



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
Hilde Marit Østlie

Fermentering med melkesyrebakterier av norskproduserte belgfrukter, og effekt på fytinsyreinnhold

Fermentation with lactic acid bacteria of Norwegian
legumes, and effect on phytic acid content

Lucy Qiu

Matvitenskap – Produksjon og produktutvikling

Forord

Denne oppgaven ble gjennomført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) våren 2020, som en del av det større prosjektet FoodProFuture. Takk til Anne Kjersti Uhlen for samarbeidet i dette prosjektet.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Hilde Marit Østlie, for god veiledning, planlegging, oppfølging og oppmuntring for masteroppgaven og under dette utfordrende semesteret, samt takk til medveileder Tove Gulbrandsen Devold for gode innspill og hjelp på laboratoriet underveis i forsøket.

Takk til May Aalberg og Ahmed Abdelghani for god hjelp på laboratoriet og at de har vært tilgjengelige til å besvare alt jeg måttet lure på. Ikke minst vil jeg takke Kari Olsen for praktisk gjennomføring av kromatografianalyse av mine prøver.

Til slutt vil jeg rette en takk til familien min og medstudenter for utrolig god støtte, samhold og oppmuntring gjennom mastergradarbeidet, og vært med på å skape den fine studietiden jeg har fått ved NMBU.

Ås, juli 2020

Lucy Qiu

Sammendrag

Belgfrukter har vært en essensiell del av menneskets kosthold i århundrer som en god kilde til energi og næringsstoffer. Det har likevel vært en lite effektiv utnyttelse av planteproteiner fra belgfrukter i moderne tid med en raskt voksende befolkning som krever mer proteinrik mat. Mye av dagens planteproteiner blir brukt til dyrefôr for å kunne produsere mer animalske produkter, som er en mindre bærekraftig matproduksjon.

Ved bruk av ulike prosesseringsmetoder kan man modifisere næringsinnholdet i plantebaserte proteinkilder, forbedre utnyttelse av næringsinnholdet, og hjelpe mot underernæring i utviklingsland. Fermentering er en prosesseringsmetode som beriker produktet med smakskomponenter, konserverer næringsinnholdet, gir økt holdbarhet, matsikkerhet og fordøyelighet. Det har også blitt vist at melkesyrebakterier kan utføre degradering av antinæringsstoffer i plantevekster. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke fermentering med melkesyrebakterier som en prosesseringssteknikk i erter og fababønner. Det ble også undersøkt påvirkning av fermenteringsprosessen på antinæringsstoffet fytinsyre. Det ble utført analyser av pH, bakterievekst, organiske syrer, karbohydrater og fytinsyreinnhold i varmebehandlede melblandinger (10 %) før (0 timer) og etter 48 timer fermentering med melkesyrebakterier (30 °C).

Resultatene viste god vekst av *Leuconostoc pseudomesenteroides* 107 og *Lactobacillus fermentum* 314 i både erte- og fababønnemel. Det ble observert mest reduksjon av pH i prøver av Astronoute ertemel (1,84 - 1,90 pH-enheter), og samtidig mest økning i bakterievekst (3,56 - 4,04 log cfu/g). Melkesyre- og eddiksyreproduksjonen var høyere i ertemel enn fababønnemel etter fermentering. Alle prøver tilsatt *L. pseudomesenteroides* 107 omsatte 100 % av sitronsyreinnholdet, mens det var ingen endring av sitronsyreinnhold etter fermentering i prøver tilsatt *Lb. fermentum* 314. Effekten av fermentering hadde ingen merkbar forskjell mellom melkesyrebakteriene som ble brukt, utenom omsetning av sitrat. Glukose ble mest omsatt av melkesyrebakteriene under fermentering (82 - 100 %), etterfulgt av maltose (77 - 100 %) og fruktose (44 - 60 %). Det ble observert en liten reduksjon av fytinsyreinnholdet i noen prøver, men fermentering ble ikke vist å ha signifikant effekt på fytinsyreinnholdet. Prøver av fababønnemel viste et høyere fytinsyreinnhold enn prøver av ertemel, som hadde korrelasjon med et høyere proteininnhold i fababønner enn i erter.

Abstract

Legumes have been an essential part of human diet for centuries as a good source of energy and nutrients. Nevertheless, there has been an ineffective utilization of legume plant proteins in modern times with a rapidly growing population that requires more protein-rich food. Most of today's plant proteins are used in animal feed to produce more animal products, which is a less sustainable food production.

By using different processing methods, the nutritional content of plant-based protein sources can be modified, improve utilization of the nutritional content, and help against malnutrition in developing countries. Fermentation is a processing method that enriches the product with flavour components, preserves its nutritional content, increases durability, food safety and digestibility. It has also been shown that lactic acid bacteria can degrade anti-nutrients in legumes. The aim of the thesis was to investigate lactic acid bacteria fermentation in peas and faba beans. The influence of fermentation on the anti-nutrition phytic acid was also investigated. Analyses of pH, bacterial growth, organic acid, carbohydrates and phytic acid content were performed before (0 hours) and after 48 hours of fermentation with lactic acid bacteria (30 °C) in heat-treated flour mixtures (10 %).

The results showed good growth of *Leuconostoc pseudomesenteroides* 107 and *Lactobacillus fermentum* 314 in both pea and faba bean flour mixture. Most reduction of pH was observed in samples of Astronaute pea flour (1,84 - 1,90 pH units), and Astronaute pea flour had the most increase in bacterial growth (3,56 - 4,04 log cfu/g). Production of lactic acid and acetic acid was higher in pea flour than faba bean flour after fermentation. All samples with added *L. pseudomesenteroides* 107 showed 100 % degradation of the citric acid content after fermentation, while there was no change in samples added *Lb. fermentum* 314. The effect of fermentation had no noticeable difference between the lactic acid bacteria used, except the degradation of citrate. Glucose was most converted by lactic acid bacteria during fermentation (82 - 100 %), followed by maltose (77 - 100 %) and fructose (44 - 60 %). A slight reduction of phytic acid content was observed in some samples, but fermentation did not exhibit significant effect on the content of phytic acid. Samples of faba bean flour showed a higher phytic acid content than in samples of pea flour, which was correlated with a higher protein content in faba bean than in peas.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1 Innledning	1
1.1 Hensikt med oppgaven	3
2 Teori	5
2.1 Belgvekster i Norge	5
2.2 Erter	7
2.3 Fababønner	9
2.4 Antinæringsstoffer i belgvekster	10
2.4.1 Fytinsyre	10
2.4.2 Tanniner	11
2.4.3 Vicin og convicin	11
2.4.4 Oligosakkarider	12
2.4.5 Protease-inhibitorer	13
2.5 Fermentering med melkesyrebakterier	13
2.6 Effekt av prosessering på næringsinnholdet i erter og bønner	18
3 Materialer og metoder	21
3.1 Preparering av prøvemateriale	21
3.2 Uttesting av blandingsforhold og varmebehandling	21
3.3 Analyse av pH	22
3.4 Vekstmedier	22
3.5 Innledende forsøk	23
3.5.1 Melkesyrebakterier	24
3.5.2 pH måling i innledende forsøk	24
3.6 Vekst- og metabolismeforsøk	25
3.6.1 Frysestock-løsning av bakteriestammene	26
3.6.2 Tillaging av prøver, varmebehandling og poding	26
3.6.3 Analyse av mikrobiell vekst	27
3.7 Analyse av organiske syrer og karbohydrater - HPLC	29
3.8 Analyse av tørrstoff	30
3.9 Frysetørking	30

3.10	Analyse av fytinsyre	31
4	Resultater	34
4.1	Innledende forsøk.....	34
4.2	Hovedforsøk.....	40
4.2.1	Mikrobiell vekst	40
4.2.2	pH	41
4.2.3	Organiske syrer og karbohydrater ved bruk av HPLC	44
4.2.4	Tørrstoff.....	49
4.2.5	Fytinsyreinnhold.....	50
5	Diskusjon	52
5.1	Effekt av fermentering ved vekstforsøk	52
5.1.1	pH og celletall	53
5.1.2	Organiske syrer og karbohydrater	54
5.2	Fytinsyreinnhold	56
5.3	Praktiske hensyn.....	58
5.4	Oppsummering og konklusjon.....	59
6	Til ettertanke og videre forskning	60
7	Referanseliste	62
	Vedlegg 1	68
	Vedlegg 2	68
	Vedlegg 3	69
	Vedlegg 4	69
	Vedlegg 5	70
	Vedlegg 6	70
	Vedlegg 7	71
	Vedlegg 8	71
	Vedlegg 9	72
	Vedlegg 10	72
	Vedlegg 11	73
	Vedlegg 12	73
	Vedlegg 13	74

1 Innledning

Korn, grønnsaker og belgfrukter har vært en essensiell del av menneskets kosthold i århundrer og vært en god kilde til energi og næringsstoffer. Planteproteiner har likevel blitt mindre utnyttet til konvensjonell mat i moderne tid, og heller blitt brukt til produksjon av dyrefôr for å kunne produsere mer animalske produkter i form av kjøtt, fisk, egg og melk. Spesielt utnyttelsen av belgfrukter har vært lav, til tross for deres veldig næringsrike og helsefremmende egenskaper. De har høyt innhold av protein og mineraler, høyt fiberinnhold, et lavt fettinnhold og ikke kolesterol.

Den globale matsikkerhet burde sette større fokus på plantevitenskap, avlingsforbedring og produksjonsagronomi av korn og belgfrukter for å rette fokus mot en mer bærekraftig matproduksjon fremover. Korn har igjennom mange år hatt stort fokus på genetisk forbedring og klimatilpasning, mens belgfrukter har hatt lite forskning sammenlignet. I 2016 ble det erklært «det internasjonale året for belgvekster» av FNs organisasjon for ernæring og jordbruk (FAO). Med fokus på bidrag fra belgfrukter til bærekraftig matproduksjon og kostholdsmangfold for å utrydde sult og underernæring på verdensbasis. Dette initiativet skulle bidra med å fremme verdien og utnyttelsen av belgvekster i hele matsystemet og øke bevisstheten av fordelene deres (Rawal & Navarro, 2019).

Høyere produksjon av belgfrukter i Norge er positivt hvis det kan erstatte importen av soyabønner og andre mindre bærekraftige proteinkilder til fôr for husdyr og produksjon av animalske produkter. Det kan også være en bra matkilde, som vil gjøre Norge mer selvforsynte og skape en grønnere produksjon og føre til verdiskapning i både landbruk og i matindustrien. Redusert produksjon av animalske produkter vil frigjøre store landarealer som kan utnyttes til dyrking av mat fremfor fôr (Day, 2013). I tillegg kreves det ca. hundre ganger mer ferskvann ved produksjon av animalske produkter enn ved produksjon av matplanter og planteproteiner (Pimentel & Pimentel, 2003).

Utnyttelsen av plantebaserte proteiner har stort forbedringspotensiale. Dette er noe som forskes på i prosjektet «FoodProFuture: Innovative and sustainable exploitation of plant proteins in future foods», finansiert av Norge Forskningsråd gjennom programmet BIONÆR. De viktigste målene er å bidra til økt kunnskap om dyrking av norske proteinrike planter, og få dem i produksjon som kjøtterstatningsprodukter. Råvarene som fokuseres mest på er

belgfrukter som erter og fababønner, og havre. I tillegg skal det også forskes på restråstoffer fra potet-, korn- og planteoljeproduksjon (Mittenzwei et al., 2017).

En av utfordringene til belgfrukter er om de kan tilpasses vekstforholdene i det norske klimaet. Spesifikt for erter vil være legde ved modning. Legde vil si at erteplanten legger seg ned ved modning og det kan føre til vanskeligere forhold ved tresking og dryssing. For åkerbønner er modningstiden senere enn andre korn- og belgfruktsorter, som kan gi mindre utbytte ved høsting og negativ påvirkning på kvalitet. Det har blitt gjort sortforsøk for å finne de sortene som kan gi størst og best avling i Norge. Sortforsøket ble gjort i regi av prosjektet FoodProFuture i 2017, der feltforsøkene ble anlagt på NMBU på Ås, og på NIBIO Apelsvoll på Toten for ulike typer gule og grønne erter. I 2015 – 2107 ble det gjort et sortforsøk i åkerbønne i regi av KornFUTH, i Norsk Landbruksrådgiving (NLR) Øst Østfold, NLR Øst Romerike og NLR Viken. Noen av sortene ble dyrket i et nytt forsøk i regi av FoodProFuture (Abrahamsen et al., 2018). Det skal i denne oppgaven jobbes med noen utvalgte sorter fra dette sortforsøket.

Belgfrukter er en hovedkilde til protein og karbohydrater i mange land, men likevel har det blitt rapportert at utnyttelsen av næringsstoffene blir begrenset på grunn av tilstedeværelsen av visse antinæringsstoffer. Blant disse er fytinsyre, tanniner, polyfenoler og flere enzymhemmere mot trypsin, chymotrypsin og α -amylase (Alonso et al., 1998). Antinæringsstoffene finnes i ulike mengder i belgfrukter og andre plantevekster der de er tilstede som forsvarsmekanisme mot insekter og patogener, fungerer som et reservelager og gir ulike fysiologiske effekter (Van der Poel, 1990). Det er ikke nødvendigvis kun negative helseeffekter for mennesker å konsumere noe antinæringsstoffer. Det har blitt rapportert av Shahidi (1997) at i noen tilfeller kan noen antinæringsstoffer gi gunstige helseeffekter ved inntak av lave konsentrasjoner. Å kunne bruke riktige prosesssteknikker vil være nødvendig for å fjerne eller redusere visse uønskede komponenter (Rehman & Shah, 2005).

1.1 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven er skrevet som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture, der målet er å forbedre utnyttelsen av norske belgfrukter og proteinvekster som erter, åkerbønner, edamamebønner og ulike kornsorter. Det er ønskelig å øke produksjonen av plantevekster, gi mer selvforsyning i landet og skape mer bærekraftig mat, da det blir stadig høyere fokus på plantebaserte produkter i Norge og globalt, som erstatning for kjøttprodukter. Det forskes også på ulike prosesseringsmetoder som ekstrudering, spiring og fraksjonering, for å undersøke påvirkning på antinæringsstoffer og hvordan optimalisere utnyttelsen av næringsstoffene til norske planteressurser og gjøre plante proteiner mer tilgjengelig.

Fermentering er en gammel prosesseringsteknikk brukt i mange ulike matproduksjoner, spesielt til meieriprodukter, alkoholholdige drikkevarer, gjærbakst og grønnsaker. Hensikten med fermentering er først og fremst rettet mot en forbedret holdbarhet og skape et trygt matprodukt, men ble også videreutviklet for å gi ny smaksprofil, forbedret konsistens og tilføre funksjonelle egenskaper til ulike produkter. Etter grundigere forskning ser man at fermenterte produkter har positiv effekt på fordøyelsessystemet, næringsmiddeloptaket og andre helsefremmende effekter (Steinkraus, 1995).

I de siste årene har det blitt en moderne trend å fokusere på fermentering. Forbrukere i den vestlige verdensdelen har vist større etterspørsel etter ulike fermenterte produkter. Dette er grunnet forbrukere som krever naturlige produkter som gir ekstra helsemessige fordeler. Fermentering blir sett på som en naturlig og ren type prosessering av mat, der forbrukere forventer et rent produkt uten syntetiske tilsetningsstoffer og ytterligere konserveringsmidler. Det har også blitt undersøkt at den yngre generasjonen liker å utforske nye og uvanlige smaker og matopplevelser. Dette gir stort potensiale for utvikling av flere fermenterte mat- og drikkevarer (Askew, 2019).

Hensikten med denne oppgaven har som hovedfokus å se på vekst og metabolisme av melkesyrebakterier i erter og fababønner. For å se på fermentering som en prosesseringsteknikk av erter og fababønner, med mulige positive påvirkninger og forbedret utnyttelse av næringsstoffene. Det ble også undersøkt om fermentering vil ha en effekt på innholdet av antinæringsstoffer hos både erter og fababønner. En reduksjon av

antinæringsstoffer vil være nyttig for utnyttelsen av de gode næringsstoffene i planteråstoffet.

Ulike stammer av melkesyrebakterier og deres fermenteringseffekt i utvalgte erter og fababønner ble undersøkt, og det ble gjort analyser av fytinsyre som et av antinæringsstoffene. Det var ønskelig å undersøke om det ga en nedgang i fytinsyreinnhold og det ble analysert ved hjelp av kit utviklet av Megazyme. Noe av hensikten var å teste om fermentering som prosesseringsmetode kan gi en forbedret melkvalitet av erter og fababønner.

2 Teori

Erteblomstfamilien *Fabaceae*, er en stor og viktig del av landbruket ved siden av kornproduksjon. *Fabaceae* dekker en rekke belgvekster som brukes som mat og i kraftfôr. Belgfrukter inkluderer erter, bønner, linser og lupiner. De er kjent for å ha en høy proteinkonsentrasjon i frøene (20-40 %), er nitrogen-fikserende, og mange av artene er tilpasset ulike dyrkingsmiljø. De blir ofte brukt i rotasjonsjordbruk mellom skift med kornarter (Aykroyd et al., 1982). Sortene som blir produsert i størst mengde på verdensbasis er soyabønner og peanøtter, som utgjør henholdsvis 50 % og 16 % av belgfrukter dyrket globalt. De er først og fremst mest brukt til planteoljeproduksjon, men også som kraftfôr eller mat da de har et høyt innhold av protein og kostfiber (Hulse, 1994). Belgfrukter har også blitt brukt til produksjon av glutenfrie produkter som muffins og spiselig matemballasje ved bruk av proteinisolater og stivelse fra kindeybønner, erter og amaranth (Shevkani & Singh, 2014; Shevkani & Singh, 2015).

2.1 Belgvekster i Norge

Det har vært i liten grad konvensjonell dyrking av erter og åkerbønner i Norge, men interessen for disse vekstene har vært økende. Man ser det er økende etterspørsel etter norske produkter i butikk.

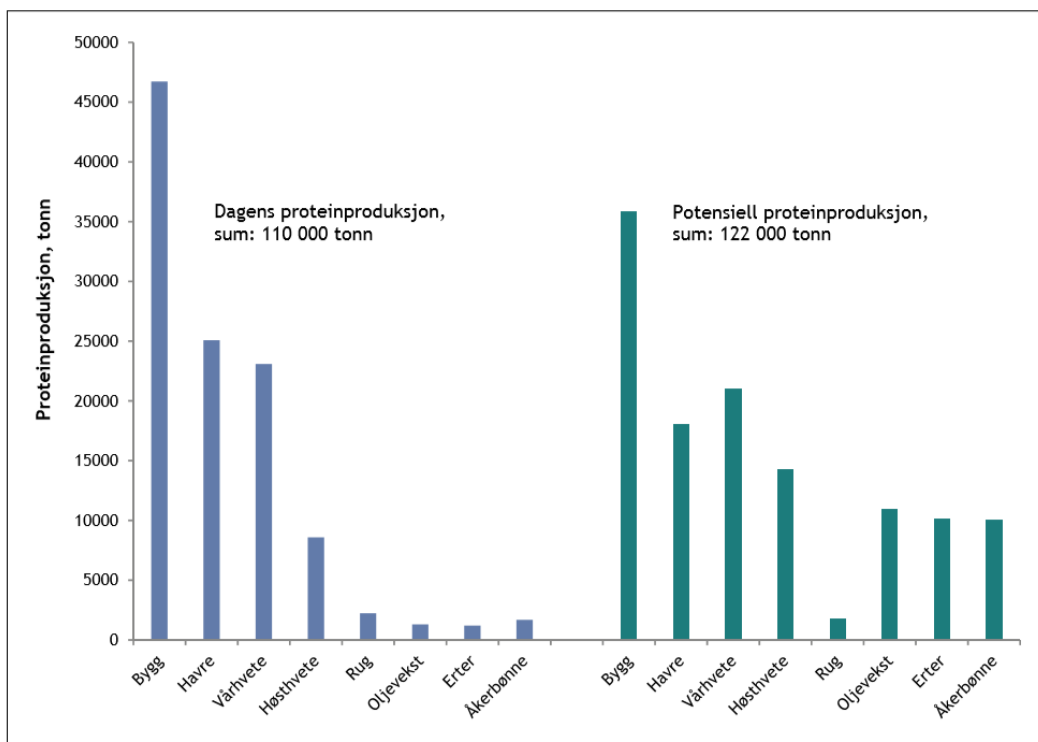
Erter og fababønner er ettårige kjernebelgvekster og tilhører erteblomstfamilien, *Fabaceae*. De kjennetegnes av at plantene lever i symbiose med nitrogenfikserende bakterier som danner knoller på røttene, noe som gjør dem selvforsynt med nitrogen. Selekterte sorter av erter og fababønner er avlet frem slik at belgene holder på frøene i overmoden tilstand, i motsetning til villsorter som åpner belgen og slipper frøene ut ved modning (Frøseth, 2009).

Den nordlige grensen for dyrking av belgvekster inkluderer Norge. Både erter og fababønner krever god varme gjennom vekstsesongen, dermed blir valg av sorter avhengig av klima.

Erter er egnet for dyrking over store deler av Østlandet og Trøndelag. Fababønner som krever senere modningstid bør dyrkes i de beste klimatiske områdene på Sør- og Østlandet. Jordarealet for mest optimalisert frøvekst med et høyt proteininnhold bør ha generelt god drenering, ha en pH over 6,0 og lite kveke (Frøseth, 2009).

Erter og fababønner kan regnes som nærrende vekster. Grunnet symbiosen med nitrogenfikserende bakterier forbedrer de jordkvaliteten, noe som gir positiv avlingseffekt på etterfølgende vekster på samme areal. Hvis det ikke har vært dyrket erter eller fababønner på arealet er det anbefalt å smitte frøene med bakteriekultur *Rhizobium leguminosarum* ved første gangs såing (Frøseth, 2017).

Arealet for dyrking av belgfrukter kan økes betraktelig i Norge. Det er ikke anbefalt å rendyrke erter og fababønner på samme skifte oftere enn hvert sjette år, med sirkulering av arter på samme areal. Det er anbefalt å la det gå minst to år mellom erter og oljevekster (raps) på samme skiftet. Ertevisnesyke, vekstfølgesykdommer og andre soppsykdommer er årsaker for å ikke anbefale rendyrking av belgfrukter i flere år på samme arealet, noe som kan være tærende for dyrking av rotvekster, poteter og korn ved neste skifte. Samdyrking av belgvekster og korn gir flere fordeler, blant annet høyere totalavling, bedre konkurransevne mot ugress, mindre legde hos erter og høyere proteininnhold for samtlige arter.



Figur 1: Produksjon av protein på kornarealene i tonn, ved dagens produksjon, og ved en potensiell høy andel av proteinvekster. Tallene er basert på gjennomsnittlig avling fra kornartene (SSB), og forventa avling for olje- og belgvekstene, likeså forventa proteininnhold i de ulike artene. Hentet fra: Abrahamsen et al. (2019).

Norske planteproteiner brukes i dag hovedsakelig til kraftfôr. Størst andel hvete og litt av havre- og byggproduksjonen går i dag til mat. Proteinene produseres mest fra kornartene, mens litt under 4 % er produsert av olje- og belgvekster. Hvis det iverksettes høyere produksjon av olje- og belgvekster kan potensielt proteinproduksjonen fra olje- og belgvekster øke til rundt 25 %. Figur 1 sammenligner nåværende proteinproduksjon med en potensiell proteinproduksjon i nærmere fremtid (Abrahamsen et al., 2019).

2.2 Erter

Erter er ettårige planter med hvite eller violet-fargede blomster, og gir grønne eller gule frø. Erter inneholder et høyt nivå av protein og karbohydrater, en relativt høy konsentrasjon av kostfiber og et lavt innhold av fett. Protein fra erter er både næringsrikt for mennesker og husdyr, og mengdene kan variere etter påvirkning av dyrkningsområdet og av generiske faktorer. Gjennomsnittlig inneholder erter 22-25 % protein. Hovedsakelig består erterprotein av lagringsproteiner og globuliner. Fra en sammenligning med andre belgvekster viste de relativt likt innhold av aminosyrene glutamin, asparaginsyre, arginin og lysin. Erter viste en høyere konsentrasjon av arginin, valin og metionin enn hos soyabønner og lupiner. Innholdet av glutaminsyre og cystein er betydelig lavere enn hos soyabønner og lupiner (Dahl et al., 2012). Erter sammenlignet med hvete gir en høyere konsentrasjon av aminosyrene arginin, lysin og asparaginsyre. I forhold til melk og andre animalske proteinkilder viser erter høyere innhold av aminosyren arginin, og tilsvarende eller høyere innhold av aminosyrene valin, glutamin og glycin (Sosulski & Imafidon, 1990).

Stivelse og fiber er hovedkomponentene i erter og utgjør gjennomsnittlig henholdsvis 46 % og 20 % av frøets tørrstoff. Fraksjoner av stivelse kan videre kategoriseres som langsomt-fordøyelig, rask-fordøyelig og resistent stivelse (Day, 2013). Ertestivelse har høyere nivå av amylose enn andre kornsorter og rotgrønnsaker, noe som gir de unike funksjonaliteter og høye nivåer av enzymresistent stivelse og langsomt-fordøyelig stivelse. Egenskapene til ertens stivelse og fiber gjør at det klassifiseres som mat med lav glykemisk indeks, og bidrar til forebygging av diabetes type 2. I tillegg kan fiber redusere kolesterolet i blodet ved å redusere reabsorpsjon av gallesyre (Dahl et al., 2012).

Erter er også en flott kilde til mineraler og vitaminer. Sammenlignet med andre typer kornsorter, inneholder erter et høyere nivå av kalsium, magnesium, fosfor, jern, sink og kobber. Og i tillegg er erter en god kilde til folsyre, som har stor betydning for blant annet normal celledeling (Tulbek et al., 2017).

Canada er en av de største produsentene og eksportør av erter i verden. Forskning fra Canada har vist at dyrking av erter krevde mindre energitilførsel, halvparten av det som krevdes for dyrking av vårhvete. Med andre ord ga erter dobbelt så høyt utbytte ved bruk av samme energi-, vann- og gjødselstilførsel. Erteplanten ga også næringsrik jord og en forbedret jordkvalitet. Det ble vist i samme forskning at dyrking av vårhvete krevde 8 % mindre energibruk i jord etter skifte fra erteplanter enn etter skifte fra andre kornsorter (Tulbek et al., 2017). Dette er grunnet erteplantenes evne til å leve i symbiose med nitrogenfikserende bakterier på plantens rotknoller som omdanner nitrogen fra atmosfæren til ammoniakk.

Sortforsøket til FoodProFuture (Abrahamsen et al., 2018) ble utført på et feltanlegg på NMBU på Ås, og et feltanlegg på NIBIO Apelsvoll på Toten. Derfra ble det valgt ut ertesortene Astronaute (engelsk, RAGT) og Ingrid (svensk, SW) som ble brukt i denne oppgaven. Astronaute var blant de sortene som ga størst avling og hadde et høyt proteininnhold, med 3 % høyere enn Ingrid. Kombinert med høy avling gir Astronaute størst proteinavling per dekar. Gjennomsnittlig 41 kg mer protein per dekar enn Ingrid i dette sortforsøket. Ingrid var blant de sortene som ga tettest plantebestand og dekket godt tidlig i vekstsesongen, noe som er positivt i konkurranse mot ugress. Ingrid har også høy tusenfrøvekt og store frø.

2.3 Fababønner

Fababønne, *Vicia faba* L., er i likhet med erter en belgfrukt som tilhører *Fabaceae* familien. Fababønner er svært utbredt med godt over 16.000 arter som er dyrket i store deler av verden. Det er også tilpasset den nordlige halvkule, men er mest dyrket til proteinrikt fôr til våre husdyr her i Norge (Abrahamsen et al., 2018). På grunn av deres høye ernæringsverdier innen protein, komplekse karbohydrater, B-vitaminer og mineraler gjør det fababønner til en av de viktigste belgvekstene på verdensbasis. De siste årene har kultivering av fababønner fått stor oppmerksomhet og økt produksjon både i USA, Canada og Europa (Etemadi et al., 2019).

Proteinkonsentrasjonen hos fababønner er en av de høyeste blant belgvekter, men kan variere stort mellom ulike genotyper (19-39 %). Gjennomsnittlig er proteininnholdet på 27 %. Lagringsproteinene består hovedsakelig av globulin (80 %), som kan deles inn i vicilin-type (7S) og legumin-type (11S). Forholdet mellom disse to typene globulin-protein kan påvirke termiske egenskaper, egenskaper til å binde smaks- og aromaforbindelser under varierende pH-betingelser og emulgeringsevne (Warsame et al., 2018).

Fababønner har lavt innhold av essensielle svovelholdige aminosyrer (metionin og cystein) og tryptofan. Innholdet av lysin er mye høyere hos fababønner enn hos visse kornsorter. Bruk av dette høye lysininnholdet hos fababønner kan bidra med supplementært protein til kornbaserte dietter som er kjent for å være mangelfulle for lysin (Alghamdi, 2009). Fettinnholdet er lavt (1-3 %), og fababønner som andre typiske belgfrukter inneholder mest karbohydrater (60-65 %) hovedsakelig i form av stivelse (Day, 2013).

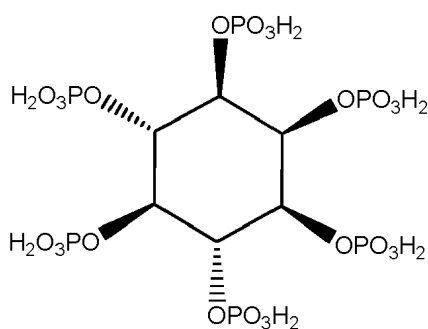
Ved sortforsøket til FoodProFuture (Abrahamsen et al., 2018), ble sortene Sampo fra Finland, og Vertigo fra Tyskland, valgt til bruk i denne oppgaven. Sampo er en tidlig type, er mer kortvokst og gir dårligere dekke mot ugress enn andre sorter. Den viste å ha noe lavere proteininnhold enn andre sorter, rundt 27 % protein, men likevel gi høyere avling enn andre sorter. Frøstørrelsen er relativ små, og Sampo har lav tusenfrøvekt. Vertigo har derimot svært store frø, noe som kan være problematisk ved utmating av såfrø, og også ved tresking. Vertigo har et gjennomsnittlig proteininnhold på rundt 28-29 %, og er en sein type.

2.4 Antinæringsstoffer i belgvekster

I planter syntetiseres en rekke forbindelser med både lav og høy molekylvekt. Disse sekundære metabolittene er til for å forsvare planten mot planteetere, insekter, patogener og virke som ekstra opplagsnæring ved ugunstige vekstforhold. Mange av disse forbindelsene merkes som antinæringsstoffer i humant kosthold. Antinæringsstoffer som finnes i erter og fababønner inkluderer α -galaktosider, fytinsyre, polyfenoler, lektiner, protease-inhibitorer og tanniner (Khokhar & Apenten, 2003).

2.4.1 Fytinsyre

Fytinsyre er en myo-inositol heksafosforsyre, og er en hoved fosforlangringskilde i plantevev. Den utgjør 60-90 % av plantevevs fosforinnhold. Det har blitt vist høyt konsentrasjon av fytinsyre i kimbladet (kotyledon) som omfavner frøet før og under spiring. Delvis finnes den også i frøskallet med fiber. I frø av belgvekster er fytat hovedsakelig lokalisert i lagringsprotein i endospermen (Tulbek et al., 2017). Fytinsyreinnhold hos fababønner varierer fra 0,71 – 1,15 %, og fra 0,75 – 0,94 % hos erter (Carnovale et al., 1988). Ved figur 2 er strukturen til fytinsyre fremstilt. Fytinsyre består av seks hydroksylgrupper der hver av de er bundet til fosfat.



Figur 2: Kjemiske struktur til fytinsyre. Hentet 02.06.20 fra Google patents: <https://patents.google.com/patent/EP3162376A1/en>

Det har blitt rapportert en negativ korrelasjon mellom fytinsyreinnhold og *in vitro* proteinfordøyelse (Carnovale et al., 1988). Fytater, salter av fytinsyre, binder seg til mineraler, proteiner og stivelse i magesekken og danne uløselige komplekser. Mineraler og sporstoffer som kalsium, magnesium, jern, kobber og sink har blitt påvist hindret absorpsjon hos mennesker. Dette fører til redusert biotilgjengelighet, redusert proteinfordøyelighet og

vil virke som en metal-chelaterende antioksidant. Fordi fosfor bundet i form av fytinsyre er utilgjengelig for absorpsjon av mennesker og andre enmagede dyr som har mangel på endogene fytaser nødvendig for defosforylering av fytinsyre, regnes det som et antinæringsstoff. Ved høyt inntak av fytinsyre over lengre tid kan det føre til mangel på de essensielle næringsstoffene (Multari et al., 2015).

De mest brukte prosesseringene for fjerning eller inaktivering av fytinsyre er bløtlegging, vanlig varmetilberedning, høytrykk-koking, spiring og fermentering. Det har blitt rapportert en signifikant reduksjon av fytinsyre ved bruk av disse prosesseringsmetodene på fababønner (Bishnoi et al., 1994).

2.4.2 Tanniner

Tanniner er polyfenoler funnet hos mange plantebaserte matvarer inkludert belgfrukter, frukt, korn, te og kakao. Tanniner er ansvarlig for fargepigmenter funnet i frøskallet, blader, røtter, frukt og bær. Erter med fargete blomster har ofte frø med høyere tannininnhold enn erter med hvite blomster (Tulbek et al., 2017).

Tanniner gir en bitter smak, fordi de virker som et «anti-beitestoff» og skal beskytte plantevekster mot nedbrytning av sopp og bakterier. Den bitre smaken kommer av at tanniner binder seg til proteiner, også proteinene i spytt (mucin, histatin), og denne reaksjonen gir en snerpet og tørr smak i munnen ved inntak av tanninrik mat (Aarnes, 2020b).

Tanniner binder seg til proteiner og mineraler, som gjør at det blir redusert biotilgjengelighet, de inhiberer trypsin, alfa-amylase og lipaseenzymer. Det har blitt vist av Crépon et al. (2010) at fababønner med lavt innhold av tanniner gir mer protein og stivelse, og mindre kostfiber, enn hos fababønner med høyt innhold av tanniner. Det er mulig å inaktivere tanninene delvis, ved bløtlegging, avskalling og varmebehandling.

2.4.3 Vicin og convicin

Hos fababønner er det et høyt innhold av to glykosider, vicin og convicin, som genererer redoks-aglykonene divicin (2,6-diamino-4,5-dihydroxypyrimidin) og isouramil (6-amino-2,4,5-

trihydroksypyrimidin) ved hydrolyse av beta-glukosidbindingen mellom glukose og hydroksylgruppen ved C-5 på pyrimidinringen. Det er mennesker med glukose-6-fosfat dehydrogenase-defekt (G6PD-defekt) som påvirkes av disse antinæringsstoffene (Pulkkinen, 2019).

Fababønner inneholder beta-glukosidase som kan splitte beta-glukosidbindinger hos både vicin og convicin. Men nivået og aktiviteten av beta-glukosidase enzymet er generelt lavt, det når en topp ved modning av frø og får en nedgang hos eldre frø eller hos frø som lagres. Dette enzymet kan i en viss grad inaktiveres ved koking og frøtørking. Det kan også inaktiveres med syre, som saltsyre ved en konsentrasjon lignende styrken på magesaft hos et normalt, voksent menneske.

Ved inntak av hydrolysert vicin og convicin hos mennesker med G6PD-defekt kan det gi akutt hemolyse, det vil si at røde blodceller vil brytes ned innen 24 - 36 timer etter inntak av fababønner, også kalt favisme. Det kan påvirke og ødelegge opptil 80 % av røde blodceller i det sirkulerende system, og er i verste fall dødelig. Normalt er favisme godartet og krever ikke blodtransfusjon. Det er ingen medisinsk kur mot det, annet enn med rask blodtransfusjon (Crépon et al., 2010).

2.4.4 Oligosakkarider

Karbohydrater deles inn i kategorier etter deres størrelse. Oligosakkarider består av 3 - 10 monosakkarider bundet sammen med glykosidiske bindinger. Hos mennesker er det mangel på enzymet alfa-galaktosidase som er nødvendig for spalting av oligosakkarider i fordøyelsessystemet. De blir brutt ned av tarmbakterier i tykktarmen og danner metan, hydrogen og karbondioksid og kan gi mye flatulens og ubehag (Aarnes, 2020a).

Oligosakkarider, inkludert raffinose, starchyose, sukrose og verbascose er ofte funnet i belgfrukter. De kan også gi en positiv effekt til tross for at oligosakkarider ikke er fordøyelig. Oligosakkarider virker som kostfiber og gir samme effekt som prebiotika som kan øke antallet bifidobakterier i tarmen ved fermentering av alfa-galaktosider. De reduserer forstoppelse, stimulerer immunsystemet og øker resistens mot infeksjoner i tarmen (Saini, 1989).

2.4.5 Protease-inhibitorer

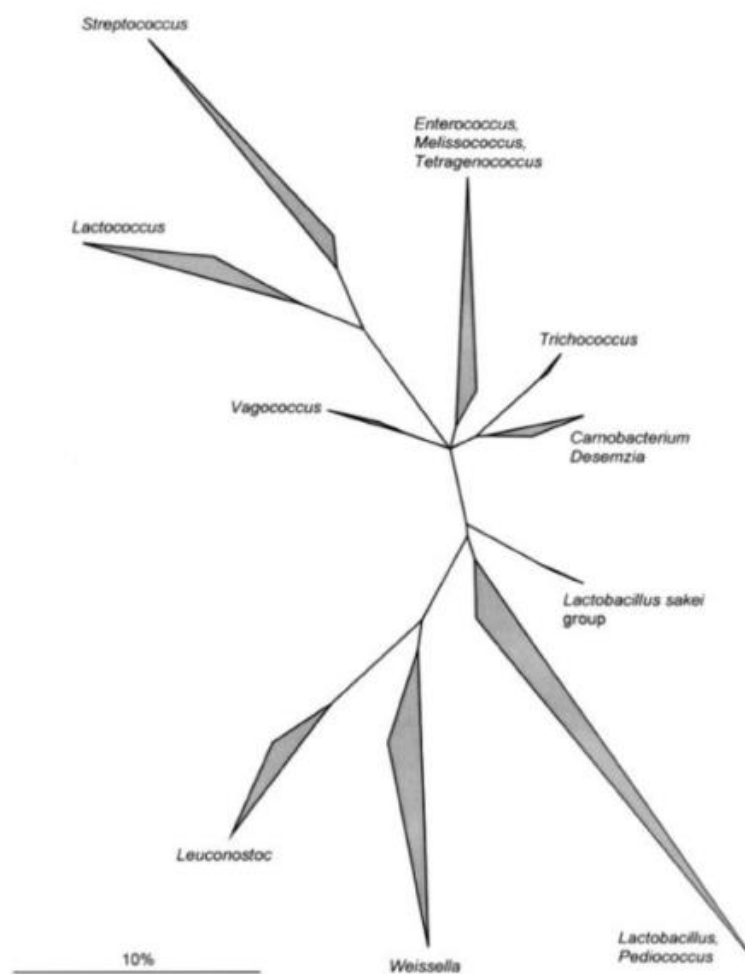
Proteiner som amylase-inhibitorer, lektiner og trypsin-inhibitorer er funnet i belgfrukter og har som funksjon å degradere lagringsproteiner og stivelse ved plantevekst. De kan også virke beskyttende for belgvekster mot å bli spist. Protease-inhibitor har stor påvirkning ernæringsmessig da de kan hemme serinproteaser fra bukspyttkjertelen, og dermed svekke proteinfordøyelsen (Guillamón et al., 2008).

2.5 Fermentering med melkesyrebakterier

Fermentering eller gjæring er trolig en av de eldste metodene for å prosessere belgfrukter, med bruk av naturlig forekommende organismer som bakterier eller sopp fra omgivelsene. Fermenteringen kunne være en kortvarig prosess som varte i et døgn, eller en forlenget prosess til flere måneder, til og med år, som er vanlig ved produksjon av noen typer soyasaus (Aykroyd et al., 1982). Fermentering beriker produktet ved å utvikle et mangfold av smakskomponenter, aromaer og tekstur. Det konserverer næringsinnholdet gjennom melkesyre-, alkoholisk-, eddiksyre- og alkalisk fermentering. Det beriker matvaren biologisk med proteiner, essensielle aminosyrer, essensielle fettsyrer og vitaminer. Det har en avgiftningseffekt under fermenteringsprosessen. Denne prosessen minsker koketiden og dermed krever mindre energi ved produksjon (Steinkraus, 1995).

Fermentering med melkesyrebakterier har flere århundrer blitt brukt til prosessering og konservering av matvarer. Metabolismen til melkesyrebakteriene gir funksjonelle egenskaper som produksjon av organiske syrer, dannelse av nye smak- og aromakomponenter, samt produksjon av proteaser og bakteriociner. Melkesyre er en av hovedmetabolittene som dannes som resultat av fermentering med melkesyrebakterier, og innholdet av melkesyre senker pH i produktet. En reduksjon av pH og produksjon av bakteriociner fra melkesyrebakteriene vil konkurrere mot og hemme vekst av andre bakterier og mikroorganismer i samme produkt. Det vil også forbedre den hygieniske kvaliteten i matvaren. Melkesyrebakterier blir også ansett som gunstige og helsefremmende bakterier og hvorav noen benyttes som probiotika. De brukes utstrakt i mat- og drikkevarer og blir merket som generelt anerkjent som trygge, «generally regarded as safe» (GRAS) til inntak for mennesker og dyr (Wright & Axelsson, 2012).

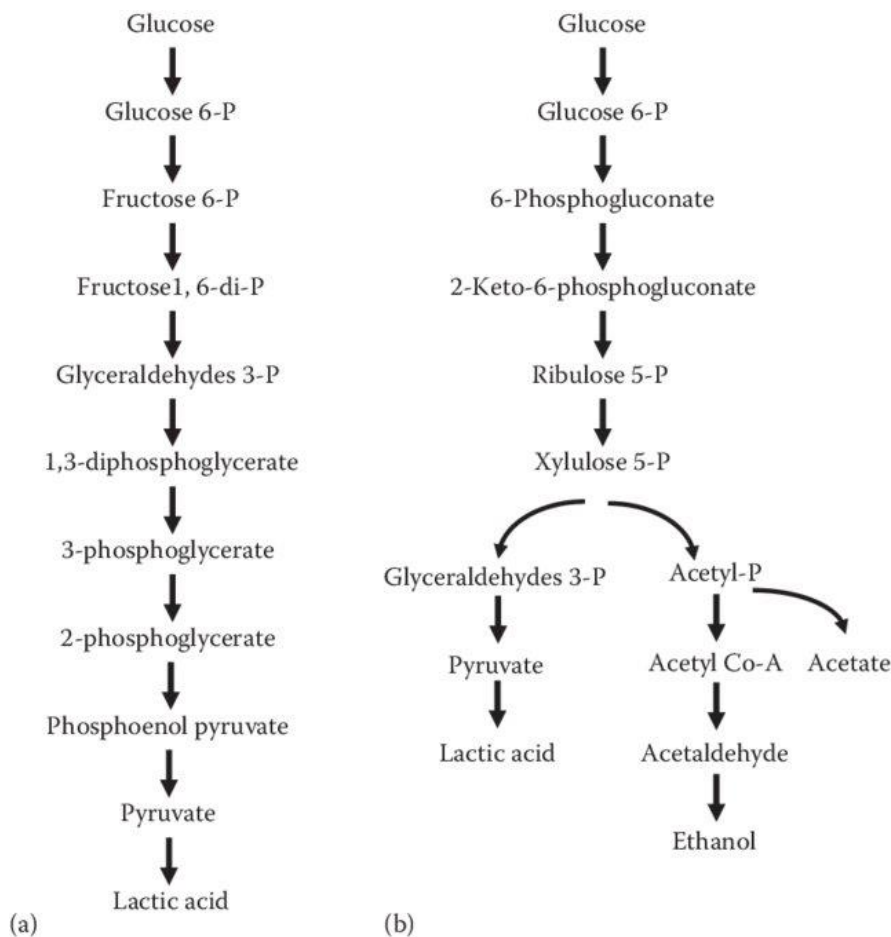
Melkesyrebakterier ble først oppdaget som melke-forsurende mikroorganismer. Etter at Orla-Jensen (1919) så sammenheng mellom forsurende bakterier og bakterier som dannet melkesyre, ble det presentert en klassifisering av dem. Klassifiseringen ble basert på deres cellulære morfologi, hvilke type sukker som ble fermentert, fermenteringsmetode og ideell veksttemperatur. Originalt ble fire familier klassifisert av Orla-Jensen: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Streptococcus*. I senere tid, og ved hjelp av moderne molekylær-biologiske metoder har det blitt klassifisert langt flere slekter og undergrupper av melkesyrebakterier. Fra *Streptococcus* familien oppdaget de slektene *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* og *Enterococcus*. Familien *Leuconostoc* ble forgreinet til slektene *Leuconostoc*, *Oenococcus* og *Weissella*. Se figur 3 for overblikk av hele klassifiseringen av melkesyrebakterier og deres slektsplassing i forhold til hverandre (Wright & Axelsson, 2012).



Figur 3: Fylogenetisk tre som viser posisjonen til ulike LAB-slektene i forhold til hverandre (Wright & Axelsson, 2012).

Melkesyrebakterier har til felles at de er Gram-positive, og har morfologisk form som kokker eller staver og kan danne lengre kjeder. De omsetter karbohydrat ved homofermentativ og heterofermentativ metabolisme. Homofermentative bakterier omsetter glukose til kun melkesyre. Ved en heterofermentering dannes det i tillegg til melkesyre ofte en viss mengde CO₂ gass og etanol eller acetat.

Ved omsetning av C6 suktermolekyler som glukose, vil det kunne gjennomføres via to fermenteringsspor. For homofermentative melkesyrebakterier omsettes glukose via Embden-Meyerhof-Parnas veien, også kalt glykolysen. Ellers kan glukose omsettes heterofermentativt via pentosefosfatveien. Fermentering av andre C6- eller C5 sukker må gjennom andre trinn som isomerisering eller fosforylering før de inngår i glykolysen. Se figur 4 for illustrasjon av de to metabolske veiene. Fakultativt heterofermentative melkesyrebakterier kan omsette karbohydrat ved hjelp av begge omsetningsveiene da de kan skaffe seg de nødvendige nøkkelenzymene for å utføre begge omsetningene. Dersom glukose er til stede, er homofermentering den foretrukne metabolismeveien. Energiutbyttet er dobbelt så stort ved homofermentering som ved heterofermentering med glukose som energikilde. (Wright & Axelsson, 2012).



Figur 4: Metabolisme via (a) Homofermentativ fermentering og (b) heterofermentativ fermentering (Kumar et al., 2015).

Slekten *Lactobacillus* består av aerotolerante, Gram-positive og stavformede bakterier. Deres metabolisme kan deles inn i tre grupper, og kan være enten homofermentative, fakultativt heterofermentative eller obligat heterofermentative. Den homofermentative reaksjonen er basert på glykolyse, kalt Embden-Meyerhof-Parnas glykolytisk vei, og danner kun melkesyre. Det er en anaerob trinnvis nedbrytning av glukose. For et glukosemolekyl dannes det to molekyler med pyruvat, to molekyler ATP, samt to molekyler med $\text{NADH} + \text{H}^+$ (i redusert form). Ulike arter av *Lactobacillus* er tilstedeværende i omgivelser på meieriet. I tillegg finnes de naturlig i jordsmonnet og på planter (Wright & Axelsson, 2012).

Slekten *Leuconostoc* er obligat heterofermentative melkesyrebakterier. Det vil si i tillegg til melkesyre (laktat) blir det dannet CO₂, etanol eller acetat. Bakteriece llene er formet som kokker, ofte langstrakte og opptrer i par eller kjeder. De danner ikke ekte cellulære kapsler, men mange typer av *Leuconostoc* produserer ekstracellulært polysakkarid (EPS) som danner et elektron-tett belegg på celleoverflaten. *Leuconostoc* kan ikke utføre hydrolyse av arginin til ammoniakk og reduserer ikke nitrat. Optimalt vekstforhold for *Leuconostoc* foretrekkes å være rundt pH 6.5, og veksttemperatur mellom 20 – 30 °C. I likhet med slekten *Lactobacillus* er ulike arter av *Leuconostoc* å finne på planter og i fermenterte plantematerialer, og i fordøyelsessystemet hos mennesker og dyr (Björkroth & Holzapfel, 2006; Vaughan et al., 2005).

Noen typer heterofermentative melkesyrebakterier som f.eks. *Leuconostoc*, kan utføre omdanning av citrat til diacetyl og acetoin. Omdanning av citrat gir melkesyrebakteriene energi og karbontilførsel, noe som fører til lengre varighet på vekstfasen (Mousavi et al., 2011). Diacetyl er en viktig aromakomponent i mange fermenterte meieriprodukter da diacetyl gir en smøraktiv smak og aroma.

2.6 Effekt av prosessering på næringsinnholdet i erter og bønner

Næringsinnholdet og innhold av antinæringsstoffer kan henholdsvis forbedres og reduseres gjennom ulike prosesseringsmetoder. Innholdet kan bli påvirket av flere forbehandlingsmetoder som avskalling, bløtlegging, spiring, varmebehandling og fermentering. Ofte brukes en kombinasjon av flere forbehandlingsmetoder.

Avskalling er en prosessteknikk som brukes mye i sammenheng med korn og belgfrukter. Avskalling brukes for å fjerne tunge partikler av resistent fiber i skallet og prosessen vil føre til lettere maleprosess og kortere koketid (Tulbek et al., 2017). Prosesseringstiden er en viktig parameter når det gjelder avskalling. For lang prosesseringstid vil føre til mer tap av endospermen. Det ble vist av Singh et al. (1992) at en avskallingsprosess ved 4 minutter fjernet en del av kalsium-, jern- og sinkinnholdet. Reduksjon av protein og løselig sukker økte med økt prosesseringstid. I en annen forskningsstudie om effekten av avskalling på tørkede hagebønner (*Phaseolus vulgaris* L.) ble det vist en stor reduksjon av tannininnholdet, da tanniner befinner seg hovedsakelig i det ytterste skallet med virkning som et fargestoff. Det ble vist en økning av fytinsyreinnhold. Avskalling økte også trypsin, chymotrypsin og α -amylase-hemmende aktiviteter i hagebønnene, men en signifikant forbedring av *in vitro* fordøyelighet av bønneproteinet (Deshpande et al., 1982).

Bløtlegging skal generelt redusere antinæringsstoffer og forbedre *in vitro* fordøyelighet av protein, men effekten av bløtlegging varierer med belgfruktsorter og bløtleggingsforhold som hvilke type løsning det bløtlegges i, temperatur og varighet. Ved bløtlegging av belgfrukter som soyabønner, lupiner og bønner i løsning tilsatt 0,5 % natrium bikarbonat (NaHCO_3) viste det reduksjon av karbohydrater, stivelse, raffinose, mineraler (utenom natrium) og antinæringsstoffene fytinsyre, tanniner og trypsin-inhibitorer. Det ble også vist en økning i *in vitro* proteinfordøyelighet og økt tilgjengelig lysin (El-Adawy et al., 2000).

Spining gjøres etter at belgfrukter har blitt bløtlagt. Gjenhydrerte frø av belgfrukter vil svulle opp og føres videre til et spirekammer. Hydratiseringen gjør at enzymer i cellene aktiverer. Lagringsstoffer som stivelse, fett og proteiner blir spaltet til sukker, glyserol og fettsyrer, og

aminosyrer, for lettere nedbrytning ved respirasjon som skal føre til frøspiring etter 2 - 6 dager. Det har blitt gjort forsøk på spiring med og uten lyskilde, ved ulike temperaturer og luftfuktighet (López-Amorós et al., 2006). Vidal-Valverde et al. (1998) viste at spiring av fababønner førte til en kraftig reduksjon av α -galaktosider og fytinsyreinnhold etter 6 dager. Stivelse og kostfiber fikk en liten reduksjon etter spiring, mens kalsium fikk en økning under spireprosessen som var relatert til reduksjonen av hemicellulose og fytinsyre.

Koking er den vanligste tilberedningsformen i husholdninger når det gjelder belgfrukter. Erter og bønner blir som oftest kokt eller tilberedt i gryteretter, som mos eller i supper. Det er en tradisjonell prosesseringsteknikk som kan forbedre næringsverdien og fordøyelighet i tørket frø av belgfrukter ved å inaktivere eller eliminere varmelabile anti-næringsstoffer, og forringende bakterier og patogener. Varmebehandling vil påvirke innholdet av langsomt-fordøyelig stivelse. Det vil skape gelatinisering og omdanne tilnærmet all langsomt-fordøyelig og resistent stivelse, til rask-fordøyelig stivelse i erter (Dahl et al., 2012). Varmebehandling har en reduserende effekt på antinæringsstoffer som tanniner og fytinsyre hos flere typer belgfrukter (kikerter, liner og kindeybønner). En forbedring i fordøyeligheten av protein og stivelse ble observert etter varmebehandling ved 120 °C i 10 minutter av disse belgfruktene (Rehman & Shah, 2005).

Klassifisering eller fraksjonering av oppmalt produkt kan utføres der partiklene er i tørr eller våt tilstand. Luftklassifisering skiller oppmalt produkt av korn eller belgfrukter inn i ulike kategorier basert på partikkelvekt. Det er en rask og økonomisk prosess som skiller lette partikler fra tunge partikler ved hjelp av luftstrøm. Denne separeringsteknikken kan produsere fint mel, grovt mel, proteinkonsentrater og stivelseskonsentrater (Tulbek et al., 2017), men har lite påvirkning på de fysiske og kjemiske egenskapene til næringskomponentene i korn og belgfrukter.

Ekstrudering er en prosess som gir råmaterialet en kort steketid mellom 100 – 180 °C og med et trykk på opptil 50 atm. Fordeler med ekstrudering inkluderer allsidighet, høy produktivitet, lave driftskostnader, energieffektivitet og gir kortere steketid.

Ekstruderingsteknologien har blitt utviklet mye i løpet av det siste tiåret. Denne typen

prosessering av belgfrukter vil tillate reduksjon av antinæringsstoffer og forbedre ernæringskvaliteten til en lavere produksjonskostnad, som prosess av bakevarer og autoklaving, på grunn av en mer effektiv bruk av energi og bedre kontroll med større produksjonskapasitet. Ekstrudering bevarer næringsinnholdet ved den korte varmebehandlingen og bryter opp proteiner slik at aminosyrer blir mer tilgjengelig og lettere fordøyelig. På samme måte blir opptil 80 % stivelse brutt opp til enkle suktermolekyler ved ekstrudering (Abd El-Hady & Habiba, 2003).

Fermentering med melkesyrebakterier er presentert i kapittelet 2.5. Naturlig fermentering og fermentering med gjær- og muggsopp er noe likt i prinsipp, men kan omdanne andre komponenter av råmaterialet som kan påvirke næringsinnholdet og mengder av antinæringsstoffer, i tillegg til endring i sensoriske egenskaper. Produksjon av β -glukosidase er en nøkkelfaktor ved nedbrytning av vicin og convicin. Det har blitt vist 100 % eliminering av vicin og 75 % av convicin i fababønner etter 48 timer fermentering med tilsetningen av muggsoppen *Aspergillus oryzae* som produserer ekstracellulær β -glukosidase (McKay, 1992).

3 Materialer og metoder

3.1 Preparering av prøvemateriale

Råmateriale av tørkede erter og fababønner ble utdelt på Vollebekk forsøksgård, i Ås. Alle fire typer erter og bønner ble rensset med en Grain Cleaner (Perten Instruments NA Inc., USA). Etter ytterligere rensing og sortering for hånd ble sortene veid opp og fraktet til NMBU, Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM).

Omtrent 5 kg ferdig veid råmateriale ble fraktet til Nofima for å bli malt til mel ved bruk av en Ultra-sentrifugalmølle (ZM200, Retsch GmbH, Norge). Det ble brukt siktstørrelse 0,5 mm for både erter og fababønner. Bønnene ble matet inn til midten av rotoren og ved sentrifugal kraft ble materiale dratt utover til rotortennene og knust til finere partikler. Det finknuste melet ble ført videre til en oppsamlingsbeholder. Melet ble så oppbevart i tette og sterile syltetøyglass, tørt og skjermet for sollys. Det ble tillagd omtrent 1,0 - 1,3 kg mel av hver sort.

3.2 Uttesting av blandingsforhold og varmebehandling

Det var ønskelig å utføre fermenteringsforsøket med erte- og fababønnemel i en tyktflytende konsistens. I tørr form eller i en blandet deigform (fast) ville det vært vanskeligere å utføre prøveuttak.

Blandingsforhold mellom mel og vann ble testet i flere omganger. Første omgang ble mel blandet med vann uten varmebehandling. Mel 40 g ble veid ut og blandet med 100 ml springvann, dvs. ca. 30 % mel i blandingen. Blanding ble stående ved romtemperatur og konsistent ble vurdert etter ca. 10 minutter.

Videre ble testing av blandingsforhold på 30 % varmebehandlet i kokende vannbad i 30 minutter. Det viste for høy konsentrasjon av mel i vann, og dermed vanskelig å arbeide med på en homogen måte i videre forsøk. Det ble så testet ca. 16 %, 15 %, 10 % og 7,5 % mel i blanding med springvann.

Etter koking på kokevannbad i 30 minutter med sporadisk røring og nedkjøling i romtemperatur ble konsistens vurdert. Det ble forsøkt å autoklavere 10 %-melblanding i 20 minutter ved 121 °C. Autoklaverte prøver ble vurdert mht. konsistens etter autoklaving og nedkjøling.

3.3 Analyse av pH

For pH-måling ble et pH-meter (PH92 Lab pH meter, Radiometer, Brønshøj, Danmark) kombinert med glasselektrode og temperatur-sonde (Radiometer Copenhagen, DK) brukt. Før bruk ble det kalibrert med buffer ved pH 4.0 og pH 7.0 (Merck, Germany). Kalibrering måtte være over 98 % nøyaktighet før bruk, hvis ikke ble elektroden vasket for så å bli kalibrert på nytt.

Analysen av pH ble gjort i hovedforsøket på samme vis.

3.4 Vekstmedier

Typer vekstmedier brukt og deres inkuberingstemperatur og inkuberingstid er vist i tabell 1.

Utplating på Plate Count Agar (PCA, Oxoid LTD, Hampshire, England) ble brukt fordi det er et standard medium formulert for test av melkeprøver, vannprøver, næringsmidler og meieriprodukter. Det gir et totaltall av aerobe mikroorganismer.

Et medium for melkesyrebakterier er MRS agar, tillaget ved å tilsette MRS buljong (MRS buljong, Oxoid LTD, England tilsatt 1,5 % agar (VWR, England)). Det er et elektivt medium formulert til å være tilpasset vekst for melkesyrebakterier, slekter som *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* og *Pediococcus*.

Violet red bile agar (VRBA, Merck KGaA, Germany), er et selektivt medium for vekst og bestemmelse av koliforme bakterier.

Rose-Bengal Chloramphenicol agar (RBA, Merck KGaA, Germany) er selektiv for isolasjon og vekst av mugg- og gjærsopp.

Lactobacillus selective Agar (LSB agar, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), ble brukt for å bestemme antall *Lactobacillus* og *Leuconostoc* i innledende testrunde. Det ga ingen utslag, dermed ble det bestemt å ikke ta med LSB agar i videre analyse.

Yeast and mould agar (YM agar, Oxoid LTD, England), ble brukt for å se vekst av mugg- og gjærsopp. Dette mediet ble brukt i innledende testrunde og ga ingen utslag, og ble dermed ikke brukt til videre analyse.

Tabell 1: Oversikt over vekstmedier, inkuberingstemperatur og inkuberingstid brukt i det innledende forsøket.

Vekstmedier	Inkuberingstemperatur (°C)	Inkuberingstid (døgn)
Plate count agar (PCA, Oxoid)	30	3
De Man Rogosa agar (MRS, Merck)	30	3
Lactobacillus selective agar (LBS, BD)	Anaerobt, 30	3
Violet red bile agar (VRBA, Merck)	37	1
Rose-Bengal Chloramphenicol agar (RB, Merck)	22	5
Yeast and Mould agar (YM, Oxoid)	30	4

3.5 Innledende forsøk

I innledende forsøk ble 8 ulike stammer av melkesyrebakterier brukt til fermentering av erte- og fababønnemel. Først ble alle stammer tilsatt i melblanding uten varmebehandling. Videre ble 6 av de stammene testet i melblandinger etter varmebehandling. Det ble benyttet 2 % poding av en overnattekultur i innledende forsøk. Bestemmelse og utvelgelse av bakteriestamme til hovedforsøket ble basert på best senkning av pH.

3.5.1 Melkesyrebakterier

Fermenteringseffekten til flere stammer av LAB ble undersøkt. Totalt 8 stammer (se tabell 2) ble undersøkt i første omgang i fermentering av både erte- og fababønnemel.

Tabell 2: Oversikt over stammer av melkesyrebakterier og hvor de er isolert fra, som ble undersøkt i det innledende forsøket med fermentering av erte- og fababønnemel.

MSB stammer	Hvor de er isolert fra
<i>Weisella confusa</i> 76	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Weisella confusa</i> 67	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Weisella cibaris</i> 187	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 314	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Lactobacillus brevis</i> 152	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Pentococcus pentosaceus</i> 120	Soyabønner, (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015)
<i>Leuconostoc citreum</i> 45	Spiret bygg, (Kvam, 2017)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 107	Spiret bygg, (Kvam, 2017)

Disse bakteriestammene ble podet fra nedfrosset frysekultur oppbevart ved -80 °C, i medium tilsatt 15 % glycerol, til MRS buljong (Oxoid) og satt til inkubering ved 30 °C inntil vekst ble observert. Videre ble 100 µl av bakteriekulturene podet i 10 ml MRS buljong og satt i inkuberingskap ved 30 °C i ca. 1 døgn før bruk. Rørene ble merket med dato. Det ble podet over på nye MRS-buljong rør før forsøksstart. Original stammekulturer ble satt på kjølerom ved 4 °C.

3.5.2 pH måling i innledende forsøk

I innledende forsøk ble alle 6 stammer av melkesyrebakterier podet i de ulike typene erte- og fababønnemel. For å se hvilke stammer egnet seg mest ble det målt pH-verdier ved 0 timer fermentering og etter 48 timer fermentering.

3.6 Vekst- og metabolismeforsøk

Etter det innledende forsøket ble det besluttet å fokusere på *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 videre, og undersøke deres fermenteringseffekt på erte- og fababønnemel. Forkortelser av prøvene blir presentert i tabell 3. Det vil refereres i forkortelser gjennom resten av oppgaven, slå tilbake til denne tabellen om usikkerhet på hvilken type prøve det vises til i resultater og diskusjon. Det ble foretatt 3 gjentak av vekst- og metabolismeforsøkene.

Tabell 3: Oversikt over forkortelser og beskrivelse for ulike prøveuttak i denne oppgaven. Forkortelser vil bli brukt videre i resultater og diskusjon.

Forkortelse	Norsk beskrivelse	Engelsk beskrivelse
PA	Ertemel Astronaute	Pea flour Astronaute
PI	Ertemel Ingrid	Pea flour Ingrid
BV	Fababønnemel Vertigo	Faba bean flour Vertigo
BS	Fababønnemel Sampo	Faba bean flour Sampo
PA-F107	Ertemel Astronaute, fermentert med <i>L. pseudomesenteroides</i> 107	Pea flour Astronaute, fermented with <i>L. pseudomesenteroides</i> 107
PA-F314	Ertemel Astronaute, fermentert med <i>Lb. fermentum</i> 314	Pea flour Astronaute, fermented with <i>Lb. fermentum</i> 314
PI-F107	Ertemel Ingrid, fermentert med <i>L. pseudomesenteroides</i> 107	Pea flour Ingrid, fermented with <i>L. pseudomesenteroides</i> 107
PI-F314	Ertemel Ingrid, fermentert med <i>Lb. fermentum</i> 314	Pea flour Ingrid, fermented with <i>Lb. fermentum</i> 314
BV-F107	Fababønnemel Vertigo, fermentert med <i>L. pseudomesenteroides</i> 107	Faba bean flour Vertigo, fermented with <i>L. pseudomesenteroides</i> 107
BV-F314	Fababønnemel Vertigo, fermentert med <i>Lb. fermentum</i> 314	Faba bean flour Vertigo, fermented with <i>Lb. fermentum</i> 314
BS-F107	Fababønnemel Sampo, fermentert med <i>L. pseudomesenteroides</i> 107	Faba bean flour Sampo, fermented with <i>L. pseudomesenteroides</i> 107
BS-F314	Fababønnemel Sampo, fermentert med <i>Lb. fermentum</i> 314	Faba bean flour Sampo, fermented with <i>Lb. fermentum</i> 314

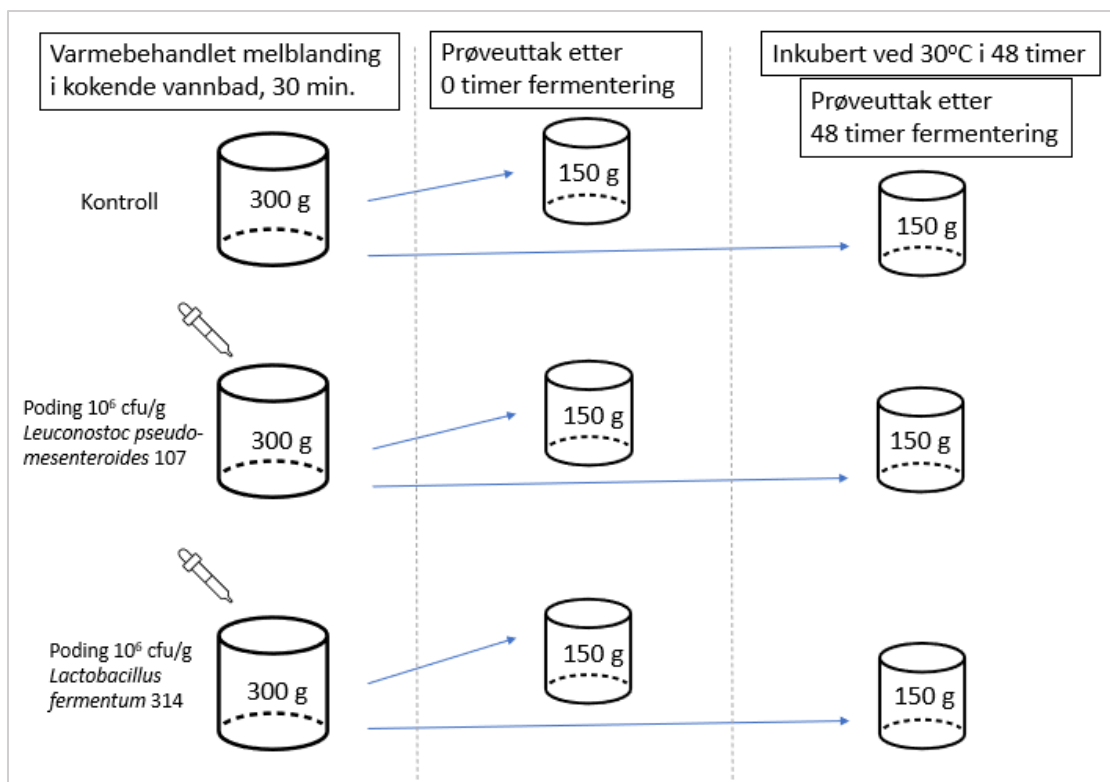
3.6.1 Frysestock-løsning av bakteriestammene

Det ble tillaget frysestock-løsninger av bakteriestammene *Lb. fermentum* 314, *Pentococcus pentosaceus* 120, *L. pseudomesenteroides* 107, og *Weisella confusa* 76. Hver bakteriestamme ble podet (1 %) over i 50 ml MRS-buljong og inkubert i 1 døgn ved 30 °C. Kulturene ble sentrifugert i en Heraeus Multifuge X3R Centrifuge (Thermo Scientific, UK), ved 4500 rpm i 10 minutter. Mediet ble helt av, og pelleten ble vasket med 25 ml Ringers løsning. Løsningen ble igjen sentrifugert ved samme innstillinger. Mediet ble fjernet, og pelleten ble igjen suspendert i 5ml Ringers løsning tilsatt 15 % glycerol og pipettert over til 0,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-50 C, Axygen®, Mexico). Disse ble plassert og oppbevart i fryser ved -80 °C.

Bakteriekonsentrasjonen ble bestemt etter innfrysning og opptining ved utplating i vekstmedium (cfu/ml). For bestemmelse av konsentrasjon ble et rør fra hver stock-løsning tint og fortynnet (-6, -7, -8) i Ringers løsning. Fortynnet bakterieløsning ble støpt inn i MRS-agar (MRS buljong (Oxoid) tilsatt i 1,5 % agar (VWR)), før inkubering ved 30 °C i 3 døgn. Konsentrasjonen (cfu/ml) ble deretter beregnet ut fra vekst og fortynningsfaktor benyttet.

3.6.2 Tillaging av prøver, varmebehandling og poding

Blandingsforhold for melblandingen er beskrevet i kapittel 3.2. For hver type mel ble det tillaget 3 paralleller, med utveid 10 % mel blandet sammen med destillert vann (30 g mel + 270 ml destillert vann). Totalt 300 g melblanding av hver prøve ble blandet i 500 ml sterile syltetøyglass tildekket med aluminiumsfolie, før varmebehandling med manuell omrøring, i kokende vannbad (100 °C) i 30 minutter. Etter varmebehandling og avkjøling i isbad, ble 2 av prøvene tilsatt bakteriekultur, henholdsvis *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 til en konsentrasjon på ca. 10^6 cfu/g. Bakteriene ble tilsatt fra opptint frysestock. Siste prøve blir ikke tilsatt bakteriekultur og regnes som en kontroll. Etter varmebehandling, avkjøling og poding ble hver prøve fordelt til to ulike syltetøyglass merket 0 timer fermentering og 48 timer fermentering, og forkortelser med hensyn til prøvetyper (se tabell 3). Se figur 5 for en mer detaljert illustrasjon av tillaging av prøvene.



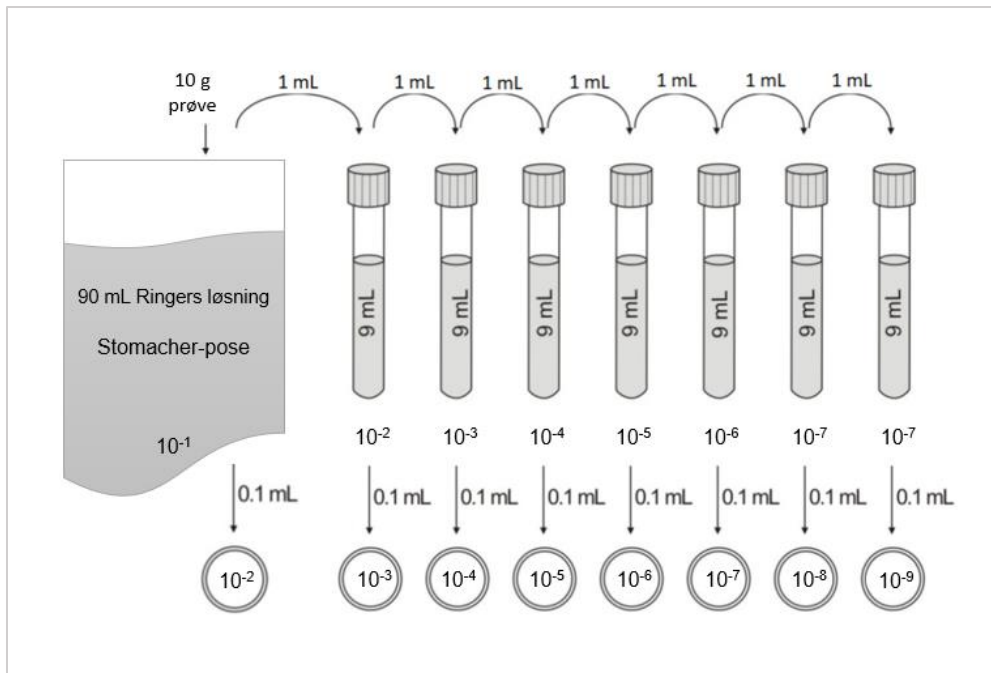
Figur 5: Illustrasjon av tillaging av prøvematerialet for hver type melblanding. Melblanding veid ut med 10 % mel tilsatt destillert vann.

3.6.3 Analyse av mikrobiell vekst

I hovedforsøket ble prøveuttak innstøpt i ulike vekstmedier i petriskåler (Heger, Bergen Plastics, Norway) og inkubert ved optimale inkuberingsbetingelser, se tabell 4. Prøveuttak ble tatt fra ulike fortynninger hos prøver før fermentering (0 timer) og hos prøver etter fermentering (48 timer). Det ble benyttet 2 paralleller av hver fortynning.

Første fortynning av prøvene ble tillaget i noe større mengde da melblandingene var svært viskøse til å kunne pipetteres og få homogent prøvemateriale. Fortynningsrekken startet ved å veie ut 10 g prøve i en steril Stomacher-pose og ble tilsatt 90 ml Ringers løsning.

Stomacher-posen med innhold ble blandet i en Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward Medical, England) i 1 minutt på lav styrke. Dette tilsvarer -1 fortynning. Videre fortynningsrekke ble tillaget som vist på figur 6 og i henhold til tabell 4.



Figur 6: Illustrasjon av tillaging av fortynningsrekke til utplating for estimering av celletall.

Etter inkubering ble vekst av kolonier på prøvene telt ved hjelp av koloniteller (STC 100, VWR, England). Gjennomsnitt av 2 paralleller av hver fortynning ble beregnet. Ved utregning ble skåler med mellom 30 – 300 kolonier per skål benyttet. Totalt ble vekstforsøket gjentatt 3 ganger og gjennomsnitt av 3 forsøkgjentak er regnet ut for celletall oppgitt i resultater.

Tabell 4: Oversikt over fortynningsgrad i ulike vekstmedier brukt i det endelige forsøket.

Prøvemateriale		MRS agar (30 °C)	RB-agar (22 °C)	VRBA (37 °C)
0 timer fermentering	Kontroll	-1, -2	-1, -2	-1
	<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	-3, -4, -5	-1, -2	-1
	<i>Lb. fermentum</i> 314	-3, -4, -5	-1, -2	-1
48 timer fermentering	Kontroll	-3, -4, -5	-1, -2	-1
	<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	-6, -7, -8	-1, -2	-1
	<i>Lb. fermentum</i> 314	-6, -7, -8	-1, -2	-1

3.7 Analyse av organiske syrer og karbohydrater - HPLC

Det ble analysert innhold av organiske syrer og karbohydrater i mel av utvalgte erte- og bønnesorter i fermenterte prøver ved 0 og 48 timer. Ved bruk av «high performance liquid chromatography» (HPLC) etter en metode ofte brukt til melkeprøver, beskrevet av Marsili et al. (1981) med noen modifikasjoner. «Diode array detector» (DAD) ble brukt for å skanne topper av organiske syrer og karbohydrater for å se om de var de riktige komponentene ved å sammenligne UV-spekter hos prøvene opp mot standarder.

Prøver av melblandingene ble blandet mest mulig homogent før 1,0 g ble veid inn i 10 ml belcorør. Først ble prøvene tilsatt 2,5 ml ionebyttet H₂O, 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) ved bruk av en kalibrert automatpipette, og 8 ml acetonitril CH₃CN (Merck KGaA, Germany) ved bruk av dispenser. Deretter ble prøvene satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 minutter med 40 rpm. Videre ble prøvene sentrifugert i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Japan), med innstillingene 3500 rpm i 15 minutter i romtemperatur.

Etter sentrifugering ble supernatanten filtrert gjennom et PTFE membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) med porestørrelse 0,2 µm. 1 ml av filtrert supernatant ble overført til HPLC-glass. Prøvene ble analysert ved bruk av et HPLC-instrument, Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), medfølgende autosampler, kolonneovn, DAD-UV detektor for organiske syrer, og RI-detektor for karbohydrater og eddiksyre. 25 µl av hver prøve ble injisert og først kjørt gjennom en forkolonne, Cation-H refill, før den ble separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Analysen ble gjennomført ved 32 °C i kolonnetemperatur, og den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck). Hastigheten var på 0,4 ml/min.

Prøvene ble målt og sammenlignet opp mot standardløsninger som ble preparert på samme fremgangsmåte. Standardløsningene som ble brukt for karbohydrater var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck KGaA, Germany). Standardløsninger for organiske syrer var sitronsyre, ravsyre, melkesyre, maursyre og eddiksyre (Sigma-Aldrich, Kina).

3.8 Analyse av tørrstoff

Tørrstoffinnhold ble målt i tre paralleller for hver enkel prøve. Det ble veid ut tilnærmet 2,0 g materiale per prøve i aluminiumsbeger, der det ble notert ned vekt med 4 desimaler, ved bruk av Sartorius (Entris224-1S, Sartorius AG, Germany) presisjonsvekt. Først ble aluminiumsbegeret veid og vekt notert, deretter ble vekten nullstilt før prøvematerialet ble veid og notert. All håndtering av aluminiumsbeger ble gjort med pinsett.

Prøvene ble satt i varmeskap (VENTI-Line, modell VL 56 Prime) på 102 °C i 24 timer. Etter 24 timer ble prøvene tatt ut av varmeskapet og overført til eksikator for nedkjøling uten at prøvene ville trekke til mer fuktighet. Avkjølte prøver ble veid og den stabiliserte vekten med 4 desimaler ble notert. Utregning av tørrvekt ble gjort slik:

$$\text{Vekt skål} + \text{vekt prøve} = \text{vekt prøve m/skål}$$

$$\text{Vekt tørr prøve} = \text{vekt tørr prøve m/skål} - \text{vekt skål}$$

$$\% \text{ tørrstoff} = \frac{\text{Vekt tørr prøve}}{\text{vekt våt prøve}} * 100$$

3.9 Frysetørking

For hvert prøvemateriale ble det fordelt og veid ut prøve i fire falconrør (50 ml CELLSTAR Polypropylene Tube, Greiner Bio-One International BmbH, Germany), tilnærmet 25 g i hvert rør for hurtigere frysetørking. Rørene måtte ha en temperatur på -40 °C eller lavere før selve frysetørkingsprosessen. Ved bruk av HETO-Winner frysetørker (Thermo Fisher Scientific, UK) ble rørene frysetørket i -85 °C og med vakuum i 3 døgn. Frysetørkingsprosessen ble fulgt etter bruksanvisning gitt av maskin-produsenten. Etter frysetørking ble prøvematerialet samlet i hvert sin 100 ml syltetøyglass, blandet homogent og oppbevart tørt til bruk og videre lagring.

3.10 Analyse av fytinsyre

For analysen av fytinsyre ble det tørkede prøvematerialet brukt i «Phytic acid (Total Phosphorus) Assay Kit» (Megazyme, Ireland). Dette Kit'et er utviklet av Megazyme for å måle innhold av fytinsyre og total tilgjengelig fosfor i næringsmidler. Det måler enkelt en større kvantitet av prøver. Det måler «totalt tilgjengelig fosfor» frigjort av næringsmidlet og krever ikke anionbytte og rensing av komponenter. Metoden inkluderer syreekstraksjon av inositolfosfat etterfulgt av tilsetning av en fytase spesifikk tilpasset fytinsyre (IP6) og for noen lavere former for myo-inositol fosfater (IP₂, IP₃, IP₄, IP₅).

Fytase er et enzym som defosforlyrer fytinsyre til lavere former av myo-inositol fosfor og vil frigi uorganisk fosfat. Videre tilsettes alkalisk fosfatase for å defosforlyre det endelige og siste fosfatet fra myo-inositol monofosfat, som er relativt resistent for fytase alene. Alkalisk fosfatase vil også frigi enkelt-fosfat fra andre komponenter som estere, men det indikeres ved dette Kit'et at mengder fosfat frigjort fra annet enn myo-inositol er betydelig liten.

For hver prøve ble 1 g tørt prøvematerialet veid ut i et 75 ml glassbeger. Det ble tilsatt 20 ml 0,66 M saltsyre (HCl) og tilført en magnet. Glassbegeret ble dekket til med aluminiumsfolie og plassert på en magnetrører (RET Basic C, IKA Labortechnik, Germany) for røring over natten i romtemperatur. Prøvene må stå til omrøring i minimum 3 timer, men det er anbefalt å la det stå over natten om mulig.

En ny standardkurve med standardløsninger ble tillaget for målinger av prøver daglig. Standardløsninger av fosfor med konsentrasjon på 0, 0,5, 2,5, 5 og 7,5 µg ble tilført i 15 ml falconrør, med 2 paralleller. Standardløsningene var stabile i 1 uke ved lagring i kjølerom på 4 °C. Nytt uttak av 1 ml standardløsningene ble gjort daglig.

Etter røring over natt ble 1 ml av prøvematerialet overført til 1,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-150 C, Axygen®, Mexico) og sentrifugert i en Micromax mikrosentrifuge (IEC, USA) ved 13.000 rpm i 10 minutter. 0,5 ml av supernatanten etter sentrifugering ble overført til et nytt eppendorfrør og umiddelbart tilsatt 0,5 ml av 0,75 M natriumhydroksidløsning (NaOH) for nøytralisering. Det ble tillaget to replikater for hver prøveekstrahering, og for hvert prøvemateriale var det 2 – 3 paralleller slik at alle prøver ble analysert med 4 – 6 replikater.

Ved tilsetning av et fargereagens som inneholder ammonium molybdat gir det en reaksjon i kontakt med uorganisk fosfat. Det dannes 12-molybdofosforsyre som vil i surt miljø reduseres til molybdenblått. Fargereaksjonen gir en proporsjonal mengde molybdenblåfarge som mengde uorganisk fosfat i prøven. Fargereagenset består av askorbinsyre og ammonium molybdat, og må blandes sammen på samme dag som det skal anvendes. Det henvises til protokollen (Megazyme, Ireland) for en fullstendig beskrivelse av analysemetoden, tid, mengder og blandingsforhold.

For hver prøveekstrahering ble det tatt to replikater for både fritt og totalt fosfor, slik at det blir fire replikater for hver enzymatisk defosforeringsreaksjon. Etter ekstraksjonsprosessen ble prøvene sentrifugert ved like innstillinger som tidligere, 13000 rpm i 10 minutter. 1 ml av supernatanten ble overført til nytt eppendorfrør og tilsatt 0,5 mL fargereagens. Standardløsningene ble preparert på samme vis, før kolorimetrisk bestemmelse av fosforinnhold.

Prøvene og standardløsningene ble inkubert i vannbad (Optima TC120, Grant, UK) ved 40°C for en time. Etter inkubering i vannbad ble 1 ml av prøver og standardløsninger blandet med Vortex (Vortex Genie 2 SI-0236, Scientific Industries, USA) og overført til 1,5 ml semi-micro kyvetter (PS, Brand GMBH + CO KG, Germany). For kolorimetrisk bestemmelse ble prøvene målt i spektrofotometer (SpectraMax M2, Molecular devices, USA) ved absorbans på 655 nm.

En standardkurve ble laget fra standardløsningene, for å vise sammenheng mellom konsentrasjon og absorpsjon av fosfor. Det ble beregnet en M-verdi basert på standardløsningene trukket fra standard 0 som ikke inneholdt fosfor ($\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosfor}}$). Et gjennomsnitt av M-verdiene ble utregnet og $M_{\text{gjennomsnitt}}$ ble brukt til videre utregning av fosforinnhold i prøvene.

For hver prøve ble det målt absorbans både av fritt fosfor og totalt fosfor. Ved utregnet standardavvik ble prøver med høyere enn to standardavvik fra gjennomsnittsverdi utelatt i utregningen videre. Konsentrasjon av fosfor i prøvene ble beregnet ved formelen nedenfor.

$$c(\text{fosfor}) = \frac{M_{\text{gjennomsnitt}} * 20 * F}{10\,000 * 1.0 * v} * \Delta A_{\text{fosfor}} \text{ [g/100g]}$$

Forenklet versjon:

$$c(\text{fosfor}) = M_{\text{gjennomsnitt}} * 0.1112 * \Delta A_{\text{fosfor}} \text{ [g/100g]}$$

ΔA_{fosfor} regnes ut av å trekke fra absorbans av fritt fosfor fra absorbans av totalt fosfor.

20 = original prøveekstrakt volum (ml). F = fortynningsfaktor (55,6). 10 000 = konvertering fra $\mu\text{g/g}$ til g/100 g. 1.0 = vekt av originalt prøvemateriale (g). v = volum av prøve til kolorimetrisk måling (1 ml).

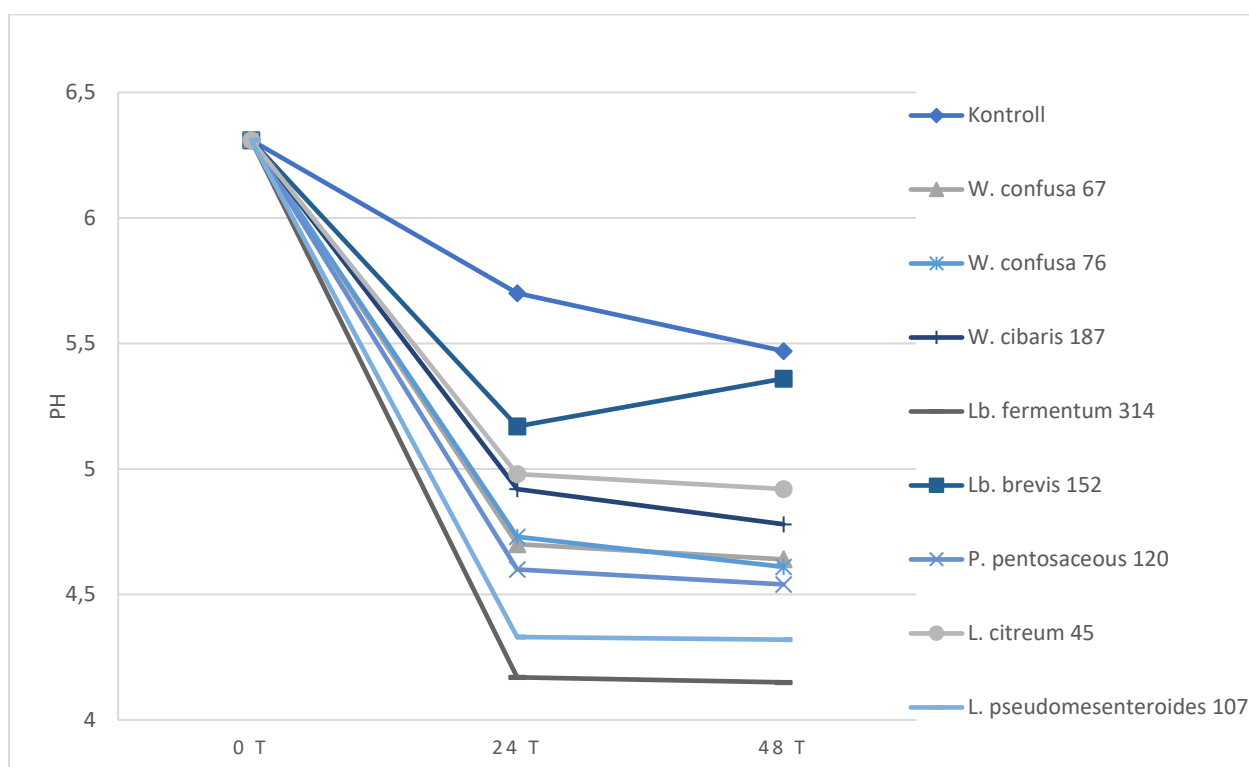
Utrekning av mengde fytinsyre ble basert på konsentrasjonen av mengden fosfor, hvor det er antatt at all fosfor som er detektert er frigitt fra fytinsyre, og at dette utgjør 28,2 % av fytinsyre. Utrekningen vises med ligningen nedenfor.

$$c(\text{fyttinsyre}) = \frac{\text{Fosfor (g/100g)}}{0.282} \text{ [g/100g]}$$

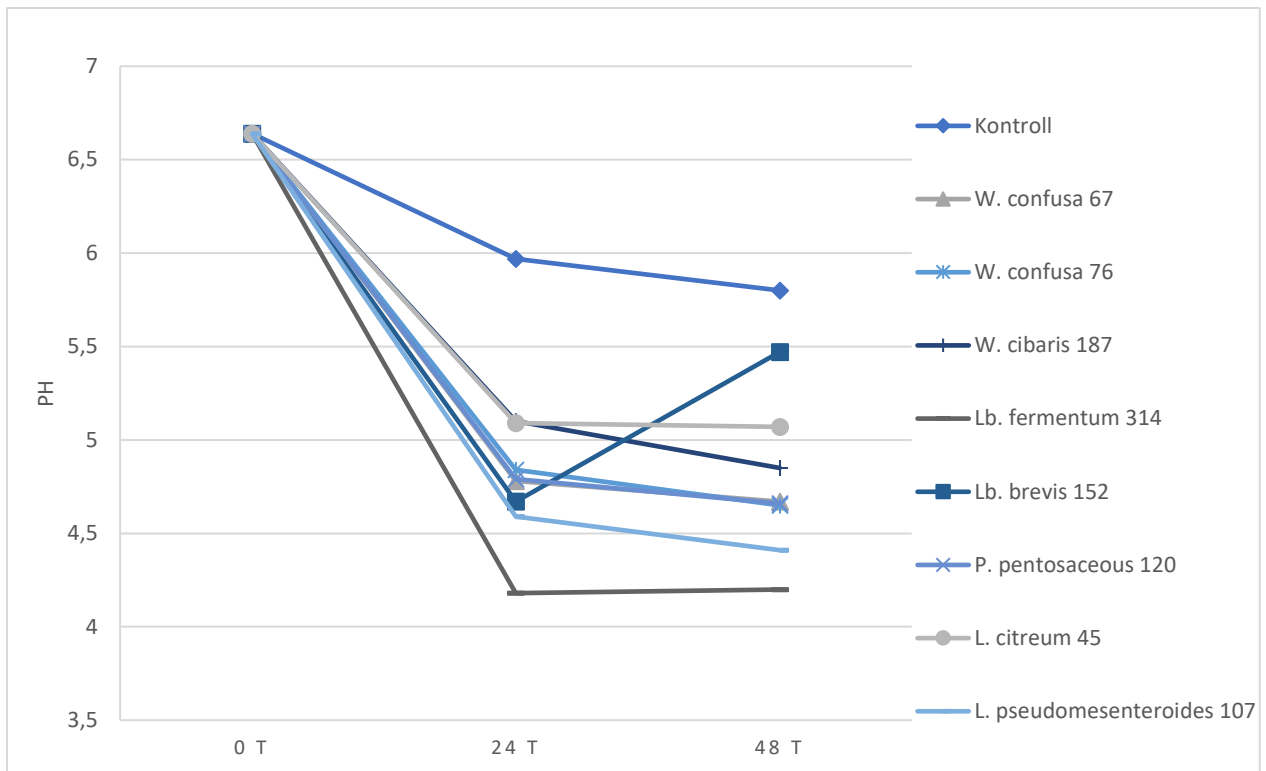
4 Resultater

4.1 Innledende forsøk

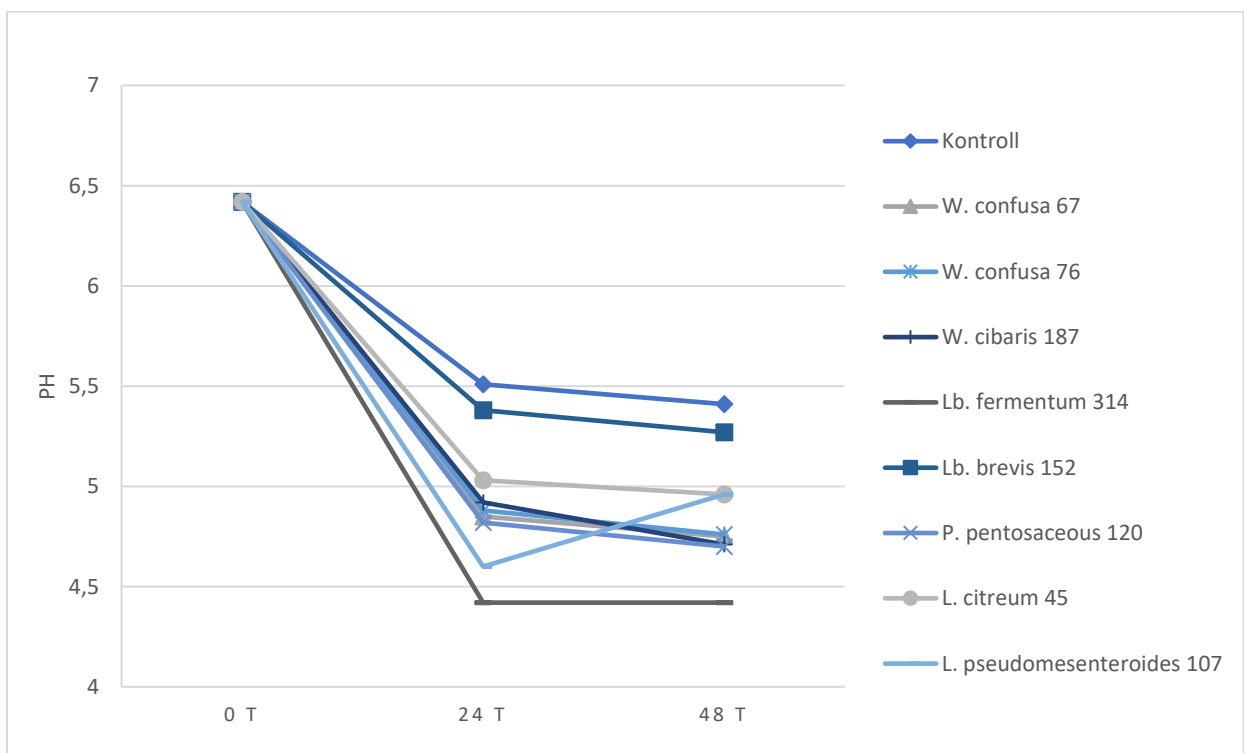
I første testrunde ble alle 8 stammer av melkesyrebakterier (se tabell 2 for oversikt) podet til melblandinger av erte- og fababønnemel. Prøvene ble ikke varmebehandlet, kun blandet med destillert vann. pH ble målt ved 0 timer, 24 timer og 48 timer fermentering, og målingene fra første testrunde er vist i figurene 7 – 10.



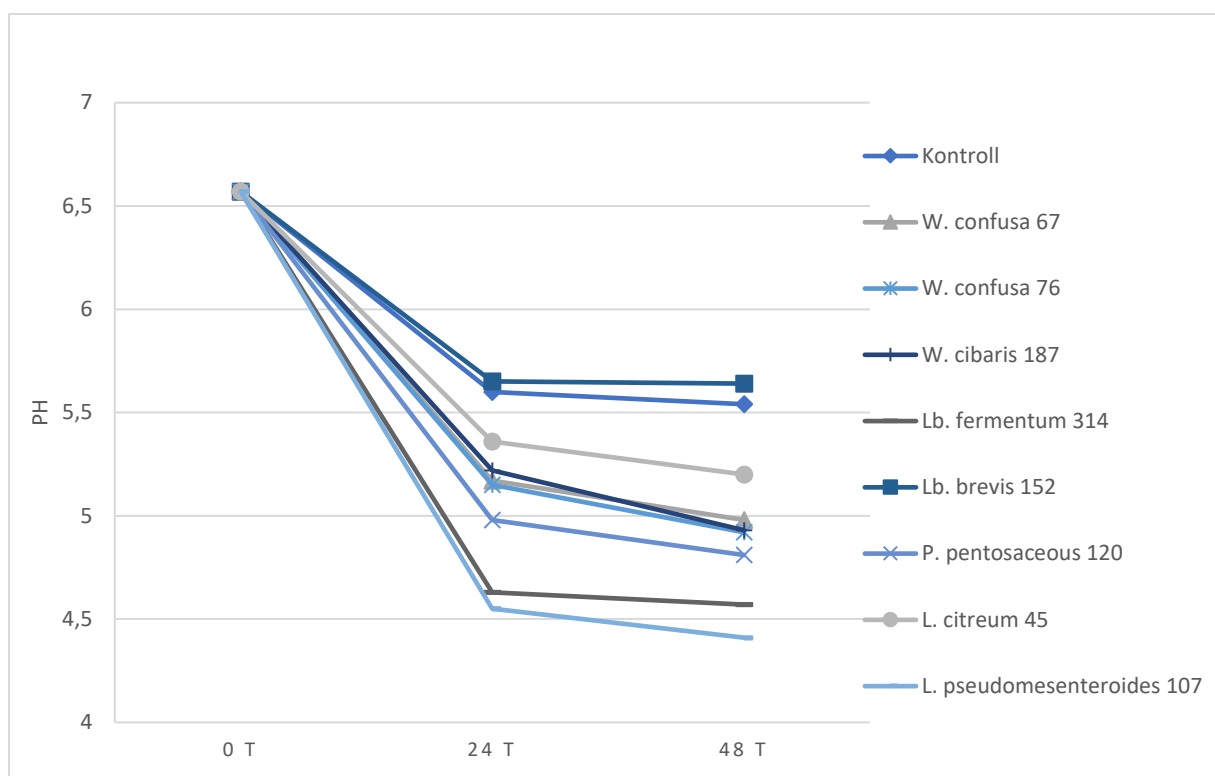
Figur 7: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30°C av kontroll og 8 stammer av melkesyrebakterier i Astronoute ertemel (10 %) ikke varmebehandlet.



Figur 8: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 8 stammer av melkesyrebakterier i Ingrid ertemel (10 %) ikke varmebehandlet.



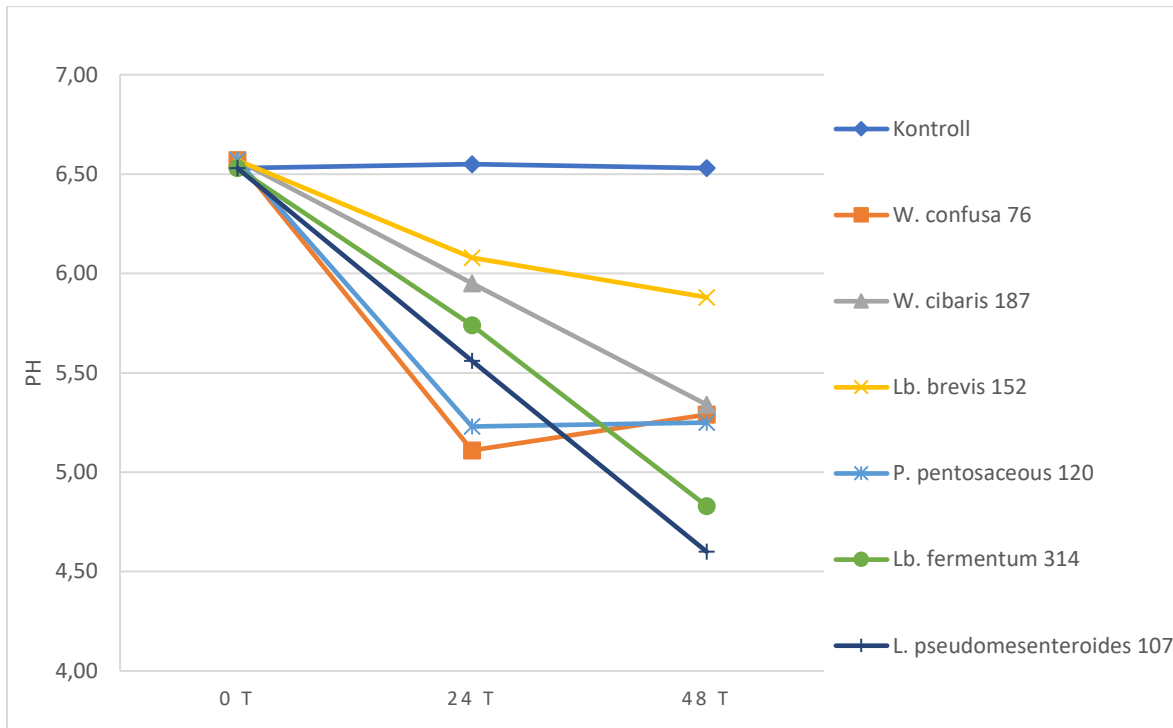
Figur 9: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 8 stammer av melkesyrebakterier i Vertigo fababønnemel (10 %) ikke varmebehandlet.



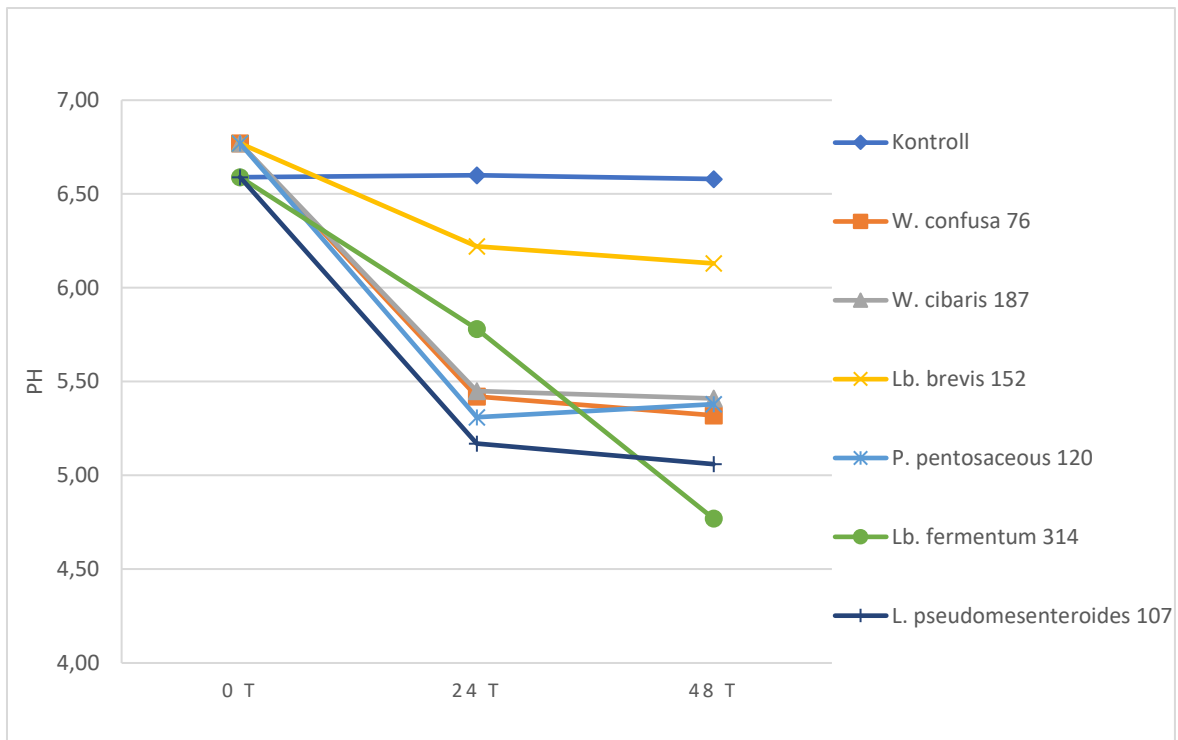
Figur 10: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 8 stammer av melkesyrebakterier i Sampo fababønneemel (10 %) ikke varmebehandlet.

Figur 7 - 10 viser pH reduksjon i samtlige kontrollprøver uten varmebehandling, hvor pH ble redusert mellom 0,84 – 1,03 pH-enheter. Prøver fermentert med *W. confusa* 76 senket pH med 1,65 – 1,99 pH-enheter. Videre viste prøver fermentert med *P. pentosaceus* 120 en pH-senkning på 1,72 – 1,98. De melkesyrebakteriene som ga mest senkning av pH var *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 i samtlige typer erte- og fababønneemel, med henholdsvis reduksjon på 1,82 – 2,23 og 2 – 2,44 pH-enheter.

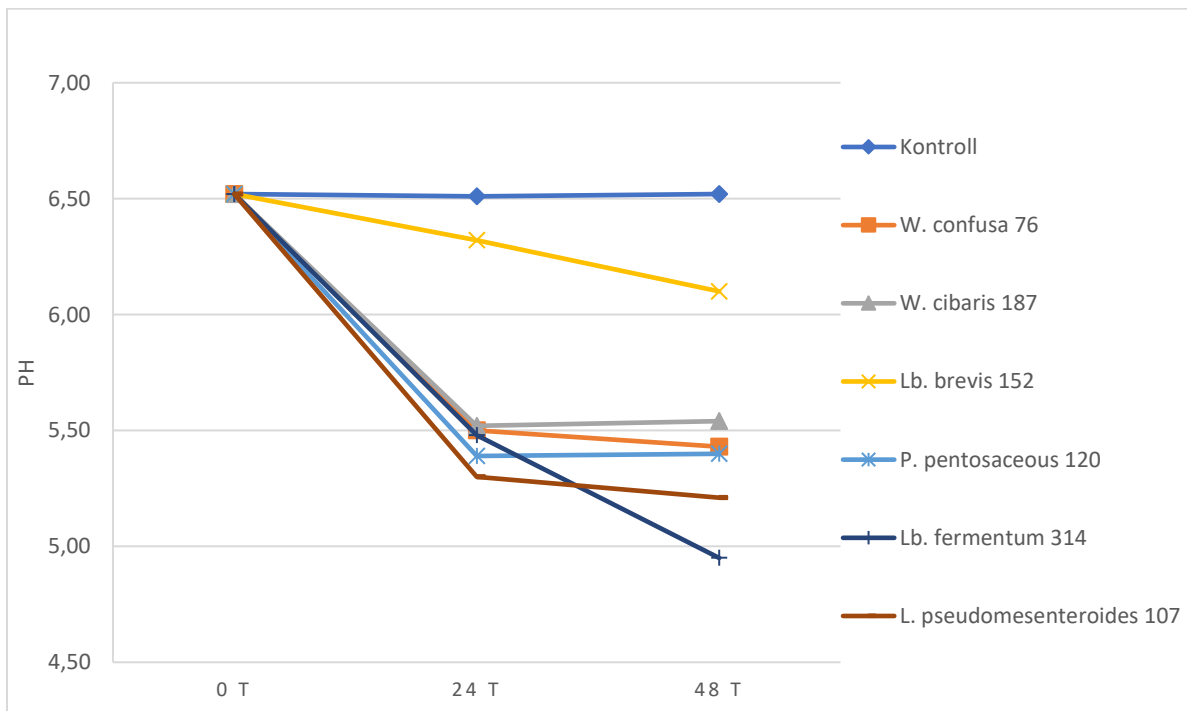
Videre i andre testrunde ble 6 stammer valgt ut til å bli testet i varmebehandlet melblandinger. pH ble målt ved 0, 24 og 48 timer fermentering og resultatene er vist i figur 11 - 14.



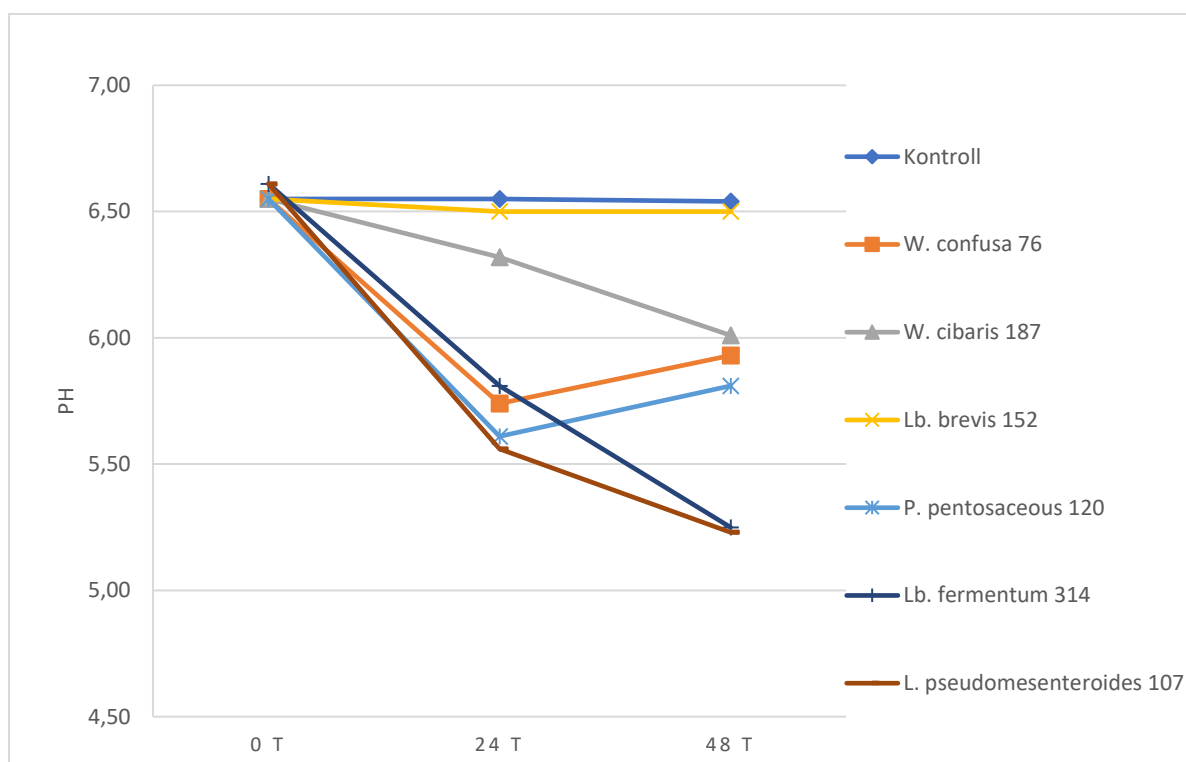
Figur 11: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30°C av kontroll og 6 stammer av melkesyrebakterier i Astronauta ertermel (10 %) varmebehandlet i 30 minutter i kokende (100 °C) vannbad.



Figur 12: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 6 stammer av melkesyrebakterier i Ingrid ertermel (10 %) varmebehandlet i 30 minutter i kokende (100 °C) vannbad.



Figur 13: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 6 stammer av melkesyrebakterier i Vertigo fababønnemel (10 %) varmebehandlet i 30 minutter i kokende (100 °C) vannbad.



Figur 14: Målinger av pH-nivå under fermentering ved 30 °C av kontroll og 6 stammer av melkesyrebakterier i Sampo fababønnemel (10 %) varmebehandlet i 30 minutter i kokende (100 °C) vannbad.

Kontrollprøver etter varmebehandling viser ingen endring i pH etter 48 timer fermentering. Se figur 11 – 14. Varmebehandlende prøver fermentert med *Lb. brevis* 152 ga minst reduksjon på 0,05 – 0,69 pH-enheter. I likhet med prøver uten varmebehandling viste det også i varmebehandlede prøver at melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 ga mest senkning av pH etter 48 timer fermentering. I varmebehandlende prøver av erte- og fababønnemel ga *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 henholdsvis reduksjon på 1,31 – 1,93 og 1,36 – 1,82 pH-enheter.

4.2 Hovedforsøk

Det ble undersøkt mikrobiell vekst, pH-utvikling, tørrstoff og innhold av karbohydrater og organiske syrer, for å se effekten av fermentering med melkesyrebakterier på erte- og fababønnemel. Det ble også gjennomført en analyse av fytinsyreinnhold, for å se effekten av fermentering på dette antinæringsstoffet.

Alle resultater er regnet ut fra 3 gjentak av fermenteringsforsøket. Enkelte verdier som hadde veldig stort avvik fra andre paralleller, ble utelukket fra utregningen. Dermed er alle gjennomsnittsverdier utregnet fra 2-3 paralleller.

4.2.1 Mikrobiell vekst

Det ble gjort analyse av mikrobiell vekst hos prøver av erte- og fababønnemel før og etter fermentering. Analysen ble gjort ved innstøping av prøvematerialet fra ulike fortynningsgrad i vekstmedium MRS, VRBA og RB-agar.

Etter inkubering var det ingen vekst på VRBA og RB-agar i alle prøver (<1 log cfu/g). Vekst på VRBA og RB-agar blir ikke presentert videre.

Melkesyrebakteriene med kjent konsentrasjon i frysestock-løsninger (se vedlegg 1) ble podet etter utregning til å gi omtrent 10^6 cfu/g i prøvene ved start fermentering. Det ble observert god vekst på MRS-agar, og celletall (log cfu/g) er vist i tabell 6. Hos samtlige kontrollprøver som ble fermentert uten melkesyrebakterier, ble det vist lite vekst (<1 log cfu/g).

For prøver fermentert med melkesyrebakterier ble det vist en økning på 2,6 – 4,04 log-verdier. Det var noe høyere økning i prøver av ertemel enn fababønnemel. Alle prøver av ertemel ved 0 t hadde celletall på 5,99 – 6,20 log cfu/g og prøver fermentert med melkesyrebakterier viste etter 48 t celletall på 9,68 – 10,03 log cfu/g. Hos prøver av fababønnemel ved 0 t viste det celletall på 5,89 – 6,34 log cfu/g, og i prøver fermentert med melkesyrebakterier (48 t) viste celletall på 8,78 – 9,95 log cfu/g.

Tabell 6: Gjennomsnittlig celletall av mikrobiellvekst på MRS-agar, av prøver fra ertemel og fababønnemel, før (0 t) og etter fermentering (48 t) med melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Celletall oppgitt som log cfu/g med standardavvik.

Prøve*	Vekst (log cfu/g)	
	0 timer	48 timer
PA-C	< 1	< 1
PA-F107	5,99 ± 0,09	10,03 ± 0,93
PA-F314	6,12 ± 0,83	9,68 ± 0,43
PI-C	< 1	< 1
PI-F107	6,20 ± 0,79	9,87 ± 0,83
PI-F314	6,19 ± 0,19	9,98 ± 0,91
BV-C	< 1	< 1
BV-F107	6,04 ± 0,06	9,95 ± 0,91
BV-F314	6,34 ± 0,26	9,03 ± 0,33
BS-C	< 1	< 1
BS-F107	5,89 ± 0,21	8,78 ± 0,26
BS-F314	6,18 ± 0,06	8,79 ± 0,21

*PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

4.2.2 pH

De to stammene fra innledende forsøk som ga mest senkning av pH i alle typer mel av ertel og fababønner ble benyttet i det endelige forsøket. Målingene fra det endelige forsøket presenteres videre i denne delen. Det ble målt pH-nivå av prøver ved start fermentering (0 timer) dvs. rett etter varmebehandling, avkjøling og poding, og av prøver etter fermentering (48 timer).

Kontrollprøvene uten tilsetning av melkesyrebakterier viste en liten senkning av pH-nivå, men endringen var ubetydelig (senkning på 0,00 – 0,23 pH-enheter). Gjennomsnittsverdier av pH-nivå er vist i tabell 7. I prøver av ertemel var pH ved 0 t 6,47 – 6,57, og i prøver av fababønnemel var pH ved 0 t 6,49 – 6,59.

Tabell 7: Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak av pH-nivå med standardavvik i prøver av ertemel og fababønnemel, før og etter 48 timer fermentering ved 30 °C uten (kontroll) og med melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

pH-måling		
Prøve*	0 timer	48 timer
PA-C	6,49 ± 0,03	6,40 ± 0,12
PA-F107	6,47 ± 0,05	4,63 ± 0,10
PA-F314	6,48 ± 0,07	4,58 ± 0,09
PI-C	6,57 ± 0,05	6,58 ± 0,05
PI-F107	6,56 ± 0,05	4,86 ± 0,09
PI-F314	6,57 ± 0,05	4,75 ± 0,06
BV-C	6,53 ± 0,03	6,23 ± 0,14
BV-F107	6,56 ± 0,03	5,09 ± 0,06
BV-F314	6,49 ± 0,10	5,17 ± 0,03
BS-C	6,59 ± 0,04	6,35 ± 0,31
BS-F107	6,56 ± 0,05	5,16 ± 0,09
BS-F314	6,56 ± 0,08	5,27 ± 0,08

*PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Som vist i tabell 7, har PA-F314 og PA-F107 mest senkning av pH med henholdsvis 1,9 og 1,84 pH enheter, etterfulgt av PI-F314 og PI-F107 med senkning på henholdsvis 1,82 og 1,7 pH enheter. Prøvene med mest senkning av pH er alle typer av ertemel, der Astronaute ertemel fikk mer senkning enn Ingrid ertemel.

Prøver av Vertigo fababønnemel (BV-F107 og BV-F314) fikk noe mindre reduksjon av pH, med henholdsvis 1,47 og 1,32 pH enheter. Minste senkning av pH ble observert i prøver av Sampo fababønnemel (BS-F107 og BS-F314) med henholdsvis 1,4 og 1,29 pH-enheter.

Det ble benyttet korrelasjon dataanalyseverktøy i Excel for å analysere en sammenheng mellom senkning av pH og økning av bakteriecelletall. Korrelasjonskoeffisienten viser en verdi mellom -1 og +1. Er koeffisienten nærmere +1, indikerer den en positiv korrelasjon mellom datasettene. Positiv korrelasjon vil si at hvis verdiene i et datasett stiger, økes også verdiene i det andre datasettet. Hvis korrelasjonskoeffisienten er tilnærmet 0, tilsier det ingen eller svak korrelasjon.

Det ble gjort utregning på antall pH-verdier senket ved å trekke fra pH-måling hos fermenterte prøver, fra prøver før fermentering. I andre datasett ble antall økninger i log-verdier regnet ut ved å treffe fra cfu/g i ikke-fermenterte prøver fra fermenterte prøver, se tabell 8 for verdier. Korrelasjonskoeffisienten ble 0,98, som tilsier en fullstendig samvariasjon mellom pH-senkning og økning i log cfu/g, se vedlegg 2.

Tabell 8: Verdier på pH-senkning og verdier log cfu/g økning i alle prøver etter fermentering ved 30 °C uten (kontroll) og med melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

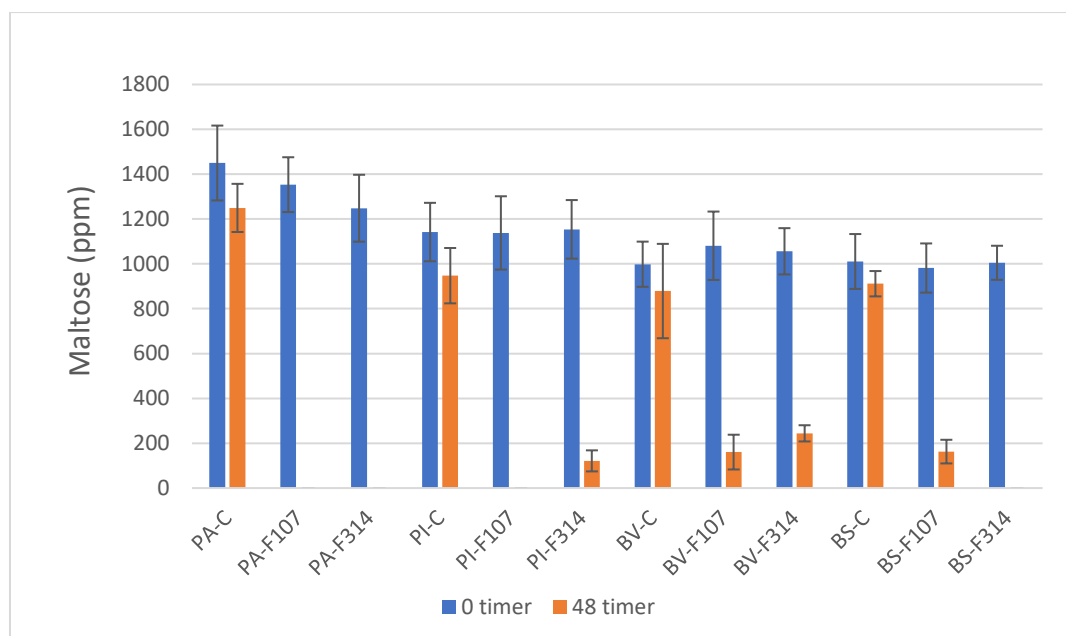
	pH senkning	log cfu/g økning
PA-C	0,09	0
PA-F107	1,84	4,04
PA-F314	1,90	3,56
PI-C	0,00	0,00
PI-F107	1,70	3,67
PI-F314	1,82	3,79
BV-C	0,30	0,00
BV-F107	1,47	3,92
BV-F314	1,32	2,69
BS-C	0,24	0,00
BS-F107	1,40	2,89
BS-F314	1,29	2,60

*PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

4.2.3 Organiske syrer og karbohydrater ved bruk av HPLC

Det ble foretatt HPLC-analyse for å undersøke nivåer av organiske syrer og karbohydrater. Karbohydrater som ble målt var maltose, glukose og fruktose, og resultatene er vist i figur 15 – 17. Ravsyre, sitronsyre, melkesyre, maursyre og eddiksyre var organiske syrer som ble analysert og resultatene er vist i figur 18 – 20. Ravsyre ble ikke detektert i prøvene og blir ikke presentert videre. Det gjelder også for maursyre som ikke blir presentert videre. Gjennomsnittsverdier ble regnet ut fra 2-3 gjentak. Noen få feilmålinger med for stort avvik til å være representativt har blitt fjernet fra utregningen.

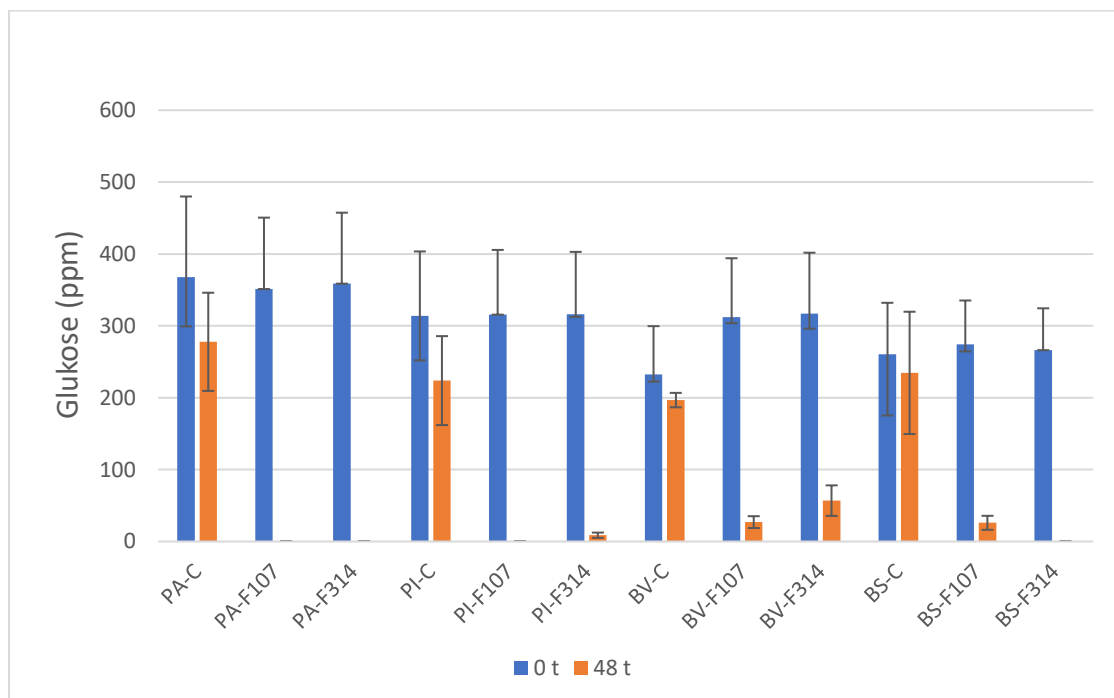
Maltose er et karbohydrat som ble brutt ned kraftig, i likhet med glukose under fermenteringen. Fruktose derimot ble bare delvis nedbrutt. I figur 15 vises det at kontrollprøvene hadde lite endring i maltoseinnhold (9 – 17 % nedgang), og viser ingen signifikant endring som effekt av fermentering, se vedlegg 4. Nesten all maltose (77 – 100 %) var brutt ned hos prøver tilsatt melkesyrebakterier, der maltose har blitt omdannet under den fermentative metabolismen. Eksempelvis viste PA-C et innhold på 1449 ppm maltose før fermentering, og et innhold på 1249 ppm etter 48 timer fermentering. Fra samme type melblanding viste PA-F107 og PA-314 rundt 1300 ppm maltose før fermentering, og alt ble brutt ned etter 48 timer fermentering.



Figur 15: Gjennomsnitt av maltose (ppm) i ertemel og fababønne, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og med *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

For glukose ble det vist en nedgang i kontrollprøvene på mellom 9,9 – 15,4 %. En nedgang på 82 – 100 % av glukose ble observert i prøver fermentert med melkesyrebakterier, der det ikke ble vist en signifikant forskjell ($p > 0,05$) på effekt av fermentering mellom melkesyrebakteriene, se vedlegg 5. Resultatene er vist i figur 16. Innholdet av glukose (232 – 367 ppm) er generelt mye lavere enn maltose (981 – 1449 ppm) i melblandingene før fermentering.

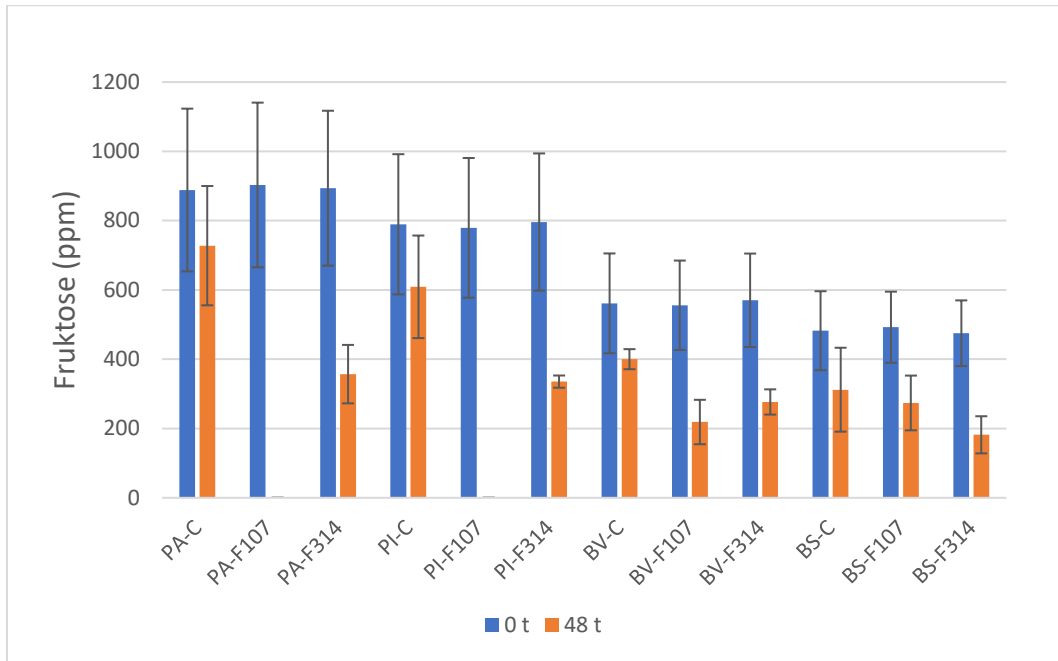
Det er tydelig store standardavvik fra målingene i prøver som fikk minst reduksjon, og liten standardavvik hos prøver med mest reduksjon av glukose.



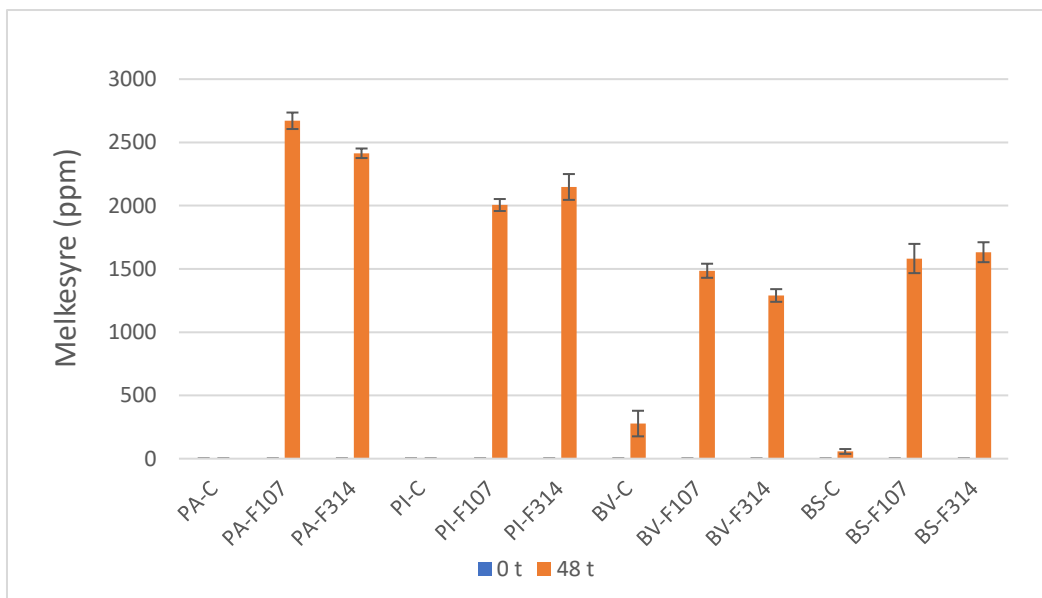
Figur 16: Gjennomsnitt av glukose (ppm) i ertemel og fababønne, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Fruktose hadde noe mer nedgang i kontrollprøvene etter fermentering enn andre karbohydrater (18 – 35 %). I begge typer ertemel ble fruktose 100 % omdannet ved tilsetning av *L. pseudomesenteroides* 107. Ertemel fermentert med *Lb. fermentum* 314 ga en nedgang på 57,8 – 60 % av fruktose. I figur 17 vises det et generelt lavere nivå av fruktose i fababønne enn ertemel, der PA og PI har henholdsvis 894 ppm og 788 ppm fruktose, mens prøver av BV og BS har henholdsvis 562 ppm og 483 ppm fruktose. Hos prøver av

fababønnemel ble det vist en nedgang på mellom 44 – 62 % etter fermentering, og det var ingen signifikant forskjell ($p > 0,05$) mellom typene melkesyrebakterie brukt til fermenteringen, se vedlegg 6.

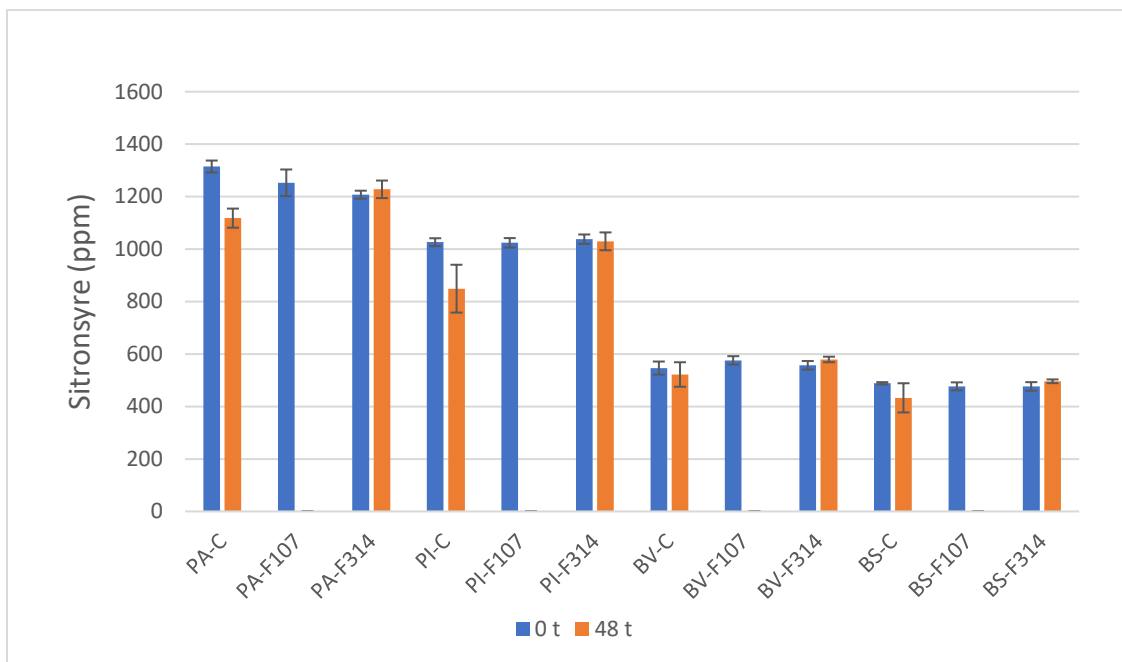


Figur 17: Gjennomsnitt av fruktose (ppm) i ertemel og fababønnemel, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.



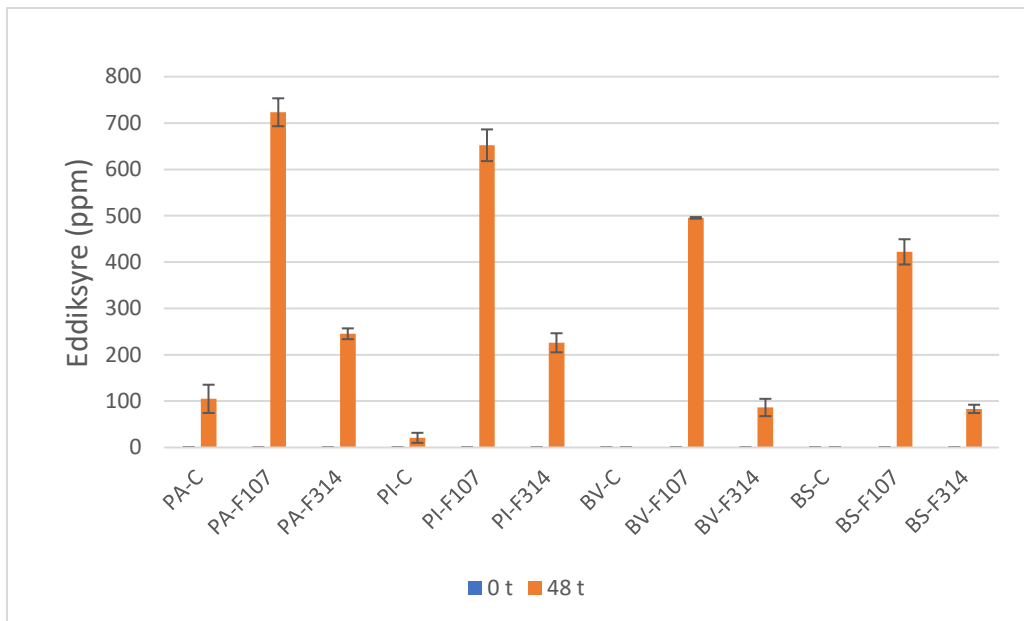
Figur 18: Gjennomsnitt av melkesyre (ppm) i ertemel og fababønnemel, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Det er ikke forventet melkesyre i prøvene ved start fermentering (0 timer), og det ble heller ikke detektert i analysen. Resultatene er vist i figur 18. I alle prøver fermentert med melkesyrebakterier ble det vist høy produksjon av melkesyre. Det er høyere produksjon av melkesyre i mel fra erter (2005 – 2670 ppm) enn i mel fra fababønner (1285 – 1631 ppm). Her er det også ikke merkbar forskjell på produksjon av melkesyre mellom bruk av *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.



Figur 19: Gjennomsnitt av sitronsyre (ppm) i ertemel og fababønnemel, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Gjennomsnitt av sitronsyreinnholdet er vist i figur 19. Det vises til et naturlig høyere innhold av sitronsyre i prøver av ertemel (1023 – 1314 ppm) enn hos prøver av bønnemel (475 – 575 ppm) før fermentering. Etter fermentering viser prøver tilsatt *L. pseudomesenteroides* 107 fullstendig omsetning av sitronsyre. Nivå av sitronsyre har fått en liten reduksjon (4,5 – 17,3 %) hos samtlige kontrollprøver etter fermentering. Det ble detektert liten til ingen endring (<1 %) av sitronsyreinnhold i fermenterte prøver tilsatt *Lb. fermentum* 314.



Figur 20: Gjennomsnitt av eddiksyre (ppm) i ertemel og fababønnemel, før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Figur 20 viste ingen eddiksyre i samtlige prøver før fermentering. Det viser at det ikke forekommer eddiksyre i erte- og fababønnemel. Det ble målt høyest innhold (ppm) av eddiksyre i fermenterte prøver tilsatt *L. pseudomesenteroides* 107. Det ble målt 723 ppm og 652 ppm eddiksyre i henholdsvis PA-F107 og PI-F107 etter 48 timers fermentering. I prøvene av fababønnemel, BV-F107 og BS-F107 ble det målt henholdsvis 495 ppm og 422 ppm av eddiksyre.

De fermenterte prøvene tilsatt *Lb. fermentum* 314 ga et lavere nivå av eddiksyre. I ertemel ble det målt 225 – 245 ppm, og i fababønnemel ble det målt 83 – 86 ppm etter 48 timers fermentering med *Lb. fermentum* 314.

For å se om det er en korrelasjon mellom mengde sitronsyre og eddiksyre i F107-prøver, ble det gjort en korrelasjon dataanalyse i Excel, se vedlegg 3. Et datasett av mengde sitronsyre i prøver før fermentering ble analysert mot et datasett av mengde eddiksyre i prøver etter fermentering. Det ga en korrelasjonskoeffisient på 0,99, som tilsier en fullstendig samvariasjon.

4.2.4 Tørrstoff

Melblandinger av prøvene startet med 10 % tørket mel, da blandingsforholdet var 30 g mel + 270 ml destillert vann. Vekt før og etter tørking i tørkeskap ble målt, et gjennomsnitt ble regnet ut og presentert i tabellen under.

Tabell 8: Gjennomsnitt av tørrstoffinnhold i prøver av ertemel og fababønnemel, før og etter fermentering med melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

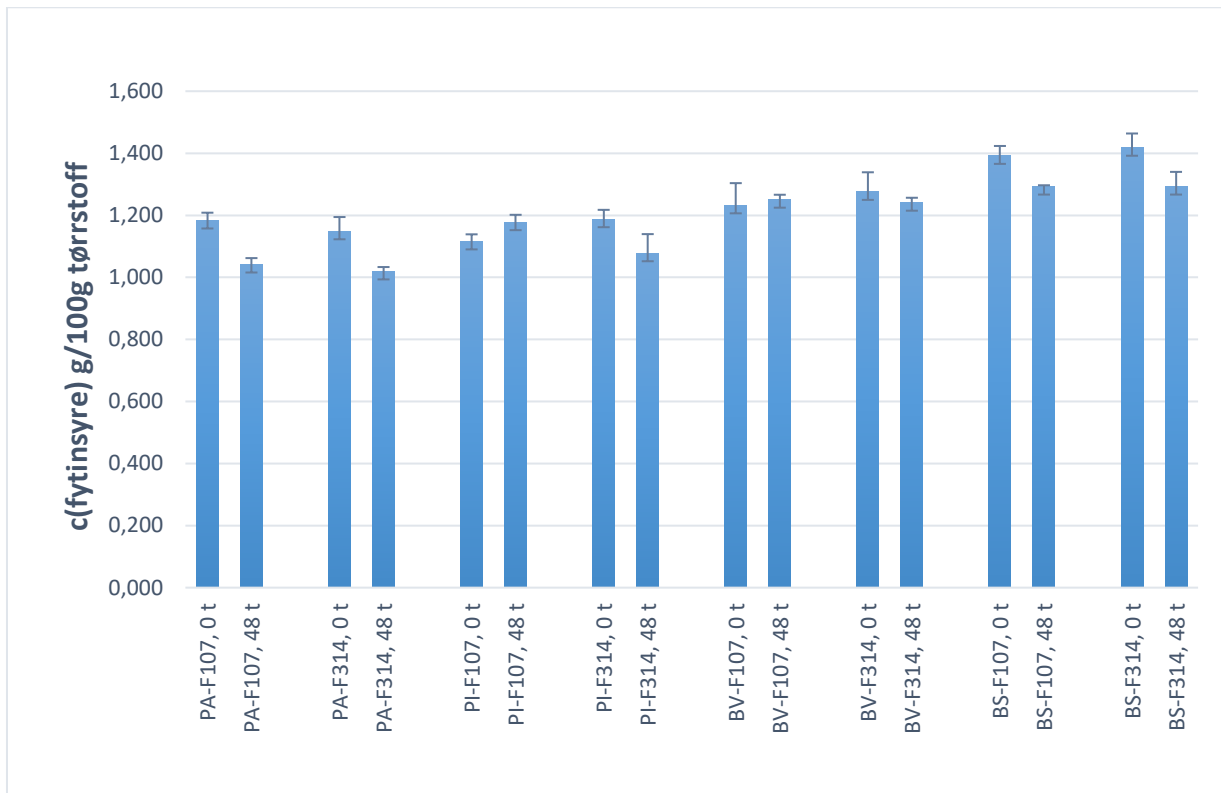
Tørrstoff i %	0 timer fermentering m/ standardavvik	48 timer fermentering m/ standardavvik
Astronaute ertemel	9,30 ± 0,79	8,78 ± 0,13
Ingrid ertemel	8,95 ± 0,27	8,85 ± 0,24
Vertigo fababønnemel	9,59 ± 0,69	8,98 ± 0,37
Sampo fababønnemel	9,52 ± 0,52	8,94 ± 0,11

Effekt av fermentering på tørrstoff kan sees i tabell 8, med % tørrstoff der prøver har blitt sammenlignet før og etter fermentering. Gjennomsnittlig tørrstoffinnhold i prøvene ble beregnet til å være ca. 9,3 % (± 0,57 %) før fermentering, og ca. 8,9 % (± 0,21 %) fermentering.

Det viser en liten reduksjon i samtlige prøver av tørrstoffinnhold etter fermentering. Mellom kontrollprøver og prøver tilsatt melkesyrebakterier ble det ikke vist en signifikant forskjell ($p > 0,01$) i endring av tørrstoffinnhold, se vedlegg 7.

4.2.5 Fytinsyreinnhold

For fababønner og erter ble det analysert innhold av både fritt og totalt fosfor ved kolorimetrisk bestemmelse. Figur 21 viser utregnet innhold av fytinsyre i mel av erter og fababønner, før og etter fermentering med tilsats av to ulike melkesyrebakterier. Verdiene til fytinsyre er oppgitt i g/100g tørrstoff (DM).



Figur 21: Innhold av fytinsyre (g/100g) i mel fra erter og fababønner før (0 timer) og etter fermentering (48 timer) med melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak med standardavvik er presentert. PA = Pea Astronaute, PI = Pea Ingrid, BV = Faba bean Vertigo, BS = Faba bean Sampo, C = kontroll, F107 = fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107, F314 = fermentert med *Lb. fermentum* 314.

Figur 21 viser et høyere fytinsyreinnhold i alle prøver av fababønner før fermentering (0 timer) (gjennomsnitt 1,34 g/100 g tørrstoff) enn i alle prøver av erter (gjennomsnitt 1,159 g/100 g tørrstoff). Det ble utført en enveis ANOVA test (variensanalyse med en faktor) i Excel, for å undersøke om det var signifikante forskjeller i fytinsyreinnhold mellom prøver av ertermel og fababønnemel. Analysen viste at mel av bønner hadde signifikant høyere innhold av fytinsyre enn mel av erter før fermentering (p -verdi $< 0,05$), se vedlegg 8. Det ble også vist et signifikant høyere innhold av fytinsyre i mel av bønner enn erter i prøvene etter

fermentering (p-verdi $\ll 0,05$), se vedlegg 9. Gjennomsnittlig fytinsyreinnhold i prøver av ertemel og fababønnemel etter fermentering (48 timer) var henholdsvis 1,079 g/100 g tørrstoff og 1,269 g/100 g tørrstoff.

For å se om fermentering hadde en betydelig effekt på fytinsyreinnhold ble det gjort en sammenligning med enveis-variansanalyse mellom prøvene før og etter fermentering. For prøver av ertemel, ble det funnet en p-verdi = 0,086. At p-verdi ikke er lavere enn 0,05 tilsier ingen signifikant forskjell i fytinsyreinnhold i ertes og ingen effekt av fermenteringen, se vedlegg 10. For fababønnemel ble det analysert en p-verdi = 0,317 (p-verdi $> 0,05$), og viser ikke en signifikant endring i fytinsyreinnholdet og derved ingen signifikant effekt av fermentering, se vedlegg 11.

Det ble undersøkt hvilken melkesyrebakterie som ga størst endring på fytinsyreinnholdet etter fermenteringsprosessen. Det ble funnet en p-verdi = 0,678 for prøver før og etter fermentering med melkesyrebakterien *L. pseudomesenteroides* 107. For prøver fermentert med melkesyrebakterien *Lb. fermentum* 314, ble det analysert frem til en p-verdi = 0,301. Ingen av melkesyrebakteriene ga signifikant forskjell i fytinsyreinnholdet etter fermentering, se vedlegg 12 og 13.

I prøvene av PI-F107, og i prøvene av BV-F107 viser det høyere innhold av fytinsyre i prøvene etter fermentering enn i prøver før fermentering. Dette var ikke signifikante forskjeller, og viser ikke signifikant effekt av fermentering. Det var en nedgang av fytinsyreinnhold i alle andre prøver.

Det ble sett på enkelttilfeller med høyest reduksjon av fytinsyreinnholdet. Prøvene som fikk mest reduksjon var PA-F107 og PA-F314, med henholdsvis 11,9 % og 11,3 % reduksjon. Begge er av typen Astronaute ertemel.

5 Diskusjon

Det har blitt undersøkt effekten av fermentering med melkesyrebakterier i mel av erter og fababønner dyrket i Norge. Oppgaven er skrevet som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture, der målet er å forbedre utnyttelsen og produksjonen av norske plantevekster som kan gi sunne og proteinrike matprodukter. Hensikten med oppgaven er å se på vekst og metabolisme av melkesyrebakterier i utvalgte norskdyrkede belgvekster. Det ble også gjort analyse for å måle innhold av fytinsyre, et anti-næringsstoff som ønskes i mindre grad i matprodukter. Belgfrukter er kjent for å bli forbundet med et høyere innhold av anti-næringsstoffer, noe som kan føre til negative helseeffekter hos dyr og mennesker. Det er ønskelig å teste fermentering som en prosesseringsmetode som kan gi positive effekter på sammensetningen av næringsstoffer og muligens forbedre utnyttelsen av planteråstoffet.

5.1 Effekt av fermentering ved vekstforsøk

Det er ofte brukt en kombinasjon av flere typer teknikker ved prosessering av belgfrukter. Avskalling, oppmaling og luftklassifisering kan fjerne resistent fiber og tanniner i skallet, og produsere konsentrerte fraksjoner av melet (Tulbek et al., 2017). Bløtlegging og spiring av belgfrukter reduserer noen antinæringsstoffer og forbedrer *in vitro* fordøyeligheten til protein, og disse metodene brukes ofte som en forbehandling til koking, ekstrudering eller fermentering (Abd El-Hady & Habiba, 2003; El-Adawy et al., 2000; López-Amorós et al., 2006).

Denne oppgaven har fokusert på fermentering som en prosesseringsmetode. I det innledende forsøket ble det testet fermentering med melkesyrebakterier i ertemel og fababønnemel som ikke ble varmebehandlet. Det viste en reduksjon av rundt 1 pH-enhet i samtlige kontrollprøver. Deretter ble det gjort fermentering av varmebehandlet melblandinger, for å fjerne uønskede mikroorganismer naturlig tilstede og gi bedre kontroll med hensyn til vekst av tilsatte melkesyrebakterier.

5.1.1 pH og celletall

Resultatene viste en økning på 2,6 – 4 log cfu/g hos fermenterte prøver med melkesyrebakterier på MRS agar. Det ble observert kolonidannelse med morfologisk likhet, dermed antas det at det hovedsakelig var vekst av melkesyrebakterier på skålene. Hos kontrollprøvene ble det ikke detektert mye reduksjon i pH. Det kan indikere at varmebehandlingen på 30 minutter i kokende vannbad ga god effekt med tanke på inaktivering av medfølgende mikrober i melblandingene.

Varmebehandlingsprosessen hadde til hensikt med å inaktivere mikroorganismer som naturlig forekommer og som derved kan skape spontan fermentering eller fordervelse av råmaterialet under gunstige forhold. Spontan fermentering er ikke nødvendigvis en negativ prosess. Det var slik fermentering av ulike råvarer opprinnelig startet og som fortsatt foregår i mange produksjoner av vin, sauerkraut, kimchi og surdeigsbrød. Tilsetning av en bestemt type og mengde melkesyrebakterier kan derimot gi en mer kontrollert fermenteringsprosess. I forskningen fra Jung et al. (2011), ble mikrobiell sammensetning relatert til metabolitter i kimchi under spontan fermentering. Der ble det vist at arter av *Leuconostoc* var mest forekommende gjennom hele gjæringen, men det ble observert en markant økning av slekten *Lactobacillus* etter det første fermenteringsstadiet.

Observasjonene i dette studiet viser at vekst av melkesyrebakterier og reduksjon av pH forekommer mer aktivt i ertemel enn i fababønnemel, med økning av bakteriecelletall mellom 3,56 – 4,04 log cfu/g i ertemel etter fermentering, i forhold til en økning av bakteriecelletall mellom 2,6 – 3,92 log cfu/g i fababønnemel. Grunnen kan være at ertemel har en mer gunstig sammensetning av komponenter enn bønner med hensyn til vekst av melkesyrebakterier. Erter har mer karbohydrater i forhold til fababønner, som derimot har et høyere innhold av protein. Astronaute ert ga best resultat med hensyn til reduksjon av pH og økning av celletall med henholdsvis 1,84 – 1,9 i pH reduksjon og 3,56 – 4,04 økning i log cfu/g for de 2 melkesyrebakteriestammene. Fra sortforsøket ble det kun opplyst at Ingrid hadde en høyere tusenfrøvekt, mens Astronaute hadde høyere proteininnhold (22 %, mens Ingrid hadde 19 % protein) (Abrahamsen et al., 2018).

Forskjeller mellom fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 eller *Lb. fermentum* 314 i erter og fababønner var ikke betydelig stor med tanke på pH og bakteriecelletall. Dette kunne muligens ha endret seg om fermenteringstiden gikk over lengre tid enn 48 timer, da

det har blitt vist i tidligere forskning (Jung et al., 2011) at fermenteringsraten til arter av *Lactobacillus* kan trenge noe mer tid for å komme i gang.

Ved korrelasjon dataanalyse mellom pH-senkning og økning i celletall log cfu/g, ble det vist en korrelasjonskoeffisient på 0,98 som tilsier en nærmest fullstendig samvariasjon. Det kan være en enda tydeligere indikasjon på at endringene skyldes tilsatte melkesyrebakterier. pH-reduksjon viser også at det har blitt produsert nok melkesyre og eddiksyre til å senke pH til et nivå som gjør miljøet surt og ugunstig for andre forringende mikrober (Taylor, 2004).

Tørrstoffinnholdet viste ingen signifikant forskjell mellom prøvene, uavhengig av type mel og type melkesyrebakterie brukt. I dette tilfelle kunne det vært nyttig å se på tørrstoffinnholdet i mel av erter og fababønner før det ble blandet med vann og varmebehandlet. Da kunne det diskuteres om varmebehandling endret tørrstoffinnholdet, men prosessen av fermentering gjorde ingen tydelig forskjell. Dette stemmer overens med tidligere forskning på fermentering av soyabønner, der det heller ikke ble rapportert noen merkbare forskjeller i tørrstoffinnholdet som effekt av fermentering (Ng'ong'ola-Manani et al., 2014).

5.1.2 Organiske syrer og karbohydrater

Konsentrasjon av gjærbare karbohydrater, bufferkapasitet, pH og tilstedeværelse av hemmende forbindelser er de viktigste miljøfaktorene som påvirker vekst av melkesyrebakterier (Demir et al., 2006). Det ble undersøkt innhold av karbohydratene maltose, glukose og fruktose ved hjelp av HPLC-analyse.

Det antas at karbohydrater har blitt omdannet av melkesyrebakteriene under fermentering og dermed ikke har blitt detektert i like høy grad i fermenterte prøver. Maltose er et disakkarid bestående av to glukose-molekyler. For å spalte disakkarider til monosakkarider for fermentering, må de ha disakkaridhydrolaser. Det indikerer at melkesyrebakteriene brukt i dette forsøket har enzymet maltase. Hele 77 – 100 % av maltose ble omdannet av melkesyrebakterier under fermenteringen i denne oppgaven. Glukose fikk noe reduksjon i kontrollprøver, og bra utnyttelse av melkesyrebakteriene som brukte 82 – 100 % under fermentering.

Fruktose inngår i glykolysen som fruktose-6-fosfat etter et fosforyleringstrinn. Reduksjon til laktat går gjennom den samme prosessen som for glukose, men kan være mindre omsettelig enn glukose og fermenteringen kan være mer tidskrevende (Wright & Axelsson, 2012). I dette forsøket ble det målt 18 – 35 % reduksjon i kontrollprøvene, noe som er høyere enn andre karbohydrater. Det ble vist mindre reduksjon blant prøver fermentert med melkesyrebakterier, rundt 44 – 60 % reduksjon. Melkesyrebakterier foretrekker glukose som energikilde under metabolismen fremfor andre karbohydrater.

Melkesyre var ikke detektert i prøver før fermentering. Det er som forventet, da det ikke naturlig finnes i belgvekster. Det ble vist nesten dobbel så høy produksjon av melkesyre i fermenterte prøver av ertemel som hos prøver av fababønnemel. Høyere produksjon av melkesyre kan indikere bedre fermentering som samsvarer med et litt høyere innholdet av stivelse og oligosakkarider i erter enn i fababønner (Gdala & Buraczewska, 1997). Hos erter utgjør karbohydrater og fiber nesten 80 % av tørrstoffet. Fra sortforsøket i regi av FoodProFuture (Abrahamsen et al., 2018) ble det vist at erter og fababønner hadde henholdsvis 21 og 29 % proteiner. Melkesyreproduksjon hos de 2 melkesyrebakteriestammene hadde lite forskjell, F107-prøver produserte i gjennomsnitt 1935 ppm melkesyre og F314-prøver produserte i gjennomsnitt 1870 ppm melkesyre etter 48 timer fermentering av erte- og fababønnemel.

Melkesyre og mer generelt organiske syrer, fungerer som biokonserveringsmiddel selv i kombinasjon med andre komponenter som karbondioksid, diacetyl og bakteriociner (De Vuyst & Vandamme, 1994). Melkesyreproduksjon og dannelse av en lav pH og surt miljø gir skade til både cellevegg og cellemembran, og endre membranpotensialet og aktiv transport og dermed føre til energiforringelse og celledød hos konkurrerende mikroorganismer. Derfor virker den høye melkesyreproduksjonen som en god konserveringseffekt i fermenterte produkter (Davidson et al., 2013).

Sitronsyre vil normalt bli brutt ned av *Leuconostoc*. Den transporteres inn i cellen via en spesifikk permease og ved hjelp av sitratlyase brytes sitronsyre ned til eddiksyre og oksaleddiksyre (Wright & Axelsson, 2012). Dette samsvarer med resultatene i dette forsøket, der sitronsyreinholdet ble fullstendig redusert i alle prøver tilsatt *L. pseudomesenteroides* 107. Det var lite reduksjon i alle andre prøver.

Reduksjonen av sitronsyre er omvendt proporsjonal med produksjonen av eddiksyre detektert i samme prøver fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107. Eddiksyre dannes fra heterofermentering dersom det er luft tilstede, uten luft blir det dannet etanol. *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 er begge heterofermentative, men det er store variasjoner mellom stammer når det gjelder omsetting av sitronsyre. En forskningsstudie om fermentering av hyllebærsaft viste at *L. casei* omsatte mye av sitronsyreinnholdet, mens prøver fermentert med *L. plantarum* ga ingen endring på sitronsyreinnholdet (Cirlini et al., 2020). Lignende resultater ble vist etter 48 timers melkesyrefermentering av gulrotsaft, at *L. casei* omsatte sitronsyre mer enn andre melkesyrebakterier brukt i forsøket. Etter lagring viste *L. plantarum*, *L. rhamnosus* og *L. paracasei* et høyere innhold av sitronsyre (Bergqvist et al., 2005).

Det ble ikke detektert ravsyre i dette forsøket. Ravsyre kan bli produsert fra sitrat som et produkt dannet av heterofermentative bakterier som for eksempel av *Lactobacillus fermentum* (Wright & Axelsson, 2012), men det skjedde ikke i dette forsøket. Produksjon av ravsyre fra sitrat kan være avhengig av hvilke stammer av *Lactobacillus fermentum* som brukes i fermenteringen.

5.2 Fytinsyreinnhold

En reduksjon av fytinsyre kan bidra til bedre biotilgjengelighet for mange andre komponenter som protein, vitaminer og mineraler. Til tross for et høyt mineralinnhold i erter, kan biotilgjengeligheten være svekket på grunn av høy konsentrasjon av fytat. Det har blitt rapportert av Sandberg (2002), at fytat fungerer som en inhibitor av sink-, jern- og kalsiumopptak. Hvis fytat blir nedbrutt, kan erter anses som en mer betydningsfull kilde til kalsium, sink og jern.

Fytinsyre, i likhet med tanniner og polyfenoler, danner komplekser med proteiner og reduserer deres løselighet og gjør dem mindre utsatt for proteolyse (Cheryan & Rackis, 1980). I tidligere studier har fermentering med melkesyrebakterier hatt suksess i reduksjon av antinæringsstoffer i belgfrukter som bønner, soyabønner og kikerter. Samtidig som reduksjon av antinæringsstoffer ble vist, ble det vist en økning i fordøyelighet av protein (Granito & Alvarez, 2006). En annen forskningsstudie viste at fermentering ga tydelig

nedgang i fytinsyreinnhold hos flere typer belgfrukter. Der hadde fababønner vist seg å ha endogen fytase-aktivitet (Luo & Xie, 2013). Det ble også vist at fytinsyreinnholdet ikke ble påvirket av fermenteringsprosessen. De optimale forholdene for nedbrytning av fytat varierte stort mellom forskjellige plantearter (Gustafsson & Sandberg, 1995).

Det ble vist en signifikant forskjell på innhold av fytinsyre mellom erter og fababønner. Innholdet var høyere i fababønnemel enn ertemel. Som nevnt danner fytinsyre komplekser med proteiner. Fra sortforsøket gjort av Abrahamsen et al. (2018) ble det vist at Ingrid og Astronaute erter hadde henholdsvis 19,3 og 22,1 % protein. Mens Sampo og Vertigo fababønner hadde henholdsvis 26,1 og 28,2 % protein. Det kan derfor være forventet at fababønner generelt har et høyere proteininnhold enn erter, og da vil fytinsyreinnholdet også være korresponderende høyt. Det kan ikke fastslåes med sikkerhet om det er en korrelasjon, da proteininnhold ikke ble målt i erte- og fababønnemel brukt i dette forsøket.

Ingen signifikant reduksjon av fytinsyre ble målt som effekt av fermenteringsprosessen i dette forsøket. Det ble heller ikke vist en signifikant forskjell mellom bruk av *L. pseudomesenteroides* 107 eller *Lb. fermentum* 314.

Prøvene som fikk mest reduksjon var begge prøvene av Astronaute ertemel fermentert med melkesyrebakterier. Det er oppgitt for lite informasjon om ertetypen til å kunne foreslå hvorfor akkurat Astronaute fikk mest reduksjon, og det ble heller ikke gjort målinger for å danne en profil over komponentsammensetningen.

Varmebehandling kan mulig påvirke fytinsyreinnholdet, men det ble ikke gjort målinger av erte- og fababønnemel ubehandlet, dvs. før koking. Det skulle ha vært gjort en analyse av mel før varmentehandling for å måle det naturlige innholdet av fytinsyre, samt undersøkt om varmebehandling ga en større effekt enn fermentering.

5.3 Praktiske hensyn

Råmaterialet i tørket form ble ikke vasket før det ble malt til mel, og hele prosessen kan ha tilført forurensinger fra omgivelser eller håndtering. Man er derfor avhengig at varmebehandlingen var nok til å inaktivere og drepe mikrober i melet før selve forsøket startet. Det kunne vært hensiktsmessig å teste lengre varmebehandlingstid.

Det ble valgt varmebehandling av melblanding på 10 % mel i kokende vannbad, fordi det var mest praktisk med tanke på mengde prøver og muligheten for omrøring underveis.

Alternativ sterilisering av råmaterialet kunne vært bestråling av melet til erter og fababønner, for å sikre at ingen andre mikroorganismer konkurrerte med de bestemte melkesyrebakteriene som ble tilsatt om næringsstoffer under fermentering.

I noen få kontrollprøver ble det observert tydelig vekst etter 48 timer inkubering. Det var tydelig i syltetøyglasset, før selve prøveuttaket og innstøping i vekstmedium. Én kontrollprøve ga vekst av en koloni på RB agar, noe som kan indikere vekst av sopp da mediet er tilsatt kloramfenikol som hemmer bakterier. Det kan indikere dårlig sterilisering av benyttet utstyr. Under forsøket ble det brukt syltetøyglass med lokk, som var autoklavert. Noen av glassene kan ha blitt brukt flere ganger før, og tålte ikke varmebehandlingen i vannbadet. Det ble dannet sprekker eller at glasset knuste helt i vannbadet slik at melblandingen rant ut, og noen gjentak måtte prepareres på nytt.

En annen mulig årsak til vekst i kontrollprøver kan være ujevn varmebehandling av melblandingene. Det var utfordrende å få jevn varmebehandling selv med omrøring under koking i vannbad. Melblandingene tyknet raskt i bunn og på sidene av syltetøyglasset, der det var nærmest kontakt med varmekilden. Omrøring med glass-stav ga ikke 100 % homogene prøver, og det kan ha blitt dannet klumper av mel som inneholdt medfølgende mikroorganismer. Disse ville da blitt skjermet mot full varmebehandling og eventuelt sporer tilstede kunne da germinere under inkubasjonstiden.

Mikroskopering av de få kontrollprøvene med vekst ble utført. Det ble observert stavformede bakterier, men man kan ikke med sikkerhet si at det ble sett spordannelse. Arter av slekten *Bacillus* kan muligens overleve varmebehandling, men det ble ikke undersøkt videre.

5.4 Oppsummering og konklusjon

Belgfrukter blir vanligvis klassifisert med lav glykemisk indeks (GI), det vil si lite nedbrytning av karbohydrater og langsom frigjøring av glukose til blodomløpet. Dette knyttes til høyere innhold av ufordøyelige karbohydrater som kostfiber, resistent stivelse og oligosakkarider i belgvekstene. Disse kan stimulere aktiviteten til prebiotiske bakterier i tarmen, resulterende i økt produksjon av kortkjedet fettsyrer, og noen typer organiske syrer som kan gi positive helseeffekter hos mennesker (Nugent, 2005). Dette ble gjort *in vitro* i fermenteringsprosessen, noe som forhåpentligvis gir samme effekter ved inntak i fermenterte matvarer og derved blant annet kunne eliminere flatulens og ubehagelig gassdannelse etter inntak av lite behandlet belgfrukter.

Ut ifra de mikrobielle resultatene kan det synes å være en tydelig vellykket fermentering med bruk av melkesyrebakteriene *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314, i norskdyrkede erter og fababønner. Både vekst, pH-reduksjon og dannelse av melkesyre og eddiksyre ble observert hos de 2 bakteriestammene. Fermenteringsforskjellen var ikke stor mellom de to typer av melkesyrebakterier brukt. Med tanke på omdannelse av sitronsyre, så var *Leuconostoc* meget effektiv sammenlignet med *Lb. fermentum* 314 som ikke omsatte sitrat.

Det ble observert mest bakteriecellevekst i prøvene av ertemel sammenlignet med fababønnemel, og det kan forklares med at erter inneholder mer stivelse og karbohydrater enn fababønner. Det samme gjelder med hensyn til senkning av pH og produksjon av melkesyre. Høyere innhold av protein, tanniner og kostfiber i fababønner kan være en grunn til at fermenteringseffekten var noe svakere. Kombinasjon med andre prosesser som skallfjerning og fraksjonering kan muligens bidra til enda høyere fermenteringsrate. Om skallfjerning og fraksjonering benyttes, kan store partikler med fiber og tanniner skilles vekk, men om det fjerner mer antinæringsstoffer, forbedrer tilgjengelighet og fordøyelighet av karbohydrater og proteiner må undersøkes videre.

6 Til ettertanke og videre forskning

Fermenterte prøver fra denne oppgaven ble frysetørket og lagret mørkt og tørt, så det er mulig å bruke samme materiale til videre forskning og sammenligne med data fra denne oppgaven. Det må nevnes at noen kontrollprøver viste seg å ikke ha fått full effekt av varmebehandlingen og viste noe vekst av andre mikroorganismer, noe som ikke var ønskelig. Optimalt sett burde det gjøres nye gjentak med samme betingelser beskrevet i denne oppgaven, gjerne med flere gjentak om mulig, eventuelt benytte forlenget varmebehandlingstid eller fermenteringstid.

Det skulle blitt utført analyse av aminosyrer i erte- og fababønnemel før og etter fermentering, men grunnet begrenset tid og nedstenging på grunn av covid-19, ble oppgaven redusert. Aminosyrer kan være interessant å undersøke videre av frysetørket materiale med tanke på proteinkvalitet etter fermentering og om det gir økning av svovelinnholdende aminosyrer, som det ofte er lite av i belgvekster.

Et tema for videre studier kan være å undersøke om fermentering med melkesyrebakterier har effekt på andre antinæringsstoffer enn fytinsyre. Det ble ikke vist en stor endring av fytinsyreinnhold, men noe reduksjon ble målt. Å måle fytinsyreinnholdet i råmaterialet før varmebehandling er å anbefale, slik at man har en ekstra verdi å sammenligne med. Andre interessante antinæringsstoffer som kan undersøkes er vicin og convicin, som finnes i fababønner og kan føre til favisme hos mennesker med G6PD-defekt. Analyse av oligosakkarider og proteaseinhibitorer kan utføres med Raffinose/D-galactose Assay Kit fra Megazyme (Irland) og ved hjelp av Protease Activity Assay Kit fra Abnova (Taiwan).

Løseligheten og aktiviteten til ulike komponenter avhenger av pH-verdien i løsningen, så det er mulig at spesifikke komponenter, som protein, får en annen løselighet etter fermentering som forårsaker en senket pH. Det kan også være interessant å undersøke proteinenes fordøyelighet og tilgjengelighet før og etter fermentering.

Først etter at fermenteringen er optimalisert, kan man gå videre til mer kreativt arbeid som produktutvikling av fermentert ertemel og fababønnemel. Det ble ikke utført noe sensorisk analyse i denne oppgaven, men kun notert ned lukt og konsistens underveis i prøveuttakene. Prøvene av fermentert ertemel ga en syrlig og god lukt, mens prøver av fermenterte

fababønnemel ga en svakere syrlig lukt. Det ble observert en fargeendring i melblandinger av fababønner. Fargen gikk fra lyse-beige til svak lilla etter 30 minutters varmebehandling.

Ideer for utvikling av produkter kan være så mangt. Fermentert erte- og fababønnemel kan muligens anvendes til å produsere vegansk yoghurt og syrnet fermentert drikke. Videre kan de fermenterte produktene, i form av deig eller tørket mel, bli inkorporert i surdeigsbakst eller utnyttes som kjøtterstatning.

7 Referanseliste

- Aarnes, H. (2020a). *oligosakkarider*. snl.no: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/oligosakkarider> (lest 19.03.2020).
- Aarnes, H. (2020b). *Tanniner*. Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/tanniner> (lest 02.06.2020).
- Abd El-Hady, E. A. & Habiba, R. A. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 36 (3): 285-293. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00217-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00217-7).
- Abrahamsen, U., Waalen, W. M. & Uhlen, A. K. (2018). Sortforsøk i erter og åkerbønne. 159-166. Tilgjengelig fra: https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/bitstream/handle/11250/2566118/016_Sortfors%25C3%25B8kErter%25C3%2585kerb%25C3%25B8nne.pdf?sequence=1&isAllowed=y (lest 20.06.2020).
- Abrahamsen, U., Uhlen, A. K., Waalen, W. M. & Stabbetorp, H. (2019). *Muligheter for økt proteinproduksjon på kornarealene*. NIBIO korn og frøvekst: NMBU.
- Alghamdi, S. S. (2009). Chemical composition of faba bean (*Vicia faba L.*) genotypes under various water regimes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (4): 477-482.
- Alonso, R., Orue, 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.
- Askew, K. (2019). *There is a mega-trend around fermentation": The rising star of fermented foods*. Tilgjengelig fra: <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/05/04/There-is-a-mega-trend-around-fermentation-The-rising-star-of-fermented-foods> (lest 02.05.2020).
- Aykroyd, W. R., Doughty, J. & Walker, A. F. (1982). *Legumes in human nutrition*, b. 20: Food & Agriculture Org.
- Bergqvist, S., Sandberg, A.-S., Carlsson, N.-G. & Andlid, T. (2005). Improved iron solubility in carrot juice fermented by homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria. *Food microbiology*, 22 (1): 53-61.
- Bishnoi, S., Khetarpaul, N. & Yadav, R. (1994). Effect of domestic processing and cooking methods on phytic acid and polyphenol contents of pea cultivars (*Pisum sativum*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 45 (4): 381-388.

- Björkroth, J. & Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The prokaryotes*, 4: 267-319.
- Carnovale, E., Lugaro, E. & Lombardi-Boccia, G. (1988). Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem*, 65 (2): 114-117.
- Cheryan, M. & Rackis, J. J. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 13 (4): 297-335.
- Cirlini, M., Ricci, A., Galaverna, G. & Lazzi, C. (2020). Application of lactic acid fermentation to elderberry juice: Changes in acidic and glucidic fractions. *LWT*, 118: 108779. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108779>.
- Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P. & Duc, G. (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba L.*) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115 (3): 329-339. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.016>.
- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum L.*). *British Journal of Nutrition*, 108 (S1): S3-S10.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M. & Schmidt, S. E. (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. I: *Food microbiology*, s. 765-801: American Society of Microbiology.
- 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 Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. I: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, s. 91-142: Springer.
- Demir, N., BAHÇEÇİ, K. S. & Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30 (3): 352-363.
- Deshpande, S., Sathe, S., Salunkhe, D. & 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.
- El-Adawy, T., Rahma, E., El-Bedawy, A. & Sobihah, T. (2000). Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. *Food/Nahrung*, 44 (5): 339-343.

- Etemadi, F., Hashemi, M., Barker, A. V., Zandvakili, O. R. & Liu, X. (2019). Agronomy, nutritional value, and medicinal application of faba bean (*Vicia faba L.*). *Horticultural Plant Journal*, 5 (4): 170-182.
- Frøseth, R. B. (2009). *Erter og åkerbønner*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/erter-og-akerbonner> (lest 10.02.2020).
- Frøseth, R. B. (2017). *Belgvekster til modning*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/belgvekster-til-modning> (lest 10.02.2020).
- Gdala, J. & Buraczewska, L. (1997). Chemical composition and carbohydrate content of several varieties of faba bean and pea seeds. *J. Anim. Feed Sci*, 6: 123-135.
- Granito, M. & Alvarez, G. (2006). Lactic acid fermentation of black beans (*Phaseolus vulgaris*): microbiological and chemical characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (8): 1164-1171.
- Guillamón, E., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Cuadrado, C., Sánchez, M. d. C. & Muzquiz, M. (2008). The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry*, 107 (1): 68-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.029>.
- Gustafsson, E. L. & Sandberg, A. S. (1995). Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Food Science*, 60 (1): 149-152.
- Hulse, J. H. (1994). *Nature, composition, and utilization of food legumes*. Current Plant Science and biotechnology in Agriculture, b. 19: Springer, Dordrecht. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0798-3_3.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E. L. & Jeon, C. O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (7): 2264-2274.
- Khokhar, S. & Apenten, R. K. O. (2003). Antinutritional factors in food legumes and effects of processing. *The role of food, agriculture, forestry and fisheries in human nutrition*, 4: 82-116.
- Kumar, R., M, K., Garsa, A., Shrivastava, B., Pv, R. & Tyagi, A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. I: *Fermented milk and dairy products*, s. 203-225. Taylor and Francis, USA: CRC Press.
- Kvam, G. (2017). *Vekst, metabolisme og ølbrygging med melkesyrebakterier og gjær*. master: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

- López-Amorós, M. L., Hernández, T. & Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (4): 277-283. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.06.012>.
- Luo, Y.-W. & Xie, W.-H. (2013). Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (*Vicia faba L.*). *CyTA-Journal of Food*, 11 (1): 43-49.
- Marsili, R., Ostapenko, H., Simmons, R. & Green, D. (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science*, 46 (1): 52-57.
- McKay, A. M. (1992). Hydrolysis of vicine and convicine from fababeans by microbial β -glucosidase enzymes. *Journal of applied bacteriology*, 72 (6): 475-478.
- Mittenzwei, K., Milford, A. B. & Grønlund, A. (2017). Status og potensial for økt produksjon og forbruk av vegetabilske matvarer i Norge.
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z. & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (1): 123-128. doi: 10.1007/s11274-010-0436-1.
- 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.
- Ng'ong'ola-Manani, T. A., Østlie, H. M., Mwangwela, A. M. & Wicklund, T. (2014). Metabolite changes during natural and lactic acid bacteria fermentations in pastes of soybeans and soybean–maize blends. *Food Science & Nutrition*, 2 (6): 768-785.
- Ng'ong'ola-Manani, T. A., Wicklund, T., Mwangwela, A. M. & Østlie, H. M. (2015). Identification and Characterization of lactic acid bacteria involved in natural and lactic acid bacterial fermentations of pastes of soybeans and soybean-maize blends using culture-dependent techniques and denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Biotechnology*, 29 (1): 20-50.
- Nugent, A. P. (2005). Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30 (1): 27-54.
- 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.
- Pulkkinen, M. (2019). *Occurrence of vicine and convicine in faba bean and their removal by hydrolysis*: University of Helsinki.
- Rawal, V. & Navarro, D. K. (2019). *The Global Economy of Pulses*. Rome: FAO.

- Rehman, Z.-u. & Shah, W. H. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91 (2): 327-331. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.019>.
- Saini, H. (1989). Legume seed oligosaccharides. I: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*, s. 329-341: Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- Sandberg, A.-S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition*, 88 (S3): 281-285.
- Shahidi, F. (1997). Beneficial health effects and drawbacks of antinutrients and phytochemicals in foods: an overview. I: ACS Publications.
- Shevkani, K. & Singh, N. (2014). Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins. *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (10): 2237-2244.
- Shevkani, K. & Singh, N. (2015). Relationship between protein characteristics and film-forming properties of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (4): 1033-1043.
- Singh, U., Rao, P. V. & Seetha, R. (1992). Effect of dehulling on nutrient losses in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5 (1): 69-76. doi: [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90007-7).
- Sosulski, F. W. & Imafidon, G. I. (1990). Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (6): 1351-1356.
- Steinkraus, K. (1995). *Handbook of Indigenous Fermented Foods, revised and expanded*: CRC Press.
- Taylor, J. R. N. (2004). FERMENTATION | Foods and Nonalcoholic Beverages. I: Wrigley, C. (red.) *Encyclopedia of Grain Science*, s. 380-390. Oxford: Elsevier.
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y., Asavajaru, P. & Lam, A. (2017). Chapter 9 - 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.
- Van der Poel, A. (1990). Effect of processing on antinutritional factors and protein nutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A review. *Animal Feed Science and Technology*, 29 (3-4): 179-208.

- Vaughan, E. E., Heilig, H. G. H. J., Ben-Amor, K. & de Vos, W. M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (3): 477-490. doi: 10.1016/j.fmre.2005.04.009.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sotomayor, C., Diaz-Pollan, C., Fernandez, M. & Urbano, G. (1998). Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207 (2): 140-145. doi: 10.1007/s002170050308.
- Warsame, A. O., O'Sullivan, D. M. & Tosi, P. (2018). Seed storage proteins of faba bean (*Vicia faba L*): Current status and prospects for genetic improvement. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66 (48): 12617-12626.
- Wright, A. V. & Axelsson, L. (2012). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. I: Vinderola, G., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & von Wright, A. (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.

Vedlegg 1

Cellekonsentrasjon (cfu/ml) i frysestock-løsninger av utvalgte bakteriekulturer.

Ved utplating ble det målt celletall og utregnet en kjent konsentrasjon av utvalgte bakteriekulturer, etter innledende forsøk.

Bakteriestamme	Cfu/ml
<i>Lb. fermentum</i> 314	10,4 * 10 ⁹
<i>P. pentosaceous</i> 120	14,1 * 10 ⁹
<i>W. confusa</i> 76	10,5 * 10 ⁹
<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	12,8 * 10 ⁹

Vedlegg 2

Korrelasjonsanalyse i Excel: mellom pH og bakteriecelletall

Datasett: senkning av pH-enheter som ble målt mot økning av log cfu/g hos prøver av erte- og fababønnemel fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 i både erte- og fababønnemel.

	pH senkning	log cfu/ml økning
pH senkning	1	
log cfu/ml økning	0,9800979	1

Vedlegg 3

Korrelasjonsanalyse i Excel: mellom sitronsyre og eddiksyre

Datsett: innhold av sitronsyre ved start fermentering og innhold av eddiksyre etter 48 timer fermentering hos prøver av erte- og fababønnemel fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107.

	<i>sitronsyre 0 timer</i>	<i>eddiksyre 48 timer</i>
<i>sitronsyre 0 timer</i>	1	
<i>eddiksyre 48 timer</i>	0,99338089	1

Vedlegg 4

Variansanalyse med en faktor: varians i maltoseinnhold mellom kontrollprøver før og etter 48 timer fermentering.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
kontroll 0 t	4	4600,58867	1150,14717	44131,3513		
kontroll 48 t	4	3986,77883	996,694708	29180,34		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	47095,3139	1	47095,3139	1,28479682	0,30025924	5,98737761
Innenfor gru	219935,074	6	36655,8456			
Totalt	267030,388	7				

Vedlegg 5

Variansanalyse med en faktor: varians i glukose mellom fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 i både erte- og fababønnemel.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
F107	4	52,962	13,2405	233,912791		
F314	4	65,5473333	16,3868333	744,195431		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	19,7988269	1	19,7988269	0,04048392	0,84718507	5,98737761
Innenfor gru	2934,32467	6	489,054111			
Totalt	2954,12349	7				

Vedlegg 6

Variansanalyse med en faktor: varians i fruktose mellom fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314 i fababønnemel.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
B-F107	2	492,4285	246,21425	1511,5926		
B-F314	2	458,3855	229,19275	4491,8612		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	289,73146	1	289,73146	0,0965216	0,7854332	18,512821
Innenfor gru	6003,4538	2	3001,7269			
Totalt	6293,1853	3				

Vedlegg 7

Variansanalyse med en faktor: varians i tørrstoff mellom kontrollprøver og prøver av erte- og fababønnemel fermentert med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
Kontroll	8	74,1304478	9,26630597	0,13806526		
F107	8	71,2522829	8,90653536	0,07826185		
F314	8	73,3431716	9,16789645	0,1300566		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,55314386	2	0,27657193	2,39536607	0,115593669	3,4668001
Innenfor gru	2,42468599	21	0,11546124			
Totalt	2,97782986	23				

Vedlegg 8

Variansanalyse med en faktor: varians mellom fytinsyreinnhold i erte- og fababønnemel, før fermentering.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
erter	4	4,63402118	1,15850529	0,00112053		
bønner	4	5,31579709	1,32894927	0,00801144		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,0581023	1	0,0581023	12,7250388	0,01182378	5,98737761
Innenfor gru	0,02739589	6	0,00456598			
Totalt	0,08549819	7				

Vedlegg 9

Variansanalyse med en faktor: varians mellom fytinsyreinnhold i erte- og fababønnemel etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
erter	4	4,31519537	1,07879884	0,00492513		
bønner	4	5,07521425	1,26880356	0,00075419		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,07220359	1	0,07220359	25,4268124	0,00235102	5,98737761
Innenfor gru	0,01703798	6	0,00283966			
Totalt	0,08924157	7				

Vedlegg 10

Variansanalyse med en faktor: fytinsyreinnhold i prøver av ertemel før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
P - 0t	4	4,63402118	1,15850529	0,00112053		
P - 48t	4	4,31519537	1,07879884	0,00492513		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,01270624	1	0,01270624	4,20342376	0,08621513	5,98737761
Innenfor gru	0,01813698	6	0,00302283			
Totalt	0,03084322	7				

Vedlegg 11

Variansanalyse med en faktor: fytinsyreinnhold i prøver av fababønnemel før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107 og *Lb. fermentum* 314.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
B - 0t	4	5,29546262	1,32386566	0,00943093		
B - 48t	4	5,07521425	1,26880356	0,00075419		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,00606367	1	0,00606367	1,19069148	0,31705896	5,98737761
Innenfor gru	0,03055536	6	0,00509256			
Totalt	0,03661903	7				

Vedlegg 12

Variansanalyse med en faktor: fytinsyreinnhold i prøver før og etter 48 timer fermentering med *L. pseudomesenteroides* 107.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
F107 0 t	4	4,9014491	1,2253623	0,0138449		
F107 48 t	4	4,7613112	1,1903278	0,0121283		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,0024548	1	0,0024548	0,1890283	0,6789284	5,9873776
Innenfor gru	0,0779195	6	0,0129866			
Totalt	0,0803743	7				

Vedlegg 13

Variansanalyse med en faktor: fytinsyreinnhold i prøver før og etter 48 timer fermentering med *Lb. fermentum* 314.

SAMMENDRAG						
Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians		
F314 0 t	4	5,0280347	1,2570087	0,0142683		
F314 48 t	4	4,6290984	1,1572746	0,0168906		
Variansanalyse						
Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	0,0198938	1	0,0198938	1,2769256	0,3016116	5,9873776
Innenfor gru	0,0934765	6	0,0155794			
Totalt	0,1133703	7				



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway