer, men innhold av disse komponentene kan reduseres helt eller delvis ved hjelp av ulike prosesseringsmetoder. Kunnskap om effekt av prosessering på antinæringsstoffer er viktig for å kunne utvikle optimale prosesseringsmetoder, som kan bidra til utvikling av planteprodukter med en mer gunstig nærings sammensetning. Målet til FoodProFuture til syvende og sist er økt produksjon og utnyttelse av planteproteiner i matprodukter, og en endring mot et mer plantebasert kosthold.

5.1 Innhold av fytinsyre

Fytinsyre vil redusere biotilgjengeligheten av mineraler, proteiner og stivelse ved å danne uløselige komplekser med disse næringsstoffene. Overdrevent inntak av fytinsyre i kosten kan gi betydelig reduksjon av opptak av jern, sink og kalsium i kroppen, og kan i verste fall medføre mineralmangel ved utilstrekkelig absorpsjon (Multari et al., 2015). Fytinsyre innehar imidlertid også positive egenskaper i form av antioksidantaktivitet, og har i senere tid blitt vist å ha helsefremmende effekter (Nikmaram et al., 2017).

Tradisjonelle metoder for bestemmelse av fytinsyre i ulike prøvematerialer inkluderer jernkloridtitrering, høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC), ionebytterkromatografi og NMR

spektroskopi. Dette er generelt avanserte og tidkrevende analysemetoder, som ikke er egnet for et stort antall prøver (McKie & McCleary, 2016). Megazyme har derfor utviklet en enkel metode for analysering av totalt fosfor og fytinsyre, som har blitt benyttet i denne oppgaven.

5.1.1 Mel og fraksjoner av erter og fababønner

I hele og avskallede erter ble fytinsyreinnholdet beregnet til å være henholdsvis 0,75 og 0,83 g/100g DM. Dette samsvarer godt med resultatene fra en studie av Khattab og Arntfield (2009), hvor fytinsyreinnholdet ble funnet å være 0,815 og 0,890 g/100g DM i henholdsvis kanadiske og egyptiske erter. I en studie av Wang og Daun (2004) ble det rapportert at erter hadde et fytinsyreinnhold på 0,86 g/100g DM. Det er også rapportert at hele erter har et fytinsyreinnhold på 0,54% (Tulbek, 2014), som er noe lavere enn det som ble målt her. Erteskall hadde noe lavere fytinsyreinnhold enn hele erter på 0,564 g/100g DM. Tulbek et al. (2017) beskriver at fytat hovedsakelig er lokalisert i proteinlagre i endospermen og skallfraksjonen hos hele erter, som kan forklare hvorfor det ble målt et relativt høyt fytinsyreinnhold også i skallfraksjonen av erter.

Luftklassifisering ble observert å ha en betydelig effekt på fytinsyreinnholdet. De grove fraksjonene av både hele og avskallede erter hadde lavest fytinsyreinnhold av alle ertefraksjonene på henholdsvis 0,287 og 0,258 g/100g DM. Det er beskrevet at ertestivelseskonsentrat, som har ca. lik sammensetning som WP-CF og DP-CF, har et fytinsyreinnhold på 0,42% (Tulbek, 2014), som er noe høyere enn det som ble målt i de grove fraksjonene. Dette kan imidlertid skyldes noe ulik sammensetning av protein og stivelse som følge av ulik fremstillingsmetode. De fine fraksjonene av hele og avskallede erter fikk målt signifikant høyere fytinsyreinnhold enn de øvrige ertefraksjonene, på henholdsvis 1,958 og 1,988 g/100g DM. I erteproteinkonsentrat, som har omtrentlig lik sammensetning som de fine fraksjonene, er det rapportert et fytinsyreinnhold på 1,60% (Tulbek, 2014), som er forenlig med det som ble målt i de fine fraksjonene. Ulike analysemetoder benyttet for fytinsyre i disse studiene og i denne oppgaven kan også forklare hvorfor det er målt noe ulikt innhold.

For de ulike melene og fraksjonene av fababønner varierte fytinsyreinnholdet mellom 0,26 (HB) og 2,56 g/100g DM (WB-FF). I hele og avskallede fababønner ble fytinsyreinnholdet beregnet til å være henholdsvis 1,27 og 1,41 g/100g DM. I en studie av Mattila et al. (2018) ble det funnet noe høyere innhold av fytinsyre, spesielt i avskallede fababønner, på henholdsvis 1,6 og 2,1 g/100g DM i hele og avskallede fababønner. Noe høyere fytinsyreinnhold i hele og

avskallede fababønner er rapportert i Alonso et al. (2000) på henholdsvis 2,17 og 2,38 g/100g DM, mens Oomah et al. (2011) rapporterte et noe lavere fytinsyreinnhold på 0,59-1,51 g/100g DM i ulike genotyper av hele fababønner. Fytinsyreinnhold i fababønner kan variere mellom ulike sorter, og kan påvirkes av faktorer knyttet til dyrkning som klimatiske forhold, lokasjon og jordsmonnforhold (Urbano et al., 2000). Det er derfor forventet en del naturlig variasjon i fytinsyreinnhold i fababønner som følge av disse faktorene. I tillegg er det i studiene benyttet andre analysemetoder for fytinsyre enn i denne oppgaven, slik at forskjeller i metodene også kan forklare hvorfor fytinsyreinnholdet varierer mellom ulike studier og denne oppgaven.

I likhet med de fine og grove fraksjonene av erter kan det også ses en tydelig effekt av luftklassifisering på innholdet av fytinsyre hos fababønner. Det ble målt et signifikant høyere fytinsyreinnhold i de fine fraksjonene av både hele og avskallede fababønner (henholdsvis 2,56 og 2,45 g/100g DM) sammenlignet med de øvrige melene og fraksjonene. Det kan forklares med at hos fababønner er fytater hovedsakelig lokalisert i proteinlagre i endospermen, og vil dermed følge proteinfraksjonen (Alonso et al., 2000). Avskalling vil følgelig også bidra til å øke fytinsyreinnholdet. Lavest fytinsyreinnhold ble målt i fababønneskall (0,26 g/100g DM), som ikke er uventet med tanke på at fytinsyre hovedsakelig lagres i frøets endosperm.

De ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner hadde varierende proteininnhold, og fytinsyreinnholdet ble beregnet i g/100g protein for å undersøke om det var noen sammenheng mellom innhold av protein og fytinsyre, som det tydet på grunnet høyt fytinsyreinnhold i de fine fraksjonene av både erter og fababønner. Prøvene av både erter og fababønner hadde relativt likt innhold av fytinsyre per protein, som hos de fleste prøvene lå mellom 3,5 og 4,5 g/100g protein. Dette indikerer at fytinsyre er positivt korrelert med protein. Lineær regresjon bekreftet dette, og viste sterk positiv korrelasjon ($R^2 = 0,9923$) mellom innhold av protein og fytinsyre i prøvene. Dette samsvarer med det som står i litteraturen om at fytinsyre lagres i proteinlagre i endospermen hos belgvekster (Gupta et al., 2015; Multari et al., 2015).

I studiene som er referert til er det benyttet ulike former for ionebytterkromatografi til ekstraksjon av fytinsyre, og videre kolorimetrisk bestemmelse av fytinsyre. Det ser ut til at metoden benyttet i denne oppgaven utviklet av Megazyme stort sett gir sammenlignbare resultater med analysemetodene benyttet i studiene. Det er benyttet noe ulike tilnærminger til metoder basert på samme prinsipp i studiene, slik at resultater fra ulike studier kan variere noe på grunn av ulik tilnærming. Fytinsyreinnholdet i belgvekster viser også naturlig variasjon som følge av blant annet type sort og dyrkingsforhold, og dette kan gjøre det noe vanskeligere å

undersøke samsvar mellom ulike analysemetoder, siden det er uvisst hvor mye av variasjonen som skyldes naturlig variasjon og analysemetodene benyttet.

Statistisk analyse viste at melene av fababønner hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn melene av erter. Dette kan skyldes at fababønner generelt har et høyere fytinsyreinnhold sammenlignet med erter. Statistisk analyse viste også at avskallede og hele erter og fababønner hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn skallfraksjoner av erter og fababønner. Dette er som forventet siden i belgfrukter vil fytinsyre som nevnt hovedsakelig være lokalisert i proteinlagre i endospermen. Det ble imidlertid målt over dobbelt så høyt innhold av fytinsyre i erteskall enn i fababønneskall. Det er beskrevet at fytinsyre både finnes i proteinlagre og skallfraksjonen hos erter (Tulbek et al., 2017), mens hos fababønner er fytinsyre hovedsakelig lokalisert i endospermen. Dette tyder på at skallfraksjonen hos erter generelt har et høyere fytinsyreinnhold enn fababønneskall. En annen mulig forklaring kan være at en større andel av ertene er blitt fraksjonert til erteskall enn det som er tilfellet i fraksjonen av fababønneskall.

Resultatene viser at fytinsyre vil akkumuleres i proteinfraksjonen hos erter og fababønner, som i utgangspunktet er uheldig siden det ønskes et økt konsum av planteproteiner. Det er vanlig å benytte luftklassifisering for å oppnå proteinrike og stivelsesrike fraksjoner, som videre kan benyttes til å berike matprodukter med næringsstoffer eller bidra med funksjonelle egenskaper. Proteinfraksjoner fra belgvekster som erter og fababønner kan ha mange bruksområder, men som følge av at fytinsyre vil følge proteinfraksjonen bør det rettes fokus på å redusere innholdet.

5.1.2 Ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser

De ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven hadde et fytinsyreinnhold som varierte mellom 1,21 og 1,57 g/100g DM, bortsett fra HSNA-4-170 som hadde et lavere innhold på 0,79 g/100g DM. Det ble ikke funnet signifikant effekt av ekstrudering på fytinsyreinnhold, som skyldes at den ikke-ekstruderte prøven og de ekstruderte prøvene hadde et relativt likt fytinsyreinnhold. Statistisk analyse viste imidlertid signifikant effekt av ekstruderingsstemperatur på fytinsyreinnhold, hvor det ble vist at prøver ekstrudert ved 145,9°C, 160°C og 174,5°C hadde signifikant høyere fytinsyreinnhold enn HSNA-4-170 og HSNA-5-170 ekstrudert ved 170°C. Det ble ikke avdekket noen klar sammenheng mellom temperatur og fytinsyreinnhold, da resultatene kun viste at HSNA-4-170 hadde et betydelig lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige prøvene ekstrudert ved andre temperaturer. Det er nok rimelig å tro at det lave, målte innholdet skyldes feilkilder og ikke en faktisk forskjell grunnet

ekstruderingsstemperatur, siden HSNA-5-170 som også var ekstrudert ved samme temperatur hadde et høyere fytinsyreinnhold som samsvarer med innholdet målt i de øvrige ekstruderte prøvene. Ved å fjerne HSNA-4-170 fra datasettet ble det ikke vist signifikant effekt av ekstruderingsstemperatur. Resultatene tyder altså på at fytinsyreinnholdet ikke har blitt redusert under ekstruderingen.

En svakhet med fytinsyrekitet fra Megazyme er imidlertid at det ikke skiller mellom fosfat frigitt fra fytinsyre og fosfat frigitt fra eventuelt lavere former for myo-inositol fosfater som måtte være tilstede i prøvene. Under prosessering kan fytinsyre (InsP₆) hydrolyseres, enten enzymatisk av fytaser eller kjemisk, til lavere myo-inositol fosfater (InsP₅, InsP₄, InsP₃, InsP₂, InsP₁) (García-Esteba et al., 1999). De fleste planter inneholder endogene fytaser som kan aktiveres under prosessering, slik at prosesserte planteprodukter kan inneholde en blanding av fytinsyre og dets ulike hydrolyseprodukter (Miller, 2007). I en studie av Sandberg et al. (1988) ble en blanding av 30% hvetekli, 60% hvetestivelse og 10% gluten ekstrudert og analysert for inositol fosfater før og etter prosessering. Under ekstrudering ble det vist at 25% av inositol heksafosfat (fytinsyre) ble hydrolysert til penta- og tetrafosfater. I en studie av Alonso et al. (2000) ble det vist at ekstrudering ga signifikant reduksjon av fytinsyreinnholdet i fababønner. Disse studiene tyder altså på at ekstrudering er forventet å hydrolysere noe fytinsyre til lavere inositol fosfatformer. InsP₆ og InsP₅ har større evne til å danne kompleks med uorganiske kationer enn de lavere myo-inositol formene, og har dermed størst negativ effekt på biotilgjengeligheten av mineraler (García-Esteba et al., 1999). Dersom noe av fytinsyren er blitt brutt ned til lavere myo-inositol fosfatformer vil ikke metoden ta høyde for dette, da det antas at alt fosfat som er frigitt kommer fra fytinsyre. I uprosesserte prøver stemmer denne antakelsen godt, siden fytinsyre er hovedformen for inositol fosfat i belgfrukter og kan utgjøre over 90% av innholdet (McKie & McCleary, 2016; Muzquiz et al., 2012). I prosesserte prøver derimot kan noe fytinsyre være brutt ned til lavere myo-inositol fosfater, og metoden vil i disse tilfellene overestimere fytinsyreinnholdet (McKie & McCleary, 2016). Det kan derfor tenkes at fytinsyreinnholdet egentlig er redusert i de ekstruderte prøvene, men at metoden ikke fanger opp dette.

Det ble utført statistisk analyse for å undersøke om fuktighetsinnhold under ekstruderingen hadde signifikant effekt på fytinsyreinnhold. Analysen avdekket kun signifikant forskjell i fytinsyreinnhold mellom prøver med et fuktighetsinnhold på henholdsvis 14 og 16%, hvor prøver med 14% fuktighet (HSNA-2-160, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9, HSNA-10-160 og HSNA-11-160) hadde signifikant høyere fytinsyreinnhold enn prøver med 16% fuktighet

(HSNA-4-170 og HSNA-8-150). Fuktighetsinnholdet hos de ulike prøvene under ekstruderingen lå på 11,2, 12, 14, 16 og 16,8%, så det ble ikke avdekket signifikant forskjell i fytinsyre mellom ytterpunktene for fuktighetsinnhold. Dersom HSNA-4-170, som hadde et betydelig lavere fytinsyreinnhold, ble utelatt fra datasettet ble det ikke detektert signifikans mellom prøver med ulikt fuktighetsinnhold. Dersom fuktighetsinnhold under ekstruderingen har signifikant effekt på fytinsyre forventes det kanskje en tydeligere trend med økende fuktighetsinnhold. Noe av årsaken til at dette ikke ble observert kan skyldes at det var stor variasjon i hvor mange prøver som ble ekstrudert ved et gitt fuktighetsinnhold. For eksempel ble kun én prøve ekstrudert både ved 16,8 og 11,2% fuktighet. Dersom flere prøver hadde vært ekstrudert ved samme fuktighetsinnhold kan det tenkes at det hadde blitt observert en mer tydelig effekt på fytinsyreinnhold.

Det ble også avdekket signifikant interaksjonseffekt av ekstruderingsstemperatur og fuktighetsinnhold på fytinsyreinnhold, hvor det ble vist at HSNA-4-170 med fuktighetsinnhold på 16% fikk målt et signifikant lavere fytinsyreinnhold enn de øvrige ekstruderte produktene. Som nevnt skyldes nok det lave fytinsyreinnholdet i HSNA-4-170 feilkilder. Det bør også nevnes at for de ulike kombinasjonene av temperatur og fuktighetsinnhold under ekstrudering var det kun ett replikat i form av ett ekstrudert produkt, bortsett fra ved 160°C og 14% fuktighet som tre produkter ble ekstrudert under. Dette har nok gjort det vanskelig å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i fytinsyreinnhold forårsaket av en kombinasjon av temperatur og fuktighetsinnhold.

Statistisk analyse viste at havrefiber hadde et signifikant høyere fytinsyreinnhold (3,25 g/100g DM) enn de ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven. I korn finnes fytinsyre hovedsakelig i klilaget, som inkluderer aleuronlaget og fruktskallet (Gupta et al., 2015; Nikmaram et al., 2017), det vil si i de ytre delene av kornet. Det er derfor forventet at det ble målt et relativt høyt fytinsyreinnhold i havrefiberprøven. I en studie av García-Esteba et al. (1999) ble havremel og havrekli analysert for fytinsyre ved hjelp av titrering. Havremel ble rapportert å ha et fytinsyreinnhold på 0,74 g/100g DM, mens havrekli ble målt å ha et fytinsyreinnhold på mellom 1,9 og 2,4 g/100g DM. Havrekli består av skallet og deler av kjernen til havrekornet, og utgjør ca. 50% av kornet, mens havrefiberprøven analysert i denne oppgaven er nok en mer oppkonsentrert form for havrefiber. Det er derfor forventet at havrefiberprøven har et høyere fytinsyreinnhold enn havrekli. Det kan tenkes at havrefiber har bidratt mest med fytinsyreinnhold i de ekstruderte produktene, siden det ble målt et betydelig

høyere fytinsyreinnhold i havrefiber. Selv om et høyt fiberinntak er gunstig for helsen kan et høyt innhold av fytinsyre som kommer med på kjøpet bidra til negative helseeffekter.

En feilkilde i forhold til analyse av havrefiber er imidlertid at prøven fikk målt en høy absorbansverdi (2,148) for totalt fosfor, som var høyere enn absorbansverdiene benyttet til standardkurven. Ideelt sett burde absorbansen ikke overskride absorbansverdiene til fosforstandardene, da det kan tenkes at sammenhengen mellom absorbans og fosfor ikke er like lineær ved høyere absorbansverdier. Dette kan ha bidratt til å feilestimere fytinsyreinnholdet i havrefiberprøven.

5.2 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider

Galaktosyl-sukrose oligosakkarider er den gruppen av oligosakkarider som er mest utbredt i planter (Muzquiz et al., 2012). Belgvekster er særlig kjent for et høyt innhold av oligosakkarider (Singh et al., 2017). Mennesker og pattedyr mangler enzym for å kunne fordøye GOS, og de vil derfor fermenteres av bakterier i tykktarmen under produksjon av gass. Høyt inntak av GOS er assosiert med tarmgass, magesmerter og diaré. Til tross for at de forårsaker ubehag ved høyt konsum vil GOS bidra med positive helseeffekter ved at de utøver samme effekt som kostfiber og har positiv innvirkning på tarmhelsen (Muzquiz et al., 2012).

5.2.1 Mel og fraksjoner av erter og fababønner

Analysing av GOS i mel og fraksjoner laget av erter viste at innholdet varierte mellom 5,80 (WP-CF) og 14,7 g/100g DM (WP-FF). De fleste ertemelene hadde et GOS-innhold på ca. 6 g/100g DM. I hele erter ble det målt et GOS-innhold på 6,33 g/100g DM, som stemmer godt overens med det som ble rapportert i en studie av Moussou et al. (2017) hvor ertemel ble funnet å ha et innhold av GOS på 6,63 g/100g DM. Lignende GOS-innhold på 6,16% er også rapportert i Tulbek (2014), mens i en studie av Wang og Daun (2004) ble det rapportert et noe lavere innhold av GOS i erter på 4,0 g/100g DM. Avskallede erter fikk målt et noe høyere GOS-innhold enn hele erter (9,65 g/100g DM), mens de fine fraksjonene av både hele og avskallede erter hadde et betydelig høyere GOS-innhold på henholdsvis 14,7 og 14,0 g/100g DM. Det er rapportert at erteproteinkonsentrat, som har noe høyere proteininnhold og lavere stivelsesinnhold enn de fine fraksjonene, har et innhold av GOS på 10,7% (Tulbek, 2014), som er noe lavere enn det som ble målt i WP-FF og DP-FF. Dette kan skyldes både ulik sammensetning av proteinfraksjonene og naturlig variasjon i GOS-innhold i erter, siden innhold

av oligosakkarider vil kunne variere mellom ulike kultivarer og vil påvirkes av frøets modningsgrad og miljømessige forhold (Moussou et al., 2017). I tillegg kan ulike analysemetoder gi forskjellig resultat. De grove fraksjonene hadde relativt likt innhold av GOS som hele erter, som lå på henholdsvis 5,80 og 6,03 g/100g DM i hele og avskallede erter. Dette er forenlig med det som er rapportert av Tulbek (2014), hvor ertestivelseskonsentrat som har ca. lik sammensetning som de grove fraksjonene ble vist å ha et innhold av GOS på 5,4%. Det at de fine fraksjonene, som har et relativt høyt proteininnhold og lavt stivelsesinnhold, har høyest GOS-innhold av alle ertemelene tyder på at GOS følger proteinfraksjonen i større grad enn stivelsesfraksjonen. Sandberg (2011) beskriver at GOS har en tendens til å konsentreres i proteinfraksjonen i erteproteinkonsentrat som er luftklassifisert, og siden de fine fraksjonene er oppnådd gjennom luftklassifisering kan dette være en mulig forklaring.

Erteskall fikk målt et relativt høyt GOS-innhold (5,92 g/100g DM), som var relativt likt som i hele erter og de grove fraksjonene. Det kan også observeres en tydelig effekt av avskalling, hvor avskallede erter hadde et høyere GOS-innhold enn hele erter. Denne effekten kan imidlertid ikke observeres i de fine og grove fraksjonene. Det virker overraskende at det ble observert en relativ stor forskjell i innhold av GOS mellom hele og avskallede erter når erteskall viste seg å ha tilnærmet likt innhold av GOS som hele erter, noe som tilsier at avskalling ikke vil medføre en betydelig økning i GOS-innhold. Høyt GOS-innhold i erteskall kan skyldes at denne fraksjonen ikke utelukkende består av skall, men også inneholder noen av de ytre lagene i erter. I ertefiber er det rapportert et GOS-innhold på 0,3% (Tulbek, 2014), noe som kan tyde på at skallfraksjonen som ble analysert også besto av andre komponenter i tillegg til ertefiber. Generelt vil innholdet av GOS i erter variere blant annet med kultivar og miljømessige faktorer (Tulbek et al., 2017).

Det er forsket lite på hvor i frøet hos ulike belgvekster GOS er lokalisert. Hos planter og belgvekster generelt vil α -galaktosider syntetiseres og lagres i lagringsorganer som frø, røtter og rotknoller under utviklingen av frøet, og de vil raskt brytes ned under spiring (Martínez-Villaluenga et al., 2008).

Analysering av GOS i mel og fraksjoner av fababønner viste at hele og avskallede fababønner hadde et GOS-innhold på henholdsvis 5,37 og 6,44 g/100g DM. Dette er i samsvar med det som ble funnet i en studie av Moussou et al. (2017), hvor det ble rapportert at fababønnemel hadde et innhold av GOS på 5,20 g/100g DM. De fine fraksjonene av hele og avskallede fababønner hadde noe høyere GOS-innhold på henholdsvis 6,34 og 6,64 g/100g DM, som er forenlig med det som ble funnet i studien av Moussou et al. (2017) hvor endospermen hos fababønner ble

vist å ha høyest innhold av løselige karbohydrater inkludert GOS sammenlignet med hele fababønner og fababønneskall, som ble rapportert å være 6,04 g/100g DM. Som nevnt vil innholdet av ulike oligosakkarider i belgfrukter påvirkes av type, art og kultivar, samt frøets modningsgrad og miljømessige forhold (Moussou et al., 2017).

Fababønneskall hadde lavest innhold av GOS på 1,39 g/100g DM, som er vesentlig høyere enn det som ble funnet i Moussou et al. (2017) hvor det ble rapportert et GOS-innhold på 0,25 g/100g DM i fababønneskall. Forskjellen kan forklares med ulik sammensetning, for eksempel hadde fababønneskall i denne oppgaven et proteininnhold på 10,8%, mens i studien av Moussou et al. (2017) hadde fababønneskallet et proteininnhold på 4,9%. I likhet med melene av erter observeres det lavere GOS-innhold i de grove fraksjonene av fababønner, både i forhold til de fine fraksjonene og melene av hele og avskallede fababønner.

Alle melene av avskallede fababønner hadde noe høyere GOS-innhold enn de tilsvarende melene av hele fababønner, og det ble målt et lavt innhold av GOS i fababønneskall. Disse resultatene indikerer at skallfraksjonen inneholder lite GOS, og følgelig vil GOS-innholdet bli mer konsentrert i avskallede fababønner. I likhet med hos erter vil GOS i mindre grad følge den grove fraksjonen som hovedsakelig er rik på stivelse, som kan forklares med at GOS hovedsakelig er lokalisert i proteinlagre i endospermen hos fababønner (Goyoaga et al., 2011).

I studiene som er referert til er det benyttet ulike typer væskechromatografi (HPLC) eller gasschromatografi (GC) for detektering og kvantifisering av enkeltkomponenter av oligosakkarider. Disse metodene skiller mellom ulike kjemiske forbindelser og vil dermed gi et relativt presist mål på innhold av enkeltkomponenter. Metoden benyttet i denne oppgaven vil derimot detektere alle typer galaktosyl-sukrose oligosakkarider, og deretter benyttes molekylvekten til raffinose for bestemmelse av raffinoseinnhold, som i denne oppgaven er benevnt som GOS grunnet at disse komponentene også detekteres i metoden. Denne metoden er derfor mye mindre presis enn metoder som benytter ulike typer chromatografi. Det ble likevel observert en del overensstemmelse i innhold av GOS på tross av ulike metoder. I likhet med fytinsyre vil også innhold av GOS i belgfrukter påvirkes av faktorer som sort og dyrkingsforhold, slik at det uansett er forventet noe variasjon i GOS-innhold.

Statistisk analyse viste at melene av erter hadde signifikant høyere innhold av GOS enn melene av fababønner. Dette er å forvente, siden innhold av α -galaktosider i ulike ertesorter er rapportert å variere mellom 2,3 - 9,6% (Reddy et al., 1984; Vidal-Valverde et al., 2003), mens ulike sorter av fababønner er rapportert å ha et innhold av α -galaktosider på mellom 1,0 – 4,5%

(Frejnagel et al., 1997; Reddy et al., 1984; Vidal-Valverde et al., 1998). Hos erter er raffinose og staktyose blitt funnet i høyest konsentrasjoner (Reddy et al., 1984; Vidal-Valverde et al., 2003), mens fababønner er rapportert å ha et lavere innhold av raffinose og staktyose sammenlignet med hagebønner og erter (Martínez-Villaluenga et al., 2008). De fine fraksjonene av både erter og fababønner ble også vist å ha signifikant høyere innhold av GOS enn de grove fraksjonene.

5.2.2 Ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser

Under prosessering og lagring av mel av belgfrukter kan det skje ulike fysiske og kjemiske endringer av dets komponenter som kan endre deres funksjonalitet og næringsverdi. Når det gjelder oligosakkarider inkludert GOS er det vist at de kan hydrolyseres til enklere sukkerer (mono- og disakkarider) under prosessering ved høye temperaturer (Moussou et al., 2017). Hydrolyseprodukter fra GOS kan ved varmebehandling reagere med aminosyrer gjennom Maillardreaksjoner (Voragen, 1998). Maillardreaksjoner skjer mellom reduserende sukker og en primær aminogruppe, og reaksjonen kan forekomme under oppvarming eller lang tids lagring (Sikorski et al., 2007). Aminosyrer som inngår i reaksjonen, som ofte er lysin, vil gjøres utilgjengelig og proteinkvaliteten vil dermed reduseres (Fellows, 2009). De fleste oligosakkarider har moderat reduserende evne hvor de vil forårsake Maillardreaksjoner i mat som varmebehandles. Stabiliteten varierer med ulike klasser oligosakkarider, avhengig av type sukker som er tilstede, deres ringstruktur, konfigurasjonsisomer og type bindinger (Voragen, 1998).

Analysering av GOS viste at de ekstruderte prøvene og den ikke-ekstruderte prøven hadde relativt likt GOS-innhold på mellom 3,86 og 4,69 g/100g DM, mens havrefiber fikk målt et signifikant lavere GOS-innhold (1,01 g/100g DM). Statistisk analyse viste at de ekstruderte prøvene hadde signifikant høyere innhold av GOS enn den ikke-ekstruderte prøven. Det ble imidlertid ikke funnet signifikant effekt av ekstruderingsstemperatur på innhold av GOS. Økt innhold av GOS etter ekstrudering kan virke uventet siden det er beskrevet i litteraturen at oligosakkarider kan hydrolyseres under prosessering ved høye temperaturer (Moussou et al., 2017). To vanlige prosesseringsmetoder som er kjent for å redusere innholdet av oligosakkarider i belgfrukter er bløtlegging og koking, som kan redusere innholdet av α -galaktosider på mellom 20 og 100% sammenlignet med ubehandlede frø fra belgfrukter. α -galaktosider er vannløselige og under bløtlegging og koking vil oligosakkaridene løses opp og vaskes ut av frøene (Martínez-Villaluenga et al., 2008). Det finnes imidlertid også studier som

viser at innholdet av GOS kan øke under varmebehandling i form av steking. I en studie av Moussou et al. (2017) ble ubehandlet og varmebehandlet ertemel (ristet ved 300°C i 10 minutter) analysert for innhold av GOS. Varmebehandlet ertemel ble vist å ha et økt innhold av GOS, hovedsakelig av raffinose, etter risting. Dette ble forklart med mulig frigivelse av oligosakkarider bundet til proteiner og andre makromolekyler, eller hydrolyse av høymolekylære polysakkarider, som er beskrevet i Martínez-Villaluenga et al. (2008). I rå belgfrukter vil noe av oligosakkaridene være tilstede i bundet form, enten til proteiner eller andre makromolekyler, eller være tilstede som komponenter i høymolekylære polysakkarider. Varmebehandling kan påvirke disse bindingene og medføre frigivelse av oligosakkarider (Rao & Belavady, 1978). Det kan tenkes at dette har skjedd i de ekstruderte prøvene, og kan forklare hvorfor det ble målt et høyere innhold av GOS etter ekstrudering.

Økt innhold av GOS i ulike belgvekster etter koking er også rapportert i andre studier (Rao & Belavady, 1978; Revilleza et al., 1990). I en studie av Revilleza et al. (1990) ble hele frø av ulike filippinske belgfrukter tørristet under høy temperatur i henholdsvis 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 og 2.0 minutter. Ved tørristing i mindre enn 0,5 minutter var innholdet av sukrose og oligosakkarider økt sammenlignet med ubehandlede frø. Ved varmebehandlingstid på 2 minutter ble det vist en nærmest fullstendig reduksjon av oligosakkarider, som ble forklart av ikke-enzymatisk bruningsreaksjon, oksidering av sukkere og pyrolyse.

Sammenlignet med temperaturene benyttet i disse studiene er ekstruderingstemperaturene benyttet i denne oppgaven betraktelig lavere. Det kan likevel tenkes at et noe økt innhold av GOS i de ekstruderte prøvene sammenlignet med uprosessert prøve kan forklares av at noen oligosakkarider er bundet til makromolekyler i råstoffet, og ikke vil spaltes av og detekteres som GOS under analysering. Varmebehandling kan ha frigitt oligosakkaridene, slik at de detekteres og det måles et høyere innhold av GOS i de ekstruderte prøvene enn i den ikke-ekstruderte prøven med lik sammensetning. At det ikke ble funnet forskjell i innhold av GOS i prøvene med ulik ekstruderingstemperatur kan skyldes at temperaturforskjellene ikke er store nok til å gi en effekt på GOS-innhold.

Det kan spekuleres i om det er forventet at Maillardreaksjoner skal finne sted under ekstruderingen, noe som i så fall ville resultert i reduksjon av GOS, som ikke ble observert hos de ekstruderte prøvene. Det er beskrevet at Maillardreaksjoner kan forekomme under ekstrudering ved høye temperaturer og lavt fuktighetsinnhold (Fellows, 2009). Det er rapportert at ekstrudering av kornblandinger medfører reduksjon av tilgjengelig lysin som følge av Maillardreaksjoner. For å unngå høyt tap av lysin under ekstrudering bør ikke temperaturen

overstige 180°C ved vanninnhold under 15% (Singh et al., 2007), siden Maillardreaksjoner skjer i større grad med økende temperaturer (Sikorski et al., 2007). Til produksjon av de ekstruderte produktene ble det benyttet temperaturer på mellom 145,9 og 174,5°C, slik at det er teoretisk mulig at Maillardreaksjoner kunne skjedd under ekstruderingen, selv om det ikke ble observert nedgang i GOS-innhold etter ekstrudering. Det er imidlertid mulig at eventuelle hydrolyseprodukter av stivelse i produktene kan ha deltatt i Maillardreaksjoner, men dette er vanskelig å vite siden denne analysen ikke ville avdekket dette.

Metoden benyttet for analyse av GOS baserer seg på at α -galaktosider (hovedsakelig raffinose, staktyose og verbaskose) i prøvematerialet hydrolyseres til D-galaktose og sukrose ved tilsetning av α -galaktosidase. Ved tilsetning av β -galaktose dehydrogenase vil β -D-galaktose oksideres til D-galakturonsyre under reduksjon av NAD^+ til NADH . Mengden NADH dannet i reaksjonen vil være støkiometrisk med mengden fritt D-galaktose, som videre benyttes til beregning av raffinoseinnhold. Under analysering av GOS i alle prøvene, både av erter, fababønner og de ekstruderte prøvene, ble det observert at reaksjonen hvor β -D-galaktose oksideres til D-galakturonsyre ikke var stoppet etter en inkuberingstid på 20 minutter ved 40°C. Absorbansen fortsatte å øke i relativt lang tid, og ble målt helt til verdiene mer eller mindre stabiliserte seg over tid. Megazyme (2018) forklarer i protokollen at dersom omdanningen av D-galaktose er fullført innen 20 minutter ved 40°C kan det generelt konkluderes med at interferens ikke har funnet sted. Dette kan tyde på at det har skjedd interferens under analysen, ved at prøvene i tillegg til raffinose inneholdt andre α -galaktosider som staktyose og verbaskose.

En ulempe med metoden er at α -galaktosidase som tilsettes prøvematerialet vil hydrolysere alle α -galaktosider tilstede i prøven til D-galaktose og sukrose. Belgfrukter er rike på både raffinose, staktyose og verbaskose, så selv om kitet kun er beregnet for å kvantifisere innhold av raffinose, vil staktyose og verbaskose tilstede i prøvene påvirke resultatet. Et mol av staktyose og verbaskose vil frigi henholdsvis to og tre mol av D-galaktose, i motsetning til raffinose som kun frigir ett mol. Siden friggitt D-galaktose benyttes til kvantifisering av raffinoseinnhold vil dette innholdet overestimere dersom staktyose og verbaskose er tilstede i prøven. Som nevnt i materialer og metoder er det i denne oppgaven valgt å betegne raffinoseinnhold som GOS-innhold, nettopp fordi belgfrukter er kjent for å ha betydelig innhold av både raffinose, staktyose og verbaskose. Selv om denne tilnærmingen ikke vil være helt korrekt på grunn av at GOS-innhold beregnes på bakgrunn av molekylvekten til raffinose, som er betydelig lavere enn molekylvektene til staktyose og verbaskose, kan dette gi et mer korrekt bilde enn å betegne det som raffinoseinnhold. Denne tilnærmingen gjør imidlertid at beregnet GOS-innhold i prøvene

ikke kan tolkes som absolutte verdier, men sammenligning med andre studier som har analysert innhold av GOS i belgvekster viser likevel relativt stor overensstemmelse.

5.3 Analyse av proteinløselighet

Løseligheten til proteiner kan beskrives som den termodynamiske likevekten mellom interaksjoner mellom proteiner og interaksjoner mellom protein og løsningsmiddel. Hydrofobe interaksjoner vil fremme protein-protein interaksjoner og resultere i lavere proteinløselighet, mens ionebindinger vil fremme protein-vann interaksjoner og medføre økt løselighet. Løseligheten til et protein avhenger av andelen hydrofile og hydrofobe områder på proteinets overflate. Siden mesteparten av de hydrofobe aminosyrene befinner seg i proteinets indre er det hovedsakelig upolare grupper på overflaten som påvirker proteinets løselighet. Jo færre hydrofobe områder, dess høyere løselighet i vann. Basert på løselighet klassifiseres proteiner i fire kategorier kjent som Osbourne fraksjoner; albuminer, globuliner, prolaminer og gluteliner. Albuminer er løselige i vann ved pH 6,6, globuliner er løselige i fortynnede saltløsninger ved pH 7,0, gluteliner er løselige i sure og basiske løsninger, mens prolaminer er løselige i 70% etanol. Både prolaminer og gluteliner er sterkt hydrofobe proteinklasser. Proteinløselighet vil også påvirkes av ulike betingelser i løsningen, deriblant pH, ionestyrke, temperatur og tilstedeværelse av organiske løsningsmidler (Damodaran, 2007). Proteiner er minst løselige ved deres isoelektriske punkt (Day, 2013). De fleste planteproteiner tilhører de fire ulike proteinklassene nevnt ovenfor. Generelt utgjør albuminer og globuliner hovedproteinene i belgvekster (Boye et al., 2010). Løseligheten til de fleste proteiner fra belgvekster er høyest ved sure og basiske pH-verdier, og vil avta betraktelig nær det isoelektriske punktet, som generelt ligger mellom pH 4 og 6 for de fleste belgvekster (Boye et al., 2010).

Det ble beregnet proteinløselighet i prøvene basert på kjent proteinkonsentrasjon og målt proteininnhold i ekstraheringer gjort av prøvene ved hjelp av Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit. For de ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner ble proteinløseligheten beregnet å ligge mellom 60,4 og 71,1%, bortsett fra hos fababønneskall hvor det ble målt en betydelig lavere proteinløselighet på 23,5%.

Til prøveekstraheringen ble det benyttet buffer med pH 8,76 tilsatt noe natriumklorid. Dette vil medføre at proteinene løses opp siden pH er høyere enn proteinenes isoelektriske punkt, samt at saltet bidrar til høyere løselighet på grunn av økt ionestyrke i løsningen. Deretter ble ekstraheringene sentrifugert i to omganger, hvor supernatanten ble benyttet videre.

Sentrifugeringen ville fjerne andre komponenter tilstede i prøven, som stivelse og fiber, som ikke var ønsket i proteinekstraktene.

De ekstruderte prøvene fikk beregnet lave proteinløseligheter på mellom 4,0 og 10,7%. HM-HSNA som ikke var ekstrudert fikk beregnet en høyere proteinløselighet på 44,1%. Lav proteinløselighet kan skyldes at proteinene har blitt denaturert under ekstruderingen, og dermed fått lavere løselighet etter prosessering. Denaturering av proteiner regnes som store endringer i sekundær, tertiær og kvartær struktur uten at peptidbindinger brytes. Denaturering av proteiner vil vanligvis medføre lavere løselighet og noe tap av funksjonelle egenskaper (Damodaran, 2007).

HM-HSNA og de ekstruderte prøvene inneholdt 50% ertestivelse, 40% havrefiber og 10% erteprotein. Det kan tenkes at det høye innholdet av havrefiber har kunnet vanskeliggjort rensingen av prøveekstraktene, slik at prøveekstraktene inneholdt fiberpartikler i tillegg til proteiner. Den ikke-ekstruderte prøven fikk også beregnet en del lavere proteinløselighet enn fraksjonene av erter og fababønner, slik at det kan tenkes at høyt fiberinnhold kan ha forstyrret proteinekstraheringen. Dette kan muligens også forklare hvorfor fababønneskall fikk beregnet en lav proteinløselighet, siden denne fraksjonen også har et høyt fiberinnhold.

Proteinkvaliteten til næringsmidler avhenger først og fremst av deres innhold av essensielle aminosyrer, men påvirkes også av biotilgjengeligheten av aminosyrene i kroppen. Fordøyeligheten av proteiner påvirkes av flere faktorer som proteinkonformasjon, antinæringsstoffer og prosessering. Ubehandlete proteiner vil vanligvis være mindre hydrolyserte enn delvis denaturerte proteiner. Samtidig vil uløselige fibrøse proteiner og kraftig denaturerte globulære proteiner være lite utsatt for hydrolyse (Damodaran, 2007). De ekstruderte produktene inneholdt erteprotein. Proteiner fra erter består i stor grad av globuliner (Day, 2013), og dersom disse har blitt denaturert under ekstruderingen kan det resultere i redusert løselighet og fordøyelighet. Samtidig er planteproteiner ofte tilknyttet trypsin- og chymotrypsininhibitorer, som i stor grad vil denatureres under varmebehandling, slik at varmebehandling generelt vil gi økt biotilgjengelighet av planteproteiner. Imidlertid vil interaksjoner mellom proteiner, polysakkarider og kostfiber redusere graden av proteinhydrolyse. Dette har betydning i ekstruderte produkter hvor det ofte benyttes høy temperatur og trykk. Proteiner utsettes for flere kjemiske modifikasjoner som involverer lysin når de utsettes for høye temperaturer og alkalisk pH, deriblant Maillardreaksjoner. Disse modifikasjonene vil redusere proteinfordøyeligheten (Damodaran, 2007). På grunn av høyt innhold av både stivelse og kostfiber i de ekstruderte produktene er det fullt mulig at disse

komponentene har interagert med protein, som har resultert i lavere proteinløselighet. Ekstrudering kan altså utvise ulike effekter på proteinløselighet og -fordøyelighet.

5.4 Analyse av trypsininhibitorer

Trypsininhibitorer er en del av plantens forsvarssystem (Tulbek et al., 2017). Proteaseinhibitorer inndeles i Kunitz typer og Bowman Birk-typer, og proteaseinhibitorer av begge typene har evne til å inhibere trypsin (Muzquiz et al., 2012). Trypsininhibitorer vil inhibere aktiviteten til trypsin ved kompetitiv binding, slik at trypsin mister sin enzymatiske aktivitet (Muzquiz et al., 2012). Høyt inntak av trypsininhibitorer kan medføre negative helseeffekter i form av redusert proteinfordøyeligheten og lavere biotilgjengelighet av protein (Nikmaram et al., 2017).

Prøvene ble analysert for innhold av trypsininhibitorer ved hjelp av Protease Activity Assay Kit fra Abnova. Virkningsmekanismen i analysen går ut på at trypsin vil spalte tilsatt proteasesubstrat som medfører økning i fluorescens som er direkte proporsjonal med proteaseaktivitet. Måling av proteaseaktivitet i prøvene ble gjort spektrofotometrisk over én time med målinger hvert minutt. Proteaseaktivitet i hver prøve ble fremstilt som en lineær graf, hvor stigningstallet ble benyttet som mål på proteaseaktivitet. Relativ trypsinaktivitet i hver prøve ble beregnet ved å korrigere for positiv kontroll, som ble definert å utvise 100% trypsinaktivitet. Resultatene ble presentert som relativ trypsininhibering.

En del av prøvene ble analysert sammen med en unaturlig lav positiv kontroll, uten at prøvene viste tegn til å gi tilsvarende lave verdier. Dette gjaldt DB-FF, DB-CF, HSNA-1-160, HSNA-2-160, HSNA-3-160, HSNA-4-170, HSNA-5-170, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9, HSNA-8-150 og HM-HSNA. For å kunne gi en fornuftig presentasjon av resultatene fra disse prøvene ble disse korrigert for ved hjelp av gjennomsnitt av de øvrige positive kontrollene, som hadde jevnt høye verdier. Dette ga en bedre fremstilling av trypsininhibering hos disse prøvene, selv om disse resultatene ikke kan vurderes som reelle verdier, men kun gi en slags pekepinn på trypsininhiberingen hos disse prøvene.

For de ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner kunne det ses en tydelig effekt av proteinmengde (40, 80 og 160 µg) på trypsininhibering, hvor en høyere proteinmengde ga høyere trypsininhibering. De fleste prøvene hadde en trypsininhibering som lå mellom 60 og 95% for de ulike proteinmengdene. Trypsininhiberingen var imidlertid relativt høy selv ved 40 µg protein, hvor den stort sett varierte mellom 60 og 70%. Fababønneskall skilte seg ut med

høy inhibering på mellom 90 og 100% for alle proteinmengdene. Dette er et uventet resultat siden det generelt i litteraturen er rapportert en økning i trypsininhibitoraktivitet i frø av belgvekster etter avskalling sammenlignet med hele frø (Alonso et al., 1998; Alonso et al., 2000; Deshpande et al., 1982; Mubarak, 2005; Shi et al., 2017). Dette indikerer at trypsininhibitorer befinner seg i endospermen hos frø av belgfrukter (Deshpande et al., 1982), slik at trypsininhibitorer vil bli mer oppkonsentrert i avskallede frø. Det er derfor vanskelig å forklare hvorfor fababønneskall fikk målt en såpass høy trypsininhibering, men det kan tenkes at prøveekstraktet ikke ble godt nok rensert for andre komponenter i forkant av analysen, slik at forurensninger i prøven kan ha interagert med trypsin. De ulike melene av erter og fababønner viste heller ikke noen tydelig forskjell i inhibering mellom hele og avskallede frø, selv om det er forventet. I tillegg er det viktig å påpeke at de ulike fraksjonene av erter og fababønner kun er fraksjonert, og ikke prosessert til et ferdig produkt. Videre prosessering av disse ingrediensene til produkter egnet for konsum kan modifisere innholdet av trypsininhibitorer. Det er likevel hensiktsmessig å kartlegge innholdet i uproseserte råmaterialer, slik at det kan undersøkes hvilken effekt prosessering har på reduksjon av proteaseinhibitorer.

DB-FF, DB-CF og HM-HSNA ble alle beregnet ved hjelp av gjennomsnitt av positiv kontroll, og ikke positiv kontroll som ble oppnådd under samme kjøring. Dette kan nok forklare hvorfor disse prøvene fikk beregnet en del høyere trypsininhibering enn de fleste andre prøvene, og resultatene bør ikke tillegges så mye vekt. Disse prøvene viser imidlertid også noe høyere inhibering med økt proteinmengde, men inhiberingen øker lite relativt sett i forhold til økningen i proteinmengde.

I en studie av Mattila et al. (2018) ble samme analysemetode (Protease activity kit, Abnova) benyttet til å analysere trypsininhibitorer i hele og avskallede fababønner. I studien ble proteinkonsentrasjoner på 80 og 160 µg testet. Resultatene viste at både hele og avskallede fababønner ga sterk trypsininhibering, hvor hele fababønner ga noe høyere inhibering, som også ble forklart som et uventet resultat.

De ekstruderte prøvene HSNA-1-160, HSNA-2-160, HSNA-3-160, HSNA-9-150, HSNA-10-160, HSNA-11-160 og havrefiber fikk beregnet lav proteinløselighet slik at det ble benyttet lavere proteinmengder under analysen på henholdsvis 40 og 80 µg protein. Resultatene fra både HSNA-1, HSNA-2 OG HSNA-3 ble korrigert for ved hjelp av gjennomsnitt av positiv kontroll, slik at disse resultatene bør vurderes kritisk. Alle prøvene viste økt trypsininhibering med høyere proteinmengde. HSNA-9, HSNA-10, HSNA-11 og havrefiber fikk beregnet rimelig lik trypsininhibering ved samme proteinmengde, som lå på mellom 73,7 og 94,3 %. HSNA-1 og

HSNA-2 hadde noe høyere trypsininhivering enn disse prøvene, mens HSNA-3 viste noe lavere trypsininhivering. Det at disse tre prøvene avviker noe fra de øvrige prøvene skyldes nok at disse resultatene er unøyaktige på grunn av korrigeringen. Resultatene viser imidlertid at disse prøvene utviser samme trend når det gjelder inhivering med økende proteinmengde.

De ekstruderte prøvene HSNA-4-170, HSNA-5-170, HSNA-6-174.5, HSNA-7-145.9 og HSNA-8-150 fikk beregnet lavest proteinløselighet, og det ble derfor benyttet proteinmengder på 20 og 40 µg protein til analysing av disse prøvene. Alle disse prøvene hadde også blitt korrigert for ved hjelp av gjennomsnitt av positiv kontroll, og bør derfor ikke tillegges for mye vekt. Alle disse prøvene viser i likhet med de andre prøvene en høyere trypsininhivering ved økt proteinmengde, selv om økningen er relativt liten med tanke på at proteinmengden dobles. HSNA-5, HSNA-6 og HSNA-7 har trypsininhivering på mellom 75,5 og 91,6% ved begge proteinmengdene, mens HSNA-4 og HSNA-8 har noe lavere trypsininhivninger som varierer mellom 59,9 og 78,8%. Dersom inhivering ved 40 µg protein sammenlignes mellom alle de ekstruderte prøvene kan det ses at inhivningen er relativt lik og stort sett varierer mellom 73,7 og 91,6%.

I litteraturen er det generelt rapportert at varmebehandling er en effektiv metode for å redusere aktiviteten til proteaseinhibitorer (Armour et al., 1998). Dette indikerer at trypsininhivorer er varmesensitive og vil inaktiveres under varmebehandling som følge av denaturering (Vidal-Valverde et al., 1994). Det er rapportert at koking av frø fra belgvekster bidrar til betraktelig reduksjon av trypsininhivoraktivitet sammenlignet med ubehandlede frø (Khatab & Arntfield, 2009; Martín-Cabrejas et al., 2009; Shi et al., 2017; Wang et al., 2010). Det er også beskrevet at ekstrudering vil redusere innholdet av trypsininhivorer i ulike belgvekster (Alonso et al., 1998; Alonso et al., 2000; Griffiths, 1984). Ekstrudering er vist å være en mer effektiv metode for å redusere trypsininhivoraktivitet sammenlignet med avskalling, bløtlegging og spiring (Alonso et al., 2000). Det kan derfor forventes å se noe redusert trypsininhivering hos de ekstruderte prøvene sammenlignet med den ikke-ekstruderte prøven (HM-HSNA). Dette kan imidlertid ikke observeres hos prøvene, hvor også de ekstruderte prøvene har høy trypsininhivering, selv ved lave proteinmengder.

Det finnes imidlertid også varmestabile trypsininhivorer. To typer trypsininhivorer i soyabønner som er blitt grundig studert er Kunitz og Bowman-Birk proteaseinhibitorer, som begge utviser noe varmestabilitet som følge av intramolekylære disulfidbindinger (van der Ven et al., 2005). Noen varmestabile trypsininhivorer har også blitt identifisert i andre belgfrukter (Shi et al., 2017). I Damodaran (2007) står det beskrevet at Kunitz typer proteaseinhibitorer er

termolabile, mens Bowman-Birk type inhibitorer er stabile under normale betingelser ved varmebehandling. Det kan tenkes at trypsininhibitorer tilstede i de ekstruderte prøvene er varmemestabile, eller at varmebelastningen under ekstruderingen ikke var tilstrekkelig høy til å denaturere trypsininhibitorer.

Det bør også nevnes at trypsin benyttet under analysen kommer fra gris. Det kan derfor tenkes at resultatene ikke er helt overførbare for humant trypsin, og at prøvematerialene kan utvise noe annerledes inhiberende effekt på trypsin hos mennesker. Trypsininhibering i prøvene bør derfor undersøkes ved hjelp av humant trypsin for å undersøke hvordan proteinfordøyelsen kan bli påvirket i mennesker.

Analysen ble også utført med proteinkontroll for å undersøke om tilstedeværelse av protein vil fungere som et ekstra substrat i reaksjonen og påvirke måling av proteaseaktivitet. Dersom annet protein enn substratet er tilstede vil dette kunne medføre at trypsin virker på dette proteinet istedenfor, som vil resultere i en lavere målt proteaseaktivitet. BSA ble benyttet til proteinkontroll hvor det ble benyttet en proteinmengde på 160 µg. BSA-kontroll fikk beregnet en høy proteaseaktivitet, som ble målt til å være noe høyere enn positiv kontroll. Dette tyder på at BSA ikke har interferert med trypsin, men det er imidlertid vanskelig å forklare hvorfor proteaseaktiviteten ble noe høyere enn i positiv kontroll, som jo er den kontrollen det forventes høyest aktivitet i som følge av at den kun inneholder buffer, trypsin og proteasesubstrat. BSA kontrollen viste jevnt høyere proteaseaktivitet i hele tidsintervallet målingene foregikk, som kan skyldes unøyaktigheter ved analysering, for eksempel ved at noe mer proteasesubstrat ble pipettert ut i denne prøven enn i prøven med positiv kontroll.

På grunn av en del usikkerhet i resultatene kan det ikke trekkes noen konkrete slutninger, og verdiene bør vurderes som relative og ikke som noen absoluttverdier. Alle prøvene utviste en tydelig trend med økt inhibering ved høyere proteinmengder, men økningen var begrenset tatt i betraktning at proteinmengdene ble doblet. Dette kan tyde på at tilstedeværelse av protein fra prøvene vil fungere som et ekstra substrat for trypsin og følgelig interferere med målt proteaseaktivitet. Denne effekten ble ikke observert hos BSA, som er noe uventet dersom proteinene i prøvene virker som et ekstra substrat for trypsin. Siden dobling av proteinmengde har en begrenset effekt på proteaseaktiviteten tyder dette på at det ikke nødvendigvis er et høyt innhold av trypsininhibitorer i prøvematerialene som medfører redusert trypsinaktivitet. Dersom dette var tilfelle ville nok inhiberingen vært lavere ved den laveste proteinmengden enn det som ble målt, mens inhiberingen ville økt mer med økt proteinmengde som følge av økt mengde trypsininhibitorer.

5.5 Oppsummering

I denne oppgaven ble det undersøkt innhold av fytinsyre og GOS, samt trypsininhivering, i ulike fraksjoner av erter og fababønner og i ekstruderte produkter bestående av 50% ertestivelse, 40% havrefiber og 10% erterprotein. Analysing av fytinsyre viste at fytinsyre vil akkumuleres i proteinfraksjonen hos erter og fababønner, og det ble avdekket sterk positiv korrelasjon mellom innhold av protein og fytinsyre. De grove og stivelsesrike fraksjonene av erter og fababønner hadde betydelig lavere innhold av fytinsyre sammenlignet med hele erter (0,75% DM) og fababønner (1,27% DM). Fytinsyrekitet fra Megazyme viste seg å gi sammenlignbare resultater med andre mer tradisjonelle analysemetoder for fytinsyre. Det ble ikke avdekket signifikant forskjell i fytinsyreinnhold mellom ikke-ekstrudert prøve og de ulike ekstruderte produktene, hvor innholdet varierte mellom 1,21 og 1,57% DM. Det ble ikke avdekket noen tydelig effekt av ekstruderingsstemperatur på fytinsyreinnhold. Havrefiber som ble benyttet som ingrediens i de ekstruderte produktene fikk målt et høyt fytinsyreinnhold (3,25% DM), og det kan tenkes at denne ingrediensen har bidratt i størst grad med fytinsyre i de ekstruderte produktene.

Ved analysing av GOS ble det vist at de fleste ertefraksjonene hadde et GOS-innhold på ca. 6% DM. Det ble målt et signifikant høyere innhold av GOS i de fine fraksjonene av erter sammenlignet med de øvrige ertefraksjonene. De fleste fababønnefraksjonene hadde et GOS-innhold som varierte mellom 5 og 6% DM, og det ble målt signifikant høyere innhold av GOS i fine fraksjoner sammenlignet med grove fraksjoner. Ertefraksjonene hadde signifikant høyere innhold av GOS enn de tilsvarende fababønnefraksjonene. De ekstruderte prøvene fikk målt et signifikant høyere GOS-innhold enn den ikke-ekstruderte prøven, men innholdet mellom de ulike prøvene var relativt like og viste en variasjon mellom 3,9 og 4,7% DM.

Analysing av trypsininhivitorer viste generelt høy trypsininhivering hos alle prøvene, selv ved lave proteinmengder. Det ble observert en økning i inhiberende effekt med økende proteinmengde, men økningen var relativt lav tatt i betraktning at proteinmengdene ble doblet. Det ble ikke observert en effekt av verken avskalling eller ekstrudering på trypsininhivering.

6 Til ettertanke og videre forskning

Først og fremst bør det nevnes at de ulike ekstruderte produktene ikke hadde et optimalt forsøksdesign på grunn av få gjentak. Optimalt sett burde det vært flere produkter produsert under samme betingelser (temperatur og fuktighetsinnhold) under ekstruderingen. Det kunne luket ut noe uforklarlig variasjon mellom like produkter, og dermed resultert i større forklart variasjon mellom ulike produkter. På denne måten kunne det vært lettere å se effekter av ulike prosesseringsbetingelser og blitt avdekket flere signifikante forskjeller.

Som nevnt i diskusjonsdelen er ikke analysemetoden benyttet for fytinsyre egnet for prosesserte prøver siden analysen ikke skiller mellom fosfat frigitt fra fytinsyre og fosfat frigitt fra lavere former for inositol fosfater, som kan være tilstede i større mengder i prosesserte prøver. Fytinsyreinnholdet i de ekstruderte prøvene kan derfor være noe overestimert dersom noe fytinsyre er blitt brutt ned under prosesseringen. Innhold av fytinsyre i de ekstruderte prøvene bør derfor analyseres ved hjelp av en annen metode for å gi et mer riktig bilde på fytinsyreinnhold etter ekstrudering.

Analysemetoden som ble benyttet for å undersøke innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider i prøvene var egentlig beregnet for raffinose, så resultatene er ikke fullstendig overførbare for GOS-innhold. Det kan derfor være interessant å undersøke mer i detalj hvilke oligosakkarider som finnes i prøvene, og kanskje undersøke innhold av hver av komponentene raffinose, staktyose og verbaskose separat. Til dette trengs det trolig mer avanserte analyseteknikker som for eksempel HPLC. Det kunne også vært interessant å undersøke hvordan innholdet av hver av disse komponentene endret seg under ekstrudering.

Resultatene fra analysen av trypsininhibitorer ble noe feilaktige på grunn av en ukjent feil som oppsto under analyseringen og medførte en feilaktig korrigering av målingene for flere av prøvene. Denne analysen bør derfor gjøres på nytt for å undersøke om det kan avdekkes noen effekter av prosessering på innhold av trypsininhibitorer. Det kan også være interessant å undersøke om prøvene inneholder andre proteaseinhibitorer, for eksempel chymotrypsininhibitorer, som også er kjent for å gi redusert proteinfordøyelse. Dette vil gi en bredere forståelse av proteaseaktivitet i ulike fraksjoner og produkter av belgvekster.

Til videre forskning hadde det vært interessant å undersøke om innholdet av antinæringsstoffer påvirker fordøyelsen, og se om responsen som observeres kan korreleres til målt innhold i prøvene. Dette kunne for eksempel blitt gjort med de ekstruderte prøvene, som er en type sunnere snacksprodukt som er ment å konsumeres som de er. De ulike melene og fraksjonene av erter og fababønner vil derimot ikke konsumeres i sin opprinnelige form, og bør videreforedles til et produkt som er ment for konsum før de eventuelt benyttes til *in vitro* fordøyelse. Prøvemateriale med høyt innhold av fytinsyre forventes å hemme opptak av mineraler som jern, sink og kalsium. Alle prøvene fikk målt en relativ høy trypsinhibering, og ved å undersøke *in vitro* fordøyelse av prøvene kan det ses om dette også kan observeres ved redusert proteinfordøyelighet.

I tillegg til fytinsyre, GOS og proteaseinhibitorer inneholder belgvekster andre antinæringsstoffer som lektiner, tanniner, saponiner og alkaloider. Det kunne vært gunstig å kartlegge innhold av noen av disse antinæringsstoffene i tillegg for å få en bredere forståelse for innhold av antinæringsstoffer i plantematerialer.

7 Litteraturliste

- Abnova. *Protease Activity Assay Kit (Red)*. 15 utg. Taiwan.
- Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2): 112-120. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.005>.
- Alonso, R., Orúe, E. & Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry*, 63 (4): 505-512. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00037-5).
- Alonso, R., Aguirre, A. & Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68 (2): 159-165. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7).
- Armour, J. C., Perera, R. L. C., Buchan, W. C. & Grant, G. (1998). Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78 (2): 225-231. doi: 10.1002/(sici)1097-0010(199810)78:2<225::aid-jsfa109>3.0.co;2-1.
- Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R. & Karim, A. A. (2010). Nonmeat Protein Alternatives as Meat Extenders and Meat Analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (5): 513-529. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x.
- Baird, T. T. (2017). Trypsin. I: *Reference Module in Life Sciences*: Elsevier.
- Boye, J., Zare, F. & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2): 414-431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
- Callisen, F., Arnt-Jensen, C., Vold, M. & Molteberg, E L. (2005). *Norges komparative fortrinn som havreproducent*, OR.07.05. Fredrikstad: Stiftelsen Østfoldforskning.
- Chen, J.-M., Radisky, E. S. & Férec, C. (2013). Human Trypsins. I: Rawlings, N. D. & Salvesen, G. (red.) *Handbook of Proteolytic Enzymes* s. 2600-2609: Academic Press.
- Damodaran, S. (2007). Amino Acids, Peptides, and Proteins. I: Fennema, O. R., Parkin, K. L. & Damodaran, S. (red.) *Fennema's Food Chemistry*, s. 217-329. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32 (1): 25-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>.
- de Boer, J. & Aiking, H. (2011). On the merits of plant-based proteins for global food security: Marrying macro and micro perspectives. *Ecological Economics*, 70 (7): 1259-1265. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2011.03.001>.
- Deshpande, S. S., Sathe, S. K., Salunkhe, D. K. & Cornforth, D. P. (1982). Effects of Dehulling on Phytic Acid, Polyphenols, and Enzyme Inhibitors of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 47 (6): 1846-1850. doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb12896.x.
- Duc, G., Marget, P., Esnault, R., Le Guen, J. & Bastianelli, D. (1999). Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*): Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. 133: 185-196. doi: 10.1017/S0021859699006905.
- Duc, G., Aleksić, J.M., Marget, P., Mikić, A., Paull, J., Redden, R.J., Sass, O., Stoddard, F.L., Vandenberg, A., Vishnyakova, M. & Torres, A.M. (2015). Faba Bean. I: De Ron, A. M. (red.) b. 10 *Grain Legumes*, s. 141-178. London: Springer Science+Business Media. doi: 10.1007/978-1-4939-2797-5.

- Fellows, P. J. (2009). Extrusion. I: Fellows, P. J. (red.) *Food Processing Technology* s. 456-477: Woodhead Publishing.
- Frejngel, S., Zduńczyk, Z. & Krefft, B. (1997). The chemical composition and nutritive value of low- and high-tannin faba bean varieties. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 6 (3): 401-412. doi: 10.22358/jafs/69536/1997.
- Frøseth, R. B. (2009). Erter og åkerbønner. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/erter-og-akerbonner> (lest 20.04.19).
- Frøseth, R. B. (2017). Belgvester til modning. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/belgvekster-til-modning> (lest 20.04.19).
- García-Estapa, R. M., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (1999). Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*, 32 (3): 217-221. doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00092-7).
- Goyoaga, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Romero, C., Guillamón, E., Varela, A., Pedrosa, M. M. & Muzquiz, M. (2011). Content and distribution of protein, sugars and inositol phosphates during the germination and seedling growth of two cultivars of *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (3): 391-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.002>.
- Griffiths, D. W. (1984). The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*Pisum* spp.) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35 (5): 481-486. doi: 10.1002/jsfa.2740350502.
- Gupta, R. K., Gangoliya, S. S. & Singh, N. K. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of food science and technology*, 52 (2): 676-684. doi: 10.1007/s13197-013-0978-y.
- Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N. & Sayyar Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*, 97 (2): 331-335. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>.
- Khattab, R. Y. & Arntfield, S. D. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (6): 1113-1118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.004>.
- Kotlarz, A., Sujak, A., Strobel, W. & Grzesiak, W. (2011). Chemical Composition and Nutritive Value of Protein of the Pea Seeds - Effect of Harvesting Year and Variety. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 75 (1): 57-69. doi: <https://doi.org/10.2478/v10032-011-0018-2>.
- Marshall, N., Cowan, S., Edwards, S., Griffiths, I., Howarth, C., Langdon, T., & White, E.M. (2013). Crops that feed the world 9. Oats - a cereal crop for human and livestock feed with industrial applications. *Food Security*, 5 (1): 13-33. doi: <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0232-x>.
- Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Hernández, T., Díaz, S. & Esteban, R. M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*, 114 (3): 1063-1068. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.070>.
- Martínez-Villaluenga, C., Frias, J. & Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (4): 301-316. doi: 10.1080/10408390701326243.
- Mattila, P. H., Pihlava, J.-M., Hellström, J., Nurmi, M., Euroala, M., Mäkinen, S., Jalava, T. & Pihlanto, A. (2018). Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products. *Food Quality and Safety*, 2 (4): 213-219. doi: 10.1093/fqsafe/fyy021.

- McKie, V. A. & McCleary, B. V. (2016). A Novel and Rapid Colorimetric Method for Measuring Total Phosphorus and Phytic Acid in Foods and Animal Feeds. *Journal of Aoac International*, 99 (3): 738-743. doi: 10.5740/jaoacint.16-0029.
- Megazyme. (2017). *Phytic acid (phytate)/total phosphorus assay procedure*. Ireland.
- Megazyme. (2018). *Raffinose/D-galactose assay procedure*. Ireland.
- Micro BCA Protein Assay Kit*. 0412.6. USA: Thermo Fisher Scientific.
- Miller, D. D. (2007). Minerals. I: Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (red.) *Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition*, s. 523-569. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis.
- Moussou, N., Corzo-Martinez, M., Sanz, M. L., Zaidi, F., Montilla, A. & Villamiel, M. (2017). Assessment of Maillard reaction evolution, prebiotic carbohydrates, antioxidant activity and alpha-amylase inhibition in pulse flours. *J Food Sci Technol*, 54 (4): 890-900. doi: 10.1007/s13197-016-2298-5.
- Mubarak, A. E. (2005). Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chemistry*, 89 (4): 489-495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.007>.
- Multari, S., Stewart, D. & Russell, W. R. (2015). Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (5): 511-522. doi: doi:10.1111/1541-4337.12146.
- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E. & Pedrosa, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11 (2): 227-244. doi: 10.1007/s11101-012-9233-9.
- Mäkinen, O. E., Sozer, N., Ercili-Cura, D. & Poutanen, K. (2016). Protein From Oat: Structure, Processes, Functionality, and Nutrition. I: Nadathur, S. R., Wanasundara, J.P.D. & Scanlin, L. (red.) *Sustainable Protein Sources*, s. 105-119. San Diego: Academic Press.
- Nikmaram, N., Leong, S. Y., Koubaa, M., Zhu, Z., Barba, F. J., Greiner, R., Oey, I. & Roohinejad, S. (2017). Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. *Food Control*, 79: 62-73. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.027.
- Oomah, B. D., Luc, G., Leprelle, C., Drover, J. C. G., Harrison, J. E. & Olson, M. (2011). Phenolics, Phytic Acid, and Phytase in Canadian-Grown Low-Tannin Fava Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (8): 3763-3771. doi: 10.1021/jf200338b.
- Page, M. J. & Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (7): 1220-1236. doi: 10.1007/s00018-008-7565-9.
- Pimentel, D. & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3): 660S-663S. doi: 10.1093/ajcn/78.3.660S.
- Rao, P. U. & Belavady, B. (1978). Oligosaccharides in pulses: varietal differences and effects of cooking and germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (2): 316-319. doi: 10.1021/jf60216a044.
- Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K. & Salunkhe, D. K. (1984). Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates—A review. *Food Chemistry*, 13 (1): 25-68. doi: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90026-8).
- Revilleza, M. J. R., Mendoza, E. M. T. & Raymundo, L. C. (1990). Oligosaccharides in several Philippine indigenous food legumes: Determination, localization and removal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 40 (1): 83-93. doi: 10.1007/bf02193782.

- Sandberg, A.-S., Andersson, H., Carlsson, N. G. & Sandström, B. (1988). Degradation Products of Bran Phytate Formed during Digestion in the Human Small Intestine: Effect of Extrusion Cooking on Digestibility. 117: 2061-5. doi: 10.1093/jn/117.12.2061.
- Sandberg, A.-S. (2011). Functional Foods: Concept to Product. I: Saarela, M. (red.) *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, s. 358-382 Elsevier Science.
- Savage, G. P. & Morrison, S. C. (2003). Trypsin Inhibitors. I: Caballero, B. (red.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, s. 5878-5884. Oxford: Academic Press.
- Serikstad, G. L., Hansen, S & de Boer, A. (2013). *Biologisk nitrogenbinding - belgvekster som kilde til nitrogen*. Bioforsk Fokus, 8, 3.
- Shen, S., Hou, H., Ding, C., Bing, D.-J. & Lu, Z.-X. (2016). Protein content correlates with starch morphology, composition and physicochemical properties in field peas. *Canadian Journal of Plant Science*, 96 (3): 404-412. doi: 10.1139/cjps-2015-0231.
- Shi, L., Mu, K. W., Arntfield, S. D. & Nickerson, M. T. (2017). Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54 (4): 1014-1022. doi: 10.1007/s13197-017-2519-6.
- Sikorski, Z. E., Pokerny, J. & Damodaran, S. (2007). Physical and Chemical Interactions of Components in Food Systems. I: Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fellows, P. J. (red.) *Fennema's Food Chemistry*, s. 849-883. Bosa Roca, United States: Taylor & Francis Inc.
- Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N. & Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, 54 (4): 858-870. doi: 10.1007/s13197-016-2391-9.
- Singh, S., Gamlath, S. & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 42 (8): 916-929. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x.
- Tharanathan, R. N. & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14 (12): 507-518. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.002>.
- Tulbek, M. (2014). *Pulse Flours as Functional Food Ingredients*. IUFOST annual conference, Montreal QC, Canada.
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y., Asavajaru, P. & Lam, A. (2017). Pea: A Sustainable Vegetable Protein Crop. I: Nadathur, S. R., Wanasundara, J. P. D. & Scanlin, L. (red.) *Sustainable Protein Sources*, s. 145-164. San Diego: Academic Press.
- UiO. (2018). *Nitrogenfiksering*: Universitetet i Oslo - Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/n/nitrogenfik.html> (lest 06.02.19).
- Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E. & Porres, J. (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56 (3): 283-294. doi: 10.1007/bf03179796.
- van der Ven, C., Matser, A. M. & van den Berg, R. W. (2005). Inactivation of Soybean Trypsin Inhibitors and Lipoxygenase by High-Pressure Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4): 1087-1092. doi: 10.1021/jf048577d.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Estrella, I., Gorospe, M. J., Ruiz, R. & Bacon, J. (1994). Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (10): 2291-2295. doi: 10.1021/jf00046a039.

- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sotomayor, C., Díaz, C., Fernandez, M. & Urbano, G. (1998). Nutrients and antinutritional factors in faba bean as affected by processing. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 207: 140-145. doi: 10.1007/s002170050308.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Hernández, A., Martín-Alvarez, P. J., Sierra, I., Rodríguez, C., Blazquez, I. & Vicente, G. (2003). Assessment of nutritional compounds and antinutritional factors in pea (*Pisum sativum*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (4): 298-306. doi: 10.1002/jsfa.1309.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, 9 (8): 328-335. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00059-4).
- Wang, N. & Daun, J. K. (2004). Effect of variety and crude protein content on nutrients and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (9): 1021-1029. doi: 10.1002/jsfa.1742.
- Wang, N., Hatcher, D. W., Tyler, R. T., Toews, R. & Gawalko, E. J. (2010). Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 43 (2): 589-594. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.012>.

Vedlegg

Oversikt over vedlegg

- Vedlegg 1:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ råstoff.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.
- Vedlegg 2:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ fraksjon.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.
- Vedlegg 3:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ luftklassifisering.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.
- Vedlegg 4:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ råstoff.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.
- Vedlegg 5:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ temperatur.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.
- Vedlegg 6:** Enveis ANOVA: fytinsyre ~ fuktighetsinnhold.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.
- Vedlegg 7:** Toveis ANOVA: fytinsyre ~ temperatur*fuktighetsinnhold.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.
- Vedlegg 8:** Enveis ANOVA: GOS ~ råstoff.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.
- Vedlegg 9:** Enveis ANOVA: GOS ~ luftklassifisering.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.
- Vedlegg 10:** Enveis ANOVA: GOS ~ råstoff.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.
- Vedlegg 11:** Enveis ANOVA: GOS ~ prosess.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

Vedlegg 1. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ råstoff.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Råstoff    1  2.903  2.9034   6.588 0.0132 *
Residuals 52 22.916  0.4407
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
B 1.317713 0.6958419     26
P 0.853640 0.6327749     28
```

Figur 1. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ råstoff (pea/bean). B = bean, P = pea.

Vedlegg 2. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ fraksjon.
 Data: fraksjoner av erter og fababønner.

```

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Fraksjon       2   3.03   1.5152   3.391 0.0414 *
Residuals     51  22.79   0.4468
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
D 1.1915802 0.6747585     24
H 0.4122941 0.1436032      6
W 1.1287818 0.7287213     24

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Quantile = 2.414
Minimum significant difference = 0.6588
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower   Center   Upper  Std.Err t value P(>t)
D-H  0.12052  0.77929  1.43806  0.27290   2.856 0.0168 *
D-W -0.59597  0.06280  0.72157  0.27290   0.230 0.9712
H-W -1.37526 -0.71649 -0.05772  0.27290  -2.625 0.0301 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

Figur 2. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ fraksjon (whole/dehulled/ hull), samt fra påfølgende Tukey test. D = dehulled, H = hull, W = whole.

Vedlegg 3. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ luftklassifisering.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.

```
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Luftklassifisering  1 18.122   18.122   228.2 1.45e-15 ***
Residuals          30  2.383    0.079
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
22 observations deleted due to missingness

      mean      sd data:n
C 0.520464 0.2993472     16
F 2.025558 0.2631279     16
```

Figur 3. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ luftklassifisering (coarse/fine). C = coarse, F = fine.

Vedlegg 4. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ råstoff.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Råstoff    1 11.241   11.241   308.7 <2e-16 ***
Residuals 59  2.149    0.036
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
F    2.935788 0.2065851     4
SPF  1.201587 0.1899512    57
```

Figur 4. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ råstoff (F/SPF). F betegner fiber (havrefiber), mens SPF betegner stivelse, protein og fiber (ekstruderte prøver og ikke-ekstrudert prøve).

Vedlegg 5. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ temperatur.
 Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

```

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Temperatur...C.  4 0.6118 0.15295    5.471 0.00103 **
Residuals       48 1.3418 0.02796
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

                mean      sd data:n
145.9 1.3818703 0.06105436      4
150   1.1564805 0.14049635     12
160   1.2420505 0.13095656     25
170   0.9736432 0.31420810      8
174.5 1.2378460 0.06013669      4

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Quantile = 2.8342
Minimum significant difference = 0.2593
95% confidence level

Linear Hypotheses:
                Lower      Center      Upper      Std.Err t value      P(>t)
145.9-150      -0.033869  0.225390  0.484648  0.091476    2.464 0.116218
145.9-160      -0.119439  0.139820  0.399078  0.091476    1.528 0.549532
145.9-170       0.148969  0.408227  0.667485  0.091476    4.463 0.000452 ***
145.9-174.5    -0.115234  0.144024  0.403283  0.091476    1.574 0.520643
150-160        -0.344828 -0.085570  0.173688  0.091476   -0.935 0.881649
150-170        -0.076421  0.182837  0.442096  0.091476    1.999 0.282190
150-174.5     -0.340624 -0.081365  0.177893  0.091476   -0.889 0.899408
160-170         0.009149  0.268407  0.527666  0.091476    2.934 0.039095 *
160-174.5     -0.255054  0.004204  0.263463  0.091476    0.046 0.999999
170-174.5     -0.523461 -0.264203 -0.004944  0.091476   -2.888 0.043814 *

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

WARNING: Unbalanced data may lead to poor estimates

Tukey's HSD
Alpha: 0.05

                Mean G1 G2
145.9 1.3818703  A
160   1.2420505  A
174.5 1.2378460  A
150   1.1564805  A B
170   0.9736432  B

```

Figur 5. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ ekstruderingsstemperatur, samt påfølgende Tukey test.

Vedlegg 6. Enveis ANOVA: fytinsyre ~ fuktighetsinnhold.
 Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

```

          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
MC....    4 0.7583  0.1896    7.612 0.0000782 ***
Residuals 48 1.1954  0.0249
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
11.2 1.1459026 0.09382930     4
12   1.1750361 0.13761157    12
14   1.2870397 0.11604114    27
16   0.9458099 0.29475400     8
16.8 1.0982227 0.04875269     2

```

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Quantile = 2.8342
 Minimum significant difference = 0.2822
 95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
11.2-12	-0.31135	-0.02913	0.25308	0.09958	-0.293	0.9983
11.2-14	-0.42335	-0.14114	0.14108	0.09958	-1.417	0.6197
11.2-16	-0.08212	0.20009	0.48231	0.09958	2.009	0.2771
11.2-16.8	-0.23453	0.04768	0.32989	0.09958	0.479	0.9889
12-14	-0.39422	-0.11200	0.17021	0.09958	-1.125	0.7927
12-16	-0.05299	0.22923	0.51144	0.09958	2.302	0.1620
12-16.8	-0.20540	0.07681	0.35903	0.09958	0.771	0.9376
14-16	0.05902	0.34123	0.62344	0.09958	3.427	0.0106 *
14-16.8	-0.09340	0.18882	0.47103	0.09958	1.896	0.3332
16-16.8	-0.43463	-0.15241	0.12980	0.09958	-1.531	0.5482

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

Tukey's HSD
 Alpha: 0.05

	Mean	G1	G2
14	1.2870397	A	
12	1.1750361	A	B
11.2	1.1459026	A	B
16.8	1.0982227	A	B
16	0.9458099		B

Figur 6. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ fuktighetsinnhold, samt påfølgende Tukey test. MC = fuktighetsinnhold.

Vedlegg 7. Toveis ANOVA: fytinsyre ~ temperatur* fuktighetsinnhold.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

Anova Table (Type II tests)

Response: Fytinsyre

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Temperatur...C.	0.15068	3	3.6103	0.0204389 *
MC....	0.29717	3	7.1200	0.0005315 ***
Temperatur...C.:MC....	0.43254	1	31.0904	0.000001412 ***
Residuals	0.61214	44		

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

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Quantile = 3.2607

Minimum significant difference = 0.2675

95% confidence level

Linear Hypotheses:

	Lower	Center	Upper	Std.Err	t value	P(>t)
160:11.2-150:12	-0.258384	0.009164	0.276712	0.082051	0.112	1.000000
160:11.2-170:12	-0.373276	-0.105728	0.161820	0.082051	-1.289	0.929430
160:11.2-145.9:14	-0.503516	-0.235968	0.031580	0.082051	-2.876	0.122873
160:11.2-160:14	-0.399077	-0.131529	0.136019	0.082051	-1.603	0.798004
160:11.2-174.5:14	-0.359491	-0.091943	0.175605	0.082051	-1.121	0.967849
160:11.2-150:16	-0.317609	-0.050061	0.217487	0.082051	-0.610	0.999460
160:11.2-170:16	0.182698	0.450246	0.717794	0.082051	5.487	0.0000625218 ***
160:11.2-160:16.8	-0.219868	0.047680	0.315228	0.082051	0.581	0.999623
150:12-170:12	-0.382439	-0.114891	0.152657	0.082051	-1.400	0.891725
150:12-145.9:14	-0.512679	-0.245131	0.022417	0.082051	-2.988	0.095848 .
150:12-160:14	-0.408241	-0.140693	0.126855	0.082051	-1.715	0.734466
150:12-174.5:14	-0.368655	-0.101107	0.166441	0.082051	-1.232	0.944648
150:12-150:16	-0.326773	-0.059225	0.208323	0.082051	-0.722	0.998193
150:12-170:16	0.173535	0.441083	0.708631	0.082051	5.376	0.0000903247 ***
150:12-160:16.8	-0.229032	0.038516	0.306064	0.082051	0.469	0.999924
170:12-145.9:14	-0.397788	-0.130240	0.137308	0.082051	-1.587	0.806340
170:12-160:14	-0.293350	-0.025802	0.241746	0.082051	-0.314	0.999997
170:12-174.5:14	-0.253764	0.013784	0.281332	0.082051	0.168	1.000000
170:12-150:16	-0.211881	0.055667	0.323215	0.082051	0.678	0.998837
170:12-170:16	0.288426	0.555974	0.823522	0.082051	6.776	0.0000008389 ***
170:12-160:16.8	-0.114140	0.153408	0.420956	0.082051	1.870	0.637111
145.9:14-160:14	-0.163110	0.104438	0.371986	0.082051	1.273	0.933927
145.9:14-174.5:14	-0.123524	0.144024	0.411572	0.082051	1.755	0.709780
145.9:14-150:16	-0.081641	0.185907	0.453455	0.082051	2.266	0.383996
145.9:14-170:16	0.418666	0.686214	0.953762	0.082051	8.363	0.0000000043 ***
145.9:14-160:16.8	0.016100	0.283648	0.551196	0.082051	3.457	0.030296 *
160:14-174.5:14	-0.227962	0.039586	0.307134	0.082051	0.482	0.999906

```

160:14-150:16      -0.186080  0.081468  0.349016  0.082051  0.993    0.984639
160:14-170:16      0.314228  0.581776  0.849324  0.082051  7.090 0.0000002919 ***
160:14-160:16.8    -0.088339  0.179209  0.446757  0.082051  2.184    0.433251
174.5:14-150:16    -0.225666  0.041882  0.309430  0.082051  0.510    0.999856
174.5:14-170:16    0.274642  0.542190  0.809738  0.082051  6.608 0.0000014757 ***
174.5:14-160:16.8 -0.127925  0.139623  0.407171  0.082051  1.702    0.742233
150:16-170:16      0.232760  0.500308  0.767855  0.082051  6.098 0.0000081960 ***
150:16-160:16.8    -0.169807  0.097741  0.365289  0.082051  1.191    0.954206
170:16-160:16.8    -0.670115 -0.402567 -0.135019  0.082051 -4.906    0.000415 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Tukey's HSD
Alpha: 0.05
      Mean G1 G2 G3
145.9:14 1.3818703 A
160:14   1.2774319 A B
170:12   1.2516303 A B
174.5:14 1.2378460 A B
150:16   1.1959637 A B
160:11.2 1.1459026 A B
150:12   1.1367389 A B
160:16.8 1.0982227 B
170:16   0.6956562 C

```

Figur 7. Output fra toveis ANOVA i R Commander, *fyttinsyre ~ ekstruderings Temperatur*fuktighetsinnhold*, samt påfølgende Tukey test. MC = fuktighetsinnhold.

Vedlegg 8. Enveis ANOVA: GOS ~ råstoff.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Råstoff    1  88.49   88.49   12.01 0.00185 **
Residuals 26 191.60    7.37
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
B 4.470029 1.628109     14
P 8.025451 3.476700     14
```

Figur 8. Output fra enveis ANOVA i R Commander, GOS ~ råstoff (pea/bean). B = bean, P = pea.

Vedlegg 9. Enveis ANOVA: GOS ~ luftklassifisering.
Data: fraksjoner av erter og fababønner.

```
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Luftklassifisering  1  90.31   90.31  11.56 0.00431 **
Residuals          14 109.37    7.81
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
C 4.682011 0.8893377      8
F 9.433472 3.8513318      8
```

Figur 9. Output fra enveis ANOVA i R Commander, GOS ~ luftklassifisering (coarse/fine). C = coarse, F = fine.

Vedlegg 10. Enveis ANOVA: GOS ~ råstoff.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Råstoff    1  15.26   15.26   515.4 <2e-16 ***
Residuals 24   0.71    0.03
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

          mean          sd data:n
F    0.9102238 0.03358043      2
SPF  3.7847801 0.17560076     24
```

Figur 10. Output fra enveis ANOVA i R Commander, GOS ~ råstoff. F betegner fiber (havrefiber), mens SPF betegner stivelse, protein og fiber (ekstruderte prøver og ikke-ekstrudert prøve).

Vedlegg 11. Enveis ANOVA: GOS ~ prosess.
Data: ekstruderte produkter og uprosesserte ingredienser.

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Prosess    1 0.2081 0.20814    9.138 0.00625 **
Residuals 22 0.5011 0.02278
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
E 3.812859 0.15379621    22
NE 3.475915 0.06603161     2
```

Figur 11. Output fra enveis ANOVA i R Commannder, $GOS \sim prosess$ (extruded/non-extruded). E = extruded (ekstruderte prøver). NE = non-extruded (ikke-ekstrudert prøve).



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway