



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Tove G. Devold

Funksjonelle egenskaper i fababønner (*Vicia faba L.*) ved varierende pH og ionestyrke

Effects of pH and NaCl on functional properties of
faba beans (*Vicia faba L.*)

Sine Martine Steien

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en del av en toårig masterutdanning i Matvitenskap – Produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet (NMBU). Oppgaven ble utført for forskningsprosjektet FoodProFuture som er et fireårig prosjekt som NMBU er med i. Laboratoriarbeidet ble utført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) våren 2018.

Dette semesteret har jeg lært masse om planteproteiner, funksjonelle egenskaper og analyser knyttet til dette. Jeg er veldig takknemlig for å ha mange flinke professorer og forskere som veiledere og har fått god hjelp og et stort støtteapparat til oppgavens mange analyser.

Det er mange mennesker jeg vil takke for tid, tålmodighet, støtte og veiledning de siste fem månedene. Først og fremst vil jeg takke hovedveileder Tove G. Devold for god veiledning, kunnskap og tilbakemeldinger. Jeg vil også rette en stor takk til biveileder Tora Asledottir som har gitt meg opplæring av ulike analyser og hjulpet meg med bearbeiding av resultater. Takk til biveileder Reidar B. Schüller som har lært meg masse om reologiske analyser. Tusen takk til biveileder Jon Ø. Hansen som har gitt meg proteinfraksjonen av fababønner som har blitt benyttet til denne oppgaven og for god kunnskap. Takk til biveileder Gerd Vegarud som var til god hjelp for valg av oppgave, metoder og kunnskap. Jeg vil også takke Irene Comi og Tone-Inger Eliassen som har hjulpet meg med å finne frem utstyr på laboratoriet. Jeg vil også rette en stor takk til forskningsprosjektet FoodProFuture for økonomisk støtte og som har latt meg få et innblikk i hvordan det er å være med i et stort forskningsprosjekt med mange samarbeidspartnere. Jeg setter stor pris på å ha fått være med og delta på møter og seminarer der jeg har fått vist frem mine resultater underveis.

En siste takk går til venner og familie som har motivert, korrekturlest, delt datakunnskaper og gitt meg daglig støtte meg gjennom dette semesteret.

Norges miljø- og biovitenskaplige universitet

Ås, mai 2018

Sine Martine Steien

Sammendrag

Belgvekster er en viktig proteinkilde for en stor del av verdens befolkning, spesielt der ressursene er knappe og tilgjengeligheten av animalskprotein er lav. I vestlige land i dag brukes mesteparten av belgvekstene som dyrkes til produksjon av fôr. Som et resultat av den økende befolkningen, er det forventet lavere matsikkerhet i fremtiden hvis ikke ressursene begynner å brukes mer optimalt. Ved at flere begynner å basere kostholdet på vegetabiliske proteinkilder, vil det kunne produseres mer bærekraftig mat sammenlignet med produksjon av kjøtt. For at flere skal velge vegetarisk må det undersøkes hvordan holdninger befolkningen har til å velge vegetarisk, slik at det kan forskes på funksjonelle og sensoriske egenskaper i proteinrike planter slik at produkter som befolkningen vil ha kan lages. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke et utvalg av funksjonelle egenskaper i en proteinfraksjon av fababønner. Det ble gjennomført analyser på proteinfraksjoner for å undersøke proteininnhold og aminosyresammensetning før funksjonelle egenskaper som proteinløselighet, viskositet, gel og skum ble undersøkt. Funksjonelle egenskaper påvirkes i stor grad av konsentrasjon, pH, ionestyrke og interaksjoner med andre komponenter. Analysene på funksjonelle egenskaper ble gjennomført ved varierende pH på 3, 4, 5, 6 og 7 og varierende ionestyrke på 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 og 1 M NaCl.

Proteinfraksjonen hadde et proteininnhold på 56 %. Aminosyresammensetningen inneholdt essensielle aminosyrer, men inneholdt lite av tryptofan og de svovelholdige aminosyrene metionin og cystein. Proteinløseligheten var lavest ved pH 4, men ved økende ionestyrke ble det også observert en økende løselighet. Det isoelektriske punktet ble derfor antatt til å være ved cirka pH 4. Ved pH-verdier fra det isoelektriske punktet ble det observert at endring av ionestyrke påvirket proteinløseligheten i mindre grad. Viskositetsmålingene viste at høyere konsentrasjon av proteinfraksjonen i prøvene resulterte i høyere viskositet. Ved 10 % konsentrasjon ble det også observert en økning av viskositet ved økende pH. Målinger som ble utført for å undersøke geleegenskaper viste at stivheten og gelstyrken var høyere i geler med høyere konsentrasjon av proteinfraksjon sammenlignet i geler med lavere konsentrasjon ved alle pH-verdier. Stivheten var høyest ved pH 3, 4 og 5 og lavest ved pH 7. Proteinfraksjonen viste god skumevne, men viste ikke god skumstabilitet sammenlignet med eggehvitpulver. Skumevnen er var dårligst ved pH 4, men ved denne pH-verdien var skummet mest stabilt. Signifikante forskjeller ved endring av pH og ionestyrke ble observert for både skumevne og skumstabilitet.

Abstract

Legumes are an important source of proteins for large segments of the world's population, especially in countries where the resources are scarce. In the western countries today, a large amount of the legumes being grown are used in animal feed. Because of the growing population in the world, weaker food security is expected in the future if the resources are not being used more optimally. If more people start basing their diet on plant-based protein sources, more sustainable foods will be produced compared with the production of meat and animal-based products. To influence the population to eat more plant proteins it is important to determine the populations attitude to plant-based products and do research on the functional and sensory properties in protein rich plants, so products can be made. The aim of this thesis was to determine some of the functional properties in a protein fraction of faba beans. Analyses of the protein fraction was done to examine the protein content and the amino acid composition was done. The functional properties such as protein solubility, viscosity, gelation and foam were analyzed. Concentration, pH, ionic strength and interactions with other components are all factors affecting the functional properties. The analyses of the functional properties were conducted with different pH-values of 3, 4, 5, 6 and 7 and varying ionic strength of 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 M NaCl.

The protein fraction consisted of 56 % crude protein. The amino acid composition contained essential amino acids, but small amounts of tryptophan and the sulfurous amino acids methionine and cysteine. The protein solubility was lowest at pH 4, but the solubility increased with an increasing ionic strength. The isoelectric point was therefore measured to be around pH 4. The solubility analysis also showed that pH-values away from the isoelectric point did not get very affected by the adjustment of the ionic strength compared to pH-values close to the isoelectric point. Measurements of viscosity showed that the viscosity increased with increasing concentration of the protein fraction in the samples. At 10 % concentration of the protein fraction an increasing viscosity with increasing pH-values was observed. Measurements on gelling properties showed that the gel stiffness was higher in the gels with higher concentrations of the protein fraction at all pH-values. The el strength was highest at pH 3, 4 and 5 and lowest at pH 7. The protein fractions showed a good foam ability, but weak foam stability. The foam ability was weakest at pH 4, but the foam was more stable at this pH-value. Significant differences by altering the pH and ionic strength was observed at both foam ability and stability.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IX
1 Innledning	1
1.1 Utnyttelse av planteproteiner i mat for en mer bærekraftig matproduksjon.....	1
1.2 Utnyttelse av belgvekster til human ernæring.....	1
1.3 Hensikt med oppgaven.....	2
2 Teori	5
2.1 Dyrking av fababønner	5
2.2 Proteiner i fababønner.....	5
2.2.1 Globuliner.....	6
2.2.2 Glutelinier.....	6
2.2.3 Albuminer.....	7
2.2.4 Prolaminer	7
2.3 Proteinekstrahering.....	7
2.3.1 Våtfraksjonering	8
2.3.2 Tørrfraksjonering.....	8
2.4 Generelt om funksjonelle egenskaper.....	9
2.4.1 Løselighet	9
2.4.2 Viskositet.....	10
2.4.3 Geldanning	11
2.4.4 Skumdanning.....	12
3 Materialer og metoder	13
3.1 Om proteinfraksjonen av fababønner benyttet i oppgaven	13

3.2	Undersøkelse av partikkelstørrelse i produkt.....	13
3.3	Analyse av proteininnhold og aminosyresammensetning.....	14
3.3.1	Prøveopparbeidelse til analyse av total nitrogen (TN) ved mikro-Kjeldahl metoden	14
3.3.2	Prøveopparbeidelse til analyse av ikke protein nitrogen (IPN) ved mikro-Kjeldahl metoden.....	14
3.3.3	Oppslutning, destillering og beregning av proteininnhold.....	15
3.3.4	Aminosyreanalyse.....	15
3.4	Proteinløselighet.....	16
3.4.1	Proteinløselighet ved bruk av Micro BCA™ Protein Assay Kit.....	17
3.4.1.1	Bestemmelse av proteinløselighet – effekt av pH.....	18
3.4.1.2	Bestemmelse av proteinløselighet – effekt av ionestyrke.....	18
3.4.1.3	Utføring av Micro BCA™ Protein Assay Kit.....	19
3.4.2	Proteinseparering ved natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel-elektroforese (SDS- PAGE).....	20
3.4.2.1	Preparering av prøveløsninger.....	20
3.4.2.2	Gjennomføring av SDS-PAGE.....	21
3.4.2.3	Synliggjøring av proteinbånd ved bruk av Gel Doc™ EZ og Image Lab.....	21
3.5	Måling av viskoelastiske egenskaper i produkt ved varierende pH og ionestyrke ved bruk av reometer.....	22
3.5.1	Preparering av prøver.....	23
3.5.2	Måling av viskositet.....	24
3.5.3	Måling av geldanningsegenskaper.....	24
3.5.3.1	Geldanning og måling av stivhet på gel.....	25
3.5.3.2	Måling av gelstyrke.....	25
3.6	Skumdanningsevne og stabilitet.....	25
3.6.1	Preparering av prøver.....	26
3.6.2	Måling av skumdanningsevne og stabilitet.....	27
4.	Resultater.....	29
4.1	Partikkelstørrelse i proteinfraksjon av fababønner.....	29
4.2	Analyse av proteininnhold og aminosyresammensetning.....	29

4.2.1 Proteininnhold.....	29
4.2.2 Aminosyresammensetning	31
4.3 Proteinløselighet	32
4.4 Analyse av proteinprofil ved SDS-PAGE.....	36
4.5 Måling av viskoelastiske egenskaper ved bruk av reometer.....	41
4.5.1 Viskositetsmålinger.....	41
4.5.1 Gelegenskaper.....	43
4.6 Skumdanningsevne og stabilitet.....	48
5 Diskusjon	51
5.1 Proteininnhold og aminosyresammensetning.....	51
5.2 Proteinløselighet	52
5.3 Viskoelastiske egenskaper	55
5.4 Skumdanning og stabilitet.....	58
6 Konklusjon.....	61
7 Til ettertanke og videre forskning.....	63
7.1 Til ettertanke.....	63
7.2 Videre forskning.....	64
8 Litteraturliste.....	65
Vedlegg.....	A
Vedlegg 1. Sitronsyre - Na ₂ HPO ₄ bufferløsninger, pH 3-7	B
Vedlegg 2. Prosedyre for fortynninger av standardløsninger av BSA.....	C
Vedlegg 3. Gjennomsnittsmålinger for TN og IPN	D
Vedlegg 4. Gjennomsnittsmålinger for proteinløselighet.....	F
Vedlegg 5. Gjennomsnittsmålinger for viskositet.....	G
Vedlegg 6. Målinger av stivhet på geler.....	I
Vedlegg 7. Skumevne og skumstabilitet.....	J

Forkortelser

11S	Legumin
7S	Vicilin
ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk; analysis of variance)
BCA	Bionchoninsyre
BSA	Bovint serumalbumin
Ca ¹⁺	Kalsium
Ca ²⁺	Kalsium
Da	Dalton
DTT	Dithiotheiol
dH ₂ O	Destillert vann
IEP	Isoelektisk utfelling (fra engelsk; isoelectric precipitation)
FBPF	Fababønneproteinfraksjon
G'	Lagringsmodul
G''	Tapsmodul
γ	Gamma
H ₂ SO ₄	Svovelsyre
HCl	Hydrogenklorid
HPLC	Væskeskromatografi (fra engelsk; high performance liquid chromatography)
IHA	Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap
IPN	Ikke-protein nitrogen
kDa	Kilodalton
M	Molar
mL	Milliliter
NH ₃	Ammoniakk
nm	Nanometer
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NDF	Naturlig løselig fiber (fra engelsk; neutral detergent fiber)
pI	Isoelektrisk punkt
SDS-PAGE	Natriumdodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese
σ	Sigma

τ	Tau
TCA	Trikloreddiksyre (fra engelsk; trichloroacetic acid)
TN	Total nitrogen
V	Volt
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Innledning

1.1 Utnyttelse av planteproteiner i mat for en mer bærekraftig matproduksjon

I 2050 er det forventet at 9 milliarder mennesker lever på jorden (Nelson et al., 2009). Matsikkerheten vil bli en økende utfordring hvis ikke ressursene brukes mer optimalt. Som et resultat av en stadig økende befolkning må planteprotein bli en stadig viktigere proteinkilde i human ernæring fremfor animalsk protein i framtiden. Spesielt i vestlige land, blir i dag en stor andel av proteinrike planter, som belgvekster, brukt i fôr i kjøtt-, egg-, melke- og fiskeoppdrettsindustrien. Bare 15 % av planteproteinene i fôret blir til animalsk protein i kjøttet. Dette betyr at hele 85 % av planteproteinene går «til spille» i forhold til om planteproteinene ble direkte benyttet til mat (Aiking, 2011). Som følge av reduserte landarealer som går med til dyrking, er det også viktig å optimalisere bruken av landarealene. Mindre enn 10 % av landarealet trengs for å dyrke vegetabilsk mat sammenlignet med arealet som trengs for å dyrke fôr for å få samme mengde proteiner fra kjøtt (De Boer & Aiking, 2011).

1.2 Utnyttelse av belgvekster til human ernæring

Planteproteiner er proteiner som kommer fra landplanter og animalske proteiner er proteiner som kommer fra animalske kilder som kjøtt, fisk, melk og egg. Proteiner i planter er ofte lagret i frøene eller kornene på planten (Day, 2013). Korn og belgfrukter er de plantene som konsumeres av mennesker for inntak av planteproteiner da disse inneholder et høyt innhold av disse næringsstoffene sammenlignet med andre vegetabiliske kilder. Korn, erter og bønner blir ofte avskallet og deretter skilt i ulike komponenter og malt opp til ulike typer mel der næringsinnholdet varierer. Videre kan melet bli fraksjonert for å øke innholdet av ønskede næringsstoffer. For eksempel inneholder et mel av oppmalte fababønner 25-30 % protein, mens etter luftfraksjonering kan proteininnholdet i proteinfraksjonen variere fra 55-65 % protein (Karaca et al., 2011; Sosulski & Youngs, 1979; Tyler et al., 1981).

Belgvekster er proteinrike vegetabiler som bidrar med både energi og mange ulike næringsstoffer, er relativt billig og kan dyrkes nesten over hele verden. Både for mennesker og husdyr bidrar belgvekster med proteiner, karbohydrater, fiber, vitaminer og mineraler (Ray & Georges, 2010). Det er heller ingen kulturer eller religioner som forbyr konsumering av belgvekster sammenliknet med noen animalske proteinkilder. Bruk av belgvekster i dietten er

en lang tradisjon spesielt blant befolkningen i sør-Asia og Afrika, men det meste som blir dyrket i verden går til dyrefôr for å produsere animalske proteiner i form av kjøtt, melk og egg.

De siste 10 årene har det skjedd endringer i markedet for vegetarmat med høyt proteininnhold i Norge. Det kommer stadig nye matprodukter som brukes som meieri- og kjøtterstattere som følge av befolkningens holdninger til blant annet mettet fett, laktose og dyrevelferd. Disse produktene er oftest laget av soyabønner, men linser, kikerter, quinoa og andre typer bønner blir også benyttet. Spesielt blant yngre er det økt fokus på miljø, dyrevelferd og bærekraftighet noe som har ført til en fremvekst av vegetarianere og veganere i den norske befolkningen. Kjøttfrie dager har også blitt et fenomen på arbeidsplasser og i husholdningen, noe som også har bidratt til økt forbruk av matvarer laget av belgvekster. Redusert inntak av animalske proteiner er blitt en trend blant mange i samfunnet. Samtidig som befolkningsveksten stiger må matproduksjonen bli mer bærekraftig. Utviklingen av næringsmidler med planteproteiner er derfor veldig aktuelt.

1.3 Hensikt med oppgaven

FoodProFuture er et forskningsprosjekt som utvikler en kunnskapsplattform for utnyttelse av norske proteinrike vekster, som belgvekster og havre. Målet er at kunnskapen kan utgjøre råvarer i plantebaserte matvarer som er gode, attraktive og inneholder mye proteiner. For å lage mat som hovedsakelig baserer seg på plantevekster med høyt proteininnhold, er det viktig å forstå hvordan planteproteinene oppfører seg under ulike betingelser for å lage et best mulig produkt. Plantebaserte produkter av høy kvalitet kan gi økonomisk gevinst i matindustrien og landbruket. Det er også viktig å ha kunnskap om norske forbrukeres holdninger slik at økt inntak av plantebaserte proteiner er med på å gjøre kostholdet til befolkningen mer bærekraftig med reduserte miljøavtrykk. En bedre helse blant store grupper av befolkningen er også å forvente siden mange proteinrike vekster har en gunstig aminosyresammensetning og inneholder lite mettet fett.

Denne masteroppgaven ble gjennomført under prosjektet FoodProFuture. Hensikten med oppgaven var å undersøke funksjonelle egenskaper i et norskprodusert luftfraksjonert fababønnemel med høyt proteininnhold. Løselighet, viskositet, gel- og skumdanning ble undersøkt ved varierende pH og ionestyrke. Et annet mål med oppgaven var å evaluere metodene som ble benyttet for å undersøke funksjonelle egenskaper i proteinrike vekster slik

at FoodProFuture kan ta med seg denne kunnskapen videre når funksjonelle egenskaper i andre produkter skal analyseres.

2 Teori

2.1 Dyrking av fababønner

Fababønner, også kalt åkerbønner, bondebønner, hestebønner og favabønner, er en del av erteblomstfamilien. Bønnene har et høyt protein- og stivelsesinnhold som gjør det godt egnet til bruk i mat og fôr (Duc et al., 1999). I utviklingsland i Asia og Afrika dyrkes fababønner til bruk i mat, og Kina er verdens største produsent (Duc, 1997). I Europa dyrkes fababønner for det meste til bruk av fôr til fjørfe, storfe og svin. I Norge brukes fababønner som kortreist kraftfôr, spesielt ved økologiske gårder for biologisk nitrogenfiksering. Nitrogenfiksering er erteplantenes evne til å binde nitrogen fra luften ved hjelp av bakterier i knoller på røttene (Serikstad et al., 2013). Dette gjør det gunstig å dyrke belgvekster mellom avlinger for å berike jorden med nitrogen. Dyrking av belgvekster er viktig ved økologisk drift der kunstgjødsel som inneholder nitrogen ikke benyttes, samtidig som det blir brukt til kraftfôr til dyrene på gården. Belgvekster har også lange røtter som bedrer jordstrukturen slik at luft og vann kan bevege seg fritt i jorda. Det er erter og fababønner som hovedsakelig dyrkes i Norge i dag (Serikstad et al., 2013). Ettersom Norge ligger på nordgrensen for belgvekster, er valg av art til dyrkning i stor grad avhengig av klima. Erter dyrkes i store deler av Østlandet og Trøndelag, mens fababønner dyrkes i Vestfold, Østfold og Follo (Korsæth & Roer, 2016; Serikstad et al., 2013).

2.2 Proteiner i fababønner

Fababønner inneholder cirka 30 % protein og er en god kilde til lysin-rike proteiner samt andre essensielle næringsstoffer som karbohydrater, fiber, vitaminer og mineraler som jern, kalium, magnesium og sink (Ray & Georges, 2010; Sosulski & Youngs, 1979). Globuliner er det dominerende proteinet, etterfulgt av gluteliner, og i små mengder inneholder fababønner også albuminer og prolaminer (Alghamdi, 2009; El Fiel et al., 2002). Innholdet av de ulike proteinene i fababønner påvirkes av en rekke faktorer som sort, gjødsling, vekstsesong og analysemetode. (Multari et al., 2015). De fire ulike proteingruppene har blitt klassifisert etter proteinenes løselighet og ekstraheringsevne i ulike løsninger kjent som Osborne klassifiserings skjema (Osborne 1924). De ulike proteinene påvirker de funksjonelle egenskapene i næringsmidler på grunn av proteinenes molekylære struktur (Day, 2013).

2.2.1 Globuliner

El Fiel et al (2002) undersøkte innholdet av ulike proteiner i fababønner og rapporterte at globulininnholdet var 69.5-78.1% av det totale proteininnholdet i fababønner. Samme globulininnhold er også observert av Alghamdi (2009). De dominerende aminosyrene i globuliner i belger er asparginsyre, glutamat, leucin og arginin (El Fiel et al., 2002). Globuliner er uløselig i vann, men løselige i saltløsninger (Day, 2013). Legumin (11S, S = Sveberg Unit) og vicilin (7S) er to ulike globulinproteiner som fababønner inneholder mye av. Legumin er en heksamer (molekylvekt ~340-360 kDa) som er utstyrt med seks subenheter (molekylvekt ~60 kDa) som er bundet sammen av ikke-kovalente bindinger (Singhal et al 2016). Hvert subenhet par består av et peptid med mange sure sidekjeder (molekylvekt ~40 kDa) og et peptid med mange basiske sidekjeder (molekylvekt ~20 kDa) som er bundet med hverandre med disulfidbindinger (Day, 2013; Karaca et al., 2011). Vicilin er en trimer som inneholder ingen disulfidbindinger og molekulvekten varierer fra ~175-180 kDa (Boye et al., 2010). Sidekjedene på disse proteinene varierer og har en molekulvekt fra ~12-75 kDa (Swanson, 1990).

Forholdet mellom legumin og vicilin i fababønner er rapportert til å være omtrent 1.7-2.3 (Martensson, 1980). Det er mange faktorer som spiller inn på forholdet mellom de to globulinproteinene som fraksjoneringsmetode og parametere som ved hvilken pH og temperatur som benyttes under fraksjoneringen. Agronomiske faktorer kan også påvirke forholdet av legumin og vicilin i belgvekster (Swanson, 1990). Barac et al. (2010) studerte seks ulike sorter erter som hadde ulike forhold av legumin og vicilin. Studien viste at rene vicilinløsninger hadde bedre emulsjons- og gelegenskaper enn rene leguminløsninger. Et lavt forhold mellom de to proteinene ble funnet å være mest gunstig i proteinfraksjoner (Barac et al., 2010).

For å undersøke forholdet mellom legumin og vicilin er det en rekke metoder som kan benyttes bant annet sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) som separerer proteiner etter molekulvekt.

2.2.2 Glutelin

Glutelin er løselige i fortynnete NaOH-løsninger. Det er på grunn av proteinenes evne til å danne aggregater, innhold av disulfidbindinger og glykosyleringer som gjør det vanskelig å løse opp proteinene i vann eller svake saltløsninger (Day, 2013). Proteinene har en høy molekulvekt fra 45-150 kDa. Aminosyresammensetningen består ikke av tryptofan og lysin, men inneholder

mye leucin, prolin og glutaminsyre (El Fiel et al., 2002). I fababønner er det rapportert at gluteliner utgjør 12-18 % av proteininnholdet (Alghamdi, 2009). Til sammenligning består ris av cirka 80 % gluteliner av det totale proteininnholdet (Day, 2013).

2.2.3 Albuminer

Albuminer er kompakte, globulære proteiner som består av to polypeptidkjeder (Day, 2013). Proteinene har et høyt innhold av svovelrike aminosyrer som cystein og metionin, noe som fører til at de to polypeptidkjedene danner disulfidbindinger med hverandre. Molekylvekten på polypeptidkjedene varierer mellom 4 og 9 kDa. Albuminer er ofte enzymer som blir utnyttet under spiringsprosessen. Selv om innholdet av albuminer i belgvekster er lavt, står albuminer for > 50 % av svovelinnholdet i belgene (Day, 2013). Proteinene er vannløselige og koagulerer ved varme. I fababønner er det rapportert at albuminer utgjør 1.4-3.0 % av proteininnholdet (Alghamdi, 2009).

2.2.4 Prolaminer

Prolaminer er verken løselige i vann eller saltløsninger, men kan ekstraheres i vandige alkoholløsninger (Day, 2013). Proteingruppen består av proteiner som varierer veldig i størrelse både mellom samme og ulike planter. Molekylvekten varierer fra 10-20 kDa (Carbonaro et al., 2015). Som gluteliner, inneholder ikke disse proteinene aminosyrene lysin og tryptofan, men inneholder mye leucin, prolin og glutaminsyre (El Fiel et al., 2002; Paulis, 1982). Det som skiller aminosyresammensetningen i gluteliner og prolaminer er at prolaminer inneholder mindre mengder glysin, metionin og histidin (El Fiel et al., 2002). Prolaminer er hovedlagringsproteinene i korn og det mest studerte proteinet fra denne gruppen er glutenproteiner fra hvete (Day, 2013). I fababønner er det rapportert at prolaminer utgjør 1.8-3.6 % av proteininnholdet (Alghamdi, 2009).

2.3 Proteinekstrahering

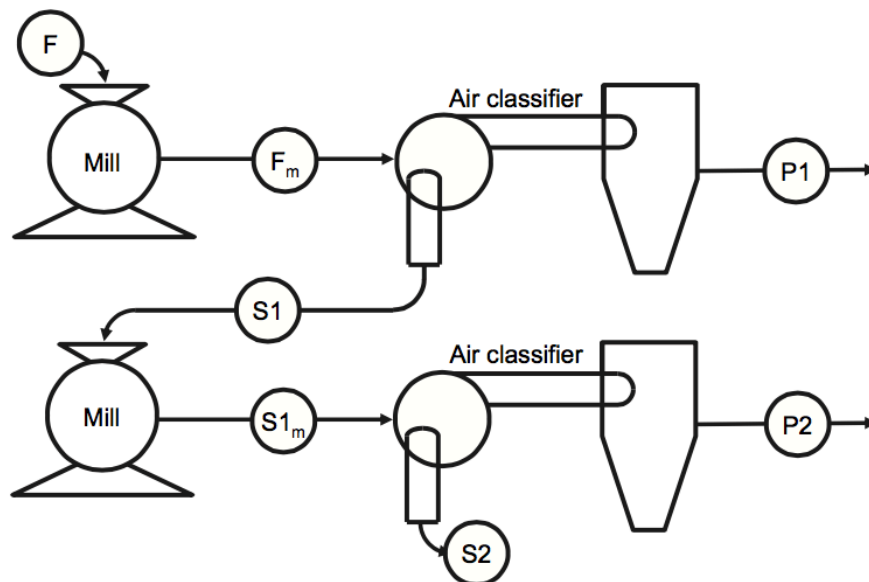
For å lage proteinrike fraksjoner i form av proteinkonsentrater eller proteinisolater er det en rekke metoder som kan benyttes. Proteinekstraheringsevnen påvirkes av pH, ionestyrke, temperatur, partikkelstørrelse, type salt og løsningsmiddel som er benyttet for å oppnå god proteinekstrahering (Singhal et al., 2016). Metodene kan grovt inndeles i våt- og tørrfraksjonering.

2.3.1 Våtfraksjonering

Våtfraksjonering består av syre/alkalisk ekstrahering – isoelektrisk utfelling (IEP), ultrafiltrering, vannekstrahering og saltekstrahering. Ved bruk av en av disse metodene kan det lages proteinkonsentrater og proteinisolater med et proteininnhold med henholdsvis 70 % og 90 % (eller høyere) (Singhal et al., 2016). Siden produktet som er brukt i oppgaven er laget ved tørrfraksjonering, vil ikke en videre beskrivelse av de ulike ekstraheringsmetodene ved våtfraksjonering beskrives.

2.3.2 Tørrfraksjonering

Luftklassifisering er en metode som separerer partikler med ulik tetthet og partikkelstørrelse. Siden proteinpartikler er mindre og tyngre enn stivelseskornerne kan det lages proteinkonsentrater ved å skille protein- og stivelsesrike fraksjoner ved bruk av luftstrøm (Schutyser & van der Goot, 2011). Fababønner inneholder både mye stivelse og protein, men for soyabønner som inneholder mye fett og lite stivelse er luft klassifisering en mindre egnet metode for å lage proteinfraksjoner (Duc et al., 1999). Høyt innhold av olje gjør det vanskelig for melpartiklene å spre seg fritt når det blir brukt luftstrøm (Singhal et al., 2016). En enkel illustrasjon av luftklassifiseringsmetoden er vist i figur 1.



Figur 1. Oppmaling og luftfraksjonering benyttes for å lage stivelses- og proteinfraksjoner i produkter som inneholder enten mye stivelse eller protein, og lite fett. F: råvare (eksempel avskallede bønner); m: oppmalt; S1 og S2: stivelsesfraksjoner; P1 og P2: proteinfraksjoner. Figuren er hentet fra (Schutyser & van der Goot, 2011).

Luftklassifiseringsmetoden begynner med at mel blir fraksjonert i stivelses- og proteinrikefraksjoner kalt henholdsvis SI og PI. Deretter kan SI bli malt og fraksjonert igjen for å danne nye protein- (PII) og stivelsesfraksjoner (SII) (Tyler et al., 1981). Fordelen med tørrfraksjonering er at proteinene beholder den opprinnelige funksjonaliteten, og at det ikke benyttes vann noe som vil gi lavere energiforbruk enn ved våtfraksjonering på grunn av manglende tørkeprosess (Pelgrom et al., 2013). Ved bruk av tørrfraksjonering er det ikke mulig å oppnå proteinisolater med svært høyt proteininnhold slik som det er mulig med bruk av metoder av våtfraksjonering. Men det er ikke mengde protein som nødvendigvis er det viktige når nye næringsmidler skal produseres, men funksjonaliteten av proteinene som blir brukt.

2.4 Generelt om funksjonelle egenskaper

De funksjonelle egenskapene til proteiner i næringsmidler er relatert til strukturen og andre kjemiske karakteristikk til proteinene (Damodaran, 2008). For å lage næringsmidler med proteinfraksjoner er det viktig å se på proteinenes funksjonelle egenskaper for å undersøke om det kan brukes i et bestemt næringsmiddel. Ved å se på proteinenes løselighet, viskositet og evne til å danne gel, skum og emulsjoner under ulike betingelser (som for eksempel ved ulike temperatur, pH, ionestyrke og ved ulike konsentrasjoner), kan det vurderes om proteinene vil være gunstig i et bestemt næringsmiddel. Oppbygningen og de funksjonelle egenskapene i proteinfraksjoner varierer i forhold til en rekke faktorer. Fraksjoneringsmetode, indre faktorer (for eksempel størrelse, form, aminosyresammensetning og konfirmasjonen av proteinene) og interaksjoner med andre makromolekyler er med på å bestemme de funksjonelle egenskapene av et produkt basert på fababønner samt variasjon av avlingen (Multari et al., 2015).

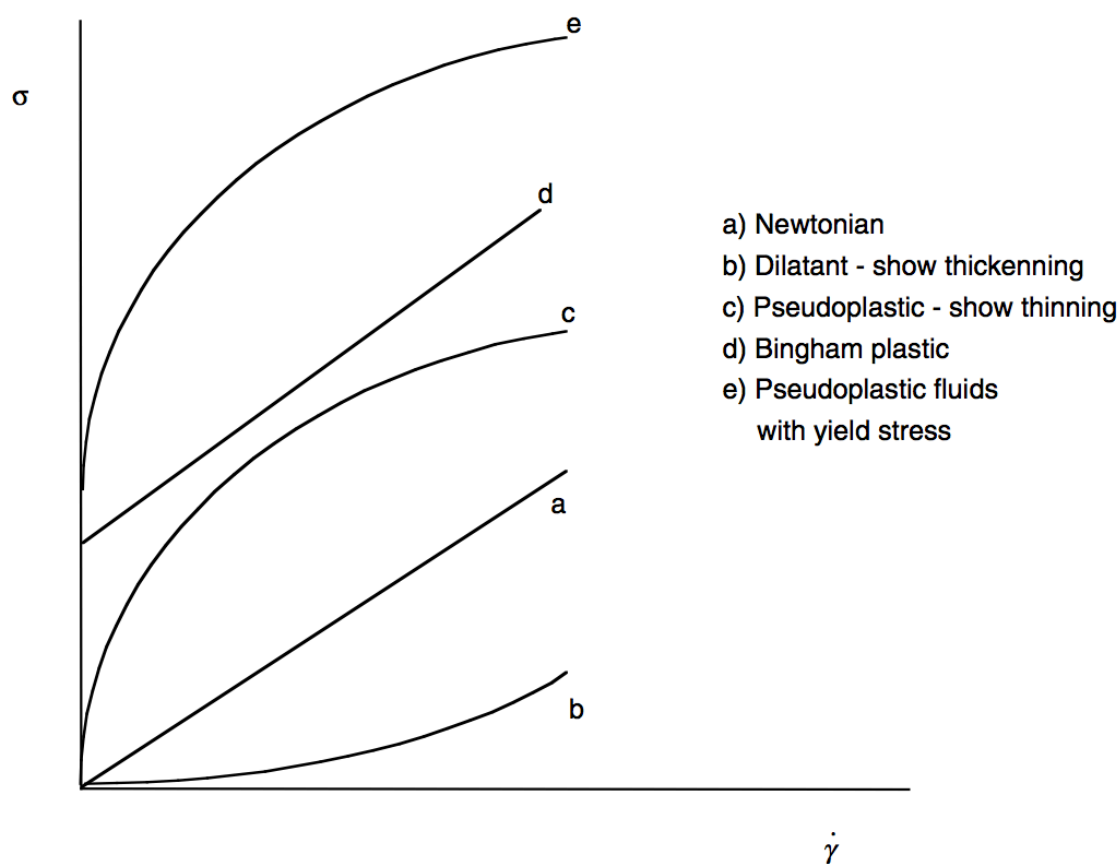
2.4.1 Løselighet

God proteinløselighet i vannholdige løsninger er en forutsetning for andre funksjonelle egenskaper som emulsjon-, gel- og skumdanning. Proteinløseligheten påvirkes av pH, temperatur, ionestyrke og type løsningsmiddel som er brukt (Day, 2013). Løseligheten til de fleste proteinfraksjoner fra belgvekster er høy ved lav og høy pH, men lavest ved rundt pH 4 som er det isoelektriske punktet for globuliner og albuminer (Boye et al., 2010). Ved det isoelektriske punktet er nettoladningen på proteinene lik null, noe som gjør proteinene minst løselig. Proteinene fra belgvekster består som nevnt tidligere av mye globuliner som har god løselighet ved nøytral pH, og kan derfor være godt egnet til bruk i næringsmidler i dette pH-

området. Proteinene i korn, som består for det meste av prolaminer og gluteliner, har lav løselighet ved nøytral pH fordi de sure og basiske aminosyrene vil være ionisert (Day, 2013).

2.4.2 Viskositet

I mange flytende matretter som supper, sauser og drikkevarer spiller viskositet en viktig rolle for munnfølelsen og metthet hos konsumenten. Viskositet er en løsnings motstand til å flyte når den blir utsatt for påført kraft. I en ideell løsning er skjærstress proporsjonal med skjærhastigheten. En slik løsning kalles en Newtonsk væske og et eksempel er vann. Flyteegenskapene til en løsning er påvirket av løsningsmiddel som er benyttet (Damodaran, 2008). Løsninger som inneholder store makromolekyler har ofte høyere viskositet, men faktorer som størrelse, form, fleksibilitet og hydreringsevne påvirker molekylenes evne til å øke viskositeten (Damodaran, 2008). For eksempel vil ikke kompakte makromolekyler gi like viskøse løsninger sammenlignet med mer utstrakte makromolekyler, selv om de er av samme molekylvekt. Hydreringsevnen til proteinene påvirker i den grad at proteiner med høy hydreringsevne sveller og blir større enn proteinenes opprinnelige form. Dette gjør løsningen mer viskøs. Høy proteinkonsentrasjon i en løsning fører til en økning i viskositeten på grunn av hydrering og protein-protein interaksjoner (Damodaran, 2008). Når proteinkonsentrasjonen er høy i en løsning vil den ofte være skjærtynnende. Det betyr at viskositeten reduseres når væsken utsettes for økende skjærhastighet. En skjærtynnende væske er derfor ikke-Newtonsk og tidsuavhengig. Tiksotropiske væsker blir viskøse igjen når stress ikke påføres væsken mer. Løsninger som inneholder mye globuliner, som er det dominerende proteinet i belgvekster, er ofte tiksotropiske (Damodaran, 2008). Egenskapene til Newtonske og ikke-Newtonske væsker er illustrert i figur 2.



Figur 2. Klassifisering av newtonske og ikke-newtonske væsker som en funksjon av skjærstress (σ) og skjærhastighet ($\dot{\gamma}$) a: Newtonsk; b: skjærtykkende; c: skjærtynnende; d: bingham plastic; e: pseudoplastisk væske med flytgrense. Figuren er hentet fra (Ibarz & Barbosa-Canovas, 2003).

2.4.3 Geldanning

I mange desserter og kjøttprodukter er geldanning nødvendig for å oppnå en ønsket konsistens. En gel er en mellomliggende fase mellom væske og fast stoff. Polymerer, proteiner eller polysakkarider som danner interaksjoner med hverandre gjennom kovalente- eller ikke-kovalente bindinger danner et tredimensjonalt nettverk. Nettverket som dannes holder på vann og andre molekyler av lav molekylvekt (Damodaran, 2008). Geldannelse er avhengig av temperatur, pH, ionestyrke og konsentrasjon for at protein-protein- og protein-løsningsmiddel-interaksjoner skal være balansert. pH og ionestyrke endrer nettoladningen til proteinene og påvirker derfor proteinenes stabilitet, proteininteraksjoner og kan medføre dissosiasjon av proteiner med kvartærstruktur. Globulære proteiner har evnen til å danne gel i vannløsninger ved å denaturere proteinene ved bruk av varme. Et eksempel på en gel av globulære proteiner

er tofu som er laget av soyabønner. Forholdet mellom innholdet av vicilin og legumin påvirker gelegenskaper som gelstyrke, fasthet og elastisitet (Day, 2013).

2.4.4 Skumdanning

Skumdanning er viktig i mange næringsmidler spesielt innen drikkevarer og desserter. Proteiner som har egenskapene til å danne og stabilisere skum er knyttet til om proteinene adsorberes til og reduserer overflatespenningen til luft-væske-grenseflaten, og danne sterke grenseflatemembraner ved protein-proteininteraksjoner (Day, 2013). Proteiner er amfifile molekyler som vil si at de inneholder både hydrofile og hydrofobe aminosyrer på overflaten. I luft-væske-grenseflaten vil de hydrofile områdene være i vannfasen, mens de hydrofobe områdene av molekylene vil orientere seg mot luftfasen. Når hydrofobe områder på proteinene migrerer til luftfasen senkes den frie energien til proteinene sammenlignet med hvis de hydrofobe områdene hadde forblitt i vannfasen. Konsentrasjonen av proteiner er mye høyere i luft-væske-grenseflaten enn i vannfasen (Damodaran, 2008). Ved bruk av proteiner med både høy molekylvekt og mange hydrofile og hydrofobe områder vil proteinene danne en veldig viskoelastisk film i grenseflaten som kan være stabil over lang tid som påvirkes lite av ytre påkjenninger. Mindre proteiner med lav molekylvekt fører til et mindre stabilt skum (Damodaran, 2008). Mange planteproteiner er kompakte i naturlig form og danner derfor lite skum, men planteproteiner som inneholder mye albuminer kan ha skumegenskaper som kan sammenlignes med eggehvite (Alamanou & Doxastakis, 1997). Eksempler på dette er proteiner fra erter og lupiner. De ulike globulinene, vicilin og legumin, påvirker skumegenskapene til planteproteinfraksjoner (Multari et al., 2015). Vicilin skaper skum som er mer stabilt, mens legumin danner mer ustabil skum med større ekspansjon (Multari et al., 2015; Patterson et al., 2010).

3 Materialer og metoder

3.1 Om proteinfraksjonen av fababønner benyttet i oppgaven

I denne oppgaven har det blitt benyttet en proteinfraksjon laget av fababønner av sorten Vertigo (såbønner) levert av Norgesfôr. Fababønner har blitt avskallet, malt opp og til slutt luftfraksjonert på Skjellfoss Mølle i regi av NFR prosjektet FeedMileage (grant no. 233685/E50). Luftfraksjoneringen skilte stivelseskorn og proteiner fra hverandre, noe som resulterte i et sluttprodukt med mye protein og lite stivelse. Den kjemiske sammensetningen av fababønneproteinfraksjonen (FBPF) som er benyttet i denne oppgaven ble analysert ved LabTek på Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA), NMBU, og er beskrevet tabell 1.

Tabell 1: Næringsinnhold (gram per 100 gram) i proteinfraksjonen etter luftfraksjoneringen. Naturlig løselig fiber er forkortet NDF.

	Tørrstoff, %	Aske, %	Kjeldahl-N, %	NDF, %	Stivelse, %	Fett, %	Protein, %	Protein i tørrstoff, %
Protein- fraksjon	92.45	6.08	9.36	9.07	8.12	3.05	58.47	63.24

3.2 Undersøkelse av partikkelstørrelse i produkt

Partikkelstørrelsen i FBPF ble analysert for å undersøke hvor stor overflate melpartiklene hadde. En lav partikkelstørrelse vil ha større overflate og vil danne lettere interaksjoner med løsningsmiddel og bli mer påvirket av endringer som blir gjort enn stor partikkelstørrelse med lite overflate. For å undersøke partikkelstørrelsen ble det benyttet en tørrmåling med Mastersizer 3000 (Malvern, England) koblet opp mot Mastersizer 3000 v3.62 software (Malvern instruments limited, England). Mastersizer 3000 kan måle partikkelstørrelser fra 0.05-3500 µm ved bruk av laserdiffraksjonsteknikk. Ved bruk av luft passerer prøven en rød og en blå laserstråle der partikkelstørrelsen måles ved å undersøke på intensiteten av spredt lys som oppstår. Større partikler vil føre til mindre vinkelspredning av innfallende lys, mens mindre partikler fører til en større vinkelspredning. Cirka en spiseskje av produktet ble overført i silen på toppen av apparatet Aero S Dry Powder Disperser (Malvern, England) som var koblet til Mastersizer 3000.

3.3 Analyse av proteininnhold og aminosyresammensetning

For videre analyser av de funksjonelle egenskapene i produktet ble proteininnhold og aminosyresammensetningen i FBPF undersøkt. Proteininnhold ble analysert ved mikro-Kjeldahl metoden og aminosyresammensetningen ble analysert ved væskechromatografi (HPLC) etter sur og basisk hydrolyse.

3.3.1 Prøveopparbeidelse til analyse av total nitrogen (TN) ved mikro-Kjeldahl metoden

Kjeldahl metoden blir benyttet for å undersøke total innhold av nitrogen i en prøve. Videre kan mengde protein i prøven bestemmes ved å multiplisere med en numerisk faktor (Kjeldahl faktor) tilpasset prøvematerialet som baserer seg på prosentandel nitrogen av proteinene som undersøkes. Ofte brukes faktoren 6.25 siden protein i gjennomsnitt består av 16 % nitrogen.

Metoden består av fire ulike trinn; nedbrytning av organiske N-forbindelser i konsentrert sovelsyre (H_2SO_4), tilsetning av natriumhydroksid (NaOH) og dannelse av ammoniakk (NH_3), destillering av ammoniakk over i borsyre og dannelse av ammonium-ioner og titrering med saltsyre (HCl) for bestemmelse av mengden borat-ioner som tilsvarer mengde ammonium-ioner (Eijsink et al 2017). Belgvekster er godt egnet til bli analysert ved Kjeldahl-metoden, spesielt i preparerte produkter med et lavt vanninnhold (Persson, 2008).

Prøveopparbeidelse ble gjennomført ved å lage 1 % og 5 % konsentrasjon FBPF i destillert vann (dH_2O). Prøvene ble rørt på en magnetplate (RCT basic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH, Germany) til prøvene var homogene. Kjeldahl-rør ble tilsatt cirka 0.5 g eller 1 g prøvemateriale. Kjeldahl-rørene ble så tilsatt 3 mL H_2SO_4 og en Kjeltab (1000 Kjeltabs Auto - AA11, Thompson & Capper Ltd, Cheshire, UK). Analyser ble utført i triplikat.

3.3.2 Prøveopparbeidelse til analyse av ikke protein nitrogen (IPN) ved mikro-Kjeldahl metoden

Analyse av total nitrogen ved mikro-Kjeldahl-metoden brukes for å undersøke proteininnholdet, men denne metoden skiller ikke protein-nitrogen fra ikke-protein nitrogen. Analyse av ikke-protein nitrogen ble derfor utført for å undersøke hvor mye av det totale innholdet av nitrogen som ikke er protein-nitrogen.

Prøveopparbeidelse av prøve til IPN ble gjort ved å veie inn cirka 10 mL prøve fra 5 % løsning av FBPF i 50 mL målekolbe. Videre ble det tilsatt 10 % trikloreddiksyre (TCA) (Merck) slik at totalvolumet av prøven hadde en vekt på 50.00 g. Prøven ble filtrert gjennom filterpapir (White ribbon filter, Whatman/GE Healthcare, Tyskland) over i et begerglass. Cirka 5.00 g filtrat ble veid i Kjeldahl-rør. Det ble gjort tre paralleller av filtratet i alt tre prøver. Kjeldahl-rørene ble tilsatt 3 mL svolvelsyre (H₂SO₄) og en Kjeltab (1000 Kjeltabs Auto - AA11, Thompson & Capper Ltd, Cheshire, UK).

3.3.3 Oppslutning, destillering og beregning av proteininnhold

Kjeldahl-rørene ble plassert på en oppslutningsblokk (Digester 2520, Tecator, Foss, Danmark). Rørene ble så kokt ved 420 °C i 1 time og 15 minutter. Etter oppslutningen ble rørene kjølt ned i 15 minutter. Prøvene ble så destillert ved bruk av Kjeltac™ 8400 (Tecator, Foss). Volumet HCl (mL) som ble brukt i blank-rørene ble automatisk trukket fra mengde titr tilført prøvene. For beregning av prosent TN og prosent IPN ble formelen under benyttet.

$$\%TN \text{ eller } \%IPN = \left(\frac{\text{mengde HCl (mol)} \cdot 14 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}{\text{innveid prøvemengde (g)}} \cdot 100 \right) =$$

$$\frac{C \text{ (mol)}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{V \text{ HCl (mL)}}{\text{innveid prøvemengde (g)}} \cdot 14 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \cdot 100$$

Konsentrasjon av saltsyre C = 0,05 mol / 1000 mL

Atomvekt for nitrogen: 14 g/mol

Videre ble prosent protein regnet ut med Kjeldahl-faktoren 6.25

$$\% \text{ Protein} = (\text{TN} - \text{IPN}) \cdot 6.25$$

3.3.4 Aminosyreanalyse

Bestemmelse av innholdet av ulike aminosyrer kan undersøkes ved å benytte et HPLC-instrument med ionebytterkolonne, ninhydrinanordning, post kolonne-derivatisering og fotometrisk detektor. Metoden går ut på å hydrolysere proteinet i prøven med HCl i 24 timer før aminosyrene separeres ved bruk av ionebytterkromatografi etter å ha dannet et farget

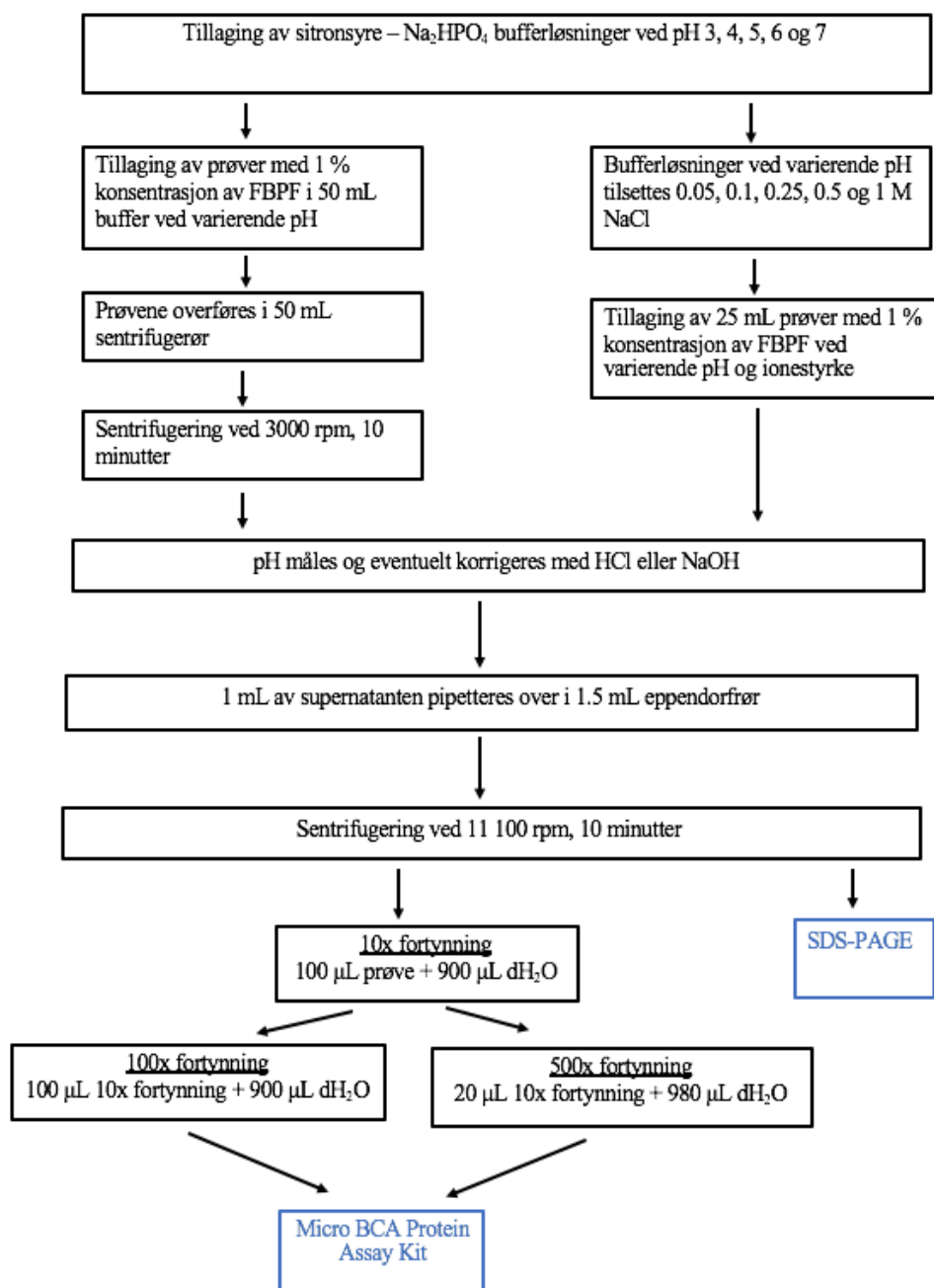
kompleks med ninhydrine slik at de ulike aminosyrene kan bestemmes kvantitativt med fotometrisk deteksjon ved 570 nm. Metoden er egnet for de fleste aminosyrer, men ikke for å bestemme innhold av tryptofan og hydroksyanaloger av aminosyrer, som for eksempel hydroksyprolin. For nærmere beskrivelse av materialer og metode for aminosyreanalyse ved oksiderte prøver henvises til IHA-nummer: 1050.

Siden mengde tryptofan kan ikke analyseres ved sur hydrolyse så en basisk hydrolyse av produktet ble utført. Ved å benytte basisk hydrolyse, separasjon på HPLC kolonne og fluorometrisk deteksjon kan mengde tryptofan i en prøve bestemmes. For nærmere beskrivelse av materialer og metode for analyse av tryptofan henvises til IHA-nummer: 1051.

For bestemmelse av aminosyresammensetning i FBPF ble det levert cirka 1 gram av produktet til LabTek på IHA ved NMBU.

3.4 Proteinløselighet

Løseligheten av proteiner påvirker funksjonelle egenskaper som vannbindingsevne, viskositet, emulsjons-, gel- og skumegenskaper fordi proteinene må foldes ut for at proteiners funksjonalitet kan utnyttes. For å undersøke proteinløseligheten ved varierende pH og ionestyrke ble løseligheten undersøkt ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit. For å undersøke om ulike proteiner var løselige ved ulike parametre ble natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel-elektroforese (SDS-PAGE) benyttet for å separere de løselige proteinene basert på molekylvekt. Flytskjema for preparering av prøver for undersøkelse av proteinløseligheten er vist i figur 3.



Figur 3. Flytskjema for preparering av FBPF-prøver ved varierende pH, ionestyrke og fortyninger for undersøkelse av proteinløselighet ved Micro BCA Protein Assay Kit og SDS-PAGE.

3.4.1 Proteinløselighet ved bruk av Micro BCA™ Protein Assay Kit

Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) ble benyttet for å undersøke mengde løselig protein ved bruk av bovint serumalbumin (BSA) som standard. Metoden baserer seg på at Cu^{2+} reduseres til Cu^{1+} av proteiner i en alkalisk løsning med veldig sensitiv og selektiv kolorimetrisk undersøkelse av Cu^{1+} danner et lilla kompleks med to molekyler bionchoninsyre

(BCA). Dette komplekset har maksimum absorpsjon ved 562 nm, og absorpsjon øker lineært med økende proteinkonsentrasjon. Proteinenes sammensetning påvirker reduksjonen av Cu^{2+} til Cu^{1+} . Fargekomplekset som dannes med BCA påvirkes av proteinstrukturen, antall peptid bånd og tilstedeværelsen av fire aminosyrer; cystein, cystin, tryptofan og tyrosin (ThermoFisher, 2015). Derfor kan denne analysemetoden gi noe forskjellige resultater enn andre proteinanalyse metoder siden aminosyresammensetningen i prøvematerialet påvirker resultatene.

3.4.1.1 Bestemmelse av proteinløselighet – effekt av pH

Proteinløseligheten påvirkes av pH fordi proteinenes ladning endres. Ved en nettoladning på proteinene som er lav, vil peptidkjeder danne interaksjoner med hverandre noe som senker løseligheten. Ved høy nettoladning vil peptidkjeder frastøte hverandre og danne interaksjoner med løsningsmiddelet. Proteinløseligheten vil da øke.

Det ble laget 1 % konsentrasjoner av FBPF i sitronsyre- Na_2HPO_4 – bufferløsninger ved varierende pH-verdi uten justering av ionestyrke. Oppskriften for bufferløsninger ved varierende pH er gitt i vedlegg 1. Det ble benyttet to metoder for å fjerne uløselig materiale. Først ble prøvene ble overført til 50 mL sentrifugerør og sentrifugert ved 3 000 rpm i 10 minutter (Allegra™ 25R Centrifuge, Beckman Coulter, Tyskland). Det ble så gjort nye pH-målinger i prøvene. Deretter ble 1 mL av supernatanten pipettert over i 1.5 mL eppendorfrør og sentrifugert (micromax, IEC, USA) i 10 minutter ved 11 100 rpm. Prøvene ble så fortynnet 100x og 500x med dH_2O . Prosedyren for fortynningene er vist i figur 3.

3.4.1.2 Bestemmelse av proteinløselighet – effekt av ionestyrke

Tilsetning av salt påvirker proteinløseligheten. For proteiner som inneholder mange hydrofobe områder vil løseligheten reduseres siden salt-ionene vil danne interaksjoner med løsningsmiddelet noe som fører til at proteinene vil danne interaksjoner med hverandre. For proteiner med mange hydrofile områder vil løseligheten øke. Hvor mye salt som tilsettes en proteinløsning for å optimalisere løseligheten varierer derfor mellom ulike proteiner.

Det ble laget 25 mL prøver med varierende ionestyrke (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 og 1 M) ved å tilsette natriumklorid (NaCl) i sitronsyre - Na_2HPO_4 – bufferløsninger ved ulik pH (3, 4, 5, 6 og 7). Prøvene ble tilsatt FBPF, 1 % konsentrasjon. For å holde pH-verdien så konstant som mulig ble løsningene korrigert med 1 M HCl eller 2 M NaOH . Det ble laget paralleller av prøvene. Det

ble så pipettert 1.5 mL prøve over i eppendorfrør som ble sentrifugert (micromax, IEC, USA) i 10 minutter ved 11 100 rpm. Prøver til SDS-PAGE ble så pipettert over i nye eppendorfrør. Cirka 1 mL av supernatanten ble tatt ut og oppbevart ved 4 °C frem til undersøkelse av proteinløselighet ved SDS-PAGE. Supernatanten som var igjen i eppendorfrørene etter sentrifugering ble prøvene fortynnet som vist i figur 3 og ristet på vortex (ZX3 Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica, Italia).

3.4.1.3 Utføring av Micro BCA™ Protein Assay Kit

Som standard i Micro BCA Protein Assay Kit ble det benyttet fortynnede løsninger av BSA. Standardløsninger ble laget i henhold til tabellen som er vist i vedlegg 2.

Micro BCA Protein Assay Kit er utstyrt med tre reagenser som skal blandes for å lage reagens som skal tilføres brønnene på mikrotiterplaten. Reagensen ble laget ved å blande Micro BCA Reagens A, Micro BCA Reagens B og Micro BCA Reagens C med forholdet 25:24:1.

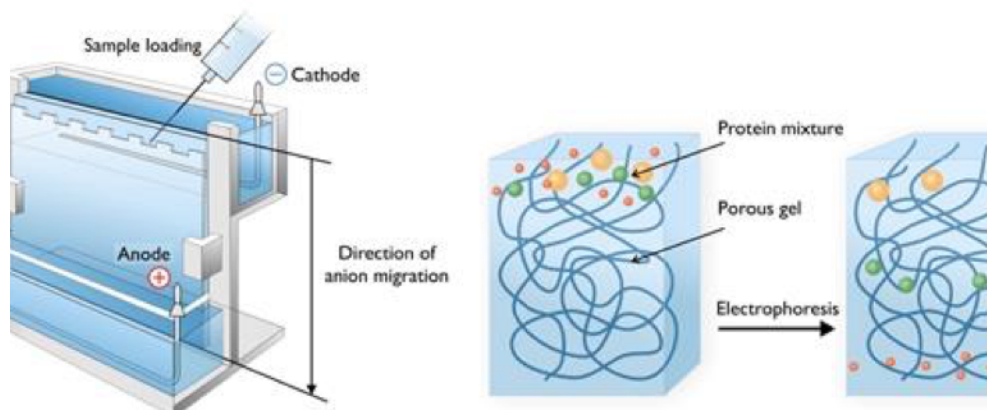
Mengde reagens som ble laget ble beregnet ved bruk av formelen under.

$(\#standarder + \#prøver) \cdot \#replikater \cdot \text{volum av reagens per brønn} = \text{totalvolum av reagens}$

Mikrotiterplater ble benyttet for blande prøver eller standarder med reagens. Først ble 150 µL prøve eller standard applisert i brønnene på mikrotiterplaten. Det ble gjort tre paralleller av hver prøve og standard. Det ble så applisert 150 µL reagens til brønnene før løsningene på mikrotiterplaten ble blandet på en platemikser (OS-10 Orbital shaker, Biosan) i cirka 30 sekunder. Platen ble dekket med lokk og inkubert i 2 timer ved 37 °C. Etter inkubering ble mikrotiterplaten kjølt ned til romtemperatur i cirka 10 minutter. Et spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular devices, USA) koblet opp mot dataprogrammet SoftMax Pro 6.5 (Molecular devices) ble benyttet for å måle absorbans ved 562 nm. Gjennomsnittet av blankprøvene ble automatisk trukket fra resultatene i prøvene. Standardene ble brukt til å lage en standardkurve som ble benyttet for å regne ut proteinkonsentrasjonen i de ukjente prøvene.

3.4.2 Proteinseparering ved natriumdodecylsulfat polyakrylamid gel-elektroforese (SDS-PAGE)

Ved å separere de ulike proteiner i de løselige prøvene ved SDS-PAGE, kan det undersøkes hvilke proteiner som er løselige ved ulik pH og ionestyrke i de ulike prøvene. Analysen baserer seg på separasjon av proteiner og andre makromolekyler med ulik størrelse ved bruk av elektroforese i en polyakrylamid-gel. Prøvene tilsettes en natriumdodecyl sulfat(SDS)-prøvebuffer som gjør at proteinene får en negativ nettoladning som fører til at proteinene denaturerer, folder seg ut og får samme masse-ladningsforhold. Dette gjør det mulig å separere proteinene fra hverandre basert på deres molekylvekt; de negativt ladde protein-SDS-kompleksene vandrer mot anoden (+) som er ”nederst” i gelen. Store proteiner vil vandre saktere sammenlignet med proteiner av lavere molekylvekt som vist i figur 4. Ved å applisere en molekylvektstandard til gelen kan de ukjente proteinenes molekylvekt estimeres (Eijsink et al 2012). Bio-Rad-standard (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards Unstained) ved molekylvekt 10 – 250 kDa ble benyttet for gjennomføringen av forsøket. Løsningene som ble benyttet i prosedyren er basert på Bio-Rad Laboratories anbefaling (Laboratories, 2011).



Figur 4. Prøver blir applisert i brønner i gelen som fungerer som et elektrisk felt ved tilførsel av spenning. Negativt ladde protein-SDS-komplekser beveger seg mot anoden. Små proteiner vandrer raskere enn store proteiner (Pål, 2013)

3.4.2.1 Preparering av prøveløsninger

Prøveløsninger til forsøket ble laget etter figur 3 og er beskrevet i kapittel 3.4.1.2. SDS-prøvebuffer (Laboratories, 2011) ble tilsatt 0.2 M dithiotheitol (DTT) (Sigma, Aldrich, USA) og 50 μ L av prøvene ble fortynnet 1:1 med SDS-prøvebuffer. FBPF, 1 %, løst i dH₂O ble tillaget for sammenligning av de løselige proteinene ved varierende pH og ionestyrke. For å

forbedre proteinenes løselighet ble FBPF fortynnet i SDS-prøvebuffer tilsatt 8 M urea og 0.2 M DTT-buffer. For å denaturere proteinene ble prøvene varmet ved cirka 95 °C i 5 minutter på varmeblokk (Thermolyne Type 17600 Dri Bath, USA). Prøvene ble oppbevart i fryser ved -20 °C frem til analysetidspunktet. Rett før tilsetning av prøvene på gel, ble pH målt og eventuelt justert med 1M NaOH til SDS-prøvebufferens pH-verdi, 6.8. Dette gjaldt for prøvene med pH-verdi på 3 og 5.

3.4.2.2 Gjennomføring av SDS-PAGE

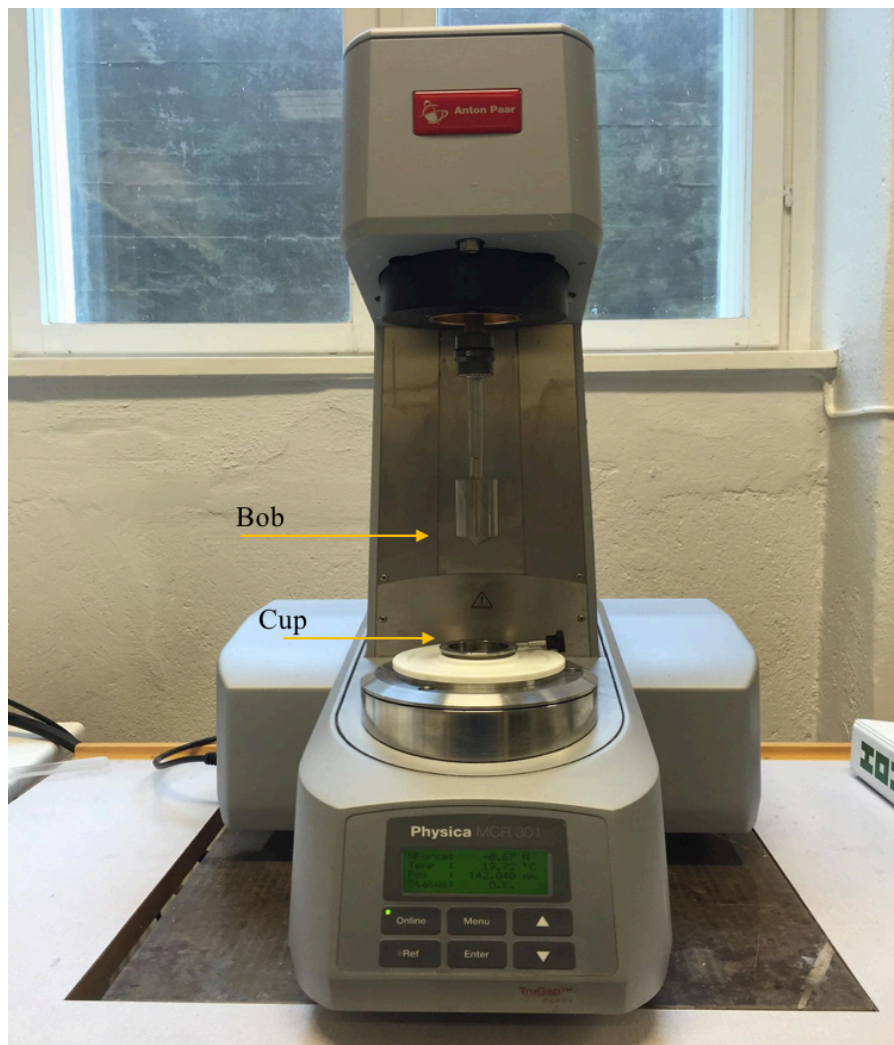
Det ble benyttet 12 % akrylamidgeler (Bio-Rad Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™, USA) i forsøket. Det ble brukt fargefrie geler med 10 og 15 brønner pr gel. Ved bruk av fargefrie geler elimineres tidkrevende farging og destillasjonstrinn som kreves ved andre proteindeteksjons metoder. De fargefrie gelene inneholder trihalogenforbindelser som fører til en hurtig fluorescensdeteksjon av proteiner med fargefrie bildesystemer uten at farging er nødvendig. Ved bruk av fargefrie geler er det ikke mulig å identifisere og kvantifisere de løselige proteinene, men målet med dette forsøket er å kun undersøke om pH og ionestyrke påvirker løseligheten av ulike proteiner. Siden prøvene har ulik løselighet av proteiner ble det tilsatt ulike konsentrasjoner av prøvene i gelen. Det ble applisert 5 µL av molekylvektstandard (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards Unstained), 20 µL av prøvene ved pH 3, 10 µL av prøvene ved pH 4 og 5 µL av prøvene ved pH 5, 6, 7 samt en prøve av melet for å se på separasjonen av det totale proteininnholdet. Prøvene ble separert ved konstant spenning på 200 V i cirka 43 minutter inntil bromfenolblåttmarkøren var synlig ”nederst” på gelen. Gelene ble oppbevart i dH₂O. Alle løsninger som ble benyttet var etter protokollen fra Bio-Rad (Laboratories, 2011).

3.4.2.3 Synliggjøring av proteinbånd ved bruk av Gel Doc™ EZ og Image Lab

For å undersøke separeringen av proteinbånd ble Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad, USA) koblet opp mot Image Lab software benyttet. Image Lab ble stilt inn til å analysere stain-free gel med beste sensitivitet på fem minutter og automatisk optimalisere eksponeringstid for svake bånd. En gel av gangen ble lagt på StainFree Tray (Gel Doc™ EZ, Bio-Rad, USA) og satt inn i Gel Doc™ EZ imager og lest av i Image Lab. Gelbildene ble lagret som jpg-filer.

3.5 Måling av viskoelastiske egenskaper i produkt ved varierende pH og ionestyrke ved bruk av reometer

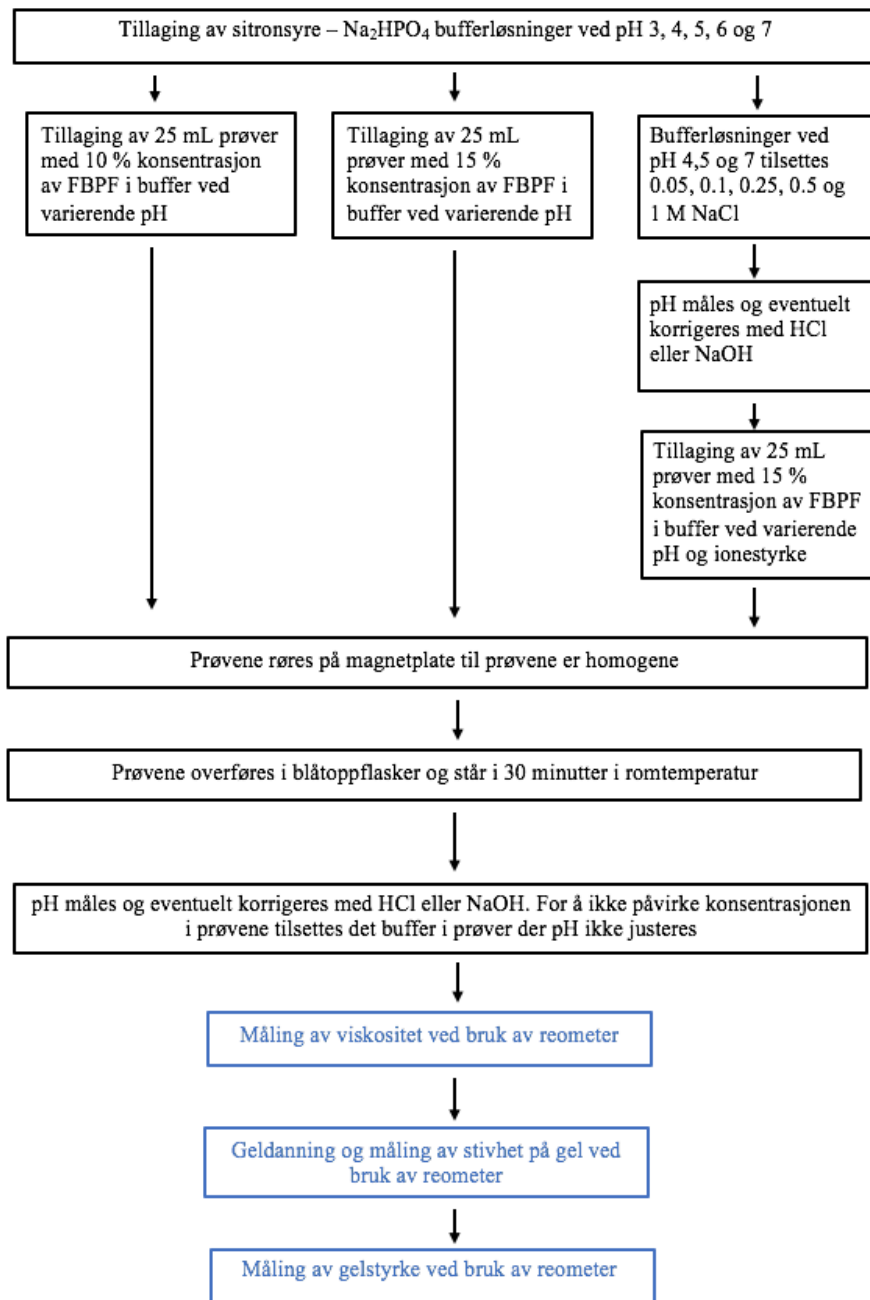
Hensikten med dette forsøket var å undersøke om prøveløsninger av FBPF ved varierende pH og ionestyrke hadde en effekt på reologiske egenskaper som viskositet og geldanning. Viskoelastiske målinger ble gjennomført ved bruk av et reometer (Anton Paar, Physica MCR 301, Østerrike) koblet opp til dataprogrammet Rheoplus/32 V3.40 (Anton Paar). En 20 mL konsentrisk bob (CC27/Ti, Anton Paar, Østerrike) og cup (Measuring Cup-C-CC27/T200/Ti, Anton Paar, Østerrike) ble benyttet. Figur 5 viser reometeret utstyrt med bob og cup. Reometeret var utstyrt med Peltier temperaturregulering for å opprettholde ønsket temperatur i prøvene som ble målt.



Figur 5. Reometer (Anton Paar, Physica MCR 301, Østerrike) utstyrt med konsentrisk bob (CC27/Ti, Anton Paar, Østerrike) og cup (Measuring Cup-C-CC27/T200/Ti, Anton Paar, Østerrike) (Foto: Steien, 2018).

3.5.1 Preparering av prøver

Flytskjema over metoden for å undersøke reologiske egenskaper i FBPF er vist i figur 6.



Figur 6. Flytskjema over reologiske målinger som ble utført i prøver av FBPF ved ulik konsentrasjon, pH og ionestyrke.

Det ble laget 25 mL prøver med 15 % og 10 % konsentrasjon av FBPF i sitronsyre-Na₂HPO₄ – bufferløsninger. Det ble laget fem prøver av hver konsentrasjon med varierende pH-verdi på 3, 4, 5, 6 og 7. Det ble også laget prøver med 15 % konsentrasjon av produkt med ulik ionestyrke (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 og 1 M NaCl) ved pH 4, 5 og 7.

Det ble først tilsatt cirka 15 mL buffer i 100 mL begerglass med utveid produkt og sammen med en magnetrører. Prøven ble så rørt på en magnetplate (RCT basic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH, Germany) til prøven var homogen. Prøvene ble så overført i målekolber på 25 mL og buffer ble pipettert i målekolben til prøven nådde 25 mL-merket. Prøvene ble overført til blåtoppflasker og stod i romtemperatur i 30 minutter. pH-verdien i prøvene ble så målt og eventuelt justert med 5 M HCl eller 1 M NaOH. For at alle prøvene skulle ha lik konsentrasjon ble det tilsatt noen dråper med buffer i de prøvene som ble tilsatt mest volum av HCl eller NaOH. Deretter ble prøvene oppbevart i kjølerom over natten ved 4 °C. Etter cirka 15 timer ble pH-verdien målt. Prøvene ble benyttet til viskoelastiske målinger, deretter undersøkelse av gelegenskaper.

3.5.2 Måling av viskositet

Måling av viskositet ble undersøkt ved rotasjonsanalyse på reometeret som analyserte viskositet (Pa·s) og skjærspenning (Pa) som en funksjon av økende skjærhastighet (1/s). Først ble prøve ble tilsatt til merket i koppen (cirka 20 mL). For å unngå støy som påvirker og fører til varierende resultater ved bruk av for lav skjærhastighet ble det bestemt at målingene ble gjennomført ved en økende skjærhastighet fra 200-500 1/s. For hver prøve ble det gjort målinger av viskositet (Pa·s), skjærspenning (Pa) og skjærhastighet (1/s) hvert sjette sekund som i alt resulterte i 20 målinger per forsøk. Målingene ble utført over nøyaktig hele rotasjoner. Det ble utført tre paralleller for hver prøve. De målte verdiene ble brukt til å fremstille flyteegenskapene i prøvene ved målt viskositet (Pa·s) mot skjærhastighet (1/s). Alle målingene ble gjennomført ved 20 °C.

3.5.3 Måling av geldanningsegenskaper

For å undersøke geldanningsevne og egenskapene til gelene ved ulik konsentrasjon, pH og ionestyrke ble først gelen dannet i reometeret ved å øke temperaturen. Reometeret målte kontinuerlig på prøven i oscillasjon for å se utviklingen av stivhet under gel formasjonen i sammenheng med tid og temperatur. Gelstyrke og tøyningsgrense ble så målt på gleen. Amplituden som ble brukt var på 0.1 % strain ved 10 rad/s, så målingene skjedde i det lineære viskoelastiske området. Amplitude sweep viste at prøvene tålte betydelig mer enn 0.1 % tøyning for å ødelegges så målingene var derfor ikke destruktive.

3.5.3.1 Geldanning og måling av stivhet på gel

For å danne gel og måle utviklingen av gelens stivhet ble det utført oscillerende målinger med en logaritmisk økende amplitude (γ) fra 0.01 til 100 % ved frekvens på 10 rad/s. Det ble applisert et tynt lag med solsikkeolje over prøven for å hindre fordamping av væske. Prøven ble varmet opp fra 20-90 °C over 15 minutter, før temperaturen ble holdt stabil over 10 minutter. Tilslutt ble prøven kjølt ned fra 90-20 °C i 15 minutter. Lagringsmodulen (G'), som er en elastisitetmodul, og tapsmodulen (G''), som beskriver viskøse egenskaper, ble målt for å undersøke ved hvilken tid og temperatur prøven gikk fra å være en viskoelastisk væske til et viskoelastisk fast stoff. Dette skjer når G' blir større enn G'' .

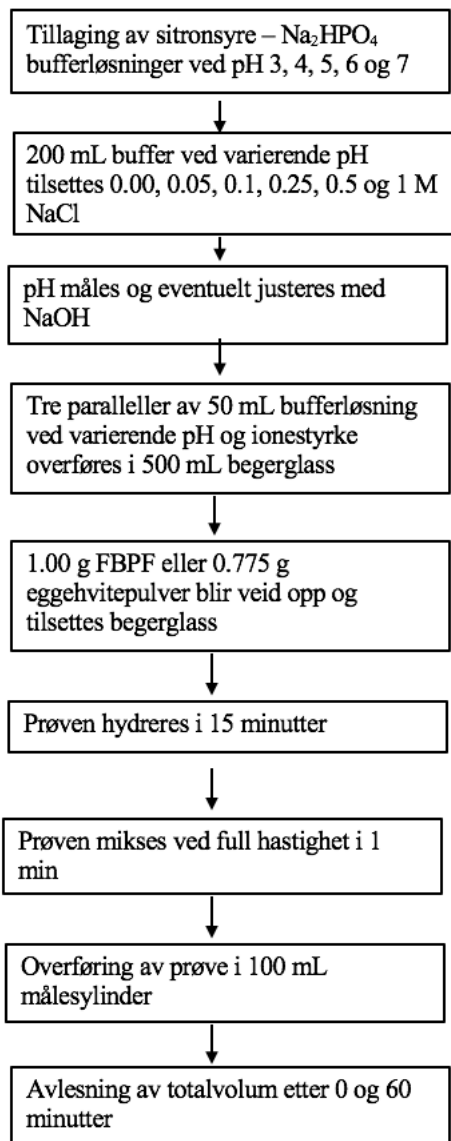
3.5.3.2 Måling av gelstyrke

Deretter ble det undersøkt hvor mye skjærkrefter gelen kunne bli påført før den ble ødelagt ved å kjøre en amplitude sweep. Dette ble målt for å undersøke hvor sterk gelen var og hvor mye den kunne strekkes. Den øvre grensen for det viskoelastiske området ble bestemt ved det punktet G' var redusert med 3 %. Ved denne reduksjonen begynner gelen og ødelegges og er derfor et interessant punkt for å sammenligne gelenes styrke (skjærspenning ved øvre grense for det viskoelastiske området). Punktet beskriver også hvor mye gelen kan deformeres (strekkes) før den ødelegges (tøyningen ved øvre grense for det lineære viskoelastiske området). I de prøvene der gelen ikke hadde nådd steady state ble økende verdier i G' ikke inkludert i makroen for bestemmelse av grensen for lineært viskoelastisk område.

3.6 Skumdanningsevne og stabilitet

For å måle skumdanningsegenskapene hos ulike proteiner undersøkes ofte skumdanningsevne og skumstabilitet. Skumdanningsevne måles i mengde skum rett etter visping, mens skumstabilitet måles i mengde skum etter en bestemt tid. For at proteiner skal ha en god skumdanningsevne er det viktig at de har egenskaper som gjør at de absorberes raskt til grenseflaten mellom luft og vann, utfolder seg og tilpasser proteinstrukturen til grenseflaten. For at proteinene skal danne god skumstabilitet er det også viktig at de i tillegg danner en viskoelastisk film ved intermolekylære interaksjoner rundt luftboblene (Alamanou & Doxastakis, 1997).

Skumegenskapene til FBPF ble undersøkt etter metoden beskrevet av Raikos et al. (2014) med noen justeringer. Flytskjema over metoden som ble benyttet for undersøkelse av skumegenskapene er vist i figur 7.



Figur 7. Flytskjema som viser de ulike trinnene for å undersøke skumegenskaper i FBPF ved varierende pH og ionestyrke. Prøver med eggehvitpulver ved pH 7 ble også undersøkt for å sammenligne skumegenskapene med produktet.

3.6.1 Preparering av prøver

Det ble laget sitronsyre – Na₂HPO₄- bufferløsninger av pH 3, 4, 5,6 og 7. For hver pH ble det laget 200 mL buffer med varierende ionestyrke (0.00, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 M NaCl). pH-verdien ble målt og eventuelt justert etter tilsetningen av NaCl. Det ble veid opp 1.00 gram FBPF som ble tilsatt i begerglass med 50 mL bufferløsning. Prøven ble så stående i romtemperatur og ble hydrert i 15 minutter. Dette ble gjort tre paralleller per buffer med ulik ionestyrke.

Et eggehvitpulver (124 eggehvitpulver standard, LOT NO: 15-03792, Källbergs) ble benyttet for å sammenligne skumdanningssevne og stabilitet med FBPF. Siden eggehvitpulveret inneholder mer protein inne FBPF ble mengden eggehvitpulver benyttet tilpasset slik at prøvene bestod av cirka like mye protein. Det lyktes ikke å komme i kontakt med leverandøren om korrekte mengder protein og andre næringsstoffer så det ble antatt av eggehvitpulveret hadde likt proteininnhold som beregning til tørrstoff av eggehvite som oppført i matvaretabellen (Matvaretabellen, 2017). Skumdanningen ble undersøkt ved pH 7 ved samme varierende ionestyrke som FBPF. Metoden ble utført likt som beskrevet over med FBPF, men det ble tilsatt cirka 0.775 gram eggehvitpulver i 50 mL buffer i stedet for at proteininnholdet skulle være likt som prøvene med FBPF.

3.6.2 Måling av skumdanningssevne og stabilitet

Prøvene ble vispet i 1 minutt ved bruk av stavmikser (CW1299, Coiline, Kina) på max hastighet. Prøvene ble deretter overført i målesylindere. Totalvolumet av prøven ble lest av 0 og 60 minutter etter visping. Skumevnen ble definert som skumekspansjon etter 0 minutter og skumstabiliteten ble definert som skumekspansjonen etter 60 minutter. Skumdanningssevnen og skumstabiliteten ble regnet ut ved bruk av likningen under.

$$\text{Skumekspansjon, \%} = \frac{V(\text{aw}) - V(\text{bw})}{V(\text{bw})} \cdot 100$$

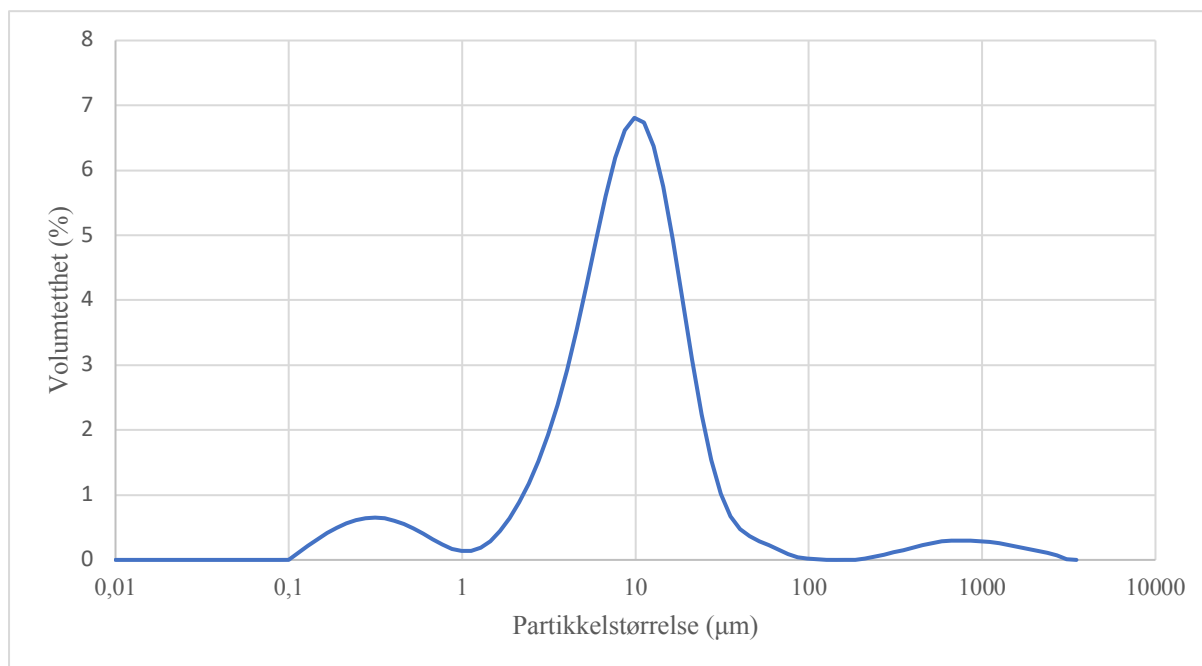
$V(\text{aw})$ er volumet i mL etter visping og $V(\text{bw})$ er volumet i mL før visping.

RStudio (versjon 1.1.447) ble benyttet for statistiske analyser på skumevne og skumstabilitet. Toveis ANOVA og Tukey's test ble benyttet til variansanalysene for å undersøke om endring av pH og ionestyrke viste signifikante forskjeller. For å indikere statistiske signifikante forskjeller ble P-verdi < 0.05 valgt.

4. Resultater

4.1 Partikkelstørrelse i proteinfraksjon av fababønner

Partikkelstørrelsen i produktet påvirker de funksjonelle egenskapene. En lav partikkelstørrelse gir en økt overflate som fører til interaksjoner med løsemiddel i høyere grad sammenliknet ved en større partikkelstørrelse. Partikkelstørrelsen i produktet ble målt ved å benytte en Mastersizer. Størrelsesfordelingen er vist grafisk i figur 8.



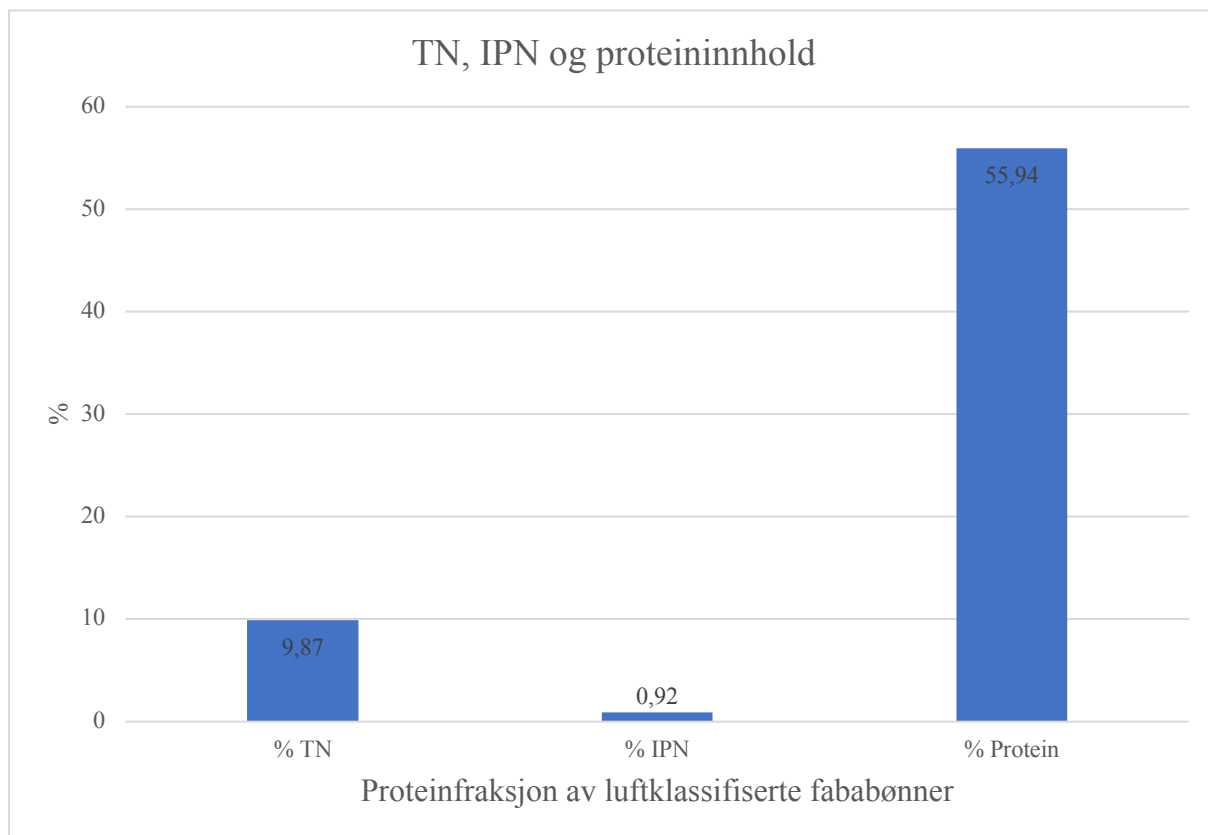
Figur 8. Partikkelstørrelsesfordelingen av FBPF. Tallmaterialet består av gjennomsnittsfordeling på 16 målinger.

Gjennomsnittlig partikkelstørrelse i proteinfraksjonen var på cirka 10 µm. Det var også mindre partikler ved 0,5 µm og større partikler ved 900 µm. Mastersizer 3000 v3.62 software oppga at 10 % av FBPF hadde mindre partikkelstørrelse enn 2,39 µm, 50 % av FBPF hadde mindre partikkelstørrelse enn 9,66 µm og 90 % av FBPF hadde mindre partikkelstørrelse enn 26,0 µm.

4.2 Analyse av proteininnhold og aminosyresammensetning

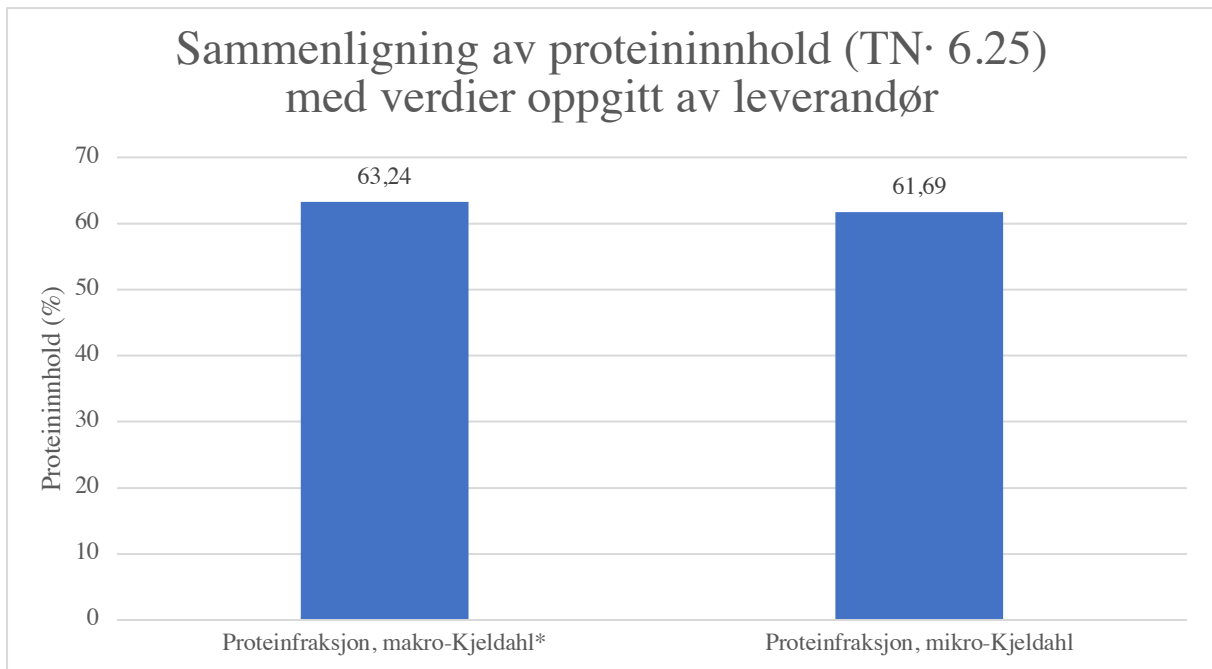
4.2.1 Proteininnhold

Proteininnholdet i FBPF ble analysert ved bruk av mikro-Kjeldahl metoden. TN ble målt til å være 9,87 % og IPN 0,92 % før Kjeldahl-faktoren ble tatt hensyn til. Vedlegg 3 viser tallmaterialet for gjennomsnittsverdiene for TN og IPN. Som vist i figur 9 ble proteininnholdet i FBPF målt til å være 55,94 %. Alle resultatene er i prosent per 100 gram tørrstoff.



Figur 9. Total nitrogen (TN), ikke-protein nitrogen (IPN) og proteininnhold ((% TN-% IPN)•6.25) i FBPF. Verdiene er gjennomsnittet av tre paralleller av fire prøver for % TN og tre paralleller av en prøve for % IPN.

Til sammenlikning har leverandør av FBPF analysert TN ved makro-Kjeldahl metoden på proteinfraksjonen. Leverandør rapporterte om proteininnhold på 63.24 % i proteinfraksjonen uten å subtrahere % IPN. For å sammenligne resultatene fra makro-Kjeldahl utført av leverandør og mikro-Kjeldahl som er utført i denne oppgaven er proteininnholdet også regnet ut uten å ta hensyn til IPN. Resultatene er fremstilt i figur 10.



Figur 10. Proteininnhold (%TN·6.25) i tørt materiale i FBPF ved bruk av makro-Kjeldahl og mikro-Kjeldahl metoden. Tallmaterialet for produkt brukt i oppgaven baseres på tre paralleller av fire prøver.

**Analyse utført av LabTek ved IHA.*

Som figur 10 illustrerer er proteininnholdet i FBPF noe høyere ved bruk av makro-Kjeldahl metoden sammenlignet med mikro-Kjeldahl metoden.

4.2.2 Aminosyresammensetning

Aminosyreinnholdet i FBPF ble analysert ved bruk av sur- og basisk hydrolyse. Basisk hydrolyse ble utført for å undersøke mengden tryptofan i produktet ettersom denne aminosyren ikke kan analyseres ved sur hydrolyse. Tabell 2 viser innholdet av de ulike aminosyrene.

Tabell 2: Innholdet av ulike aminosyrer oppgitt som gram per kg FBPF. Tabellen viser resultatene fra sur hydrolyse og basisk hydrolyse (kun tryptofan).

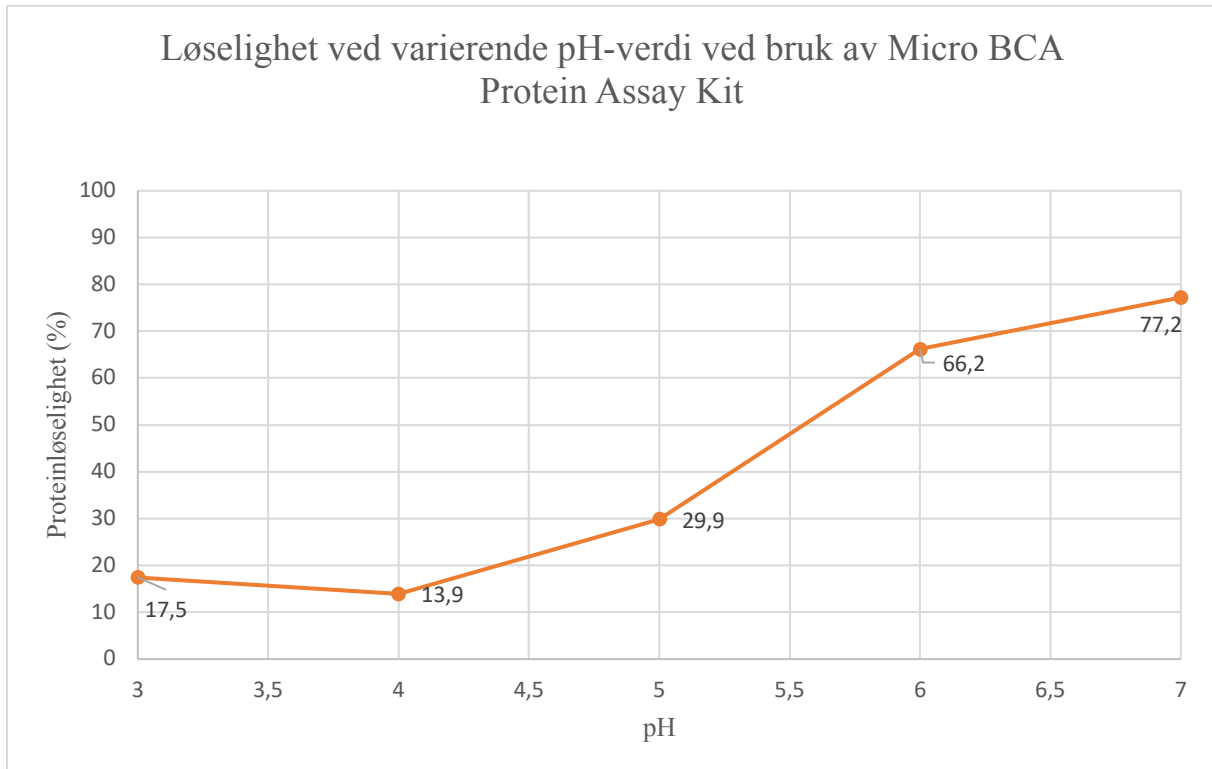
Aminosyre	Gram per kg i FBPF
Alanin - Ala	1.973
Arginin - Arg	4.806
Asparginsyre - Asp	5.411
Cystein - Cys	0.58
Fenylalanin - Phe	2.224
Glutamat - Glu	9.43
Glycin - Gly	2.083
Histidin, His	1.327
Isoleucin, Ile	2.166
Leucin, Leu	3.871
Lysin, Lys	3.649
Metionin, Met	0.639
Prolin, Pro	2.475
Serin, Ser	2.691
Treonin, Thr	2.198
Tyrosin, Tyr	1.565
Valin, Val	2.553
<u>Sum aminosyrer</u>	49.253
Tryptofan, Trp	0.514

Som tabell 2 viser inneholder FBPF lavt innhold av de svovelrike aminosyrene cystein og metionin. Analysen viste høyt innhold av glutamat etterfulgt av asparginsyre og arginin. Dersom innholdet av de ulike aminosyrene summeres, gir dette et proteininnhold på 53.9 % i tørt materiale.

4.3 Proteinløselighet

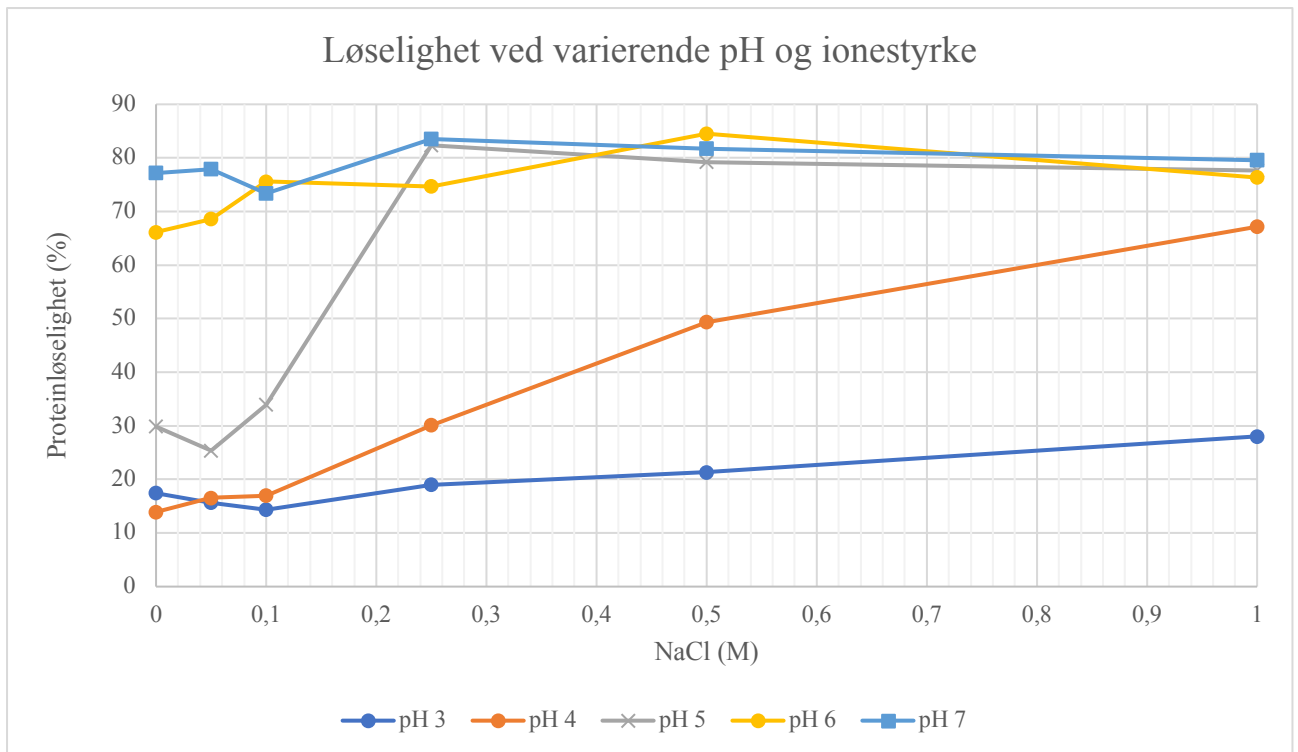
Løseligheten av protein i produktet ble undersøkt ved varierende pH og ionestyrke i sitronsyre- Na_2HPO_4 - bufferløsninger ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit. Løseligheten ble undersøkt ved pH 3, 4, 5, 6 og 7 og ved 0.00, 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 og 1.00 M NaCl for alle pH-

verdiene. En grafisk fremstilling av resultatene med varierende pH er vist i figur 11 og i figur 12 er proteinløseligheten ved varierende ionestyrke også inkludert i resultatene.



Figur 11. Proteinløselighet av FBPF ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit ved varierende pH. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller av fire prøver, i alt 12 målinger per punkt i grafen. Gjennomsnittsverdiene er også vist i vedlegg 4.

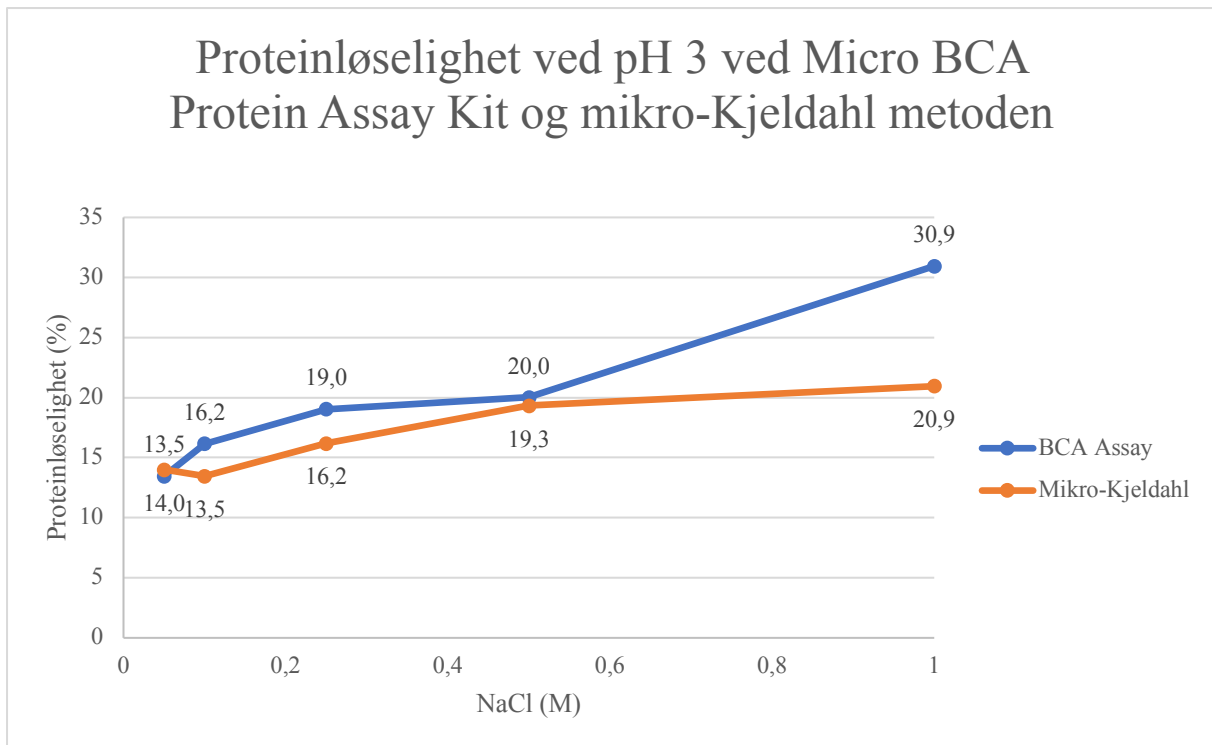
Proteinløseligheten var lavest ved pH 4 og høyest ved pH 7 med proteinløselighet på henholdsvis 13.9 % og 77.2 %. Grafen viser en U-formet kurve der løseligheten øker desto større differanse det er mellom pH-verdien og pH 4. Videre viser figur 12 hvordan løseligheten ved varierende pH ble påvirket ved varierende ionestyrke.



Figur 12. Proteinløselighet av FBPF ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit ved varierende pH og ionestyrke. Figuren viser hvordan proteinløseligheten påvirkes av varierende pH ved ulike ionestyrker. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller av fire prøver, i alt 12 målinger per punkt i grafen. Gjennomsnittsverdiene er vist i vedlegg 4.

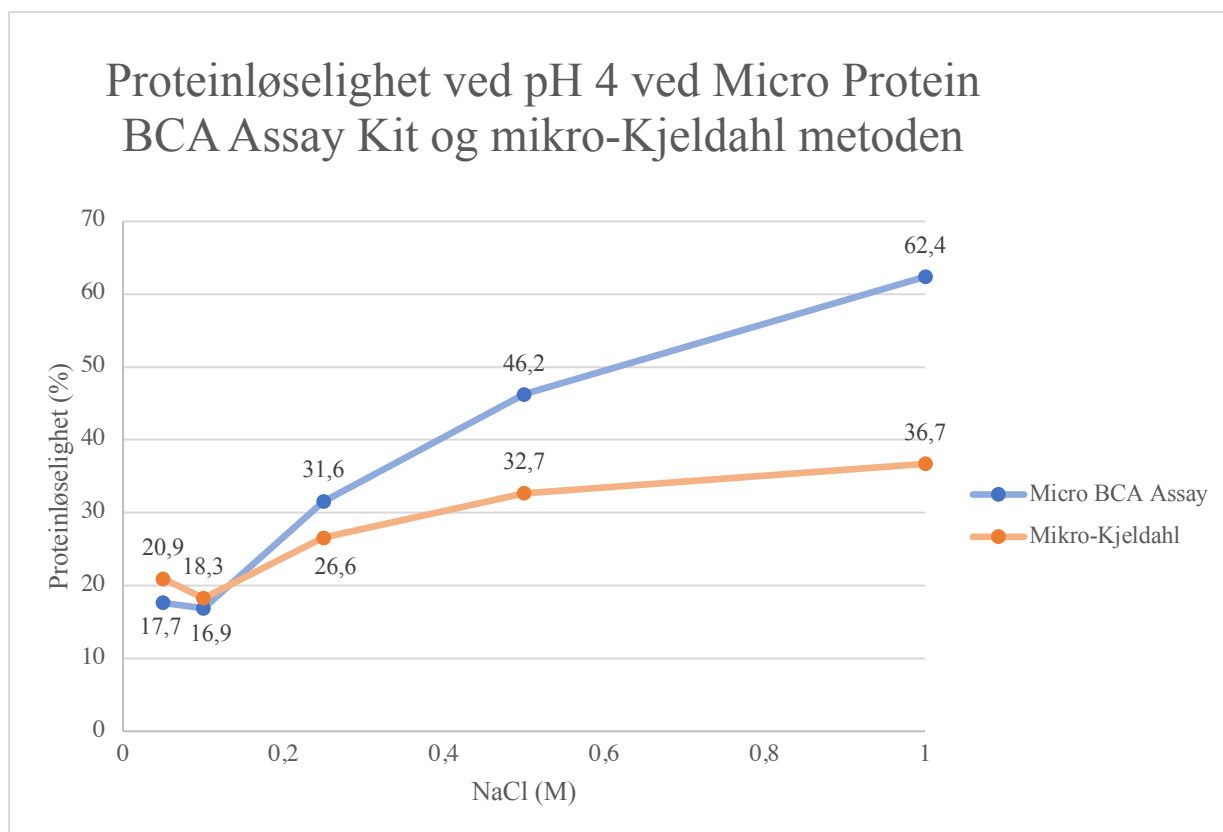
Som figur 12 viser varierer løseligheten både ved varierende pH og ionestyrke. Løseligheten er høyest ved pH 6 og 7, og holdes relativt stabilt ved endring av ionestyrke ved disse pH-verdiene. Ved pH 4 og pH 5 blir løseligheten mest påvirket av ionestyrke, og som figuren viser øker løseligheten ved disse pH-verdiene ved økende ionestyrke. Løseligheten av proteinene ved pH 3, 6 og 7 påvirkes ikke i like stor grad av ionestyrken som ved pH 4 og pH 5. Prøvene ved pH 3 har jevnt over lavest løselighet sammenlignet med de andre pH-verdiene. Løseligheten øker ved alle pH-verdier ved en økende ionestyrke. Ved pH 4 øker løseligheten jevnere ved økende ionestyrke, mens ved pH 5 øker løseligheten mest mellom ionestyrke 0.1 M NaCl og 0.25 M NaCl.

For å undersøke om resultatene utført ved Micro BCA Protein Assay Kit ble påvirket av pH og ionestyrke, ble det utført mikro-Kjeldahl med samme prøver som ved Micro BCA Protein Assay Kit for pH 3 og pH 4 ved ulike ionestyrker. En grafisk fremstilling av resultatene fra de to ulike metodene er vist i figur 13 og 14.



Figur 13. Sammenligning av proteinløselighet av FBPF ved pH 3 ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit og mikro-Kjeldahl metoden ved varierende ionestyrke. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller av fire prøver av Micro BCA Protein Assay Kit, og gjennomsnittet av tre paralleller for mikro-Kjeldahl.

Micro BCA Protein Assay Kit målte en høyere proteinløselighet enn det mikro-Kjeldahl metoden gjorde. Ved lav ionestyrke var forskjellene mindre enn ved høyere ionestyrke. Resultatene fra de to ulike metodene ved pH 3 viser ganske lik proteinløselighet ved økende ionestyrke opp til 1 M NaCl. Ved denne ionestyrken ble proteinløseligheten analysert til å være 30.9 % ved Micro BCA Assay og 20.9 % ved mikro-Kjeldahl. Det ble observert enda større variasjoner ved de to metodene ved pH 4 som figur 14 viser.



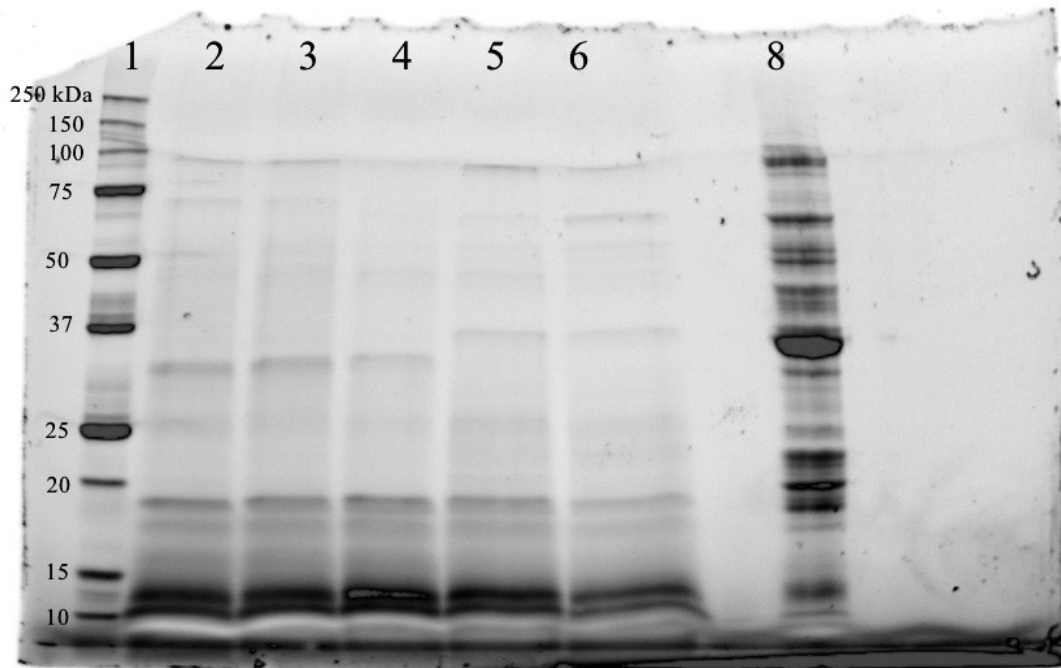
Figur 14. Sammenligning av proteinløselighet av FBPF ved pH 4 ved bruk av Micro BCA Protein Assay Kit og mikro-Kjeldahl metoden ved varierende ionestyrke. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller av fire prøver av Micro BCA Protein Assay Kit, og gjennomsnittet av tre paralleller for mikro-Kjeldahl.

Lignende trend av variasjonen av proteinløseligheten mellom Micro BCA Assay og mikro-Kjeldahl som ble målt ved pH 3 ble også observert ved pH 4. Som figur 14 viser varierer proteinløseligheten i mindre grad ved lav ionestyrke sammenlignet med høy ionestyrke. Ved 0.05 M NaCl ble proteinløseligheten målt til å være 17.7 % og 20.9 % ved henholdsvis Micro BCA Assay og mikro-Kjeldahl, men ved 1 M NaCl var proteinløseligheten henholdsvis 62.4 % og 36.7 %. Selv om resultatene varierer mellom de ulike metodene som vist i figur 13 og 14, er det en tydelig trend mellom de to metodene som viser at løseligheten øker med økende ionestyrke.

4.4 Analyse av proteinprofil ved SDS-PAGE

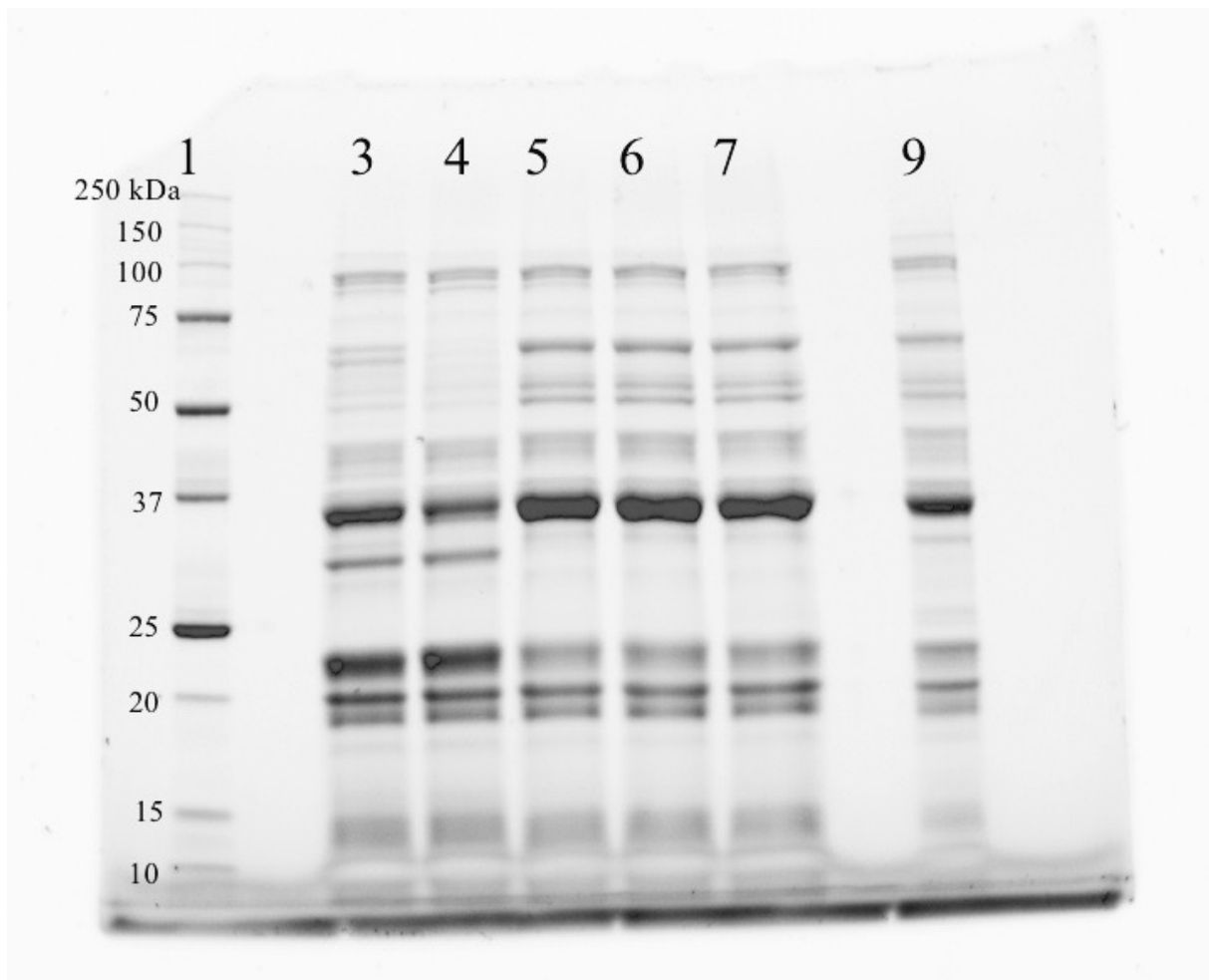
Det ble utført SDS-PAGE av prøver med FBPF og varierende pH og ionestyrke for å undersøke om løseligheten av ulike proteiner varierte ved å endre disse faktorene. For å synliggjøre separeringen av proteinbånd ble Gel Doc™ EZ imager koblet opp mot Image Lab software benyttet. Avhengig av proteinløseligheten til proteinene ved ulik pH og ionestyrke, ble det

applisert ulike konsentrasjoner av prøvene ved ulike pH. Noen av gelene kan derfor ikke direkte sammenlignes på grunn av ulike konsentrasjoner. Resultatet av proteinsepareringen er vist i figur 15, 16, 17 og 18. Svakest bånd ble observert ved pH 3 for alle de ulike ionestyrkene som vist i figur 15.



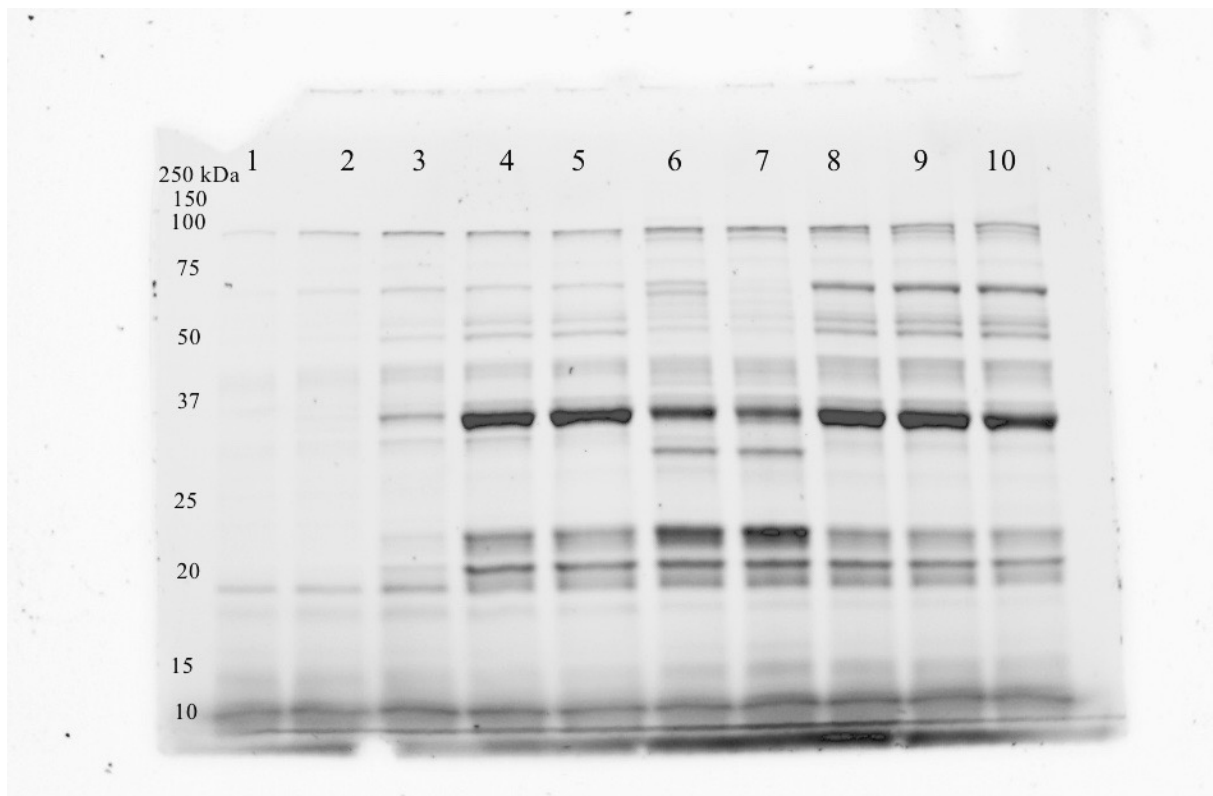
Figur 15. Proteinseparering av FBPF ved pH 3 ved varierende ionestyrke sammenlignet med proteinprofil av FBPF løst i urea. Brønn 1; Molekylvektstandard, 5 μ l; brønn 2; pH 3, 0.05 M NaCl, 20 μ l; brønn 3; pH 3, 0.1 M NaCl, 20 μ l; brønn 4; pH 3, 0.25 M NaCl, 20 μ l; brønn 5; pH 3, 0.5 M NaCl, 20 μ l; brønn 6; pH 3, 1 M NaCl, 20 μ l; brønn 8; 1 % FBPF i 8M urea + DTT-buffert, 5 μ l. Prøvene med SDS-buffert ved pH 3 ble korrigert til pH 6.8 med 1 M NaOH.

Figuren viser at det er tydeligere bånd nederst på gelen, noe som tyder på en bedre løselighet for proteiner av lav molekylvekt ved pH 3 ved varierende ionestyrke. Proteinsepareringen viser også at proteinløseligheten endrer seg fra brønn 4 (pH 3, 0.25 M NaCl) til brønn 5 (pH 3, 0.5 M NaCl) ved molekylvekt 25-37 kDa. I prøvene ved pH 4 med varierende ionestyrke ble det også observert endringer i proteinløseligheten. Dette er vist i figur 16.



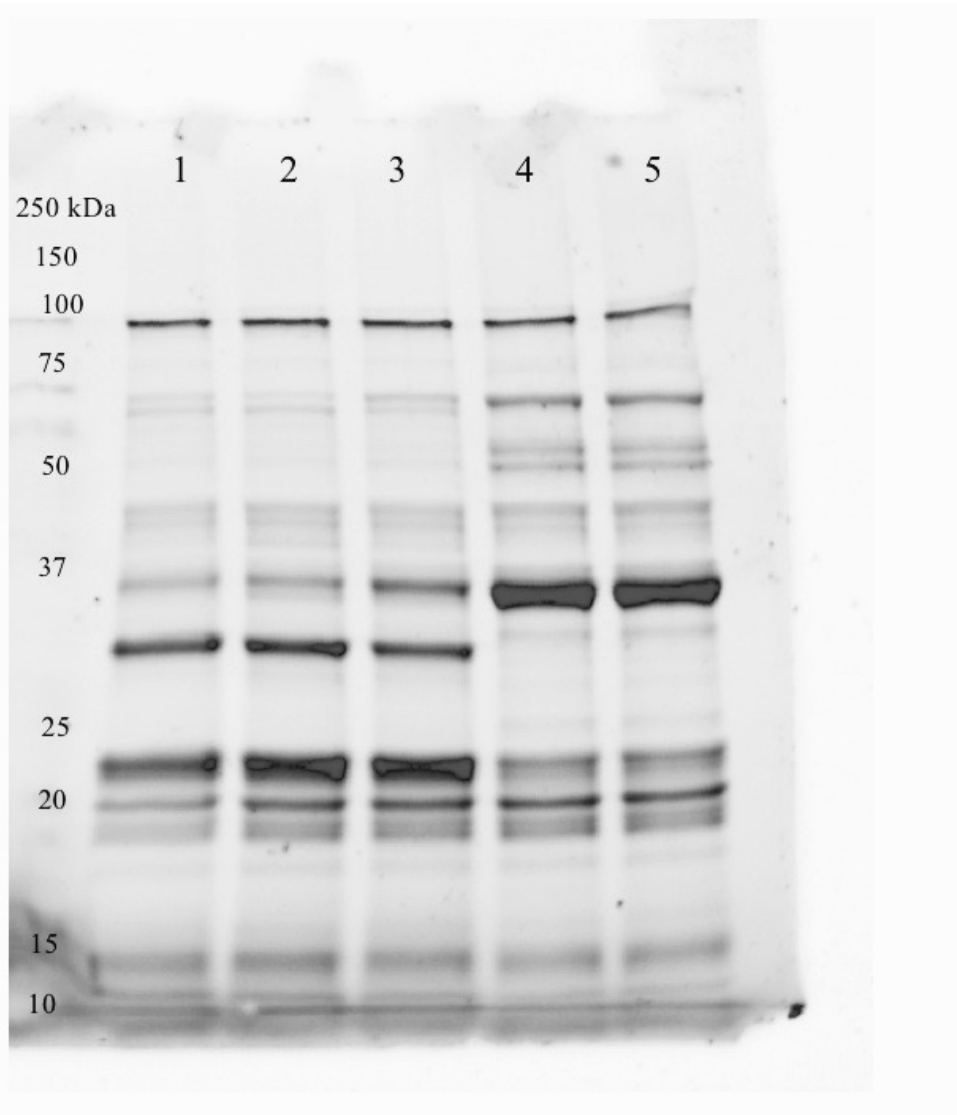
Figur 16. Proteinseparering av FBPF ved pH 4 ved varierende ionestyrke sammenlignet med proteinprofil av FBPF løst i urea. Brønn 1; Molekylvektstandard, 5 μ l; brønn 3; pH 4, 0.05 M NaCl, 10 μ l; brønn 4; pH 4, 0.1 M NaCl, 10 μ l; brønn 5; pH 4, 0.25 M NaCl, 10 μ l; brønn 6; pH 4, 0.5 M NaCl, 10 μ l; brønn 7; pH 4, 1 M NaCl, 10 μ l; brønn 9; 1 % FBPF i 8M urea + DTT-buffer, 5 μ l. pH i prøvene med SDS-buffer ved pH 4 ble ikke korrigert da prøvene hadde en pH på cirka 6.0.

Som figur 16 viser ble både proteiner med lav og høy molekylvekt ble løst opp ved ulike ionestyrke. Fra 0.1 M NaCl til 0.25 M NaCl (brønn 4 og 5) ble det observert den tydeligste endringen av proteinløseligheten mellom 25-37 kDa. En reduksjon i proteinløseligheten ved molekylvekt mellom 20-25 kDa ble også observert. Proteinbåndene i prøvene ved pH 5 og 6 er vist i figur 17.



Figur 17. Proteinseparering av FBPF ved pH 5 og 6 ved varierende ionestyrke. Brønn 1; pH 5, 0.05 M NaCl, 5 μ l; brønn 2; pH 5, 0.1 M NaCl, 5 μ l; brønn 3; pH 5, 0.25 M NaCl, 5 μ l; brønn 4; pH 5, 0.5 M NaCl, 5 μ l; brønn 5; pH 5, 1 M NaCl, 5 μ l; brønn 6; pH 6, 0.05 M NaCl, 5 μ l; brønn 7; pH 6, 0.1 M NaCl, 5 μ l; brønn 8; pH 6, 0.25 M NaCl, 5 μ l; brønn 9; pH 6, 0.5 M NaCl, 5 μ l; brønn 10; pH 6, 1 M NaCl, 5 μ l. Prøvene med SDS-buffer ved pH 5 ble justert til pH 6.8 med 1 M NaOH. I prøvene med SDS-buffer ved pH 6 ble ikke pH korrigert da prøvene hadde en pH på cirka 6.0.

Ved pH 5 ble det observert svake proteinbånd ved lav ionestyrke som vist i figur 17. Ved økende ionestyrke fra 0.25 M NaCl er det tydeligere bånd som ligner proteinbåndene i prøvene ved pH 6 med ionestyrke 0.25-1 M NaCl. I prøvene ved pH 6 fra 0.1 M NaCl til 0.25 M NaCl (brønn 7 og 8) er det en tydelig endring av proteinløseligheten mellom 25-37 kDa. Proteinbåndene blir generelt tydeligere ved økende ionestyrke fordi proteinløseligheten ved pH 6 og pH 5 øker med økende ionestyrke slik at konsentrasjonen av proteiner i prøvene er høyere ved høy ionestyrke enn i prøvene ved lav ionestyrke. Tydelige proteinbånd ble også observert for prøvene ved pH 7 som er vist i figur 18.



Figur 18. Proteinseparering av FBPF ved pH 7 ved varierende ionestyrke. Brønn 1; pH 7, 0.05 M NaCl, 5 μ l; brønn 2; pH 7, 0.1 M NaCl, 5 μ l; brønn 3; pH 7, 0.25 M NaCl, 5 μ l; brønn 4; pH 7, 0.5 M NaCl, 5 μ l; brønn 5; pH 7, 1 M NaCl, 5 μ l. I prøvene med SDS-buffert ved pH 7 ble ikke pH justert.

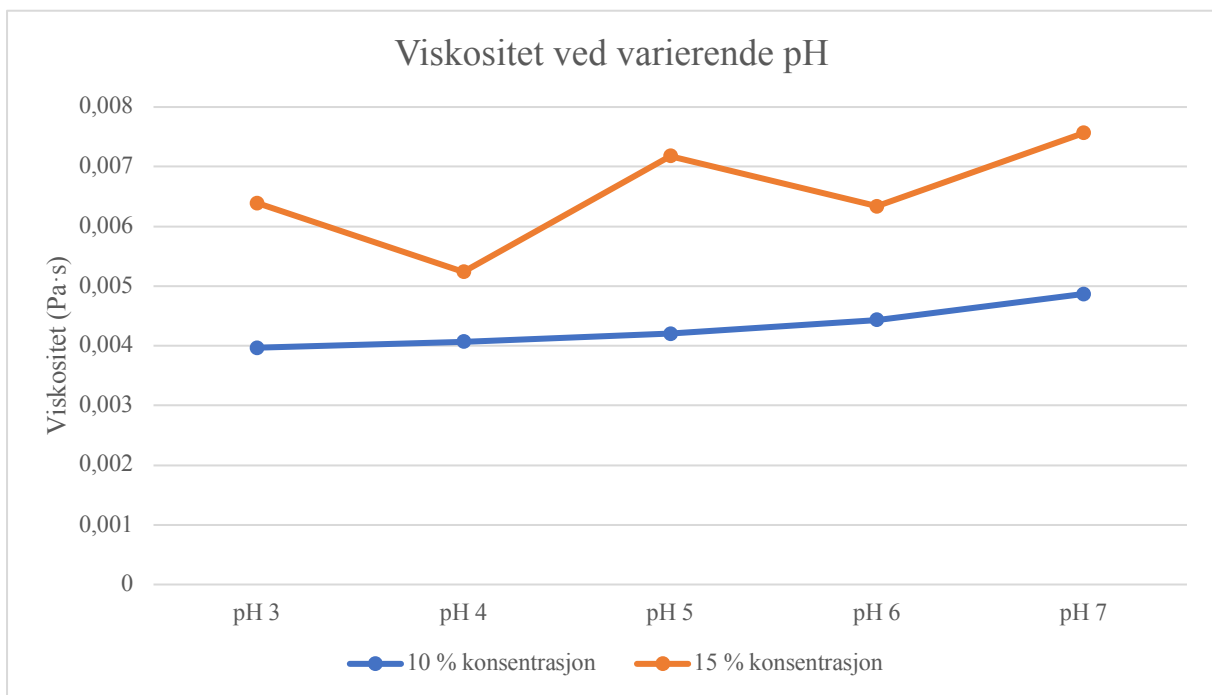
Proteinløseligheten endres mest mellom 0.25 M NaCl og 0.5 M NaCl (brønn 3 og 4). Båndene som endres er proteiner av molekylvekt mellom 25-37 og 50-75 kDa. Mellom molekylvekt 20-25 kDa er det også en reduksjon av løselig protein ved økende ionestyrke.

4.5 Måling av viskoelastiske egenskaper ved bruk av reometer

Det ble utført viskositetsmålinger og undersøkelse av gelegenskaper ved varierende pH og ionestyrke av FBPF ved 10 % og 15 % konsentrasjon.

4.5.1 Viskositetsmålinger

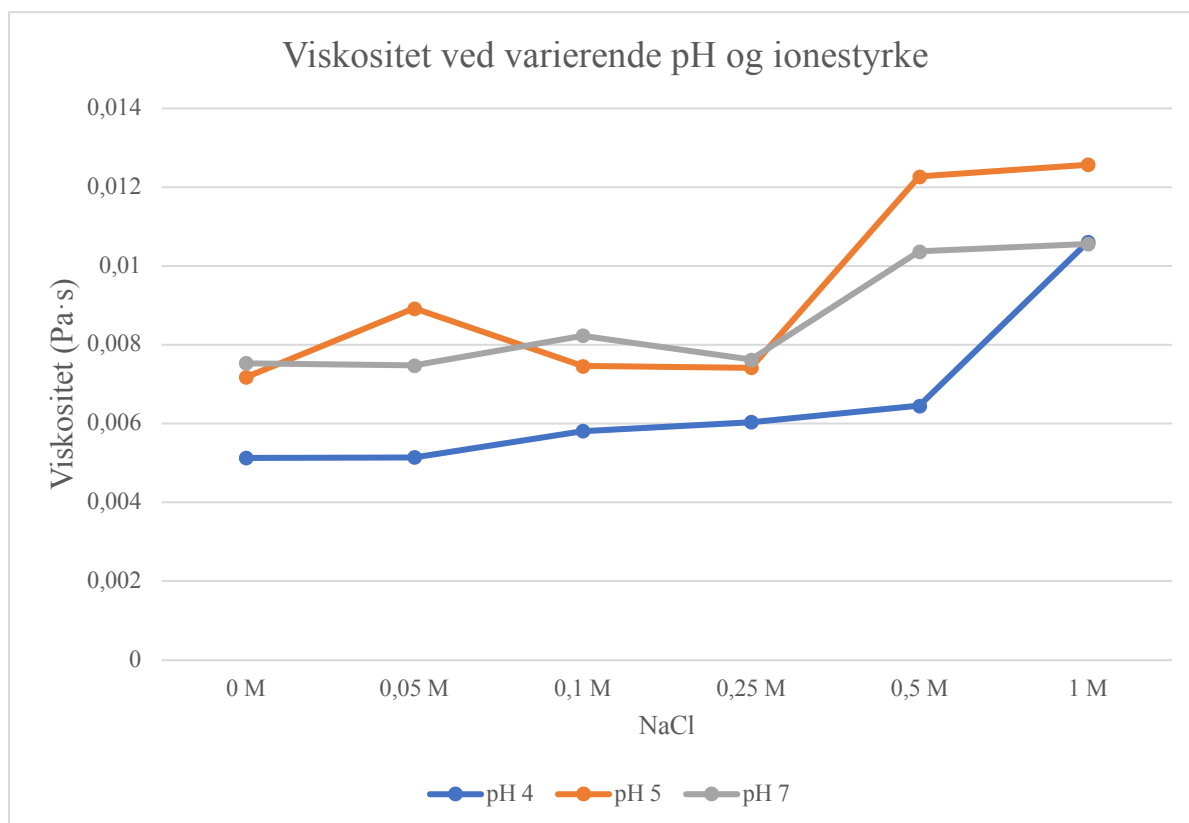
Viskositetsmålingene ble utført ved en rotasjonsanalyse som undersøkte viskositet (Pa·s) og skjærspenning (Pa) som en funksjon av økende skjærhastighet (1/s). Målingene ble utført ved en økende skjærhastighet på 200-500 1/s. Alle målingene ble undersøkt ved 20 °C. Hver prøve ble målt tre ganger. Når prøvene ble målt på nytt ble det målt en litt lavere viskositet i prøvene. En grafisk fremstilling av viskositet ved 10 % og 15 % FBPF med varierende pH-verdi og konstant ionestyrke er vist i figur 19.



Figur 19. Viskositetsmålinger utført ved to konsentrasjoner av FBPF med varierende pH og uten endring av ionestyrke. Tallmaterialet er gjennomsnittsverdier ved tre gjentak av 20 viskositetsmålinger ved økende skjærhastighet fra 200-500 1/s, totalt 60 punkter målt per punkt i figuren. Gjentakene for viskositetsmålingene er vist i vedlegg 5, tabell 8.

En gradvis økning av viskositet ble observert i prøvene med 10 % konsentrasjon av FBPF ved økende pH. I prøvene med 15 % konsentrasjon av FBPF ble det derimot observert varierende viskositet der pH 4 viste lavest viskositet etterfulgt av FBPF ved pH 6. For begge konsentrasjonene ble det målt høyest viskositet ved pH 7.

For å undersøke påvirkning av viskositet ved å endre ionestyrke, ble det utført viskositetsmålinger ved pH 4, 5 og 7 ved varierende ionestyrke ved 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 og 1 M NaCl. Et gjennomsnitt av målingene er vist i figur 20.



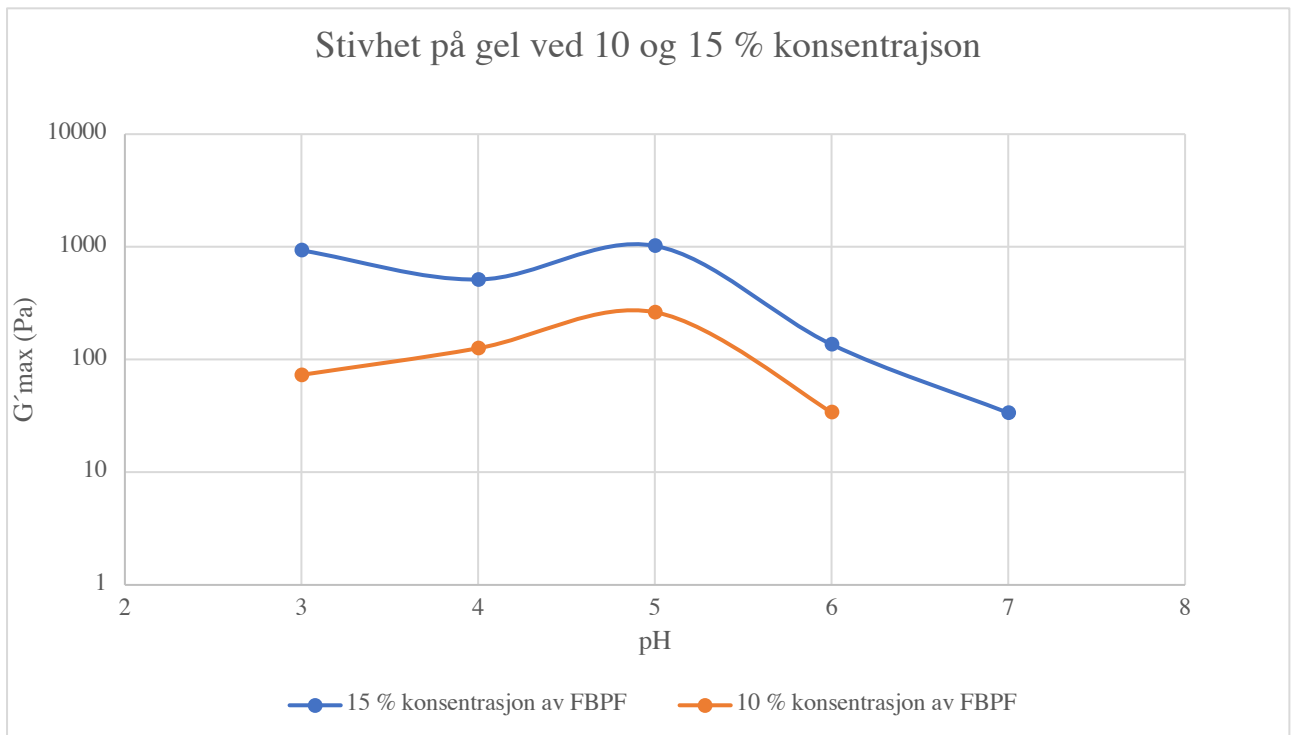
Figur 20. Viskositetsmålinger utført ved 15 % konsentrasjon av FBPF med varierende pH og ionestyrke. Tallmaterialet er gjennomsnittsverdier ved tre gjentak av 20 viskositetsmålinger ved økende skjærhastighet fra 200-500 1/s, totalt 60 punkter målt per punkt i figuren. Gjentakene for viskositetsmålingene er vist i vedlegg 5, tabell 9.

Lavest viskositet ble observert ved pH 4 ved alle ionestyrker, men fra 0.5 M–1 M NaCl økte viskositeten mer enn den ellers gradvise viskositetsøkningen ved pH 4. Både pH 5 og pH 7 viste ingen tydelig trend av viskositet ved økende ionestyrke, men begge pH-verdiene hadde en økning i viskositet mellom 0.25 og 0.5 M NaCl som vist i figuren. Ved økende ionestyrke har pH 4 og pH 7 en lik trend ved lav ionestyrke (0–0.1 M NaCl). Ved endring av ionestyrke tyder det på at pH 5 har noe høyere viskositet enn pH 7.

4.5.1 Gelegenskaper

Nesten alle prøver av FBPF dannet gel bortsett fra 10 % FBPF ved pH 7. Prøvene gikk over til å være viskoelastisk væske til viskoelastisk fast stoff da G' var større enn G'' .

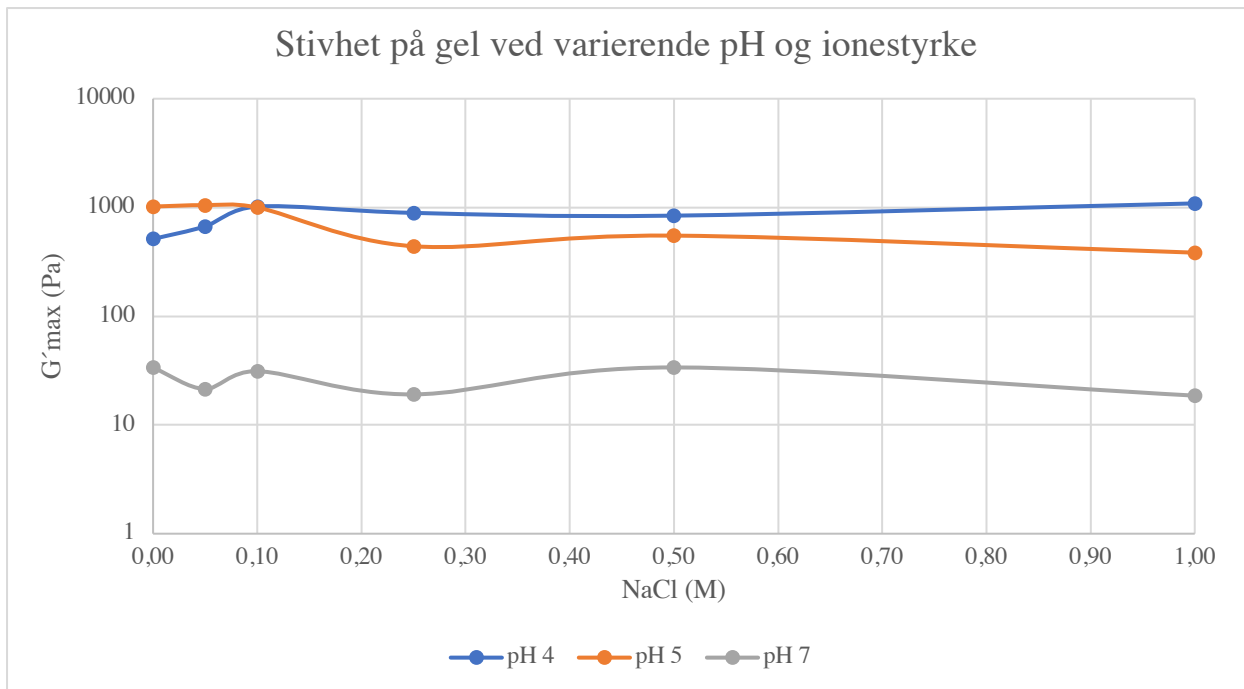
Gelegenskaper ble målt etter geldanning av prøvene. Stivhet på gel ved 10 og 15 % konsentrasjon av FBPF er vist i figur 21.



Figur 21. Stivhet på gel ved 10 og 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende pH. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH, konsentrasjon og ionestyrke. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 10.

I prøvene med 15 % FBPF ble det observert en økning av G' under måling av stivhet på gel. Stivheten var høyere ved 15 % konsentrasjon av FBPF sammenlignet med 10 % konsentrasjon ved alle pH-verdier. For begge konsentrasjoner ble det observert en økende stivhet fra pH 4 til 5, før stivheten igjen ble redusert ved høyere pH-verdier. Det ble ikke dannet gel ved 10 % FBPF ved pH 7 og derfor ble ikke målinger av gelegenskaper ved denne kombinasjonen av pH og konsentrasjon utført.

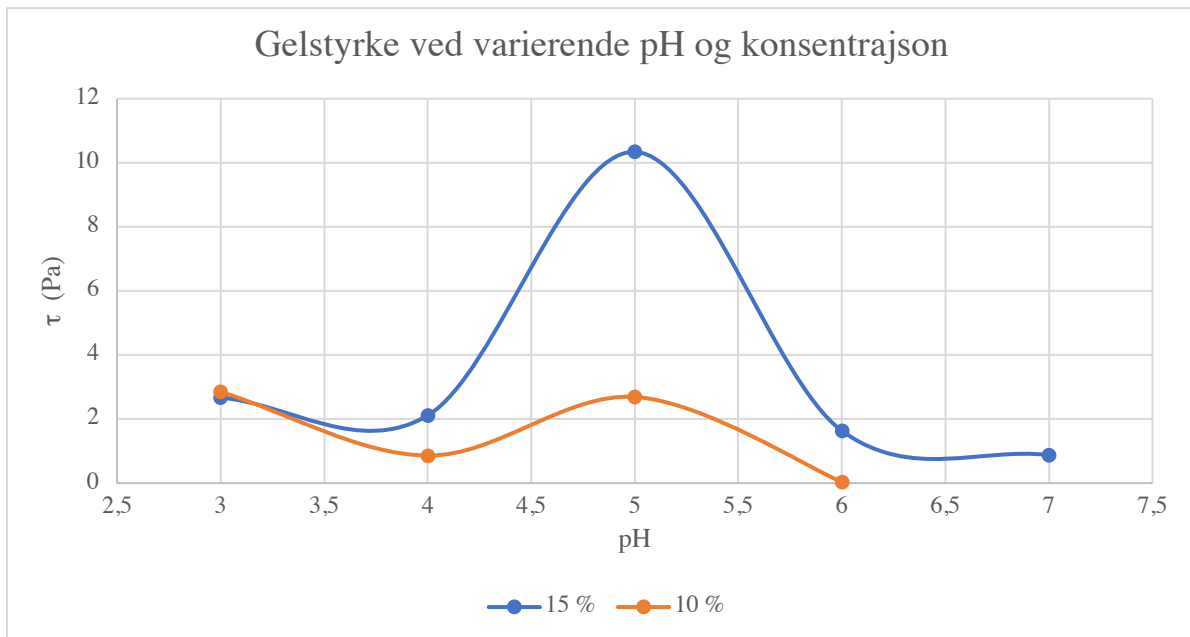
Det ble utført målinger av gelegenskaper på prøver med konstant konsentrasjon og varierende ionestyrke ved pH 4, 5 og 7 for å undersøke om endring av ionestyrke påvirker gelens egenskaper. Fremstillingen av resultatene er vist i figur 22.



Figur 22. Stivhet på gel ved 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende ionestyrke og pH. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH, konsentrasjon og ionestyrke. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 11.

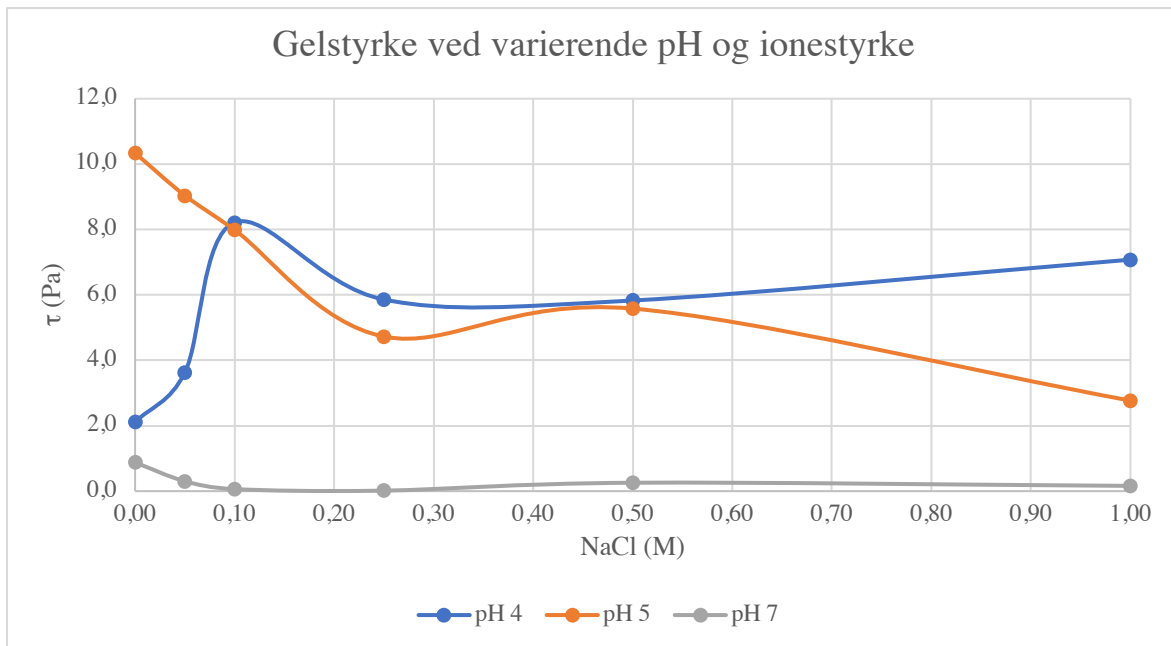
I prøvene ved pH 4 og 5 ble det observert en økning av G' under måling av stivhet på gelene. Stivheten var lavest ved pH 7 for alle ionestyrker. Gelene ved pH 4 og 5 hadde høyere stivhet. Ved lav ionestyrke (< 0.1 M NaCl) var G' max høyest ved pH 5, men ved økende ionestyrke var prøver ved pH 4 høyest. Ingen tydelig trend i endring av stivhet som effekt av økende ionestyrke ble observert ved noen av pH-verdiene.

Prøvene ble utsatt for økende skjærstress for å analysere gelstyrken og hvor mange prosent gelene kunne strekkes i den øvre grensen for det viskoelastiske området. Det ble observert en positiv korrelasjon mellom stivhet på gelene og gelstyrken. Figur 23 viser gelstyrken ved 10 % og 15 % FBPF ved varierende pH. Slik som resultatene viste ved måling av stivhet på gel, er også gelstyrken høyest ved pH 5. Ved pH 6 og 7 ble det målt lavest gelstyrke.



Figur 23. Gelstyrke ved 10 og 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende pH. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH og konsentrasjon. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 10.

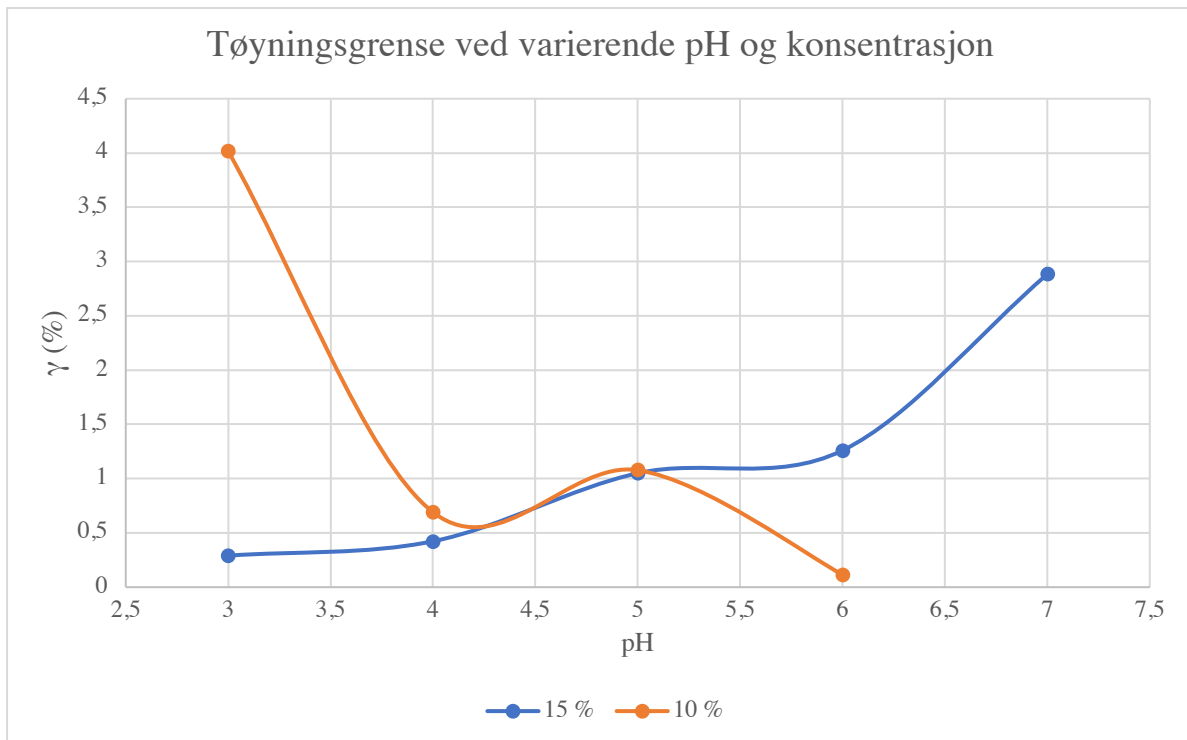
Som figur 23 viser, er gelstyrken høyere ved 15 % FBPF sammenlignet med 10 % FBPF. Ved pH 5 ble det målt størst variasjon i gelstyrke mellom de to konsentrasjonene. For å undersøke om endring av ionestyrke påvirker gelstyrken, ble dette undersøkt. Resultatene er fremstilt i figur 24.



Figur 24. Gelstyrke ved 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende pH og ionestyrke. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH, konsentrasjon og ionestyrke. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 11.

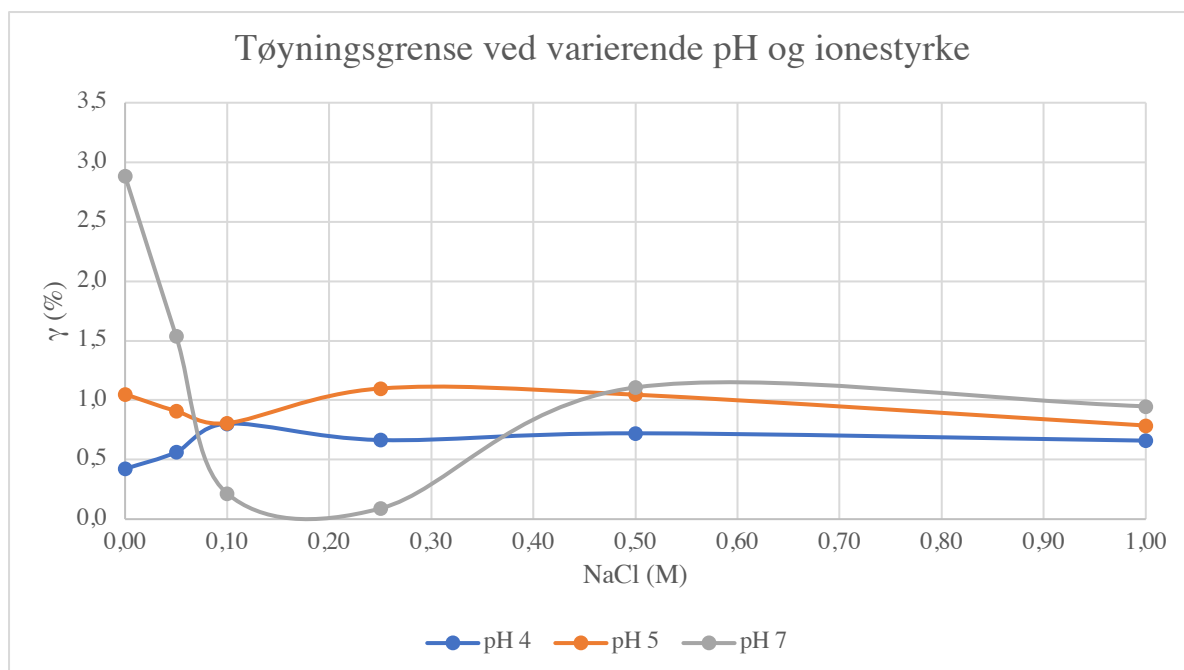
Gelstyrken var lavest ved alle ionestyrker i geler ved pH 7. Ved pH 4 og 5 påvirket endringen av ionestyrken gelstyrken i større grad enn ved pH 7. Sammenlignet med figur 22 som viser stivheten til gelene i de samme prøvene som figur 24, er det også her en positiv korrelasjon mellom stivhet og styrke på gelene. Ved lave ionestyrker (0-0.25 M NaCl) er stivheten og styrken høyest ved pH 5, men ved høyere ionestyrke enn 0.1 M NaCl er stivheten og gelstyrken høyest ved pH 4.

En annen måling på egenskapene til FBPF ved varierende pH, ionestyrke og konsentrasjon var å undersøke hvor mye gelen kunne strekkes før G' var redusert med 3 % som er den øvre grensen i det lineære viskoelastiske området. Tøyningsgrensen til geler ved varierende pH og konsentrasjon er vist i figur 25.



Figur 25. Tøyningsgrense ved 10 og 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende pH. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH og konsentrasjon. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 10.

Figur 25 viser at tøyningsgrensen minker med økende pH ved 10 % FBPF, men øker ved økende pH ved 15 % FBPF. Variasjonene er store så det er vanskelig å se en trend i tøyningsgrensen ved varierende pH og konsentrasjon. Figur 26 viser hvordan tøyningsgrensen ble påvirket av varierende ionestyrke ved pH 4, 5 og 7.

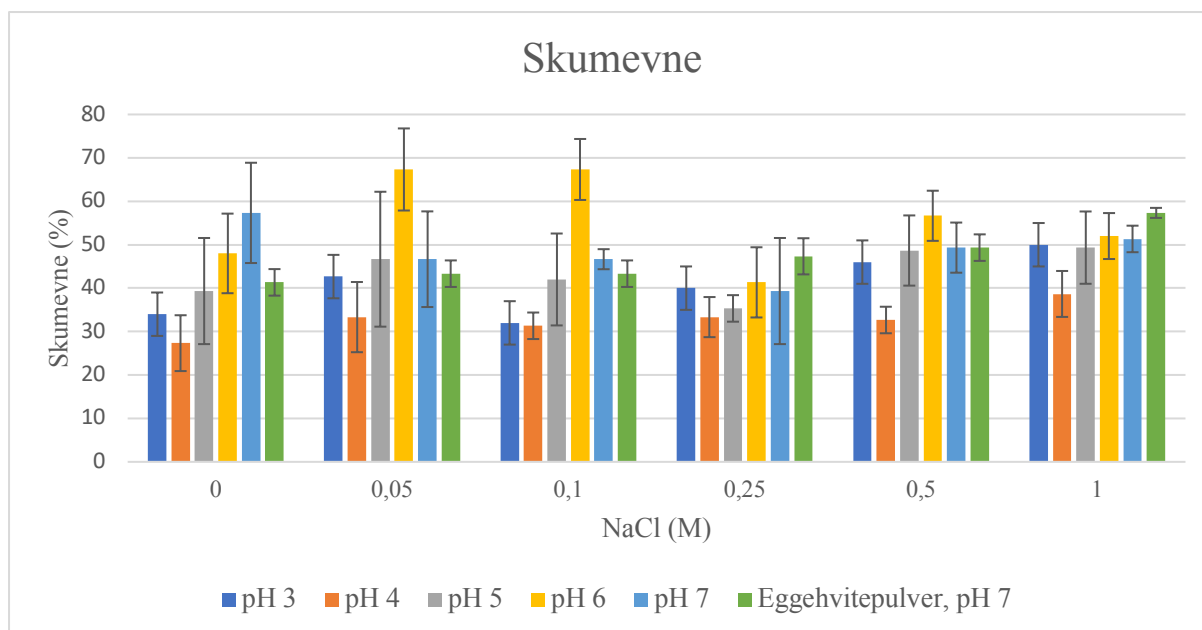


Figur 26. Gelstyrke ved 15 % konsentrasjon av FBPF ved varierende pH og ionestyrke. Hvert punkt baserer seg på en prøve som er undersøkt ved bestemt pH, konsentrasjon og ionestyrke. Tallmaterialet er vist i vedlegg 6, tabell 11.

Tøyningsgrensen ble mer påvirket av økende ionestyrke ved pH 7, enn ved pH 4 og 5, som figur 26 viser. Ved 0 M NaCl var tøyningsgrensen høyest ved pH 7, men ved samme pH-verdi var tøyningsgrensen lavest ved 0,1 og 0,25 M NaCl. Ved pH 5 ble det målt høyere tøyningsgrense ved alle ionestyrker sammenlignet med pH 4.

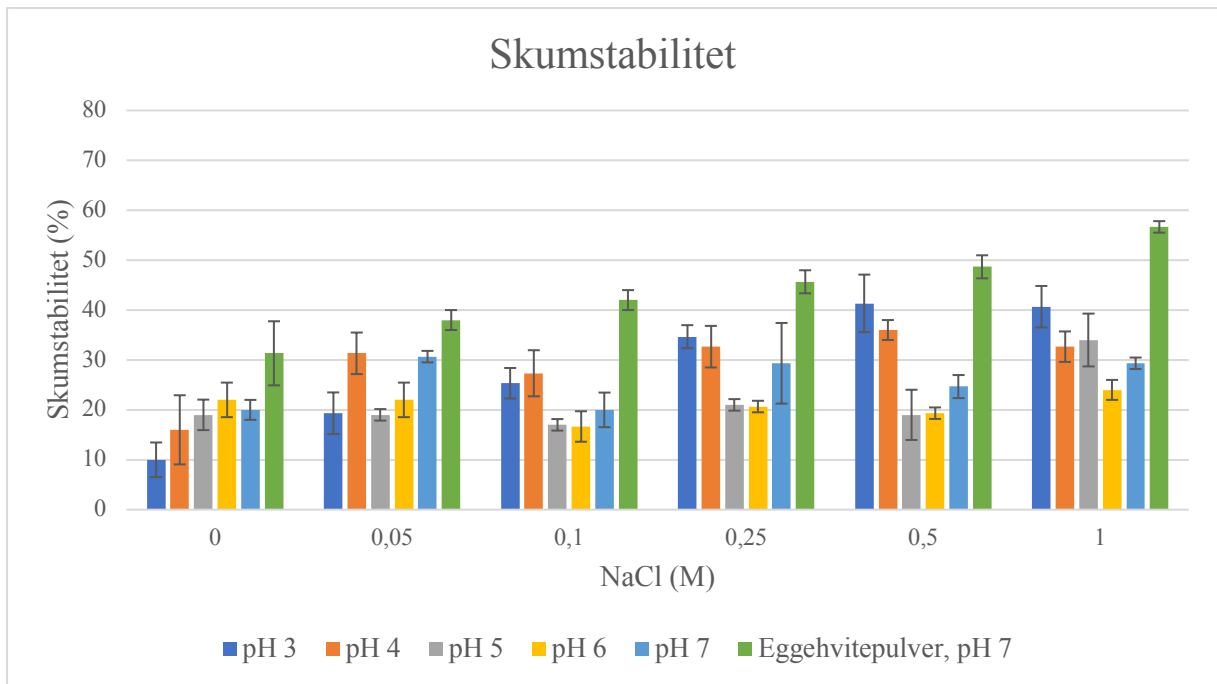
4.6 Skumdanningsevne og stabilitet

Skumdanningsevne og skumstabilitet ble undersøkt ved varierende pH og ionestyrke ved å vispe 2 % konsentrasjon av FBPF i sitronsyrebuffer. Skumdanningsevne ble beregnet rett etter visping, mens skumstabilitet ble beregnet 60 minutter etter visping. Produktet ble sammenliknet med sitronsyrebuffer med 1,55 % eggehvitpulver for at proteininnholdet skulle samsvare FBPF. Figur 23 viser skumdanningsevnen til produktet.



Figur 27. Skumdanningssevne til FBPF ved varierende pH og ionestyrke. Til sammenligning har det blitt benyttet et eggehvitpulver ved pH 7 med varierende ionestyrke. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller, \pm standardavvik for parallellene. Tallmaterialet er hentet fra vedlegg 7.

Som figur 27 viser, er det noe variasjon i skumevnen ved både varierende pH og ionestyrke av FBPF. Skumevnen er lavest ved pH 4 ved alle ionestyrker og høyest ved pH 6 og pH 7. Det ble ikke observert en tydelig økning eller reduksjon av skumevnen ved varierende ionestyrke. Resultatene viser at produktet og eggehvitpulveret har ganske lik skumevne ved pH 7 ved varierende ionestyrke. Standardavvikene var høyere fordi skumevnen i paralleller av prøvene varierte i stor grad ettersom det ble dannet noen store luftbobler i noen prøver som påvirket volumet. For å undersøke om prøvene var signifikante fra hverandre, ble resultatene plottet inn i RStudio og undersøkt ved hjelp av toveis ANOVA og Tukey's test. Resultatene viste tydelige signifikante forskjeller ($p < 0.001$) av både pH, ionestyrke og kombinasjonen av varierende pH og ionestyrke på skumdanningssevne. Resultatene over skumstabiliteten som ble undersøkt 60 minutter etter visping er vist i figur 28.



Figur 28. Skumstabilitet til FBPF ved varierende pH og ionestyrke. Til sammenligning har det blitt benyttet et eggehvitepulver ved pH 7 med varierende ionestyrke. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av tre paralleller, \pm standardavvik for parallellene. Tallmaterialet er hentet fra vedlegg 7.

Volumet av skum var tydelig redusert 60 minutter etter visping. Volumet var redusert ved alle pH-verdier og ionestyrker. Størst differanse var observert ved pH 6 og 7. Ved pH 4 var det minst reduksjon av skum. Eggehvitepulveret viste høyest skumstabilitet ved alle ionestyrker og var betydelig høyere enn prøvene med produkt ved pH 7. Ved pH 3 og pH 4 ble det observert en bedre skumstabilitet ved tilsetning av NaCl. For å undersøke om de ulike faktorene hadde signifikant påvirkning på produktet ble resultatene plottet inn i RStudio. Resultatene viste signifikante forskjeller ($p < 0.0001$) i skumstabilitet ved varierende pH, ionestyrke og kombinasjonen av varierende pH og ionestyrke.

5 Diskusjon

Målet for denne oppgaven var å undersøke ulike funksjonelle egenskaper i en proteinfraksjon av fababønner ved ulik pH og ionestyrke. Proteininnhold og aminosyresammensetning ble analysert, og de funksjonelle egenskapene løselighet, viskositet, gelegenskaper, skumevne og skumstabilitet ble undersøkt. Som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture var det også en del av oppgaven å evaluere ulike metoder som ble benyttet for å vurdere om disse kan bli brukt til senere analyser på tilsvarende planteproteiner i prosjektet.

5.1 Proteininnhold og aminosyresammensetning

Proteininnholdet (etter at IPN ble trukket fra) i FBPF ble analysert til å være 55,91 % ved mikro-Kjeldahl metoden. Det var forventet at produktet ville ha et proteininnhold som var likt proteininnholdet som var målt ved makro-Kjeldahl metoden. Ut ifra sammenligningen ved bruk av de ulike metodene for analyse av FBPF i figur 10, ble det målt noe lavere proteininnhold ved mikro-Kjeldahl metoden. Siden proteinfraksjonene er analysert med ulikt utstyr og metoder, kan derfor sammenlikningen være noe unøyaktig. For analyse av proteininnhold i ulike produkter, slik som proteinfraksjoner fra belgvekster og korn, er makro-Kjeldahl mest benyttet og er ansett for å være mest nøyaktig. Dette skyldes blant annet at det er mulig å benytte større prøvemengder noe som gir mer presise resultater når prøvematerialet er heterogent eller har et høyt innhold av protein. IPN i produktet ble målt til å være 9.3 % av det totale nitrogeninnholdet. I litteraturen rapporteres det varierende IPN-innhold i fababønner. Periago et al (1996) undersøkte IPN i ulike belgvekster ved ulike metoder og rapporterte at IPN-innholdet i fababønner var 26.02 % av TN (Periago et al., 1996). Bhatti (1974) rapporterte en varierende IPN prosentandel av TN i ulike sorter fababønner. Mellom 8-11 % av TN var beregnet som IPN ifølge rapporten (Bhatti, 1974), noe som stemmer godt overens med resultatene i dette forsøket. Metode som er benyttet for å undersøke IPN-innholdet i fababønner kan være hovedgrunnen til et at resultatene varierer i ulike forsøk. Fababønner av samme sort har blitt målt til å ha et høyere IPN-innhold ved ekstrahering med 70 % etanol + 30 % TCA sammenliknet med kun 70 % etanol eller 0.2 % NaOH og 30 % TCA (Periago et al., 1996). Andre faktorer som påvirker IPN-innholdet er sort og modningsstadiet (Ros & Rincón, 1990; Ros & Rincon, 1993; Singh & Jambunathan, 1981). Selv om ekstraksjonsmetode påvirker resultatene er det viktig å undersøke om IPN-innholdet er en betydelig del av TN eller ikke, slik at ikke proteininnholdet overestimeres. En overestimering av proteininnholdet oppstår når

proteininnholdet beregnes som lik TN. Det er vist i en rekke studier at proteininnholdet er lavere enn TN i belgvekster (Mosse, 1990; Sosulski & Holt, 1980; Wu et al., 1995).

Aminosyresammensetningen i FBPF ble analysert med sur- og basisk hydrolyse ved LabTek på IHA. Det var høyt innhold av aminosyrene glutamat, asparginsyre og arginin, og lavt innhold av tryptofan, cystein og metionin. Aminosyresammensetningen som ble analysert samsvarer med andre studier som undersøker aminosyreinnholdet i fababønner (Bhatty & Christison, 1984; Kaldy & Kasting, 1974; Marquardt et al., 1975; Nitsan, 1971; Shewry et al., 1981; Sosulski & Youngs, 1979). Proteininnholdet ved å summere innholdet av de ulike aminosyrene var 53.9 %, som er noe lavere enn ved mikro-Kjeldahl metoden som viste proteininnhold på 55.9 %. Disse resultatene viser at ulike metoder gir ulike resultater noe som støttes av forskning av ulike metoder for analyse av proteininnhold (Mæhre et al., 2018). Ved å regne ut proteininnholdet ved å summere aminosyrene kan gi noe lavere proteininnhold ettersom noen av aminosyrene kan ødelegges under analysen. Ved Kjeldahl metoden baseres utregningen av proteininnhold på en Kjeldahl-faktor som ofte er 6.25 siden proteiner i snitt inneholder 16 % nitrogen. Dette kan føre til at proteininnholdet estimeres til å være noe høyere eller lavere enn det som er tilfelle (Mæhre et al., 2018).

5.2 Proteinløselighet

For at et protein skal ha tilfredsstillende funksjonelle egenskaper som viskositet, løselighet, skum-, gel- og emulsjonsdanning er en høy proteinløselighet nødvendig. Proteinløseligheten av FBPF varierte ved både varierende pH og ionestyrke. Ved pH rundt det isoelektriske punktet til proteinene i fababønner påvirket ionestyrken løseligheten mer enn ved pH-verdier som var enten høyere eller lavere enn det isoelektriske punktet. Ved økende ionestyrke ble det generelt observert en økende løselighet ved alle pH-verdier.

Når proteinløselighet relateres til varierende pH vil de fleste næringsmiddelproteiner danne en U-formet kurve (Damodaran, 2008). Lavest proteinløselighet er å forvente ved proteinenes isoelektriske punkt. Når nettoladningen til proteinene er lik null, vil proteinene miste den elektrostatiske frastøtningen noe som fører til aggregering og utfelling. Hvis summen av asparginsyre og glutamat er høyere enn summen av lysin, arginin og histidin er proteinene «sure» (Damodaran, 2008). Dette er tilfelle for en stor del av næringsmiddelproteiner, inkludert FBPF (Damodaran, 2008). Sure proteiner har pI mellom pH 4 og pH 5. Resultatene viste lavest løselighet ved pH 4, etterfulgt av pH 3 og deretter pH 5 uten endring av ionestyrke. Det

isoelektriske punktet til proteinene i produktet kan derfor antas å være ved cirka pH 4. Tilsetning av FBPF i næringsmidler med pH på rundt 4 kan derfor gi reduserte funksjonelle egenskaper sammenlignet med bruk av produktet i næringsmidler med nøytral pH, spesielt dersom god løselighet er viktig. Belgvekster rapporteres til å ha pI mellom pH 4 og pH 5. (Boye et al., 2010; Kinsella, 1979; Ma et al., 2011; Raikos et al., 2014; Sreerama et al., 2012; Sridaran et al., 2012). Siden løseligheten øker ved pH-verdier langt fra pI, er det forventet at løseligheten av FBPF vil være enda høyere ved alkalisk pH. Dette ble ikke undersøkt da oppgavens hensikt var å undersøke proteinenes potensiale i næringsmidler og det er svært få av disse som har pH > 7.

Økende løselighet ved tilsetning av NaCl kan forklares ved "salting in and salting out" prinsippet (Kinsella, 1979). Det går ut på at ved tilsetning av lave konsentrasjoner salt, vil løseligheten av proteinene øke fordi Cl⁻ bindes til de positivt ladde aminosyresidegruppene, spesielt ved lav pH, og påvirker løseligheten ved å fremheve den elektrostatiske avstøtningen (Kinsella, 1979). Ved tilsetning av høye konsentrasjoner salt, øker hydrering av ionene på bekostning av proteinet. Dette fører til mindre hydrering av aminosyrene på proteinets overflate noe som fører til at proteinene danner interaksjoner med hverandre og felles ut. Løseligheten blir da redusert. Kinsella (1979) hevder at protein-vann-interaksjoner er størst og løseligheten er maksimal i soyabønner når pH er nøytral og ionestyrken er lav (< 0.1) eller lik null. Aluko & Yada (1995) undersøkte proteinløselighet av globulinisolater fra øyebønne ved varierende pH-verdi fra 3 – 8 og ionestyrke ved 0.5, 1, 1.5 og 2 M NaCl. Resultatene viste at ved økende pH påvirket ionestyrken løseligheten av proteinene i mindre grad. Artikkelen rapporterer også at proteinløseligheten var best ved høyest pH for alle ionestyrkene (Aluko & Yada, 1995). Lignende resultater ble også observert i denne oppgaven. Resultatene viste en relativt stabil proteinløselighet for pH 6 og 7 og en økning i løselighet ved pH 3, 4, 5 ved økende ionestyrke. Dette tyder på at saltkonsentrasjonene som ble tilsatt bufferløsningene var for lave for å salte ut proteinene. I næringsmidler vil ikke saltkonsentrasjonen være så høy at det dannes utfellinger av proteinene. Dette vil nok derfor ikke være en utfordring i næringsmiddelindustrien.

Proteinene i løsningene pH 3, 5 og 7 hadde en reduksjon av løselighet ved lav ionestyrke. Dette kan begrunnes med at siden ionestyrken er lav, nøytraliseres ladningene på overflaten av proteinene. For proteiner som består av mange ikke-polare områder, som planteproteiner, vil løseligheten reduseres (Damodaran, 2008). Damodaran (2008) hevder at dette fenomenet grovt sett kan observeres ved ionestyrke < 0.5 M. Resultatene fra metoden som ble benyttet for å undersøke løseligheten viser en økning av løselighet mellom 0.1 og 0.25 M NaCl. Årsaken til

dette kan være den ukjente ionestyrken til bufferen som ble benyttet. Det er derfor mest hensiktsmessig å sammenligne løseligheten basert på en økning i ionestyrke og pH og ikke trekke konklusjoner om ved nøyaktig hvilken ionestyrke som gir best løselighet ved en gitt pH.

Proteinløseligheten ved pH 3 og 4 ved varierende ionestyrke ble undersøkt ved mikro-Kjeldahl metoden i tillegg til Micro BCA Protein Assay Kit. Det ble observert en forskjell i proteinløseligheten ved de to metodene spesielt ved økende ionestyrke. En lavere løselighet ble observert ved mikro-Kjeldahl metoden. I instruksjonsheftet til Micro BCA Protein Assay Kit informeres det om at ionestyrke over 1 M NaCl i prøvene kan påvirke resultatene (ThermoFisher, 2015). Det ble ikke benyttet ionestyrke over 1 M NaCl, men den totale ionestyrken i prøvene er ukjent ettersom bufferens ionestyrke er ukjent. Det er derfor grunn til å tro at mikro-Kjeldahl metoden gir mer nøyaktige resultater i prøver ved høyere ionestyrke. Som figur 13 og 14 viser, så følger begge metodene samme trend i proteinløseligheten og det antas derfor at trendene av løseligheten kan brukes for å sammenligne prøver ved en bestemt ionestyrke, men med annen pH-verdi.

Proteinløseligheten ble også undersøkt ved SDS-PAGE for å undersøke om ulike proteiner løste seg opp ved økende ionestyrke. Gelen med prøver av pH 3 ved ulik ionestyrke var vanskelig å separere på grunn av lav pH som resulterte i uklare bånd. Siden pH i prøven ble justert ble konsentrasjonen lavere, noe som resulterte i svakere bånd som kan være vanskelig å tyde. Likevel kan det observeres en endring i proteinbånd mellom 25 og 30 kDa fra ionestyrke 0.25-0.5 M NaCl. Denne proteinløselighetsendringen ble observert ved alle pH-verdier. Selv om det ikke ble utført videre undersøkelser på hvilke proteiner som var best løselige ved varierende pH eller ionestyrke, er det grunn til å tro at det er proteiner av typen globuliner som øker i løselighet. Globuliner er de mest dominerende proteinene i belgvekster og er løselige i svake saltkonsentrasjoner (Day, 2013; El Fiel et al., 2002). Siden proteinkonsentrasjonen varierer på gelene ved ulik pH, kan ikke gelene med varierende pH sammenlignes. Det kan derfor ikke trekkes konklusjoner om hvilke proteiner som er løselige ved hvilken pH. Resultatene i SDS-PAGE, Micro BCA Assay og mikro-Kjeldahl metoden viser like trender i forhold til proteinløselighet. Gelene i SDS-PAGE viser tydelig hvordan proteinløseligheten øker ved økende ionestyrke for pH 4 og pH 5 ved at proteinbåndene blir tydeligere. Dette støtter opp resultatene ved Micro BCA Assay og mikro-Kjeldahl. Det har ikke blitt funnet noen artikler med SDS-PAGE-resultater av fababønneproteiner som kan sammenlignes med resultatene i

denne oppgaven og det er derfor vanskelig å trekke noen videre konklusjoner om akkurat hvilke proteiner som er løselige.

5.3 Viskoelastiske egenskaper

Når prøvene ble utsatt for viskositetsmålinger på nytt, ble prøvene målt til å være litt mindre viskøs. Dette kjennetegner en skjærtynnende (tixotropisk) væske. Når prøvene blir målt flere ganger husker prøven at det har blitt utført kraft på den. Siden viskositeten bare var noe redusert etter hver viskositetsmåling, kan prøvene klassifiseres som svakt tixotropiske (Steffe, 1996). Viskositeten var høyest i prøvene med 15 % FBPF ved alle pH-verdier sammenlignet med 10 % konsentrasjon av FBPF. Disse resultatene samsvarer med teorien om at økende konsentrasjon av makromolekyler vil øke viskositeten (Damodaran, 2008). Ved økende pH ble det også observert høyere viskositet i prøvene med 10 % FBPF. Årsaken til dette kan være den økende løseligheten ved økende pH-verdi fra pH 4 noe som fører til at proteinene foldes ut og binder bedre til vannmolekylene. Dette vil gi en økning av viskositet i prøvene. En annen mulig forklaring kan være at 0.2 M Na_2HPO_4 har en høyere viskositet enn 0.1 M sitronsyre. Siden bufferen som ble benyttet som løsningsmiddel består av ulike forhold av syre og base vil det være en økende mengde 0.2 M Na_2HPO_4 med økende pH-verdi. En like tydelig viskositetsøkning i prøvene med 15 % konsentrasjon sammenlignet med 10 % konsentrasjon ble ikke observert. Ved økende pH-verdi varierte viskositeten der pH 5 og pH 7 viste høyest viskositet etterfulgt av pH 3 og pH 6. Lavest viskositet ble observert for prøven ved pH 4. Dette kan forklares med at siden viskositeten øker ved tilsetning av molekyler med høy molekylvekt og som har høy løselighet, vil viskositeten være lavere ved proteinenes pI. Hvis resultatene sammenlignes med løselighetsanalysen i figur 12, var det forventet at viskositeten var høyest ved alle ionestyrker ved pH 7, og at viskositeten økte ved pH 5 fra 0.25 M NaCl. Dette var ikke tilfelle. En mulig påvirkning av resultatene kan være saltsyren som ble tilsatt prøvene for å holde pH så konstant som mulig. For at ikke konsentrasjonen av FBPF og NaCl ble endret for mye ble det brukt 5 M HCl. Tilsetning av syre kan føre til at proteinene koagulerer og felles ut. Dette er for eksempel en del av prosessen ved produksjon av tofu som kan lages av fababønner. Koaguleringen fører til en reduksjon av fordelingen av produktet i prøven, og prøven kan bli noe mindre viskøs siden proteinene felles ut og synker nederst i prøven, eller mer viskøs hvis de koagulerte proteinene blir en del av prøvematerialet i reometeret. Prøvene ble observert homogene før målinger på reometer, men siden analysen er mer sensitiv enn det blottet øyet kan HCl ha hatt mer innvirkning på viskositetsmålingene. Dette kan være en mulig forklaring for at det ikke ble observert en tydelig økning av viskositet i prøvene med 15 % FBPF ved

økende pH og ved de ulike ionestyrkene. Prøvene som ble tilsatt HCl var ved pH 3, pH 4 og pH 5. Prøvene ved pH 6 og pH 7 ble ikke tilsatt HCl, men tilsvarende mengde buffer ble tilsatt for at alle prøvene hadde lik konsentrasjon. For å gjøre mer nøyaktige undersøkelser på viskositetsegenskapene til FBPF ville det vært mer hensiktsmessig å måle viskositeten av prøvebufferen ved varierende pH og ionestyrke uten tilsetning av produktet for å undersøke om viskositeten endres ved enten pH eller ved tilsetning av NaCl og i hvilken grad.

Geldanningsegenskapene til proteiner påvirkes av proteinkonsentrasjon, ionestyrke, pH og interaksjoner med andre komponenter (Yasuda et al., 1986). I denne analysen ble egenskapene til FBPF undersøkt ved to ulike konsentrasjoner, varierende pH og varierende ionestyrke for utvalgte pH-verdier. For å danne gel ble prøvene varmet opp for, før de ble nedkjølt igjen. Når pro-gel blir avkjølt til lavere temperatur reduseres den termiske kinetiske energien som fører til stabile ikke-kovalente bindinger mellom ulike funksjonelle grupper på makromolekylene i produktet (Damodaran, 2008). Dette fører til en gel som består av hydrogenbindinger, og hydrofobe og elektrostatiske interaksjoner. For alle pH-verdier var stivheten og gelstyrken høyest for geler ved 15 % konsentrasjon FBPF fremfor ved 10 % konsentrasjon. Siden det er flere makromolekyler som er involvert i gel formasjonen ved 15 % FBPF, var det forventet at stivheten og styrken på gelen øker med økende konsentrasjon. Det ble ikke dannet gel av prøven med 10 % FBPF ved pH 7. Samme resultat har blitt observert for proteinkonsentrater av mucuna bønne og ertebønner (Adebowale & Lawal, 2003; Akintayo et al., 1999). I studiene ble det vist at mindre proteinkonsentrasjon var nødvendig for geldanning ved lavere pH-verdier nær det isoelektriske punktet sammenlignet med høyere pH-verdi som ved pH 7 og 8. Raikos et al (2014) sammenlignet egenskapene i ulike vegetabiliske proteinkilder ved å finne lavest konsentrasjon for gelling ved varierende pH (4, 7 og 10). Resultatene viste at hvete, grønne erter, bokhvete og fababønner var bedre geldannere enn lupin og hemp (Raikos et al., 2014). Resultatene viste at de fleste planteproteiner danner gel ved konsentrasjon mellom 10 og 14 %. Når ulike produkter skal undersøkes for funksjonelle egenskaper, som ved geldanning, er det viktig å tenke på de andre komponentene i produktet og ikke bare proteinene. Geldanning påvirkes også av andre makromolekyler som polysakkarider og lipider (Sathe et al., 1982). Karbohydrater har blitt rapportert å redusere den termodynamiske affiniteten av proteiner for vannmolekyler og øker samspillet mellom protein-vann-interaksjoner noe som øker geldanningsevnen (Adebowale & Adebowale, 2007).

I Figur 22, som viser hvordan stivheten på gelene blir påvirket av varierende ionestyrke, ser det ikke ut til at tilsetning av NaCl har noen like mye påvirkning på gelenes stivhet som endring av pH. Ved økende tilsetning av NaCl, minker stivheten ved pH 5 og 7 noe. Grunnen til dette kan være nøytralisering av ladninger på proteinene som oppstår mellom saltioner og de ladde aminosyrene. Dette fører til færre elektrostatiske interaksjoner med nærliggende proteinkjeder som gjør at gelnettverket blir svakere. Som et resultat av dette vil gelstyrken være svakere siden hydrogen- og ionebindinger blir svakere (Akintayo et al., 1999; Catsimpooulas & Meyer, 1971). Liknende resultater har blitt observert for proteinkonsentrater av ertebønner (Akintayo et al., 1999). I geler ved pH 4 var det vist motsatt effekt ved tilsetning av NaCl. Økende ionestyrke resulterte i at gelene fikk en økning av stivhet på gelene. Siden pH 4 er nær det isoelektriske punkt til fababønner, er nettoladning på proteinene nær null. Ved tilsetning av NaCl, vil derfor ladningene bli flere og elektrostatiske interaksjoner øker. Dette fører til stivere gel ved økning av ionestyrke. Stivheten og gelstyrken ble mer påvirket av endring av pH enn endring av ionestyrke. Damodaran (2008) hevder at hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner påvirker gelegenskaper i større grad enn elektrostatiske interaksjoner, bortsett fra tilsetning av flerverdige ioner som danner kryssbindinger. Ladde proteingrupper er viktig i gel formasjonen for protein-vann-interaksjoner og for vannholdingskapasiteten i gelen (Damodaran, 2008).

Da gelstyrken ble målt i gelene fortsatte G' å øke i mange av prøvene. Dette betyr at gelene ikke var i steady state da styrken på gelen skulle måles. Det ble derfor observert en økning av G' i starten av mange prøver før G' ble redusert igjen. Siden økende skjærstress ble påført for å analysere gelen mens G' økte, er det grunn til å anta at G'_{max} i gelene ble målt til å være noe lavere enn det som ville vært tilfellet hvis gelstyrken ble målt i geler ved steady state. Da ville G'_{max} vært den første målingen som ble utført før skjærstress ble påført. At gelene ikke var i steady state da analysen ble utført kan på en måte bli sett på som en feilkilde fordi stivheten og styrken til gelene blir noe lavere enn det som egentlig er tilfelle. Samtidig var hensikten å undersøke stivhet på gelene i ulike prøver i et likt analyseoppsett. At geler da ikke hadde nådd «steady state», er en del av resultatene.

Måling av tøyningsgrensen til gelene ved 10 % og 15 % FBPF ga uklare resultater. Ved 10 % konsentrasjon av FBPF ble tøyningsgrensen redusert ved økende pH, mens det motsatt ble observert i gelene med 15 % FBPF. Variasjonen av reduksjonen og økningen av tøyningsgrensen ved økende pH var stor, så det er vanskelig å se en tydelig trend av disse resultatene. Tøyningsgrensen ved varierende ionestyrke ble mer påvirket i gelene ved pH 7 ved

økende ionestyrke sammenlignet med økende ionestyrke i gelen ved pH 4 og 5. Ved analyser av geleegenskapene til FBPF ble det kun utført målinger på en prøve ved bestemt pH, konsentrasjon og ionestyrke. Resultatene i disse undersøkelsene kan derfor være endres om forsøket gjennomføres flere ganger. Grunnen til at det ikke ble utført flere gjentak på måling av geldanningsegenskaper var fordi prøveprepareringen og geldanning var tidskrevende. Det ble derfor bestemt at undersøkelser på flere ulike geler ved varierende konsentrasjon, pH og ionestyrke var mer av interesse for å få et overblikk over geleegenskaper og undersøke om det var noen interessante resultater som skilte seg ut og som kan bli undersøkt videre ved senere anledninger. Det andre alternativet ville vært å undersøke geleegenskaper ved færre pH-verdier og ionestyrke, men heller gjøre flere paralleller. Dette ville gitt mer nøyaktige resultater, men den generelle oversikten over utviklingen av geleegenskaper ved et bredere spekter av pH og ionestyrke ville blitt utelatt.

5.4 Skumdanning og stabilitet

Skumevnen var høyest ved pH 6 og 7, og lavest ved pH 4. Som nevnt tidligere påvirkes de funksjonelle egenskapene av løseligheten av proteinene. På grunn av produktets isoelektriske punkt ved pH 4 er proteinene aggregert med hverandre og vanskeligere å løse opp. Dette fører til at de har en redusert adsorpsjon til grenseoverflaten mellom luft og vann og utfolder seg i mindre grad (Were et al., 1997). Dette fører igjen til at proteinene ikke tilpasser proteinstrukturen etter grenseoverflaten slik at hydrofile områder på proteinene danner interaksjoner med vannfasen og hydrofobe områder danner interaksjoner med luftfasen slik at skum dannes. Ved pH fra det isoelektriske punkt frastøtes proteinene fra hverandre i løsningen slik at det lettere dannes skum ved at proteinene adsorberes til grenseflaten, utfolder seg og reorienterer seg i større grad. Arogundade et al (2006) har også undersøkt skumevnen til fababønner ved varierende pH (2, 4, 7, 10 og 12) og ionestyrke (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1 og 2 M NaCl). Det ble rapportert lavest skumevne ved pH 4 og høyest skumevne ved pH 12 og resultatene viste også at skumevnen var signifikant forskjellig ($p < 0.05$) ved økende ionestyrke for pH 4 (Arogundade et al., 2006). Fernandez-Quintela et al (1997) rapporterte at et fababønneisolat (ekstrahert ved IEP) hadde lavere skumevne (15%) enn et soyabønneisolat. Skumstabiliteten til fababønneisolatet var også lavere enn soyabønneisolatet (Fernández-Quintela et al., 1997).

En lav skumstabilitet ble observert for produktet ved alle pH-verdier og ionestyrker. Lignende skumstabilitet er rapportert av Raikos et al (2014) for fababønner. I forsøket ble det undersøkt

skumevne og stabilitet ved pH 4, 7 og 10 for ulike mel av vegetabiler. Grønne erter og bokhvete ble rapportert til å ha betydelig bedre skumstabilitet enn fababønner (Raikos et al., 2014). Reduksjonen av skumvolumet mellom 0 og 60 minutter til produktet var lavest ved pH 4 for alle ionestyrker etterfulgt ved pH 3. Sammenlignet med forsøket som ble utført for å undersøke løselighet, var løseligheten lavest ved pH 3 og pH 4. Lignende resultater ble rapportert av Arogundade et al (2016) der fababønneproteinisolat ved pH 4 ble rapportert til å ha høyest skumstabilitet sammenlignet med pH 2, 10 og 12. Studier av Aluko & Yada (1995) viser også at skumstabilitet er mest stabilt ved proteinenes isoelektriske punkt (Aluko & Yada, 1995). Når nettoladningen er lik null blir frastøtende interaksjoner mellom proteinene redusert og protein-proteininteraksjoner dannes i de molekylære lagene ved grenseoverflaten mellom vann og luft, også kalt lamellene.

I drikkevarer og mange desserter tilsettes eggehvite for å gi næringsmiddelet skumegenskaper. For å undersøke om fababønner kan ha tilsvarende egenskaper var det derfor interessant å danne skum med eggehvitepulver under samme betingelser som FBPF. Skumevnen til eggehviteprotein ble målt til å være ganske lik som produktets skumevne ved samme pH-verdi, 7, og ionestyrke. Det ble observert større luftbobler i skummet av FBPF enn ved skummet som ble dannet av eggehviten som bestod av mange små luftbobler. De små luftboblene er mer stabile siden lamellene er tykkere og sterkere noe som resulterte i at eggehvitepulveret hadde en høy skumstabilitet.

Proteinkonsentrasjonen påvirker skumegenskaper i stor grad. I noen proteiner, som serum albumin, er det kun nødvendig med 1 % proteinkonsentrasjon for å danne stabilt skum (Damodaran, 2008). Generelt for de fleste proteiner kreves det minimum 2-5 % proteinkonsentrasjon for å danne et relativt stabilt skum. Ved å ha en større proteinkonsentrasjon i prøveløsningene ville skumevnen og skumstabiliteten vært større, men for å undersøke hvorvidt skumegenskapene påvirkes av pH og ionestyrke er det viktigste å opprettholde samme konsentrasjon for alle prøver.

Hvordan skumegenskaper endres ved tilsetting av salt påvirkes av type salt som blir benyttet og løselighetsegenskapene til proteinene i løsningen. Skumevnen og skumstabiliteten i løsninger med mange globulære proteiner øker ved økende innhold av NaCl (Damodaran, 2008). Siden globuliner er saltløselige var det forventet at skumevnen økte ved økende ionestyrke. Det ble ikke observert en tydelig økning, men en forklaring på dette kan være at en

høyere saltkonsentrasjon ville vist en tydelig endring av skumevnen og at det ble benyttet for lave saltkonsentrasjoner i dette forsøket.

En faktor som spiller inn på skumevnen og skumstabiliteten er fettinnholdet som er i produktet. Lipider er mer overflateaktive enn proteiner og vil adsorbere til grenseoverflaten mellom luft og vannfasen raskere enn proteiner (Damodaran, 2008). Dette hindrer proteinene i å komme i kontakt med luftfasen, noe som fører til at skumevnen reduseres. Produktet består av 2-3 % fett og det antas at fett ikke påvirker skumevnen og stabiliteten i veldig stor grad. Damodaran (2008) hevder en fettkonsentrasjon som er >0.5 % vil påvirke skumegenskapene i stor grad, men dette er ikke tilfelle i prøveløsningene som ble benyttet i forsøket.

Resultater av skumevne og skumstabilitet påvirkes i stor grad av utstyret som er benyttet i forsøket. Miksere kan gi veldig varierende resultater på grunn av oppbygging, type visp og hastighet og hvor fort den øker i temperatur. Annet utstyr, som for eksempel diameter av begerglass, påvirker også i stor grad resultatene. Selv om forsøket tok hensyn til dette og også hvordan mikseren ble holdt da vispingen ble utført, var de ulike parallellene noe ulike. På grunn av varierende størrelse på luftbobler ble det observert en høy skumevne i noen prøver og en lav skumevne i andre prøver med mange små luftbobler i stedet for noen store luftbobler. Standardavviket var derfor høyt for skumevne. De store luftbobler var ustabile og kollapset i løpet av 60 minutter. Parallellene ved skumstabilitet ga derfor mer nøyaktige resultater. Et lavere standardavvik var derfor tilfelle ved resultatene til skumstabilitet siden de store luftboblene hadde kollapset.

6 Konklusjon

I denne oppgaven ble egenskaper i en proteinfraksjon av fababønner undersøkt. Partikkelstørrelse, proteininnhold og aminosyresammensetning ble analysert, og det ble utført målinger på utvalgte funksjonelle egenskaper. Proteinløselighet, viskositet, gel- og skumdanning ble undersøkt ved endringer av pH og ionestyrke.

Proteininnholdet i proteinfraksjonen av fababønner var 59 % og aminosyresammensetningen var av passende innhold essensielle aminosyrer, men inneholdt mindre mengder av tryptofan og de svovelholdige aminosyrene metionin og cystein. Partikkelstørrelsen i FBPF var lav, noe som optimaliserer interaksjoner mellom proteinene i partiklene og løsningsmiddelet. Endring av pH og ionestyrke påvirket FBPF i proteinløselighetstester. Proteinløseligheten var på rundt 80 % ved nøytral pH ved alle ionestyrker, men varierte fra 14-67 % ved pH nær pI ved økende ionestyrke. Ionestyrken påvirket løseligheten mer i prøver ved pH nær pI der løseligheten økte ved økende ionestyrke. FBPF viste lavest løselighet ved pH 4 uten endring av ionestyrke. SDS-PAGE viste at løseligheten av ulike proteiner varierte både ved varierende pH og ionestyrke. Ved økende konsentrasjon av FBPF økte også viskositeten ved alle pH-verdier. Det ble også observert en økende viskositet ved økende pH-verdi i prøvene med 10 % konsentrasjon FBPF. Grunnen til dette kan være proteinenes økende løselighet ved økende pH eller at viskositeten på prøvebufferen som ble benyttet var mer viskøs ved høyere pH-verdi. Gelstyrken og stivheten på gelene var også sterkere i prøvene med høyere konsentrasjon av FBPF. Stivheten og styrken var lavest ved nøytral pH, og sterkest ved pH nær pI. FBPF hadde god skumevne, men en redusert skumstabilitet sammenlignet med eggehvitepulver. Skumevnen var størst ved pH-verdier fra pI, mens skummet var mer stabilt ved produktets pI.

Proteinfraksjonen av fababønner er en interessant ingrediens til produksjon av ulike plantebaserte produkter fordi proteininnholdet er høyt og prosesseringen fra hele fababønner til proteinfraksjonen er billig, enkel og energibesparende, og prosessen foregår helt uten bruk av kjemiske stoffer. Kostholdet i spesielt vestlige land må baseres i større grad på planteproteiner fremfor animalske proteiner hvis matproduksjonen skal bli mer bærekraftig. Befolkningen i verden øker, og for å oppnå matsikkerhet, må matindustrien tenke innovativt med fokus på bærekraftighet.

7 Til ettertanke og videre forskning

7.1 Til ettertanke

Utfordringen ved å undersøke funksjonelle egenskaper med varierende pH og ionestyrke er å holde disse parameterne konstant. Etter tilsetning av en bestemt konsentrasjon av produktet ble pH-verdien i prøvene endret. For å hindre denne pH-ændring ble det besluttet å endre pH-verdien med HCl og NaCl. Som et resultat av dette ble både konsentrasjonen av produktet og ionestyrken noe endret. Resultatene fra de ulike forsøkene som undersøker produktets løselighet-, skum-, viskositet- og gelegenskaper kan derfor ha blitt noe påvirket av dette. Det er derfor viktig ved slike forsøk å definere forsøksoppsettet og hvordan slike utfordringer er håndtert. Å bruke tid på å lage en god prosedyre for å holde både konsentrasjon, pH og ionestyrke konstant er derfor fordelaktig for å få nøyaktige resultater.

Ved undersøkelse av funksjonelle egenskaper er det ikke bare proteinene i produktet som påvirker resultatene. Spesielt ved undersøkelse av skum-, gel- og viskositetsegenskaper vil resultatene bli noe påvirket av fett og stivelse som er i produktet. Det er derfor viktig å kjenne til produktene som skal undersøkes for å ta hensyn til andre makromolekyler som kan påvirke resultatene. Det er også viktig å definere ekstraheringsmetode som er benyttet for å øke innholdet av proteiner. Hvilken behandlingsmetode proteinene er utsatt for påvirker egenskapene i stor grad (Schutyser & van der Goot, 2011).

Ved bruk av lignende forsøk for å undersøke funksjonelle egenskaper i andre planteproteiner kan det være hensiktsmessig å bruke en standard for hvert forsøk for å evaluere om resultatene virker gunstige. En standard som kan benyttes er for eksempel soyaproteiner som er mye forsket på og som vil reagere relativt likt med andre proteiner i ulike forsøk. Ettersom løselighetsresultatene varierte ved bruk av Micro BCA Protein Assay kit og mikro-Kjeldahl-metoden hadde det vært hensiktsmessig med en standard å sammenligne resultatene med for å kunne evaluere hvorvidt en god metode er benyttet eller ikke for å oppnå nøyaktige resultater.

7.2 Videre forskning

Forskningsprosjektet FoodProFuture er fortsatt i startfasen når det gjelder å karakterisere og undersøke utnyttelse av norske proteinrike vekster. Videre forskning på proteinfraksjonen som er benyttet i denne oppgaven vil være å sammenligne de funksjonelle egenskapene med andre proteinfraksjoner av norske proteinvekster. Det hadde også vært interessant å sammenligne de funksjonelle egenskapene i produktet med og uten varmebehandling. Siden de fleste næringsmidler blir varmebehandlet er det gunstig å vite hvordan proteinfraksjonens egenskaper endres ved å bli utsatt ved høyere temperatur. Videre undersøkelser på proteinsepareringen ville også vært interessant å studere. Det ble observert ulik løselighet ved varierende pH og ionestyrke i produktet, men identifisering av de løselige proteinene på gelene ble ikke utført. Hvilke proteiner som var løselig i FBPF og hvor mye av FBPF som var løselig i de ulike prøvene ville vært interessant å få mer informasjon om slik at ved å tilpasse pH og ionestyrke kan egenskapene til ønskede proteiner benyttes.

Parallelt med denne oppgaven har det blitt undersøkt hvordan proteinfraksjonen vil påvirke egenskapene i ulike næringsmidler i regi av FoodProFuture. Ved tilsetning av produktet i pasta, brød og snacks kan produktene få en mer gunstig aminosyresammensetning og et høyere proteininnhold. Hvordan de funksjonelle og sensoriske egenskapene endres ved tilsetning av proteinfraksjonen i ulike mengder blir påvirket av næringsmiddelets andre ingredienser og produksjonsmetode er derfor meget interessant. Å sammenligne disse resultatene med oppgaven blir interessant for å videre kunne vurdere muligheten for å benytte proteinfraksjonen i næringsmidler som kan få suksess på markedet. Proteinfraksjonens høye innhold av tanniner og antinæringsstoffer som påvirker smak og opptak av næringsstoffer er også gunstig å kartlegge for å undersøke hvordan gode og ernæringsmessig mat kan lages. Dette er også en del av kunnskapsplattformen som skal utformes av FoodProFuture.

8 Litteraturliste

- Adebowale, K. & Lawal, O. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food chemistry*, 83 (2): 237-246.
- Adebowale, Y. A. & Adebowale, K. O. (2007). Evaluation of the gelation characteristics of mucuna bean flour and protein isolate. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*, 6 (8): 2243-2262.
- Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (2-3): 112-120. doi: 10.1016/j.tifs.2010.04.005.
- Akintayo, E., Oshodi, A. & Esuoso, K. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66 (1): 51-56.
- Alamanou, S. & Doxastakis, G. (1997). Effect of wet extraction methods on the emulsifying and foaming properties of lupin seed protein isolates (*Lupinus albus ssp. Graecus*). *Food Hydrocolloids*, 11 (4): 409-413. doi: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(97\)80038-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(97)80038-0).
- 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.
- Aluko, R. & Yada, R. (1995). Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53 (3): 259-265.
- Arogundade, L. A., Tshay, M., Shumey, D. & Manazie, S. (2006). Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba L.*) protein concentrate. *Food hydrocolloids*, 20 (8): 1124-1134.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O. & Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *Int J Mol Sci*, 11 (12): 4973-90. doi: 10.3390/ijms11124973.
- Bhatty, R. (1974). Chemical composition of some faba bean cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 54 (2): 413-421.
- Bhatty, R. & Christison, G. (1984). Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum L.*), faba bean (*Vicia faba L. spp. minor*) and lentil (*Lens culinaris Medik.*) meals, protein concentrates and isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 34 (1): 41-51.
- Boye, J., Zare, F. & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2): 414-431. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.003.
- Carbonaro, M., Maselli, P. & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76: 19-30.
- Catsimpoolas, N. & Meyer, E. (1971). Gelation phenomena of soybean globulins. II. Protein-water miscible solvent interactions. *Cereal chemistry*.
- Damodaran, S. (2008). *Amino acids, peptides and proteins*. Fennema's food chemistry, 4.
- 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: 10.1016/j.tifs.2013.05.005.
- De Boer, J. & Aiking, H. (2011). On the merits of plant-based proteins for global food security: Marrying macro and micro perspectives. *Ecological Economics*, 70 (7): 1259-1265.
- Duc, G. (1997). Faba bean (*Vicia faba L.*). *Field Crops Research*, 53 (1-3): 99-109.

- Duc, G., Marget, P., Esnault, R., Le Guen, J. & Bastianelli, D. (1999). Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*): Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. *The Journal of Agricultural Science*, 133 (2): 185-196.
- El Fiel, H. E. A., El Tinay, A. H. & Elsheikh, E. A. E. (2002). Effect of nutritional status of faba bean (*Vicia faba L.*) on protein solubility profiles. *Food Chemistry*, 76 (2): 219-223. doi: 10.1016/s0308-8146(00)00314-9.
- Fernández-Quintela, A., Macarulla, M., Del Barrio, A. & Martínez, J. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51 (4): 331-341.
- Ibarz, A. & Barbosa-Canovas, G. V. (2003). *Rheology of Food Products*. Unit operations in food engineering: Crc Press.
- Kaldy, M. & Kasting, R. (1974). Amino acid composition and protein quality of eight faba bean cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 54 (4): 869-871.
- Karaca, A. C., Low, N. & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44 (9): 2742-2750. doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.012.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56 (3): 242-258.
- Korsæth, A. & Roer, A.-G. (2016). Livsløpsanalyse (LCA) av dyrking av erter og åkerbønner i Norge. *NIBIO Rapport*.
- Laboratories, B.-R. (2011). Mini-PROTEAN®Precast Gels Instruction Manual and Application Guide. Tilgjengelig fra: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1658100.pdf (lest 15.03.2018).
- Ma, Z., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S. O., Monpetit, D. & Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Research International*, 44 (8): 2534-2544.
- Marquardt, R., McKirdy, J., Ward, T. & Campbell, L. (1975). Amino acid, hemagglutinin and trypsin inhibitor levels, and proximate analyses of faba beans (*Vicia faba*) and faba bean fractions. *Canadian Journal of Animal Science*, 55 (3): 421-429.
- Martensson, P. (1980). Variation in legumin: vicilin ratio between and within cultivars of *Vicia faba L. var. minor*. *Vicia faba: feeding value, processing and viruses*. Proceedings of a seminar in the EEC Programme of Coordination of Research on the Improvement of the Production of Plant Proteins, held at Cambridge, England, June 27-29, 1979.: Martinus Nijhoff. World crops: production, utilization and description, volume 3.
- Matvaretabellen. (2017). Tilgjengelig fra: <http://www.matvaretabellen.no/> (lest 01.05.2018).
- Merck. (2018). Buffer Reference Center. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html#citric> (lest 10.01.2018).
- Mosse, J. (1990). Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (1): 18-24.
- Multari, S., Stewart, D. & Russell, W. R. (2015). Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (5): 511-522. doi: 10.1111/1541-4337.12146.
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.-J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, 7 (1): 5.

- Nelson, G. C., Rosegrant, M. W., Koo, J., Robertson, R., Sulser, T., Zhu, T., Ringler, C., Msangi, S., Palazzo, A. & Batka, M. (2009). Climate change: Impact on agriculture and costs of adaptation, b. 21: Intl Food Policy Res Inst.
- Nitsan, Z. (1971). *Vicia faba* beans vs. soyabean meal as a source of protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22 (5): 252-255.
- Pál, G. (2013). Electrophoresis. Introduction to Practical Biochemistry, ELTE Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology: 94-119.
- Patterson, C., Maskus, H. & Bassett, C. (2010). Fortifying foods with pulses. *Cereal Foods World*, 55 (2): 56-62.
- Paulis, J. W. (1982). Recent developments in corn protein research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30 (1): 14-20. doi: 10.1021/jf00109a003.
- Pelgrom, P. J., Vissers, A. M., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. (2013). Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. *Food research international*, 53 (1): 232-239.
- Periago, M., Ros, G., Martínez, C. & Rincón, F. (1996). Variations of non-protein nitrogen in six Spanish legumes according to the extraction method used. *Food research international*, 29 (5-6): 489-494.
- Persson, J.-Å., Wennerholm, M., O'Halloran, S. (2008). Handbook for Kjeldahl digestion. DK-3400 Hilleroed, Denmark: FOSS.
- Raikos, V., Neacsu, M., Russell, W. & Duthie, G. (2014). Comparative study of the functional properties of lupin, green pea, fava bean, hemp, and buckwheat flours as affected by pH. *Food Sci Nutr*, 2 (6): 802-10. doi: 10.1002/fsn3.143.
- Ray, H. & Georges, F. (2010). A genomic approach to nutritional, pharmacological and genetic issues of faba bean (*Vicia faba*): prospects for genetic modifications. *GM crops*, 1 (2): 99-106.
- Ros, G. & Rincón, F. (1990). Indices of quality and maturity for different commercial sizes of pea seed for canning. *Food Chemistry*, 38 (1): 1-10.
- Ros, G. & Rincon, F. (1993). Changes in some constituents of pea seed during commercial canning. *Plant foods for human nutrition*, 43 (3): 233-240.
- Sathe, S., Deshpande, S. & Salunkhe, D. (1982). Functional properties of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] proteins. *Journal of Food Science*, 47 (2): 503-509.
- Schutyser, M. A. I. & van der Goot, A. J. (2011). The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (4): 154-164. doi: 10.1016/j.tifs.2010.11.006.
- Serikstad, G. L., Hansen, S. & de Boer, A. (2013). Biologisk nitrogenbinding-belgvekster som kilde til nitrogen. *Bioforsk Fokus*.
- Shewry, P., Mifflin, B., Forde, B. & Bright, S. (1981). Conventional and novel approaches to the improvement of the nutritional quality of cereal and legume seeds. *Science Progress (1933-)*: 575-600.
- Singh, U. & Jambunathan, R. (1981). Relationship between nonprotein nitrogen and total nitrogen in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 29 (2): 423-424.
- Singhal, A., Karaca, A. C., Tyler, R. & Nickerson, M. (2016). Pulse proteins: from processing to structure-function relationships. I: *grain legumes*.
- Sosulski, F. & Youngs, C. (1979). Yield and functional properties of air-classified protein and starch fractions from eight legume flours. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56 (3): 292-295.
- Sosulski, F. & Holt, N. (1980). Amino acid composition and nitrogen-to-protein factors for grain legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 60 (4): 1327-1331.

- Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratape, V. M. & Singh, V. (2012). Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, 131 (2): 462-468.
- Sridaran, A., Karim, A. A. & Bhat, R. (2012). Pithecellobium jiringa legume flour for potential food applications: Studies on their physico-chemical and functional properties. *Food chemistry*, 130 (3): 528-535.
- Steffe, J. F. (1996). Introduction to rheology. Rheological methods in food process engineering: Freeman press.
- Swanson, B. G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (5): 276-280. doi: 10.1007/bf02539676.
- ThermoFisher. (2015). Instructions Micro BCA Protein Assay Kit. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23235> (lest 04.04.2018).
- Tyler, R., Youngs, C. & Sosulski, F. (1981). Air classification of legumes. I. Separation efficiency, yield and Composition of the starch and protein fractions. *Cereal Chem*, 58 (2): 144-148.
- Were, L., Hettiarachchy, N. & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*, 62 (4): 821-824.
- Wu, W., Williams, W., Kunkel, M., Acton, J., Huang, Y., Wardlaw, F. & Grimes, L. (1995). True N conversion factor for diet and excreta in evaluating protein quality. *Journal of food science*, 60 (4): 854-857.
- Yasuda, K., Nakamura, R. & Hayakawa, S. (1986). Factors Affecting Heat-Induced Gel Formation of Bovine Serum Albumin. *Journal of Food Science*, 51 (5): 1289-1292.

Vedlegg

Oversikt over vedlegg

Vedlegg 1: Sitronsyre - Na_2HPO_4 bufferløsninger, pH 3-7

Vedlegg 2: Prosedyre for fortynninger av standardløsninger av BSA

Vedlegg 3: Gjennomsnittsmålinger for TN og IPN

Vedlegg 4: Gjennomsnittsmålinger for proteinløselighet

Vedlegg 5: Gjennomsnittsmålinger for viskositet

Vedlegg 6: Målinger av gelegenskaper; stivhet, tøyningsgrense og styrke

Vedlegg 7: Skumevne og skumstabilitet

Vedlegg 1. Sitronsyre - Na₂HPO₄ bufferløsninger, pH 3-7

Tabell 3: Illustrerer anbefalte forhold mellom Sitronsyre og Na₂HPO₄ ved varierende pH. 0.1 M Sitronsyre monohydrat (C₆H₈O₇ • H₂O), 210.14 g/mol; 0.2 M dinatriumhydrogenfosfat dihydrat (Na₂HPO₄ • 2H₂O), 178.05 g/mol (Merck, 2018).

pH	x mL 0.1 M sitronsyre	y mL 0.2 M Na ₂ HPO ₄
3	79,45	20,55
4	61,45	38,55
5	48,5	51,5
6	36,85	63,15
7	17,65	82,35

Vedlegg 2. Prosedyre for fortynninger av standardløsninger av BSA

Tabell 4: Prosedyre for fortynnede standardløsninger av BSA benyttet i brønner på mikrotiterplater ved Micro BCA Protein Assay Kit for undersøkelse av proteinløselighet. (ThermoFisher, 2015).

Rør	Volum dH ₂ O	Volum og kilde av BSA	BSA konsentrasjon
A	4,5 mL	0,5 mL fra BSA ampulle	200 µg/mL
B	8,0 mL	2,0 mL fra fortynning i rør A	40 µg/mL
C	4,0 mL	4,0 mL fra fortynning i rør B	20 µg/mL
D	4,0 mL	4,0 mL fra fortynning i rør C	10 µg/mL
E	4,0 mL	4,0 mL fra fortynning i rør D	5 µg/mL
F	4,0 mL	4,0 mL fra fortynning i rør E	2,5 µg/mL
G	4,8 mL	3,2 mL fra fortynning i rør F	1 µg/mL
H	4,0 mL	4,0 mL fra fortynning i rør G	0,5 µg/mL
I (blank)	8 mL	0	0 µg/mL

Vedlegg 3. Gjennomsnittsmålinger for TN og IPN

Tabell 5: Tallmaterialet for beregning av TN av FBPF ved mikro-Kjeldahl metoden.

Nr.	Batch	Navn på prøve	Vekt (g)	Titr	% TN	Gj. snitt % TN	Gj. snitt % TN DM	Gj. snitt % TN DM
6	5 % FBPF	Prøve, 1 g	1,01	6,56	9,11	8,99	9,73	9,87
7	5 % FBPF	Prøve, 1 g	1,00	6,24	8,70			
8	5 % FBPF	Prøve, 1 g	1,04	6,81	9,17			
9	5 % FBPF	Prøve, 1 g	1,03	1,37	9,35	9,22	9,97	
10	5 % FBPF	Prøve, 1 g	1,03	1,35	9,11			
11	5 % FBPF	Prøve, 1 g	0,99	1,30	9,19			
12	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,54	3,52	9,19	9,21	9,97	
13	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,50	3,30	9,24			
14	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,51	3,33	9,20			
15	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,51	0,66	9,14	9,06	9,80	
16	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,50	0,65	9,03			
17	5 % FBPF	Prøve, 0.5 g	0,50	0,64	9,01			

Tabell 6: Tallmaterialet for beregning av IPN av FBPF ved mikro-Kjeldahl metoden.

Nr.	Batch	Tekst	Vekt (g)	Titr	% IPN	% IPN DM	% Gj. Snitt IPN DM
6	5 % FBPF	Prøve	4,91	0,60	0,86	0,93	0,92
7	5 % FBPF	Prøve	5,01	0,61	0,85	0,92	
8	5 % FBPF	Prøve	5,00	0,61	0,85	0,92	

Vedlegg 4. Gjennomsnittsmålinger for proteinløselighet

Tabell 7: Gjennomsnittsmålinger for proteinløselighet ved varierende pH og ionestyrke. Tallmaterialet bygger på gjennomsnittet av 12 målinger for hvert punkt.

	Proteinløselighet (%)					
pH	0.00 M	0.05 M	0,1 M	0,25 M	0,5 M	1 M
3	17,46	15,68	14,34	19,00	21,31	28,04
4	13,93	16,57	16,99	30,11	49,36	67,16
5	29,91	25,37	33,96	82,35	79,21	77,65
6	66,16	68,57	75,60	74,69	84,52	76,39
7	77,22	77,90	73,36	83,52	81,73	79,60

Vedlegg 5. Gjennomsnittsmålinger for viskositet

Tabell 8: Illustrerer viskositetsmålingene av FBPF som ble utført i løsninger ved varierende pH og konsentrasjon. Det ble utført tre viskositetsmålinger per prøve hvor det ble gjort 20 målinger ved økende skjærhastighet fra 200-500 1/s.

Prøve	Viskositet (Pa·s)			
	Gjentak 1	Gjentak 2	Gjentak 3	Gjennomsnitt viskositet
pH 3, 10 %	0,003946	0,0039595	0,0039975	0,003967667
pH 3, 15 %	0,0062775	0,0061742	0,0061353	0,006195658
pH 4, 10 %	0,0040755	0,0040655	0,0040589	0,004066649
pH 4, 15 %	0,0051815	0,0051168	0,0050965	0,005131614
pH 5, 10 %	0,004191	0,004211	0,004212	0,004204667
pH 5, 15 %	0,0073465	0,007143	0,007044	0,007177833
pH 6, 10 %	0,0044335	0,0044315	0,0044265	0,0044305
pH 6, 15 %	0,006127	0,0061632	0,0061647	0,006151632
pH 7, 10 %	0,0049245	0,004843	0,004837	0,004868167
pH 7, 15 %	0,0077645	0,0074695	0,0073737	0,007535895

Tabell 9: Illustrerer viskositetsmålingene av FBPF som ble utført i løsninger ved varierende pH og ionestyrke. Det ble utført tre viskositetsmålinger per prøve hvor det ble gjort 20 målinger ved økende skjærhastighet fra 200-500 1/s.

Prøve	Viskositet (Pa·s)			
	Gjentak 1	Gjentak 2	Gjentak 3	Gjennomsnitt viskositet
pH 4, 0 M	0,0051815	0,0051168	0,0050965	0,005131614
pH 4, 0.05 M	0,0051455	0,0051515	0,0051447	0,005147246
pH 4, 0.1 M	0,0057845	0,0058465	0,005815	0,005815333
pH 4, 0.25 M	0,0061615	0,00602	0,0059347	0,006038746
pH 4, 0.5 M	0,006659	0,0064205	0,0062905	0,006456667
pH 4, 1 M	0,010835	0,01055	0,010455	0,010613333
pH 5, 0 M	0,0073465	0,007143	0,007044	0,007177833
pH 5, 0.05 M	0,0092532	0,0088674	0,0086484	0,008922982
pH 5, 0.1 M	0,0081805	0,0078495	0,0063581	0,007462693
pH 5, 0.25 M	0,0077025	0,0074015	0,007164	0,007422667
pH 5, 0.5 M	0,01245	0,01241	0,01195	0,01227
pH 5, 1 M	0,012825	0,012495	0,01239	0,01257
pH 7, 0 M	0,0077645	0,0074695	0,0073737	0,007535895
pH 7, 0.05 M	0,0075325	0,0074705	0,00744	0,007481
pH 7, 0.1 M	0,00843	0,0081684	0,0080985	0,008232307
pH 7, 0.25 M	0,0076885	0,0075625	0,0076355	0,007628833
pH 7, 0.5 M	0,010565	0,0103355	0,010218	0,010372833
pH 7, 1 M	0,01084	0,01047	0,0103737	0,010561228

Vedlegg 6. Målinger av stivhet på geler

Tabell 10: Tallverdier for måling av stivhet (Pa), tøyningsgrense (%) og gelstyrke (Pa) av geler ved varierende pH og konsentrasjon.

pH	G' max (Pa)		γ (%)		τ (Pa)	
	15 %	10 %	15 %	10 %	15 %	10 %
3	930	73,1	0,2905	4,016	2,67	2,85
4	513	126	0,4227	0,6909	2,113	0,8606
5	1020	263	1,05	1,078	10,34	2,692
6	136	34	1,26	0,116	1,635	0,03541
7	33,6		2,884		0,8765	

Tabell 11: Tallverdier for måling av stivhet (Pa), tøyningsgrense (%) og gelstyrke (Pa) av geler ved varierende ionestyrke ved pH 4, 5 og 7.

NaCl, M	G' max (Pa)			γ (%)			τ (Pa)		
	4	5	7	4	5	7	4	5	7
0,00	513,0	1020,0	33,6	0,4227	1,0500	2,8840	2,1130	10,3400	0,8765
0,05	671,0	1050,0	21,4	0,5628	0,9086	1,5380	3,6270	9,0400	0,3027
0,10	1020,0	1000,0	31,2	0,8025	0,8068	0,2155	8,2150	7,9880	0,0623
0,25	892,0	440,0	19,1	0,6649	1,0980	0,0892	5,8590	4,7260	0,0158
0,50	841,0	551,0	33,8	0,7216	1,0460	1,1070	5,8300	5,5820	0,2566
1,00	1090,0	384,0	18,6	0,6599	0,7869	0,9481	7,0790	2,7680	0,1609

Vedlegg 7. Skumevne og skumstabilitet

Tabell 12: Rådata for skumevne og skumstabilitet ved varierende pH og ionestyrke i FBPF og eggehvitpulver. pH-verdi ble justert i noen bufferløsninger på 200 mL etter tilsetning av NaCl vist med ”*”.

* pH justert med 8 dråper 1 M NaOH etter tilsetning av NaCl

** pH justert med 8 dråper 4 M NaOH etter tilsetning av NaCl

*** pH justert med 16 dråper 4 M NaOH etter tilsetning av NaCl

**** pH justert med 4 dråper 1M NaOH etter tilsetning av NaCl

***** pH justert med 24 dråper 1M NaOH etter tilsetning av NaCl

***** pH justert med 50 dråper 1 M NaOH etter tilsetning av NaCl

***** pH justert med 6 dråper 4 M NaOH etter tilsetning av NaCl

pH	NaCl, M	pH i buffer	FBPF, g	0 min, ml	60 min, ml	Skumevne	Skumstabilitet
3	0,00 1	3,03	1	60	53	20	6
3	0,00 2	3,03	1,001	69	56	38	12
3	0,00 3	3,03	1,002	72	56	44	12
3	0,05 1	2,97	0,999	70	59	40	18
3	0,05 2	2,97	1	73	58	46	16
3	0,05 3	2,97	1,001	71	62	42	24
3	0,1 1	2,93*	1,001	63	61	26	22
3	0,1 2	2,93*	1,003	66	63	32	26
3	0,1 3	2,93*	1,001	69	64	38	28
3	0,25 1	2,96**	1,001	69	66	38	32
3	0,25 2	2,96**	1,001	71	68	42	36
3	0,25 3	2,96**	1,003	70	68	40	36
3	0,5 1	2,93**	0,999	70	69	40	38
3	0,5 2	2,93**	1,001	77	69	54	38
3	0,5 3	2,93**	1,002	72	74	44	48
3	1,0 1	2,91***	1,003	73	71	46	42
3	1,0 2	2,91***	0,999	73	72	46	44
3	1,0 3	2,91***	1,003	79	68	58	36
4	0,00 1	3,93	1	60	54	20	8
4	0,00 2	3,93	0,998	65	60	30	20
4	0,00 3	3,93	0,999	66	60	32	20

4	0,05 1	4,06	1	69	65	38	30
4	0,05 2	4,06	0,999	62	64	24	28
4	0,05 3	4,06	1,002	69	68	38	36
4	0,1 1	4,01	0,998	68	61	36	22
4	0,1 2	4,01	1	71	65	42	30
4	0,1 3	4,01	1,002	69	65	38	30
4	0,25 1	3,95****	1,003	70	64	40	28
4	0,25 2	3,95****	1	70	67	40	34
4	0,25 3	3,95****	1,001	74	68	48	36
4	0,5 1	3,94*****	1,002	67	67	34	34
4	0,5 2	3,94*****	1,001	69	68	38	36
4	0,5 3	3,94*****	0,996	70	69	40	38
4	1,0 1	3,93*****	0,997	70	66	40	32
4	1,0 2	3,93*****	0,998	75	65	50	30
4	1,0 3	3,93*****	1,004	71	68	42	36
5	0,00 1	5,08	1,001	63	58	26	16
5	0,00 2	5,08	1	71	61	42	22
5	0,00 3	5,08	1,001	75	60	50	20
5	0,05 1	5,03	1	67	59	34	18
5	0,05 2	5,03	1,002	71	59	42	18
5	0,05 3	5,03	0,999	82	60	64	20
5	0,1 1	5,02	1	65	58	30	16
5	0,1 2	5,02	1	75	59	50	18
5	0,1 3	5,02	0,999	73	59	46	18
5	0,25 1	4,91	0,999	66	60	32	20
5	0,25 2	4,91	1,002	68	61	36	22
5	0,25 3	4,91	1,004	69	60	38	20
5	0,5 1	4,94*****	1	79	57	58	14
5	0,5 2	4,94*****	1,002	72	59	44	18
5	0,5 3	4,94*****	0,998	72	62	44	24
5	1,0 1	4,93***	1	70	65	40	30
5	1,0 2	4,93***	1,001	78	70	56	40
5	1,0 3	4,93***	1,002	76	66	52	32
6	0,00 1	6	0,998	73	60	46	20
6	0,00 2	6	0,998	70	63	40	26
6	0,00 3	6	0,998	79	60	58	20
6	0,05 1	6,09	1,001	80	62	60	24
6	0,05 2	6,09	1	82	62	64	24
6	0,05 3	6,09	1,002	89	59	78	18

6	0,1 1	6,07	1,002	84	58	68	16
6	0,1 2	6,07	0,998	87	57	74	14
6	0,1 3	6,07	1	80	60	60	20
6	0,25 1	5,97	1,002	67	61	34	22
6	0,25 2	5,97	1,001	75	60	50	20
6	0,25 3	5,97	1,002	70	60	40	20
6	0,5 1	6	1,002	75	60	50	20
6	0,5 2	6	0,999	80	59	60	18
6	0,5 3	6	1,002	80	60	60	20
6	1,0 1	5,94**	0,998	78	62	56	24
6	1,0 2	5,94**	1,003	73	63	46	26
6	1,0 3	5,94**	1,001	77	61	54	22
7	0,00 1	7	1	82	60	64	20
7	0,00 2	7	1,003	82	59	64	18
7	0,00 3	7	1	72	61	44	22
7	0,05 1	7,06	1,002	77	66	54	32
7	0,05 2	7,06	1,002	76	65	52	30
7	0,05 3	7,06	1	67	65	34	30
7	0,1 1	7	0,998	72	59	44	18
7	0,1 2	7	1,002	74	62	48	24
7	0,1 3	7	1	74	59	48	18
7	0,25 1	6,95*****	1,002	75	67	50	34
7	0,25 2	6,95*****	1,002	71	67	42	34
7	0,25 3	6,95*****	1,003	63	60	26	20
7	0,5 1	6,95*****	1,002	78	61	56	22
7	0,5 2	6,95*****	0,997	73	63	46	26
7	0,5 3	6,95*****	1	73	63	46	26
7	1,0 1	6,93***	0,998	77	65	54	30
7	1,0 2	6,93***	1,002	74	65	48	30
7	1,0 3	6,93***	1,002	76	64	52	28
Egg, 7	0,00 1	6,96	0,77	69	62	38	24
Egg, 7	0,00 2	6,96	0,776	72	67	44	34
Egg, 7	0,00 3	6,96	0,775	71	68	42	36
Egg, 7	0,05 1	6,99	0,776	72	68	44	36
Egg, 7	0,05 2	6,99	0,773	70	69	40	38
Egg, 7	0,05 3	6,99	0,771	73	70	46	40
Egg, 7	0,1 1	6,98	0,771	70	70	40	40
Egg, 7	0,1 2	6,98	0,774	72	72	44	44
Egg, 7	0,1 3	6,98	0,778	73	71	46	42

Egg, 7	0,25 1	6,99*****	0,779	72	72	44	44
Egg, 7	0,25 2	6,99*****	0,771	73	72	46	44
Egg, 7	0,25 3	6,99*****	0,775	76	74	52	48
Egg, 7	0,5 1	6,95*****	0,773	73	73	46	46
Egg, 7	0,5 2	6,95*****	0,771	76	75	52	50
Egg, 7	0,5 3	6,95*****	0,774	75	75	50	50
Egg, 7	1,0 1	6,98***	0,774	79	78	58	56
Egg, 7	1,0 2	6,98***	0,772	78	78	56	56
Egg, 7	1,0 3	6,98***	0,772	79	79	58	58



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway