

Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Effekt av prosessering på *in vitro* proteinfordøyelighet av åkerbønner (*Vicia faba* L.)**

Effect of processing on *in vitro* protein digestibility  
of faba beans (*Vicia faba* L.)

Marte Wallin Gulbrandsen

Matvitenskap



# FORORD

Denne oppgaven er skrevet i forbindelse med en masterutdannelse i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven ble skrevet som del av forskningsprosjektet FoodProFuture. Prosesseringer ble gjort ved Nofima og NMBU i Ås. Laboratoriearbeid ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). En av analysene ble utført ved LabTek i Ås.

Forsøket ble gjennomført under restriksjoner som følge av covid-19, våren 2020. Dette hindret noe laboratoriearbeid, og det utsatte arbeidet til en annen masterstudent om innhold av antinæringsstoffer i det samme prøvematerialet, som kunne vært en nyttig studie på tvers av denne oppgaven.

Jeg ønsker å takke hovedveileder Tove G. Devold for kunnskap og konstruktive tilbakemeldinger. Videre vil jeg takke biveileder Anne Kjersti Uhlen for nyttig kunnskapsdeling, spesielt om åkerbønner og planteproteiner, og for innhenting av det ene partiet av åkerbønner. Takk til biveileder Svein Halvor Knutsen for kunnskap om ekstrudering og anskaffelse av flere av prøvematerialene. En stor takk til Tora Asledottir for opplæring av analysemetoder, god hjelp med resultatbehandling og engelsk korrekturlesing. Takk også til Irene Comi som har vært hjelpsom på laboratoriet, til Ragnhild Aabøe Ingingstad for statistisk innspill, og til medstudent Lucy Qui for oppmaling av åkerbønner. Tusen takk til medstudent Emilie Gullberg Jørgensen for deling av prosesserte og frysetørkede prøvematerialer. Til slutt vil jeg takke FoodProFuture for økonomisk støtte og for muligheten til å være en del av forskningsprosjektet.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, juni 2020

---

Marte Wallin Gulbrandsen

# SAMMENDRAG

Tilstrekkelig protein i kosten er essensielt for opprettholdelse av en funksjonell kropp, men kvaliteten av proteinet er avgjørende for i hvilken grad proteinet utnyttes. Animalsk protein i form av kjøtt, egg og meieriprodukter har en høy kvalitet, men produksjonen har stor miljøpåvirkning. Med en raskt voksende befolkning bør alternative proteinkilder i større grad utnyttes for å sikre nok protein. Åkerbønner (*Vicia faba* L.) er belgvekster som kan kultiveres flere steder på Østlandet i Norge. Bønnen er proteinrik, og gjennom nitrogenfiksering vil den gi bedre vekstforhold for andre vekster i omløpet, som korn. Selv om proteininnholdet i åkerbønner er høyt, har de et begrenset innhold av noen essensielle aminosyrer, som medfører lavere proteinkvalitet sammenlignet med animalske produkter. For å sikre optimal utnyttelse av proteinet, er det nødvendig at proteinet i størst mulig grad blir fordøyd og absorbert. Fordøyeligheten av proteiner bestemmes i stor grad av faktorer som prosessering, innhold av antinæringsstoffer og strukturen av proteinene. Formålet med denne oppgaven var å undersøke effekten av ekstrudering (våt og tørr), koking, bløtlegging og spiring på *in vitro* fordøyeligheten av åkerbønneproteiner. En viktig del av oppgaven var også å evaluere hvorvidt BCA-metoden, sammenlignet med Dumas-metoden, er en egnet analysemetode for vurdering av proteinfoerdøyelighet.

Åkerbønner ble fraksjonert til en proteinrik og en stivelsesrik fraksjon. Den proteinanrikede fraksjonen ble fordøyd rå, kokt (grøt), og som to ekstruderte produkter (våt og tørr). Åkerbønner ble også malt med skall og fordøyd rå og kokt (grøt). I tillegg ble hele åkerbønner bløtlagt og spirt ved ulike tider (0, 24, 48 og 72 timer) før koking. Alle produkter ble fordøyd i en statisk *in vitro* fordøyelsesmodell. Fordøyeligheten ble analysert ved måling av proteinløselighet med Dumas-metoden og BCA-metoden. SDS-PAGE ble benyttet for å studere proteinenes nedbrytningsprofil under fordøyelse.

Av de proteinanrikede åkerbønneprovne viste den tørrestruderte prøven lavere proteinfoerdøyelighet enn rå, kokt og våtekstrudert prøve (ikke signifikant). Blant prøvene av fullformalte og hele åkerbønner viste grøten og de bløtlagte bønnene spirt i 24/72 timer før koking en høyere fordøyelighet sammenlignet med rå referanseprøve

(ikke signifikant). Koking viste spesielt en positiv innvirkning på proteinfordøyeligheten når kokevannet ble beholdt, som ved koking av grøt. Det ble ikke observert en sammenheng mellom spiretid og proteinfordøyelighet. En effekt av stivelsesinnhold på proteinfordøyelighet ble observert hvor proteinanrikede rå åkerbønner viste signifikant ( $p < 0,01$ ) høyere fordøyelighet enn rå åkerbønner med et høyere stivelsesinnhold. Den proteinanrikede grøten viste også større proteinfordøyelighet sammenlignet med grøten av fullformalte åkerbønner (mindre protein, mer stivelse). BCA-analysen viste å være uegnet til vurdering av proteinfordøyelighet, trolig på grunn av tap av peptidbindinger under proteolyse og forstyrrelser av blant annet tanniner under måling. Det var ingen korrelasjon ( $R^2 = 0,02223$ ) mellom BCA-analysen og Dumas-analysen etter måling av de proteinanrikede prøvene, og korrelasjonen var lav ( $R^2 = 0,58837$ ) etter måling av fullformalte og hele åkerbønneprøver.

# ABSTRACT

Sufficient protein in the diet is essential for maintaining a functional body, but the protein quality is crucial in determining how the protein is utilized in the body. Animal protein in the form of meat, eggs and dairy products has a high quality, but the production has a large environmental impact. With a rapidly growing world population, alternative protein sources should be exploited to secure a sufficient dietary protein production. Faba beans (*Vicia faba* L.) are legumes that can be cultivated in several southern and eastern parts of Norway. The bean is rich in protein, and through nitrogen fixation it will improve the growth conditions for other crops in rotation, such as grains. Although the protein content of faba beans is high, it lacks some essential amino acids, which results in lower protein quality compared to animal products. To ensure optimal protein utilization, the protein also needs to be highly digested and absorbed. The digestibility of proteins is largely determined by factors such as processing, the content of anti nutritional factors and the protein structure. The aim of this thesis was to investigate the effect of extrusion (wet and dry), cooking, soaking and germination on the *in vitro* digestibility of faba bean proteins. An important purpose of the thesis was also to evaluate whether the BCA assay, compared to the Dumas method, is a suitable method for assessing protein digestibility.

Faba beans were fractionated into a protein-rich and a starch-rich fraction. The protein-enriched fraction was digested raw, cooked (porridge) and as two extruded products (wet and dry). Faba beans were also fully milled and digested raw and cooked (porridge). In addition, whole faba beans were soaked and germinated at different time lengths (0, 24, 48 and 72 hours) prior to cooking. All products were digested in an *in vitro* static digestion model. The digestibility was analysed by measuring protein solubility with the Dumas method and the BCA method. SDS-PAGE was used to study the degradation profile of the proteins during digestion.

Among the protein-enriched faba bean samples, the dry extruded sample showed a lower protein digestibility than raw, cooked and wet-extruded sample (not significant). Among the samples of fully milled and whole faba beans, both the porridge and the

whole beans that were soaked and germinated for 24/72 hours prior to cooking showed a higher digestibility compared to the raw flour (not significant). In particular, cooking had a positive effect on protein digestibility when the cooking water was retained, as with porridge. No correlation between germination time and protein digestibility was observed. An effect of starch content on protein digestibility was observed where protein-enriched raw faba beans showed significantly ( $p < 0.01$ ) higher digestibility than raw faba beans with a higher starch content. The protein-enriched porridge also showed greater protein digestibility than the porridge of fully milled faba beans (less protein, more starch). The BCA assay proved unsuitable in measuring protein digestibility, probably due to loss of peptide bonds during proteolysis and interference of tannins, among others, during measurement. In particular, there were no correlation ( $R^2 = 0.02223$ ) between the BCA assay and the Dumas assay after measuring the protein-enriched samples, and the correlation was low ( $R^2 = 0.58837$ ) when measuring fully milled and whole faba bean samples.





# INNHOOLD

<b>FORORD</b> .....	<b>I</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>X</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Proteinkilder, helse og miljø</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Et behov for en bedre utnyttelse av planteprotein</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Oppgavens formål</b> .....	<b>4</b>
<b>2. KUNNSKAPSSTATUS</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Dyrking av belgvekster i Norge</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Åkerbønner</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Innholdsstoffer i åkerbønner</b> .....	<b>7</b>
2.3.1 Protein.....	8
2.3.2 Antinæringsstoffer.....	11
<b>2.4 Fordøyelse og absorpsjon av proteiner</b> .....	<b>14</b>
2.4.1 Munn .....	15
2.4.2 Mage.....	16
2.4.3 Tarm.....	16
<b>2.5 Måling og simulering av fordøyelighet</b> .....	<b>17</b>
<b>2.6 Prosessering av åkerbønner</b> .....	<b>18</b>
2.6.1 Fraksjonering og ekstrudering.....	18
2.6.2 Bløtlegging.....	19
2.6.3 Spiring .....	19
2.6.4 Koking.....	19
<b>2.7 Effekt av prosessering på proteinfordøyelighet</b> .....	<b>20</b>

2.8	Økt kunnskap for bedre utnyttelse av planteprotein .....	21
<b>3.</b>	<b>MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>23</b>
3.1	Om prøvematerialet og innledende prosesseringer .....	23
3.2	<i>In vitro</i> fordøyelse av prosesserte åkerbønner.....	25
3.3	Analyse av nitrogeninnhold ved Dumas-metoden.....	27
3.4	Analyse av proteinløselighet ved BCA-metoden.....	28
3.4.1	Beregning av proteinkonsentrasjon.....	29
3.4.2	Beregning av proteinløselighet .....	30
3.5	Analyse av proteinnedbrytning under <i>in vitro</i> fordøyelse ved SDS-PAGE.....	30
3.5.1	Testkjøringer med lavmolekylær gel.....	32
3.6	Resultatbehandling og statistisk analyse.....	33
3.7	Oppsummert oversikt over forsøksoppsettet.....	34
<b>4.</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>35</b>
4.1	Proteininnhold i bønneprøver før <i>in vitro</i> fordøyelse.....	35
4.2	Proteinkonsentrasjon og proteinløselighet i fordøyde åkerbønneprøver .....	36
4.3	Proteinprofil før, under og etter <i>in vitro</i> fordøyelse .....	42
4.3.1	Semikvantitativ bestemmelse av proteiner etter SDS-PAGE.....	47
<b>5.</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>51</b>
5.1	BCA-analyse og Dumas-analyse som metoder for måling av proteinløselighet .....	52
5.1.1	Mulige forstyrrelser fra tanniner under BCA-analyse.....	55
5.2	Proteinenes nedbrytningsprofil målt med SDS-PAGE .....	57
5.2.1	Proteinprofil i grovfraksjonen .....	58
5.3	Den generelle effekten av prosesseringer .....	59
5.4	Effekt av ekstrudering på proteinfordøyelighet.....	60
5.5	Effekt av koking på proteinfordøyelighet.....	62
5.6	Effekt av bløtlegging på proteinfordøyelighet .....	65
5.7	Effekt av spiring på proteinfordøyelighet.....	67
5.8	Konklusjon .....	70

<b>6. Til ettertanke og videre forskning.....</b>	<b>73</b>
<b>7. Litteraturliste.....</b>	<b>77</b>
<b>Vedlegg.....</b>	<b>A</b>

### **Vedlegg sendt til veiledere**

1. Dumas-analyse: Rådata og utregninger
2. BCA-analyse: Rådata og utregninger
3. SDS-PAGE: Intensitetsberegninger

# FORKORTELSER

ANF	Antinæringsstoff (fra engelsk; Antinutritional Factor)
ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk; Analysis of Variance)
BCA	Bionchoninsyre (fra engelsk; Bicinchoninic Acid)
BSA	Bovint serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiumdiklorid
Cu <sup>+</sup> /Cu <sup>2+</sup>	Enverdig/toverdig kobberion
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DM	Tørrstoff (fra engelsk; dry matter)
DTT	Dithiotheiol
FF	Finfraksjon, rå
FF-K	Finfraksjon, kokt grøt
FF-TE	Finfraksjon, tørrekstrudert
FF-VE	Finfraksjon, våtekstrudert
FoodProFuture	Food Protein Future
G	Stivelsesrik grovfraksjon, rå
HB	Hel åkerbønne
HB-B-0-K	Hel åkerbønne, bløtlagt og kokt
HB-B-24-K	Hel åkerbønne, bløtlagt, spirt 24 timer og kokt
HB-B-48-K	Hel åkerbønne, bløtlagt, spirt 48 timer og kokt
HB-B-72-K	Hel åkerbønne, bløtlagt, spirt 72 timer og kokt
HCl	Saltsyre
KBM	Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
kDa	Kilodalton
M	Molar
X	

M	Mageprøve
MB	Fullformalt åkerbønne, rå
MB-K	Fullformalt åkerbønne, kokt grøt
mM	Millimolar
MW	Molekylvekt (fra engelsk; Molecular Weight)
N	Nitrogen
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroksid
nm	Nanometer
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
R <sup>2</sup>	Korrelasjonskoeffisient
RPM	Omdreininger per minutt (fra engelsk; revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecyl sulfat (fra engelsk; Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (fra engelsk; Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
T	Tarmprøve
U	Ufordøyd prøve
U	Units
V	Volt



# 1. INNLEDNING

Et kosthold med nok protein er essensielt for opprettholdelse av en funksjonell kropp. For optimal utnyttelse av proteiner i maten, må proteinet bli tilstrekkelig fordøyd og absorbert i tarmen. For å sikre optimal utnyttelse av verdifullt protein, er det viktig med økt kunnskap om faktorene som påvirker proteinfordøyelsen. I tillegg er det viktig å vurdere miljøpåvirkningene av matvarer. En matvare som kilde til protein bør produseres mot å optimalisere den ernæringsmessige kvaliteten, uten å bidra med store klimaavtrykk.

## 1.1 Proteinkilder, helse og miljø

Proteiner er viktige byggesteiner i alt levende vev, og alle livsnødvendige prosesser i kroppen avhenger av bestemte proteiner eller enzymer som kan katalysere de ulike reaksjonene (Pedersen, 2013). Det anbefales et proteininntak tilsvarende 10–20 % av energiinntaket (Helsedirektoratet, 2016). Et kosthold med fravær av protein kan gi alvorlig nedbrytning av muskler og vev, leverskade, apati, ødem og forandringer i hud og hår (Geissler & Powers, 2010; Pedersen, 2013). Mangelsykdommer som følge av utilstrekkelig proteininntak forekommer særlig i tropiske områder der basismaten har et lavt proteininnhold (Pedersen, 2013). Proteiner finnes i store mengder i animalske matvarer, som kylling, egg, fisk, svin, storfe og meieriprodukter, men betydelige mengder er også å finne i matvarer fra planteriket, som belgvekster og korn. Ettersom mennesker opprinnelig er omnivore organismer (både plante- og kjøttetere), har begge kilder alltid vært viktige bidrag til protein (McGee, 2007).

Planteprotein er relativt billig sammenlignet med animalsk protein, og potensielt er også variasjonen og tilgjengeligheten av planteprotein større. Likevel er direkte konsum av planteprotein noe begrenset i den vestlige verden, der proteinet i stor grad er blitt brukt til produksjon av kraftfôr for produksjon av egg, melk og kjøtt (Day, 2013). Konverteringen av protein fra husdyrfôr til animalske matvarer har imidlertid en lav effektivitet. Gjennomsnittlig kreves 6 kg planteprotein for å produsere 1 kg animalsk protein, med en variasjon mellom ulike produksjonssystemer (de Boer et al., 2006).

Likevel blir en tredjedel av den globale produksjonen av korn og belgvekster brukt årlig som dyrefôr. Denne andelen inneholder nok energi til å mette 3 milliarder mennesker (Smil, 2002). Samtidig krever husdyrsektoren 11 ganger mer energi og en betydelig større andel vann og landareal til proteinproduksjon sammenlignet med hva som kreves for produksjon av planteprotein. Utslipp av drivhusgasser er også betraktelig større. Dette har store negative innvirkninger på miljøet (Day, 2013; Sabaté & Soret, 2014).

## 1.2 Et behov for en bedre utnyttelse av planteprotein

Det er forventet at verdens befolkning vil øke med over 25 % frem mot år 2050 (FN-Sambandet, 2019). Med denne befolkningsveksten er det estimert et behov for økt matproduksjon tilsvarende 70 %, og mer enn 30 % av denne økningen må dekkes av proteinrik mat (Warsame et al., 2018). Av miljømessige hensyn og det faktum at produksjon av animalsk protein i husdyrsektoren på et punkt vil nå maksimal kapasitet, vil det være avgjørende for matsikkerheten med en bedre og mer effektiv utnyttelse av planteprotein (Day, 2013; Sabaté & Soret, 2014). I tillegg er det av helsemessige årsaker en generell anbefaling å redusere kjøttforbruket, spesielt rødt kjøtt, selv om animalske produkter også kan være en gunstig kilde til næringsstoffer (Geissler & Powers, 2010; Godfray et al., 2018). Denne anbefalingen gjelder imidlertid ikke befolkningsgrupper i land med høyt inntak av plantekost og hvor nivåene av blant annet selen, jod, jern, nitrogen, fosfor, kalsium og magnesium i jordsmonnet – og derved i plantene – er lave. For disse kan et økt inntak av animalsk protein være gunstig (Gibson et al., 2000; Neumann et al., 2002). Mange som følger et vestlig kosthold har et ønske om å endre sine matvaner, enten det er av helse-, miljø- og/eller dyrevelferdsårsaker. Undersøkelser har vist at nesten 50 % av alle europeere har sagt seg villige til å erstatte kjøtt med andre proteinkilder (Warsame et al., 2018). I en studie av Bugge og Alfnes (2018) uttrykte halvparten av respondentene (nordmenn) en interesse for å spise middag uten kjøtt eller fisk. Erter, bønner og linser var blant proteinkildene flest ønsket å øke inntaket av, mens storfekjøtt var den proteinkilden flest ønsket å spise mindre av.

Belgvekster er planter i erteblomstfamilien (*Fabaceae*). Vekstene inkluderer blant annet erter, lupin, åkerbønner, soya, kikerter, linser og bønner (McGee, 2007). Disse belgvekstene inneholder fra rundt 20–40 % protein, og er allerede viktige proteinkilder



over store deler av verden (Day, 2013; Henchion et al., 2017). Det høye proteininnholdet i belgvekster skyldes et symbiotisk samarbeid mellom planten og rhizobiumbakterier på røttene; hvor nitrogen fra luften konverteres til ammonium som planten direkte kan benytte for å syntetisere aminosyrer (McGee, 2007). De siste årene har interessen for belgvekster økt, og 2016 ble av FNs generalforsamling utnevnt som belgfruktens år (Calles, 2016). Med den økte interessen for belgvekster, sammen med et økt fokus på klima, har det de siste årene vært en ekspansjon av vegetabiliske produkter på matmarkedet. I Norge er en stor andel av de vegetariske produktene basert på soyabønner, og da spesielt de såkalte kjøtterstatningsproduktene. Soyabønne er en belgvekst med svært høyt proteininnhold (>40 %), og den har en aminosyre-sammensetning på linje med animalsk protein (McGee, 2007). En ulempe eksisterer likevel ved at all soya må importeres fordi dette er en belgvekst som krever andre klimaforhold for dyrking enn hva vi har i Norge. For at Norge skal sikre en bærekraftig matproduksjon bør vi finne råvarer som kan dyrkes under norske forhold, og erter (*Pisum sativum*) og åkerbønner (*Vicia faba* L.) representerer to av hovedalternativene til soyabønner som plantebaserte proteinkilder (Peltonen-Sainio et al., 2013).

Åkerbønne (*V. faba*) er en svært tilpasningsdyktig plante, og har i tillegg et høyt proteininnhold (gjennomsnittlig 30 %) (Abrahamsen et al., 2019). Et høyt innhold av protein er fordelaktig, men det er proteinkvaliteten som er avgjørende ved vurdering av åkerbønner og andre matvarer som kilde til protein. Kvaliteten av proteiner i næringsmidler er primært en funksjon av 1) komposisjonen av aminosyrer i forhold til menneskets aminosyrekrav, og 2) graden av proteinets fordøyelighet – altså hvorvidt proteinet fordøyes, absorberes og utnyttes i kroppen (Nosworthy & House, 2017). Animalske proteinkilder imøtekommer menneskets aminosyrekrav, og er samtidig veldig fordøyelige (Nosworthy & House, 2017; Tomé, 2013). Proteinene i åkerbønner og andre plantevekster har, i varierende grad, et for lavt innhold av én eller flere essensielle aminosyrer til å dekke menneskets behov for normal vekst og utvikling. I nativ tilstand er åkerbønneprotein i tillegg mindre fordøyelig enn animalsk protein (Pedersen, 2013; Tomé, 2013).

### 1.3 Oppgavens formål

Denne masteroppgaven ble skrevet som del av forskningsprosjektet FoodProFuture (2017–2021), som er et tverrfaglig prosjekt med ni nasjonale og fem internasjonale akademiske partnere involvert. Prosjektets ledelse er ved Institutt for plantevitenskap (IPV) ved NMBU. FoodProFuture har som hensikt å utvikle en kunnskapsplattform for å skape smaksrike, sunne, attraktive og proteinrike produkter av norske planteråvarer. Hovedfokuset ligger på norskdyrkede belgvekster, som erter og åkerbønner. I arbeidet mot å skape en slik kunnskapsplattform vil det innhentes resultater fra forskning i flere områder: Blant annet vil det forskes på mulighetene for produksjon av mer planteprotein under norske klimatiske forhold. Det vil også bli undersøkt hvordan et kosthold med mer plantebasert protein påvirker helse, miljø og sosiale forhold. I tillegg vil det samles kunnskap for å kunne optimalisere utnyttelsesgraden av plantekost.

Selv om plantevekster er gode kilder til protein, kan den lave fordøyeligheten av planteproteiner ofte trekkes frem som en begrensende faktor for å bruke en høy andel planteprotein i human ernæring. Proteinfordøyeligheten kan likevel variere mellom ulike planteråvarer, og den kan øke med ulike typer av prosesseringer. Men det er fremdeles et stort behov for økt kunnskap om hvordan fordøyeligheten av plantevekster varierer, og hvordan den kan forbedres slik at disse proteinkildene kan dekke menneskets behov på linje med protein fra animalske produkter. Formålet med denne oppgaven var å studere effekten av ulike prosesseringer på *in vitro* proteinfordøyelighet av åkerbønner (*V. faba*). Dette ble gjort gjennom to former av ekstrudering (våt- og tørrestrudering), bløtlegging, spiring ved ulike tider (24, 48 og 72 timer) og koking. Åkerbønnene ble høstet fra to områder på Østlandet i Norge, hvorav det ene partiet ble fraksjonert før prosessering. *In vitro* fordøyelse ble gjort med en statisk fordøyelsesmodell etter protokoll fra COST INFOGEST. Proteinfordøyeligheten av prosesserte åkerbønner ble vurdert fra proteinløseligheten beregnet etter analyse med Dumas-metoden og BCA-metoden. Et formål med denne oppgaven var også å undersøke om BCA-analyse er en egnet metode for vurdering av proteinfordøyelighet. Dette ble gjort ved å sammenligne resultatene fra BCA-analysen med resultatene fra Dumas-analysen; som ansees som en mer pålitelig, men også mer tidkrevende metode. SDS-PAGE ble benyttet for å analysere proteinenes nedbrytningsprofil under fordøyelse.

## 2. KUNNSKAPSSTATUS

### 2.1 Dyrking av belgvekster i Norge

Klimaet i Norge begrenser hvilke arter av belgvekster som kan dyrkes. Eksempelvis er vekstsesongen for soya for lang for våre forhold. Lupin modner også svært sent, og er i tillegg lite konkurransedyktig mot ugress (Frøseth, 2017). Når det gjelder åkerbønner er modningstiden også noe sen for disse, men de kan dyrkes i områder med lang veksttid, hovedsakelig sør for Oslo, i kystnære strøk. Det har imidlertid kommet nye og bedre åkerbønnesorter på markedet med tidligere modning, og som kan dyrkes i et større område i Norge (Abrahamsen et al., 2019). Åkerbønner har gode klimamessige tilpasningsevner som blant annet gjør dem mer tolerante overfor kald jord sammenlignet med for eksempel soyabønner. Erter kan også spire i relativt kald jord. (Etemadi et al., 2019; Warsame et al., 2018). I Norge kan vekstsesongen være preget av mye regn, som kan gi større problemer med sykdommer og utfordringer ved innhøsting. Mye regn kan imidlertid også være fordelaktig, da både erter og åkerbønner kan være utsatt for tørke tidlig i sesongen før rotsystemet er tilstrekkelig utviklet, ettersom røttene normalt ikke går så dypt (Etemadi et al., 2019). Både erter og åkerbønner er spesielt godt egnet for dyrking på Østlandet (Frøseth, 2017). I perioden 2016 til 2018 ble erter og åkerbønner i størst grad produsert i Østfold og Vestfold, etterfulgt av Akershus, Buskerud og Telemark (Abrahamsen et al., 2019).

I Norge har man de siste årene opplevd et økende areal for erter og åkerbønner, men arealet av proteinvekster utgjør (2019) likevel ikke mer enn <2,5 % av det totale vekstarealet, og da er oljevekster inkludert (Abrahamsen et al., 2019). Det er etterspørsel og økonomi som avgjør hvor mye som kan dyrkes, da man potensielt kan dyrke erter og åkerbønner på et areal 7 ganger større enn hva som var tilfellet i 2019 (Abrahamsen et al., 2019). Produksjonen vil da hovedsakelig skje i et vekstskifte med korn ettersom det bør gå 6–8 år mellom hver dyrking for å unngå sykdomsangrep. Erter og åkerbønner vil være en god forgrøde til hvete, og dyrking av disse belgvekstene er godt egnet i områder hvor hvete allerede dyrkes (Abrahamsen et al., 2019).

Med vekstskifte menes rekkefølgen av vekster som dyrkes etter hverandre på samme dyrkingsområde. Et produksjonssystem med vekstskifte av belgvekster og korn har en positiv innvirkning på kornavlingene da belgvekster gjennom nitrogenfiksering samler nitrogen i jorda, hvilket gir en bedre kvalitet, et større utbytte og et høyere proteininnhold av kornet (Abrahamsen et al., 2019; Frøseth, 2009). I tillegg vil et slikt dyrkingssystem gi bedre konkurransevne mot ugress, bedre jordkvalitet, økt kontroll av plantesykdommer og redusert behov for syntetiske N-forbindelser (nitrogengjødsel) (Frøseth, 2017; Peltonen-Sainio et al., 2013; Serikstad et al., 2013; Tulbek et al., 2017).

## 2.2 Åkerbønner

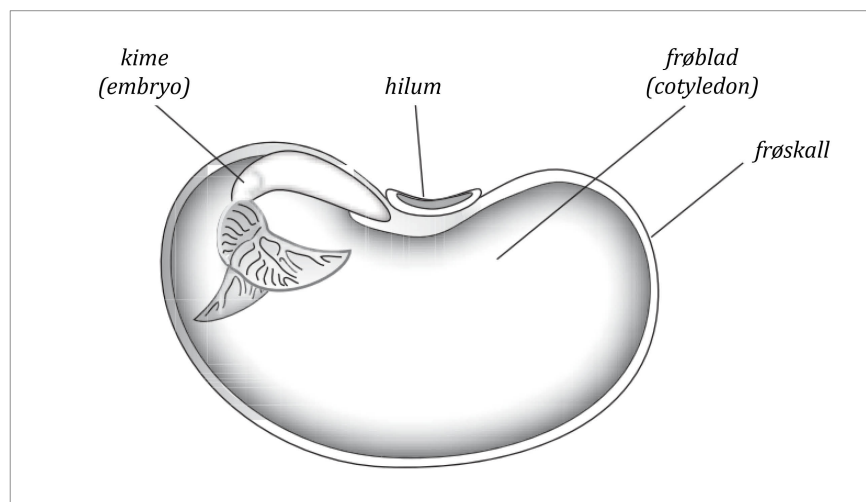
Åkerbønner (*Vicia faba* L.) er en type av kjernebelgvekster (norsk betegnelse for «food legume») tilhørende erteblomstfamilien (*Fabaceae*) (Frøseth, 2009). Åkerbønneren er en av verdens eldste belgvekster, og andre navn på arten er bønnevikke, bondebønne og hestebønne (engelsk; faba bean) (Frøseth, 2009; Warsame et al., 2018). Bønnene dyrkes i rundt 70 land (størst produksjon i Kina, etterfulgt av Etiopia, Storbritannia og Australia), og gir nær 4 millioner tonn årlig (McGee, 2007; Warsame et al., 2018). Plantene er ettårige, har lang veksttid og bør såes tidlig (Frøseth, 2009). Frøene er hovedsakelig det viktigste produktet ved dyrking, både økonomisk og næringsmessig (Frøseth, 2009). Frøskallet er derimot tykt og seigt, og blir ofte fjernet (McGee, 2007). Innen arten åkerbønne finnes tre varieteter med ulik frøstørrelse: *Vicia faba* var. *minor*, *V. faba* var. *equina*, og *V. faba* var. *major*. I Norge er det kun småfrøtypen (*minor*) som er aktuell å dyrke til frømodning (Frøseth, 2017). Aktuelle sorter av åkerbønner til dyrking i Norge er blant andre Kontu, Vertigo, Sampo og Louhi (Frøseth, 2017).

Åkerbønner og andre belgvekster fikserer nitrogen (N). Dette foregår gjennom et symbiotisk samspill mellom belgveksten og arter av bakterieslekten *Rhizobium* som lever i knoller på planterøttene. Nitrogenfikseringen innebærer at N fra atmosfæren tas opp i bakterieknollene på røttene hvor det omdannes til plantetilgjengelige N-forbindelser som utnyttes i plantevevet (Bennetau-Pelissero, 2019; Serikstad et al., 2013). Belgveksten sørger for næring/energi (karbohydrater gjennom fotosyntesen) til bakterien, mens bakterien forsyner planten med N for å møte dens N-krav (Frøseth, 2017). Åkerbønner er unik i at den opprettholder nitrogenfikseringen selv om jorda

allerede er relativt rik på N (Etemadi et al., 2019). Åkerbønner er uvurderlige i en bærekraftig planteproduksjon da de har evnen til å fikse N svært effektivt; i like stor grad som soya og erter til sammen (Warsame et al., 2018). Det er en stor sammenheng mellom effektiv N-fiksering og proteininnhold, og under optimale forhold gir åkerbønner det største proteinutbyttet sammenlignet med andre belgvekster (Warsame et al., 2018). Planten har også en god innvirkning på andre vekster i et vekstskifte på grunn av et kraftig rotsystem (Abrahamsen et al., 2019).

## 2.3 Innholdsstoffer i åkerbønner

Den generelle oppbyggingen av et åkerbønnefrø er illustrert i figur 1. Frøene består av en kime (embryo) omgitt av et beskyttende frøskall. Kimen består av to store frøblader (cotyledons) og en tynn stilk. Frøbladene inneholder mesteparten av opplagsnæringen (slik endospermen gjør i korn). Frøskallet dekker hele frøet, bortsett fra ved hilum, altså stedet hvor frøet har vært festet til belgen. Det er gjennom hilum at frøet absorberer vann under spiring, og vann kan herfra passere direkte til kimen (McGee, 2007).



**Figur 1.** Tverrsnitt av et åkerbønnefrø (*V. faba*) med en av de to frøbladene fjernet for å kunne illustrere kimen. Hilum representerer området hvor frøet har vært festet til belgen. Hentet fra McGee (2007).

Åkerbønner inneholder generelt mye protein, komplekse karbohydrater (stivelse, oligosakkarider og kostfiber), mineraler (som kalium, fosfor, magnesium, kalsium, jern, selen og sink) og vitaminer (spesielt B-vitaminer), samt lite fett (Dahl et al., 2012; Shevkani et al., 2019). Frøene akkumulerer store mengder protein under utvikling, og

spesielt da i frøbladene (Tulbek et al., 2017). Frøbladene inneholder i tillegg stivelse, løselig fiber og oligosakkarider (Singh et al., 2017). Noe protein er også å finne i frøskallet, men hovedsakelig består skallet av polysakkarider, og inkluderer mesteparten av frøets ufordøyelige fiber (Henchion et al., 2017). Åkerbønner, som andre belgvekster, inneholder i tillegg noen antinæringsstoffer, deriblant vicin og convicin, enzyminhibitorer, hemagglutiner (lektiner), fytinsyre, oligosakkarider og polyfenoler. Vicin, convicin, enzyminhibitorer, lektiner, fytinsyre og oligosakkarider er i størst grad lokalisert i frøbladene sammen med proteinet, men noe er også å finne i frøskallet (Khazaei et al., 2019; Singh et al., 2017; Tulbek et al., 2017). Polyfenoler, som tanniner, er i størst grad lokalisert i frøskallet (Singh et al., 2017).

### **2.3.1 Protein**

Proteiner er komplekse makromolekyler hovedsakelig bygd opp av 20 ulike  $\alpha$ -aminosyrer. Alle aminosyrer består av et sentralt karbonatom (C) linket til en aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ), en karboksylgruppe ( $\text{COOH}$ ), et hydrogenatom (H) og en sidekjede (R) (Branden & Tooze, 2012; Mathews et al., 2013). Dette gir aminosyrer den kjemiske formelen  $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ . Sidekjeden er unik for hver aminosyre. Aminosyrer med alifatiske (Ala, Ile, Leu, Met, Pro og Val) og aromatiske (Phe, Trp og Tyr) sidekjerder er hydrofobe og vil derfor vise begrenset løselighet i vann. Enkelte aminosyrer inneholder svovel, og kalles svovelholdige aminosyrer. Dette gjelder cystein og metionin. Metionin er i tillegg én av ni essensielle aminosyrer sammen med valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tryptofan, treonin, lysin og histidin. Det vil si at kroppen ikke selv kan syntetisere disse, men må få dem tilført gjennom kosten (Pedersen, 2013).

Proteininnholdet i åkerbønner er et av de høyeste blant belgvekstene, etter soyabønner. Mengde protein på basis av tørrstoff ligger på mellom 19 og 39 %, vanligst i underkant av 30 (Frøseth, 2009; Warsame et al., 2018). Selv om proteininnholdet er høyt, er proteinkvaliteten dårligere sammenlignet med animalsk protein grunnet et begrenset innhold av cystein, metionin (svovelholdige og essensielle) og tryptofan (essensiell) (Abrahamsen et al., 2019; Bennetau-Pelissero, 2019). Innholdet av lysin (essensiell) er derimot høyt, og ettersom korn inneholder lite lysin, men er rikere på metionin og cystein, vil belgvekster og korn komplementere hverandre i aminosyresammensetning.

Dette til sammen gir en fullverdig proteinkvalitet (Warsame et al., 2018). En oversikt over fordelingen av aminosyrer i åkerbønneprotein er vist i tabell 1.

**Tabell 1.** Fordeling (mol%) av aminosyrer i proteinet i hele åkerbønnefrø (V. faba). De hydrofobe aminosyrene (Ala, Ile, Leu, Met, Pro, Val, Phe, Trp og Tyr) representerer 29,28 mol% av alle aminosyrene. Hentet fra Bennetau-Pelissero (2019).

Aminosyre	Fordeling (mol%)	Aminosyre (forts.)	Fordeling (mol%)
Alanin, Ala	3,63	Arginin, Arg	9,18
Isoleucin, Ile	3,45	Asparagin, Asp	9,45
Leucin, Leu	6,54	Glutaminsyre, Glu	14,79
Metionin, Met	0,66	Histidin, His	2,31
Prolin, Pro	3,72	Lysin, Lys	5,55
Valin, Val	3,81	Serin, Ser	4,5
Fenylalanin, Phe	3,75	Treonin, Thr	3,18
Tryptofan, Trp	0,81	Cystein, Cys	0,78
Tyrosin, Tyr	2,91	Glysin, Gly	3,81

Aminosyrer kan bindes sammen ved hjelp av peptidbindinger mellom aminogruppen av én aminosyre og karboksylgruppen av en annen aminosyre i et utall kombinasjoner, hvilket danner utgangspunktet for et enormt antall ulike proteiner. Sammenkobling av to aminosyrer kalles et dipeptid, av tre et tripeptid, opp til ti aminosyrer et oligopeptid, og over ti et polypeptid (Pedersen, 2013). Aminosyrer linket sammen ved peptidbindinger danner primærstrukturen av proteiner, og det er denne aminosyresekvensen som gir hvert protein dets spesielle struktur og funksjonelle egenskaper (Damodaran et al., 2008). Videre former deler av polypeptidkjeden sekundærstrukturen til proteiner ved primært å danne enten  $\alpha$ -helix eller  $\beta$ -sheet-strukturer. Sekundærstrukturen av åkerbønneprotein er hovedsakelig  $\beta$ -sheets og i mindre grad  $\alpha$ -helix.  $\beta$ -sheet-strukturer er generelt mer stabile enn  $\alpha$ -helix-strukturer grunnet en høy hydrofobisitet, hvilket fremmer protein-protein-interaksjoner slik at løseligheten reduseres (Carbonaro et al., 2012; Damodaran et al., 2008). Dette kan være en årsak til noe dårligere fordøyelighet av åkerbønneprotein sammenlignet med animalsk protein, hvor  $\alpha$ -helix-strukturer utgjør en større andel (Shevkani et al., 2019). Polypeptidkjedene kan foldes inn i et tredimensjonalt nettverk kalt tertiærstrukturen til proteinene. Den viktigste omorganiseringen under dannelse av tertiærstrukturer er relokalisering av hydrofobe sidekjeder til innsiden av proteinet. Om andelen av hydrofobe aminosyrer i et protein er >30 % får proteinene en mer hydrofob overflate, som bidrar til protein-protein-

interaksjoner og lavere løselighet (Damodaran et al., 2008). Når protein inneholder mer enn én polypeptidkjede formes det som betegnes som proteinets kvaternærstruktur (Damodaran et al., 2008; Pedersen, 2013). Et foldet protein blir i noen tilfeller videre stabilisert av disulfidbindinger mellom cysteinenheter (Mathews et al., 2013).

Hovedklassene av proteiner i åkerbønner er globuliner (saltløselige) og albuminer (vannløselige). Disse betegnes som lagerproteiner (Warsame et al., 2018). I åkerbønner utgjør globulinene >80 % av det totale proteinet (Shevkani et al., 2019; Warsame et al., 2018). Andre proteiner er prolaminer og gluteliner (løselig i henholdsvis 70 % etanol og i sure/basiske løsninger), men disse forekommer i kun mindre mengder (<5 %) (Shevkani et al., 2019). En oversikt over lagerproteinene i åkerbønner er vist i tabell 2.

**Tabell 2.** Fordeling (% av totalt protein) av hovedtypene av lagerproteiner i åkerbønner (*V. faba*), og subenheter av disse, samt molekylvekten målt i kilodalton (kDa).

Lagerprotein			Fordeling (%)	Løselighet	Molekylvekt (kDa)
Globulin	11S legumin	$\alpha$ -legumin	40–55 <sup>3</sup>	Saltløselig	36–40 <sup>1,4,5</sup>
		$\beta$ -legumin			22–23 <sup>1,4,5</sup>
	7S vicilin	Vicilin	15–28 <sup>3</sup>		46–55 <sup>5</sup>
		Convicilin			64–66 <sup>5</sup>
Albumin			10–20 <sup>4</sup>	Vannløselig	4–9 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bennetau-Pelissero (2019); <sup>2</sup> Day (2013); <sup>3</sup> Robinson et al. (2019); <sup>4</sup> Shevkani et al. (2019); <sup>5</sup> Warsame et al. (2018).

Globulinene kan klassifiseres som viciliner (og eventuelt conviciliner) (7S-globuliner) og leguminer (11S-globuliner) (Warsame et al., 2018). Et nativt legumin-molekyl (300–400 kDa) er heksamere, bestående av seks nesten identiske subenheter (50–60 kDa). Hver av subenhetene består av to polypeptidkjeder,  $\alpha$  (36–40 kDa) og  $\beta$  (22–23 kDa), linket sammen med disulfidbindinger (Bennetau-Pelissero, 2019; Shevkani et al., 2019; Warsame et al., 2018).  $\alpha$ -legumin (sur) er i stor grad hydrofil og derved hovedsakelig lokalisert på proteinets overflate, mens  $\beta$ -legumin danner den indre hydrofobe kjernen (Shevkani et al., 2019). I åkerbønner utgjør leguminene >50 % av globulinene (Warsame et al., 2018). Vicilin (~163 kDa) er trimer bestående av to typer av subenheter; store convicilin-typer (>60 kDa) og mindre vicilin-typer (46–55 kDa) (Shevkani et al., 2019; Warsame et al., 2018). Leguminer inneholder generelt mer av de svovelholdige aminosyrene metionin og cystein, mens vicilin mangler cystein. Legumin er også rikere på tryptofan sammenlignet med vicilin (Shevkani et al., 2019; Warsame et al., 2018).



Albuminene (4–9 kDa) utgjør 10–20 % av proteinene i åkerbønner og inneholder mer av essensielle (tryptofan, lysin, treonin og metionin) og svovelholdige (cystein og metionin) aminosyrer sammenlignet med globulinene (Day, 2013; Shevkani et al., 2019). I tillegg følger det med albuminene ulike enzymer og antinæringsstoffer (Lam et al., 2018). Strukturen av albumin er mer kompakt og stabil sammenlignet med globulin, hvilket hemmer proteolyse (Drulyte et al., 2019).

Ettersom alle aminosyrer inneholder N, og av det faktum at nesten alt N i mat finnes som aminogrupeer (-NH<sub>2</sub>), kan mengde protein i en matvare estimeres ved å måle mengde N. Dette kan gjøres ved kjemiske analyser, som Kjeldahl og Dumas. Gjennomsnittlig er N-innholdet i protein på ca. 16 % (Mathews et al., 2013; Pedersen, 2013).

### **2.3.2 Antinæringsstoffer**

Åkerbønner inneholder naturlig ulike antinæringsstoffer (ANFs), som vicin og convicin, enzyminhibitorer (protease- og  $\alpha$ -amylaseinhibitorer), fytinsyre, lektiner, tanniner og oligosakkarider. Enzyminhibitorer og lektiner er proteiner; tanniner er polyfenoler; vicin og convicin er glykosider (Muzquiz et al., 2012). ANFs regnes ikke som næringsstoffer, men kan ha metabolske effekter i menneskekroppen. Det er vist at ANFs kan ha positive helseeffekter, som å redusere blodglukosenivå og faren for diabetes, kreft, hjerte- og karsykdommer og fedme (Singh et al., 2017). Stoffene omtales da ofte som bioaktive komponenter. Samtidig kan ANFs være toksiske, og flere av stoffene assosieres med en redusert fordøyelighet og biotilgjengelighet av næringsstoffer, som proteiner og mineraler (Alonso et al., 2000; Muzquiz et al., 2012). Innholdet av ANFs kan reduseres, og da spesielt gjennom ulike prosesserings-teknologier. En oversikt over ANFs i åkerbønner er vist i tabell 3.

**Tabell 3.** Oversikt over antinæringsstoffer (ANFs) som forventes å finne i åkerbønner (*V. faba*), med beskrivelser av mulige fysiologiske effekter av disse.

ANF	Mekanisme	Fysiologiske effekter	Egenskaper
<b>Tanniner</b>	Kompleksdannelse med proteiner, fordøyelsesenzymer, polysakkarider og metallioner <sup>7, 8, 12</sup>	Redusert biotilgjengelighet av proteiner og mineraler <sup>10</sup> Kan redusere faren for kreft <sup>6</sup>	Varmestabil <sup>9</sup> Vist reduksjon ved avskalling, bløtlegging, spiring og fermentering <sup>9</sup> Redusert stabilitet ved pH 7 <sup>1</sup>
<b>Fytinsyre</b>	Kompleksdannelse med proteiner, fordøyelsesenzymer, mineraler og stivelse <sup>9</sup> Antioksidant <sup>9</sup>	Redusert biotilgjengelighet av proteiner og mineraler <sup>9</sup> Redusert fare for forgiftning av tungmetaller <sup>9</sup>	Varmestabil <sup>9</sup> Vist reduksjon ved avskalling, bløtlegging, spiring og fermentering <sup>9</sup>
<b>Protease-inhibitorer</b>	Kan binde til fordøyelsesenzymer <sup>9</sup>	Fordøyelsesenzymer inaktiveres; redusert proteinfordøyelighet <sup>9</sup> Kan redusere faren for kreft <sup>9</sup>	Kunitz: Varmelabil <sup>2</sup> Bowman-Birk: Varmestabil <sup>2</sup>
<b>Lektiner</b>	Kan binde til spesifikke sukkerer og glykoproteiner <sup>9</sup> Tømming av lagre av næringsstoffer <sup>9</sup>	Redusert fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer <sup>9</sup> Redusert vekst, død <sup>9</sup> Kan redusere faren for kreft, stimulere tarmfunksjon og lindre fedme <sup>9</sup>	Varmelabil <sup>9</sup>
<b>Oligo-sakkarider</b>	Unnviker fordøyelse og absorpsjon i tynntarmen. Fermenteres av tykktarmbakterier <sup>14</sup>	Gassdannelse og redusert proteinfordøyelighet <sup>14</sup> Prebiotika; normaliserer tarmfloraen <sup>13</sup> Kan redusere faren for kreft <sup>13</sup>	Vannløselig <sup>11</sup> Vist reduksjon ved bløtlegging, spiring og koking <sup>4, 11, 14</sup>
<b>Vicin og convicin</b>	Bryter ned røde blodlegemer <sup>15</sup>	Favisme (akutt hemolytisk anemi) <sup>5</sup>	Varmestabil <sup>5</sup> Vist reduksjon ved bløtlegging, spiring og fermentering <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Adamczyk et al. (2011); <sup>2</sup> Damodaran et al. (2008); <sup>3</sup> Drulyte og Orlie (2019); <sup>4</sup> El-Adawy et al. (2000); <sup>5</sup> Khazaei et al. (2019); <sup>6</sup> Li et al. (2003); <sup>7</sup> Lu og Bennick (1998); <sup>8</sup> Moya et al. (2008); <sup>9</sup> Muzquiz et al. (2012); <sup>10</sup> Prigent et al. (2003); <sup>11</sup> Rupérez (1998); <sup>12</sup> Serrano et al. (2009); <sup>13</sup> Singh et al. (2017); <sup>14</sup> Tulbek et al. (2017); <sup>15</sup> UiO (2019).

### 2.3.2.1 Tanniner

Tanniner er fenolforbindelser som blant annet bidrar med farge og astringens til frøskallet. Det er gruppen av tanniner kalt kondenserte tanniner (engelsk; condensed tannins), eller proantocyanidiner, som er av størst betydning for åkerbønner og andre plantevekster (Damodaran et al., 2008). Fenolgruppene gir tanniner evnen til å felle ut proteiner gjennom kompleksdannelse (Hagerman et al., 1992; Moya et al., 2008). Dette gjør proteinene mindre tilgjengelige for proteolytisk nedbrytning under fordøyelse (Drulyte & Orlie, 2019). Tannin-protein-komplekser er ofte uløselige, og derved

mindre fordøyelige (Prigent et al., 2003). Tanniner kan også forme komplekser med fordøyelsesenzymmer, polysakkarider og metallioner (Lu & Bennick, 1998; Moya et al., 2008; Serrano et al., 2009). Kompleksdannelse involverer hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner, men også eventuelt kovalentbindinger med aminogrupper av lysin, hvilket inhiberer trypsinkatalysert nedbrytning (Damodaran et al., 2008). Studier viser at tanniner kan forstyrre spektrofotometrisk måling av proteinløselighet (Adamczyk et al., 2011).

### **2.3.2.2 Fytinsyre**

Fytinsyre, myo-inositol-(1,2,3,4,5,6) hexakis-fosfat, betraktes som et ANF da den har evnen til å danne uløselige komplekser med næringsstoffer slik at løseligheten og biotilgjengeligheten av disse reduseres. Dette gjelder mineraler ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  og  $\text{Fe}^{3+}$ ), stivelse og protein (Muzquiz et al., 2012). Fytinsyre kan også binde til fordøyelsesenzymmer slik at enzymaktiviteten, og derved fordøyeligheten av næringsstoffer, reduseres. Det er også vist fordeler ved fytinsyre, som redusert fare for forgiftning av tungmetaller (Muzquiz et al., 2012).

### **2.3.2.3 Proteaseinhibitorer**

Enzyminhibitorer (del av albuminfraksjonen) kan påvirke ernæringsverdien av åkerbønner ved direkte å binde til fordøyelsesenzymmer slik at disse inaktiveres (Muzquiz et al., 2012). Proteaseinhibitorer kan deles inn i de to familiene Kunitz og Bowman-Birk. Kunitz-inhibitorer er varmelabile, mens Bowman-Birk-inhibitorer er stabile under normale termiske forhold (Damodaran et al., 2008). Enzyminhibitorer kan ha fordelaktige egenskaper, som å redusere faren for kreft (Muzquiz et al., 2012).

### **2.3.2.4 Lektiner**

Lektiner kan reversibelt binde til spesifikke sukkerer og glykoproteiner på overflaten av mukosaceller i tarmveggen, og derved forstyrre fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer, som aminosyrer (Muzquiz et al., 2012). Stoffene kan også forstyrre hormonbalansen. Samtidig kan lektiner ha fordelaktige egenskaper som å stimulere tarmfunksjon, lindre fedme og redusere faren for kreft (Muzquiz et al., 2012).

### 2.3.2.5 Oligosakkarider

Oligosakkarider, som raffinose, stachyose og verbascose, blir ikke fordøyd og absorbert, men fermenteres av tykktarmbakterier. Dette gir gassdannelse og redusert proteinfordøyelighet (Tulbek et al., 2017). Samtidig kan oligosakkarider ha liknende positive funksjoner som kostfiber (normalisere tarmfloraen), og de kan redusere potensielt karsinogene N-nitroso-komponenter (Singh et al., 2017).

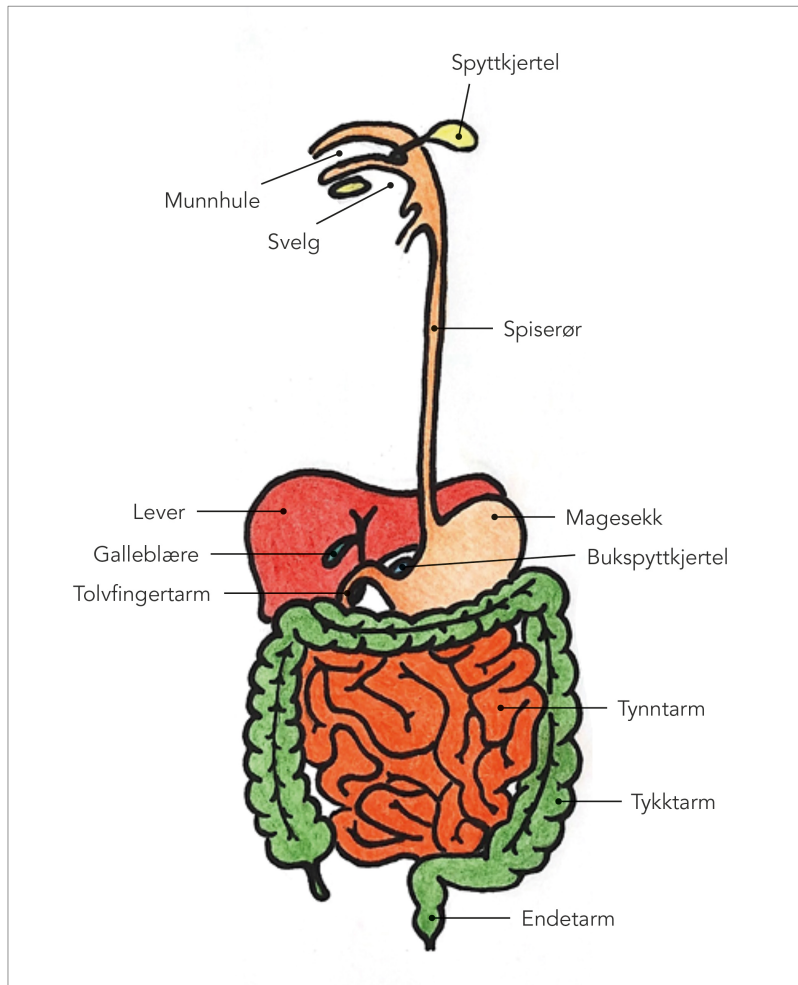
### 2.3.2.6 Vicin og convicin

Åkerbønner, som eneste kjernebelgvekst, inneholder vicin og convicin. Dette er ANFs som kan gi favisme (akutt hemolytisk anemi) hos mennesker med en genetisk arvet mangel på glukose-6-fosfat dehydrogenase (G6PD) (Khazaei et al., 2019). G6PD-defekt har stor forekomst på verdensbasis, med størst utbredelse i Asia, Midtøsten og Sørøst-Asia. Forekomsten er lav i europeiske land, men med økt emigrasjon og flyktningstrøm vil enzymdefekten også finnes i Norge (Gladheim & Foerster, 2010).

## 2.4 Fordøyelse og absorpsjon av proteiner

Fordøyelse betegner prosesser i fordøyelseskanalen hvor komplekst sammensatte næringsstoffer i maten brytes ned til enkle kjemiske forbindelser ved hjelp av enzymer (Sjaastad et al., 2010). Proteiner blir brutt ned til aminosyrer eller korte peptidkjeder, tilgjengelige karbohydrater (stivelse, sukrose og maltodekstriner) spaltes til glukose og fruktose, og fett (triglyserider) til fettsyrer og monoglyserider (Pedersen, 2013). Disse enkle forbindelsene kan deretter absorberes og utnyttes av kroppens celler og organer (Pedersen, 2013).

Fordøyelsessystemet inkluderer fordøyelseskanalen og ulike kjertler (spyttkjertel, bukspyttkjertel, kjertler i magesekk og tynntarm). Kjertlene skiller ut fordøyelsesvæsker med fordøyelsesenzymer inn i fordøyelseskanalen. Fordøyelseskanalen strekker seg fra munnen til endetarmsåpningen (anus), via magen, tynntarmen og tykktarmen, som vist i figur 2. Tynntarmen kan deles i tre deler: duodenum, jejunum og ileum. Under fordøyelse skjer hovedsakelig mekanisk prosessering, innblanding av sekreter (spytt) og fordøyelsesvæsker, utskillelse av fordøyelsesenzymer, enzymatisk nedbrytning av organiske næringsstoffer og absorpsjon (Pedersen, 2013; Sjaastad et al., 2010).



**Figur 2.** Fordøyelseskanalen med tilhørende kjertler.  
Eget arbeid, basert på figur fra Villarreal og Aurebekk (2018).

### 2.4.1 Munn

I munnhulen blir maten delt opp i mindre partikler gjennom tygging (mekanisk fordøyelse). Dette gir maten en større overflate, og enzymatiske spaltingssteder blir mer tilgjengelige slik at effektiviteten til overflateaktive enzymer øker. I munnhulen skjer også innblanding av spytt. Spyttet forenkler svelging, det har en antibakteriell effekt, og det regulerer pH slik at forholdene blir optimale for enzymene. Av næringsstoffene i maten er det kun stivelse som spaltes i munnen, og dette skjer ved hjelp av enzymet amylase fra spyttet (Sjaastad et al., 2010).

## 2.4.2 Mage

I magen skjer en videre mekanisk fordøyelse ved at maten eltes kraftig. Kjertler produserer saltsyre (HCl) og pepsinogen; et inaktivt proteolytisk enzym som senere aktiveres til pepsin som deretter starter proteinfordøyelsen. Saltsyreutskillelsen sørger for aktivering av pepsinogen til pepsin og den holder pH ned mot 1,5–3,0. pH-forholdene blir da optimale for fordøyelsesenzymene, mens mikroorganismer som kommer med maten inaktiveres (Pedersen, 2013; Sjaastad et al., 2010). Sur pH bidrar også til denaturering av proteiner slik at peptidbindinger tilgjengeliggjøres for proteolyse. Rundt 20 % av proteinet fordøyes i magen (Pedersen, 2013). Etter et måltid tar det 3–4 timer før magesekken tømmes, og maten føres videre til tolvfingertarmen (duodenum), som er den øverste delen av tynntarmen (Pedersen, 2013).

## 2.4.3 Tarm

I tolvfingertarmen blandes innholdet fra magen med fordøyelsesvæsker fra bukspyttkjertelen (pankreas), galleblæren og tynntarmens egne små kjertler. Bukspyttet og tarmsaften nøytraliserer det sure innholdet fra magesekken (pH øker til ~7). I tillegg skilles det ut enzymer som spalter protein, stivelse (men også noen oligosakkarider og disakkarider) og triglyserider. Trypsin, kymotrypsin, karboksypeptidase og elastase er proteaser fra bukspyttkjertelen som spalter peptidbindinger og korte peptidkjeder til frie aminosyrer og di- og tripeptider (Pedersen, 2013). Peptidene som gjenstår etter hydrolyse av pankreasenzymene spaltes videre til frie aminosyrer av aminopeptidase og dipeptidase i børstesømmen (Pedersen, 2013; Sjaastad et al., 2010). Proteiner absorberes i form av frie aminosyrer og di- og tripeptider inn i epitelceller i tynntarmen, hovedsakelig i tolvfingertarmen. Overflateforøkelse (veggfolder, tarmtotter og børstesøm) gjør absorpsjonen effektiv (Pedersen, 2013). De absorberte forbindelsene transporteres via blodet til organer, som lever, og muskulatur (Pedersen, 2013; Sjaastad et al., 2010). I tykktarmen skjer ingen fordøyelse eller absorpsjon av protein, men en varierende grad av fermentering (anaerob nedbrytning utført av tarmmikrober) av det som ikke er absorbert i tynntarmen (Sjaastad et al., 2010). I hvilken grad proteinet fordøyes og absorberes, og hvorvidt aminosyrer utnyttes i kroppen, beskriver proteinets fordøyelighet.

## 2.5 Måling og simulering av fordøyelighet

Fordøyeligheten av en matvare bestemmes av graden av absorpsjon av de ulike endeproduktene fra fordøyelsen, og hvorvidt disse utnyttes i kroppen (Sjaastad et al., 2010). En økt fordøyelighet vil si at en større andel av næringsstoffene brytes ned til enklere komponenter som lettere kan tas opp i blodet og bringes til ulike deler av kroppen. En matvare rik på næringsstoffer, som proteiner, har ikke nødvendigvis en høy næringsverdi. Hvor godt matvaren fordøyes og graden av absorpsjon av næringsstoffene bestemmer næringsverdien. Fordøyeligheten av et næringsmiddel kan påvirkes av type næringsstoff og mengden ANFs assosiert, samt helsen til konsumenten, prosesseringer og måltidssammensetning (Tulbek et al., 2017).

Fordøyelse kan måles *in vivo* (i dyr eller mennesker) eller *in vitro* (i reagensrør). Måling *in vivo* med mennesker betegnes som gullstandarden for å måle fordøyelighet og ernæringsverdi av et næringsmiddel, men det er samtidig tidkrevende, kostbart og vanskelig å kontrollere. Forsøk med dyr kan gi gode resultater, men unngås ofte av etiske grunner (Drulyte & Orlien, 2019; Nosworthy & House, 2017). *In vitro* forsøk simulerer de fysiologiske forholdene i den øvre mage-tarmkanalen; det vil si munnen, magen og tynntarmen. Slike metoder er raskere, mindre kostbare, enklere å kontrollere og enkelt reproducerbare. *In vitro* metoder kan være dynamiske eller statiske. Statiske modeller benytter et konstant forhold av mat til enzymer/enzymaktiviteter og elektrolytter, og konstant pH i hver fordøyelsesfase. Det eksisterer likevel et mangfold av statiske modeller med variasjon i parametere som pH, tid og mengde enzym til substrat, hvilket kan gi forskjeller i hvordan maten brytes ned, og følgelig den målte fordøyeligheten. Man bør derfor være varsom med å sammenligne resultater fra *in vitro* forsøk hvor ulike modeller er benyttet. Som et resultat av et samarbeid mellom tverrfaglige eksperter i nettverket COST INFOGEST, er det utviklet en standardisert protokoll for *in vitro* fordøyelse. Det er vanskelig eksakt å simulere de komplekse fordøyelsesprosessene i kroppen, men statiske *in vitro* modeller er vist å være nyttige i å forutsi utfall av *in vivo* fordøyelse (Bohn et al., 2018; Brodkorb et al., 2019; Drulyte & Orlien, 2019; Sousa et al., 2020). Etter *in vitro* forsøk kan matens fordøyelighet måles ved å analysere sluttproduktene; det vil si peptider, aminosyrer, fettsyrer og enkle sukkerer.

## 2.6 Prosessering av åkerbønner

Åkerbønner blir sjelden konsumert rå. Prosesseringer inkluderes for å øke ernæringsverdien av bønner ved at blant annet tilgjengeligheten av proteiner og ulike mineraler øker. Bløtlegging, spiring og koking er eksempler på tradisjonelle prosesseringer som enkelt kan gjøres av forbruker selv. Andre former for prosessering benyttet i næringsmiddelindustrien inkluderer blant annet tørrfraksjonering og ekstrudering.

### 2.6.1 Fraksjonering og ekstrudering

Ekstrudering er en form for varmebehandling og mekanisk bearbeiding. Dette er en rask prosess hvor stivelses- og proteinrike materialer blir mykgjort og kokt gjennom en kombinasjon av fuktighet, trykk, høy temperatur (150–180 °C) og mekaniske skjærkrefter (Damodaran et al., 2008; Moen & Sahlstrøm, 2016; Tulbek et al., 2017). Massen eltes og skrus gjennom en kanal og frem til en dyse som former produktet (Saldanha do Carmo et al., 2019). Under ekstrudering vil stivelse gelatinisere, mens proteiner vil denaturere og omdannes til et fibrøst nettverk (Bennetau-Pelissero, 2019; Damodaran et al., 2008). Prosesseringsteknologier som tar i bruk høye temperaturer har gjerne en negativ effekt på matens ernæringsverdi, men den korte tiden under ekstrudering kan også bidra til at enkelte næringsstoffer bevares bedre (Saldanha do Carmo et al., 2019). Ekstrudering kan gi produkter med ulike sensoriske egenskaper, eksempelvis fra blandingsprodukter av proteinrike fraksjoner av korn og belgvekster, som pasta, frokostblandinger, kjeks og «kjøtterstatningsprodukter».

To hovedtyper av ekstrudering er våt- og tørreksrudering. I våteksrudering blir vann og damp sprøytet inn i sylindren under prosessering. Dette gir grunnlag for ingredienser/produkter lignende kjøtt. I tørreksrudering har ikke ekstruderen mulighet for ekstern innsprøyting av vann eller damp. Her skjer oppvarming gjennom mekanisk friksjon. Med begrenset vann får man ingredienser som ekspanderer og ligner varianter av «ostepop» eller pellets. Disse kan videre svelles ved tilsetning av vann, og deretter kvernes og bli basis for noe som i struktur ligner en slags kjøttdeig (Hægermark, 2019).



Før ekstrudering kan man fraksjonere en råvare for spesifikt å lage et stivelsesrikt produkt eller et proteinrikt produkt. Med tørrfraksjonering menes at frø males til fint mel, for deretter at partiklene luftsorteres etter tetthet for å samle opp én fraksjon med høyere proteininnhold, ofte kalt finfraksjon, og én med høyt innhold av stivelse, betegnet grovfraksjon (Abrahamsen et al., 2019).

### **2.6.2 Bløtlegging**

Bløtlegging er en tradisjonell metode som innebærer å legge bønner, frø eller nøtter i vann, som regel over natten ved romtemperatur. Etter bløtleggingen fjernes vaskevannet fordi dette gjerne inneholder uønskede stoffer (ANFs). Det er spesielt hensiktsmessig å bløtlegge åkerbønner for å korte ned på koketiden og for å redusere faren for luft i magen, ettersom oligosakkarider vil tapes til vaskevannet (Rupérez, 1998). Bløtlegging er vist å oppkonsentrere innholdet av total mengde protein, fett og fiber, ettersom mengden ikke-protein N og karbohydrater reduseres (El-Adawy et al., 2000). Under bløtlegging vil åkerbønnen svulle og få en mykere konsistens, men det er fremdeles nødvendig med påfølgende prosessering, som koking.

### **2.6.3 Spiring**

Spiring er en prosess som involverer opptak av vann av et tørt frø i hvilefase. Åkerbønnefrøet vil svulle og frøskallet sprenge. Hydreringen aktiverer enzymer, som spalter lagringsstoffer til mindre molekyler; stivelse til sukker; fett til glyserol og fettsyrer; og protein til peptider og aminosyrer (Berner, 2014). Spiringen kan også generere bioaktive komponenter med antioksidantaktivitet, som askorbinsyre, tokoferoler, tokotrienoler og fenolkomponenter (Albarracín et al., 2015). Vann, oksygen, lys og temperatur er viktige faktorer under spiring, hvor temperaturen for optimal spiring gjerne gjenspeiler optimal temperatur under plantens vekst (Berner, 2014).

### **2.6.4 Koking**

Åkerbønner kan kokes hele, gjerne etter bløtlegging og eventuelt spiring, eller de kan males og kokes til en grøt. Bløtlagte åkerbønner bør skylles i kaldt vann før koking. Koketiden vil variere med lengden av bløtleggingen og hvor mye væske som er

absorbent. Hele åkerbønner krever generelt rundt 60–120 min koketid. Koketiden blir lengre dersom vannet er mineralholdig eller tilsatt salt (Jebsen, 1986).

## 2.7 Effekt av prosessering på proteinfordøyelighet

Proteinfordøyeligheten av åkerbønner er i utgangspunktet (i rå tilstand) lavere enn hva som er nødvendig for et effektivt opptak i tynntarmen (Drulyte & Orlien, 2019). Dette har sammenheng med proteinstruktur, innhold av essensielle aminosyrer og innhold av ANFs. For et effektivt opptak i tynntarmen er det nødvendig at strukturen av proteinet fremmer proteolytisk nedbrytning til peptider og aminosyrer. Prosessering er vist å øke fordøyeligheten av protein fra rundt 40 % til opp mot 98 % (Muzquiz et al., 2012).

Strukturen av proteiner stabiliseres av relativt svake kjemiske krefter, som hydrogenbindinger og ioniske og hydrofobe interaksjoner mellom sidekjedene av hydrofobe aminosyrer, samt sterke (brytes ikke ved denaturering med mindre dette skjer under «reduserende betingelser») kovalente disulfidbindinger mellom SH-grupper i aminosyren cystein. De svake kreftene kan brytes av varme, høye saltkonsentrasjoner, syre (som magesyre), fenol, etanol og mekanisk påvirkning (Damodaran et al., 2008; UiO, 2011b). Dette medfører endringer i sekundær-, tertiær- og kvaternærstruktur og kalles proteindenaturering. Et denaturert protein kan ha mange ulike konformasjoner med endret løselighet som følge av forandringer i overflateegenskaper (Damodaran et al., 2008). I et nativt protein er mesteparten av hydrofobe grupper lokalisert på innsiden av proteinet, men under denaturering åpnes proteinstrukturen slik at en større andel hydrofobe grupper eksponeres til omgivelsene. Hydrofobe grupper fremmer protein-protein-interaksjoner og gir redusert løselighet, mens ioniske interaksjoner mellom ladde eller polare grupper fremmer protein-vann-interaksjoner, som resulterer i økt løselighet (Damodaran et al., 2008). Avhengig av graden av denaturering vil dette påvirke løseligheten enten positivt eller negativt. Gjennom delvis proteindenaturering, som følge av for eksempel mild varmebehandling, eksponeres hydrofile sidekjedene slik at protein-vann-interaksjoner fremmes. I tillegg tilgjengeliggjøres proteolytiske spaltingssteder (Damodaran et al., 2008; Drulyte & Orlien, 2019). En mer omfattende proteindenaturering, som følge av for eksempel kombinasjonen høy temperatur og høye skjærkrefter, gir en økt andel av hydrofobe aminosyrer på overflaten slik at protein-

protein-interaksjoner fremmes og løseligheten reduseres (Damodaran et al., 2008). Proteinaggregering vil også gi en redusert tilgjengelighet av enzymatiske spaltingssteder (Drulyte & Orlien, 2019).

Proteinfordøyeligheten kan øke dersom prosesseringene medfører en reduksjon av ANFs, da disse stoffene i tilfellet mister evnen til å redusere eller hindre opptak av proteiner. Termisk behandling vil spesielt kunne redusere eller inaktivere varmelabile ANFs, inkludert Kunitz-type proteaseinhibitorer og lektiner (Damodaran et al., 2008; Muzquiz et al., 2012). Gjennom ekstrudering kan >90 % av ANFs inaktiveres, og ekstrudering har vist å gi signifikante forbedringer av proteinfordøyelighet, både *in vitro* og *in vivo* (Drulyte & Orlien, 2019). Andre prosesseringer som ikke inkluderer varmebehandling, som avskalling, bløtlegging, spiring og fermentering, vil kunne redusere innholdet av ANFs ved at stoffene blir mekanisk fjernet, kjemisk modifisert eller brutt ned. Slike metoder er spesielt effektive mot varmestabile ANFs, som tanniner, fytinsyre og Bowman-Birk-inhibitorer, men også oligosakkarider og lektiner er vist reduksjon som følge av disse prosesseringene (El-Adawy et al., 2000; Schwediauer et al., 2018; Tulbek et al., 2017). Avskalling er spesielt effektiv mot tanniner ettersom disse hovedsakelig er lokalisert i frøskallet (Serrano et al., 2009). Under spireprosessen hydrolyseres proteiner av enzymer aktivert under spireprosessen, hvilket øker løseligheten av proteinene (Schwediauer et al., 2018).

## 2.8 Økt kunnskap for bedre utnyttelse av planteprotein

I dag forskes det på å forbedre både ernæringsmessige og funksjonelle egenskaper av planteproteiner slik at disse helt eller delvis kan erstatte animalsk protein. Forskningen omhandler alt fra plantens livssyklus, utnyttelsesgrad og påvirkning på miljøet, til forbrukeranalyser og produktutvikling. Dette er blant arbeidet som gjøres i prosjektet FoodProFuture, som bidrag til økt kunnskap for bedre utnyttelse av planteprotein.

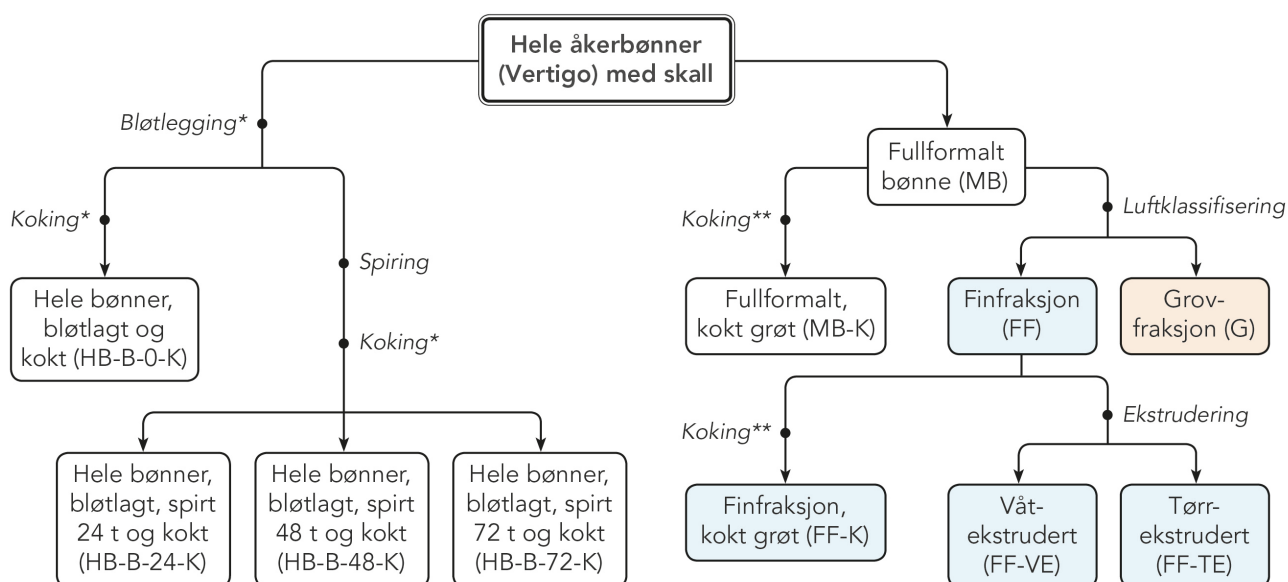


### 3. MATERIALER OG METODER

I forbindelse med denne masteroppgaven ble det gjort en *in vitro* fordøyelse av prosesserte åkerbønner (til tider omtalt bønner), og det ble utført analysemetoder relatert til proteinløselighet, proteinkvantifisering og nedbrytning av proteinet. Det ble også utført statistisk analyse for å avdekke eventuell signifikans i datasettet, og lineær regresjon for å studere korrelasjonen mellom Dumas-analysen og BCA-analysen.

#### 3.1 Om prøvematerialet og innledende prosesseringer

Åkerbønner av sorten Vertigo ble innhentet fra to ulike dyrkingsområder på Østlandet. Den ene prøven ble innhentet fra feltforsøk dyrket på Vollebekk forsøksgård ved NMBU i Ås i 2018. Den andre prøven var fra et større parti av åkerbønne dyrket av bønder i Østfold sesongen 2018, og levert til Skjelfoss Korn AS for luftklassifisering. Partiet fra Vollebekk forsøksgård i Ås ble prosessert ved NMBU, mens partiet fra Skjelfoss Korn AS ble prosessert ved Nofima, avdeling Ås. Flytskjema over prosesseringene for utarbeidelse av åkerbønneprøvene benyttet i dette forsøket er vist i figur 3.



**Figur 3.** Flytskjema ved utarbeidelse av de prosesserte åkerbønneprøvene. Alle de prosesserte prøvene ble til slutt frysetørket. Blå = proteinanrikt; oransje = stivelsesrik. Åkerbønner er for enkelhets skyld betegnet bønner. (\* Vaskevann/kokevann ble fjernet. \*\* Kokevann ble beholdt.)

Partiet av åkerbønner fra Skjelfoss Korn AS ble malt med skall (fullformalt) og videre fraksjonert til en stivelsesrik grovfraksjon og en proteinrik finfraksjon ved hjelp av luftklassifisering i en kommersiell mølle (Skjelfoss Korn AS, Hobøl, Norge). Finfraksjonen ble benyttet videre for tillaging av grøt (NMBU) og til ekstrudering (Nofima). Grøten ble kokt i Falconrør med skrukork i forholdet 1:10 med henholdsvis prøve og vann. Dette ble gjort i vannbad ved  $\sim 96$  °C i 30 min, med risting hvert andre til tredje minutt for en homogen koking. Grøten ble deretter frysetørket i en Heto dry winner 685 frysetørker (Alere AS, Norge). Ekstruderingen ble gjort eksternt på Nofima i en dobbeltskrueekstruder (KETSE 20/40 Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Tyskland) i henhold til Saldanha do Carmo et al. (2019). Maksimum temperatur for tørr- og våtekstrudering var henholdsvis 160 og 140 °C. Ved våtekstrudering ble det benyttet en kjøledyse (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Tyskland) med tre separate kjølesoner koblet med termostatregulert sirkulasjonsvann (20 °C) som kjølemedium. Den tørrestruderte prøven ble lagret ved romtemperatur mens den våtekstruderte ble fryst ved  $-40$  °C og videre frysetørket i en Christ Gamma 1-16 LSCplus frysetørker (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Tyskland).

Åkerbønnene dyrket på Vollebekk ble først rensset for uønskede partikler og størrelser ved bruk av en Perten Grain Cleaner 5110 (Perten Instruments AB, Sverige). Deretter ble skadede åkerbønner (maskinelle skader og insektskader) manuelt sortert ut. Én del av åkerbønnene ble videre fullformalt i en RETCH ZM 200 mølle (Retch GmbH Haan, Tyskland) og kokt til en grøt i vannbad i 30 min, på samme måte som med finfraksjonen nevnt over. Åkerbønnene som ikke ble malt, men beholdt hele, ble bløtlagt og kokt eller bløtlagt, spirt ved tre ulike tider (24, 48 eller 72 timer) og deretter kokt (av en annen masterstudent ved NMBU). For disse prøvene ble hele bønner først skylt med springvann og deretter bløtlagt i springvann (8 °C) i 16 timer ved romtemperatur, med én times lufting to ganger for å sørge for tilførsel av oksygen. Spiringen ble utført i mikromaltingsanlegget (Custom Laboratory Products, Milton Keynes, England) ved KBM, NMBU, under kontrollerte temperaturbetingelser og med programmert lufting styrt via dataprogrammet Micromalt på en ekstern datamaskin. Temperaturen var satt til 16 °C, men det var problemer med å holde temperaturen  $<20$  °C. Støpeprogrammet før spireprosessen startet var som følger: 8 t våtstøp, 16 t tørrstøp, 8 t våtstøp, 16 t tørrstøp, 2 t våtstøp. Etter 0, 24, 48 eller 72 timer spiring ble prøvene kokt i 1 time, i

forholdet 1:6 med henholdsvis åkerbønner og vann. Vaskevann og kokevann ble fjernet etter henholdsvis bløtlegging og koking. Bønnene ble skylt i springvann og deretter blandet med springvann i forholdet 1:1, før prøvene ble most med en stavmikser. Alle de prosesserte prøvene ble til slutt midlertidig fryst ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , før overføring til  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 12 timer og frysetørking i 48 timer i en Heto dry winner 685 frysetørker (Alere AS, Norway) (utført av en annen masterstudent ved NMBU). Frysetørkingen bidro til å kontrollere vannmengde under fordøyelse, og prøvene ble godt egnet for analyse av enkeltkomponenter. Etter frysetørking ble bønnene finknust manuelt med en morter før *in vitro* fordøyelse og videre analyse. En oversikt over prøvematerialet benyttet i dette forsøket er vist i tabell 4.

**Tabell 4.** Oversikt over åkerbønneprøvene benyttet i forsøket. Fullformalt = hele bønner malt med skall; BLANK = vann istedenfor åkerbønner under *in vitro* fordøyelse. Åkerbønner er for enkelhets skyld betegnet bønner.

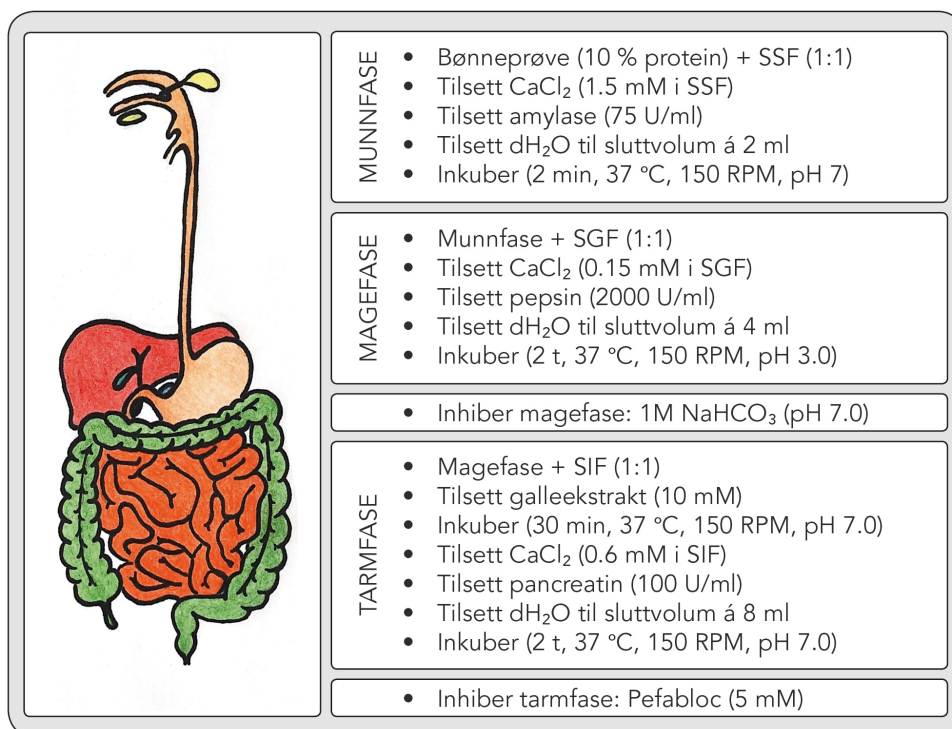
Prøve	Forklaring
G	Stivelsesrik grovfraksjon, rå
FF	Proteinrik finfraksjon, rå (referanse)
FF-K	Finfraksjon, kokt grøt
FF-VE	Finfraksjon, våtekstrudert
FF-TE	Finfraksjon, tørrekstrudert
MB	Fullformalt bønne, rå (referanse)
MB-K	Fullformalt bønne, kokt grøt
HB-B-0-K	Hel bønne, bløtlagt og kokt
HB-B-24-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 24 t og kokt
HB-B-48-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 48 t og kokt
HB-B-72-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 72 t og kokt
BLANK	<i>In vitro</i> fordøyelsesenzym

### 3.2 *In vitro* fordøyelse av prosesserte åkerbønner

*In vitro* fordøyelse ble utført i henhold til Brodkorb et al. (2019), som er en standardisert protokoll basert på en internasjonal konsensus utviklet av nettverket COST INFOGEST bestående av tverrfaglige eksperter fra 35 land. Det henvises til denne protokollen for en nærmere beskrivelse av fremgangsmetoden. Enzymaktivitetstester ble gjort i forkant av denne masteroppgaven (høsten 2019), i henhold til Brodkorb et al. (2019). Aktiviteter for amylase, pepsin og pancreatin (blandingsprodukt av fordøyelses-enzym) var henholdsvis 102 U/mg, 2947 U/mg og 5,82 U/mg.

For å sikre et likt forhold av substrat og enzym i fordøyelsen (med utgangspunkt i protein), ble alle tørre/frysetørkede åkerbønneprøver fortynnet til en protein-konsentrasjon på 10 % før *in vitro* fordøyelse. Dette ble gjort ved å veie ut riktig mengde prøve før tilsetting av dH<sub>2</sub>O til 10,0 g. Enkelte prøver hadde noen større partikler etter frysetørring, og disse partiklene ble knust ved hjelp av en morter før utveiling. *In vitro* fordøyelse ble utført med 1,0 g prøve (10 % protein) i to paralleller i Falconrør med skrukork (50 ml CELLSTAR® Tube, Greiner Bio-One GmbH, Tyskland). Det ble også inkludert en kontrollprøve med kun enzymer (BLANK) og en prøve uten fordøyelsesenzymer (i protokollen betegnet stabilitetstest; videre i oppgaven betegnet ufordøyde prøver, U). Enzymene benyttet var amylase ( $\alpha$ -amylase from human saliva, Type XIII-A, A1031, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA), pepsin (Pepsin from porcine gastric mucosa, P7012, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA) og trypsin og amylase i form av pancreatin (Pancreatin from porcine pancreas, P7545, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA). I tillegg ble galleekstrakt (Bile extract porcine, B8631, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA) benyttet i tarmfasen. I munnfasen ble amylase tilsatt til en konsentrasjon på 75 U/ml, i magefasen ble pepsin tilsatt til en konsentrasjon på 2000 U/ml, og i tarmfasen ble galle og pancreatin (ikke individuelle enzymer som foreslått i protokollen) tilsatt til en konsentrasjon på henholdsvis 10 mM og 100 U/ml trypsinaktivitet. Det ble ikke tilsatt lipase til noen av prøvene, da prøvematerialet hadde et lavt fettinnhold. Både prøvene, enzymene, gallen og CaCl<sub>2</sub> ble konstant holdt på is under prøveprepareringen, utenom ved vortexing. Inkuberingen ble gjort i varmeskap (Incu-Shaker Mini, Benchmark Scientific, USA) ved 37 °C og 150 RPM, med uttak etter magefase (122 min) og tarmfase (272 min). Ved uttak ble enzymaktiviteten inhibert ved å øke pH >7 med 1 M NaHCO<sub>3</sub> i magefasen (videre betegnet mageprøve, M), og ved tilsetting av 5 mM Pefabloc (Pefabloc® SC, 76307, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Israel) i tarmfasen (videre betegnet tarmprøve, T). Etter *in vitro* fordøyelse ble alle prøver fryst ved -20 °C før videre analyser. En oversikt over fordøyelsesprosedyren er illustrert i figur 4.





**Figur 4.** Oversikt over metoden for in vitro fordøyelse (INFOGEST 2.0) i henhold til Brodkorb et al. (2019), med ønskede sluttkonsentrasjoner av komponentene. SSF, simulated salivary fluid; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid.

En pH-test-fordøyelse ble først utført med finfraksjonen (FF) for å finne nødvendige mengder av 1 M HCl/NaOH for å oppnå riktig pH gjennom fordøyelsen. Før siste inkubasjon ble pH om nødvendig justert med 1 M HCl/NaOH.

### 3.3 Analyse av nitrogeninnhold ved Dumas-metoden

Dumas er en metode for å detektere mengde nitrogen (N) i en prøve. Dette gjøres ved at alle former for N konverteres til nitrogengass ( $\text{N}_2$ ) gjennom forbrenning ved 800–1000 °C (850–1150 °C ble benyttet i dette forsøket). Mengden  $\text{N}_2$  måles deretter ved bruk av en termisk konduktivitetsdetektor. Dumas måler både organisk og uorganisk N, som vil si at all N som detekteres ikke nødvendigvis stammer fra protein (Jung et al., 2003). Ved å multiplisere N med 6,25 (Kjeldahl-faktoren) kan man få et estimat på proteininnhold. I Dumas-analyse tillates en variasjon på 4,4 % mellom ulike dager, og en variasjon på 1–2 % ved analyse innen samme dag (Hustoft & Johnsen, 2020).

Åkerbønneprøvene ble analysert for mengde (%) N med Dumas-metoden på tørre/frysetørkede prøver før *in vitro* fordøyelse, og på løselig del av begge paralleller av U, M og T. Tørre/frysetørkede prøver ble analysert før fordøyelse for å sikre et likt utgangspunkt av protein under fordøyelsen, og for å undersøke om de ulike prosesseringene påvirket proteininnholdet. For å få separert ut den løselige delen av U, M og T ble prøvene sentrifugert ved 4000 *g* i 10 min. De tørre/frysetørkede protein-anrikede prøvene (FF, FF-VE og FF-TE), utenom FF-K, samt den stivelsesrike grovfraksjonen (G) ble analysert av Nofima. De resterende tørre/frysetørkede prøvene fra fullformalte og hele bønner, samt FF-K og alle de fordøyde løsningene (U, M og T), ble analysert av LabTek i Ås i henhold til ISO 16634 (2008), og ved hjelp av instrumentet Vario El Cube elementanalysator (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Tyskland).

Ved resultatbehandling ble proteininnhold (%) beregnet ved å multiplisere N med 6,25. Ved videre beregning av proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) ble de fordøyde løsningene korrigert for innhold av protein fra fordøyelsesenzymene (prøve BLANK), samt fortynningen under fordøyelsen (~8 ml for de U og T, ~4 ml for M). Metoden for utregning av proteinløselighet er beskrevet nærmere under methodedelen for kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit.

### 3.4 Analyse av proteinløselighet ved BCA-metoden

Proteinløselighet ble målt ved hjelp av Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) for å se på graden av tilgjengelig protein i den simulerte tynntarmsprøven etter *in vitro* fordøyelse. Micro BCA Protein Assay Kit er en metode for kolorimetrisk detektering og kvantifisering av total mengde protein. Metoden benytter bicinchoninsyre (BCA) som reagens for detektering av Cu<sup>+</sup>, som dannes når Cu<sup>2+</sup> reduseres av protein i et basisk miljø. Når to BCA-molekyler reagerer med Cu<sup>+</sup> vil det dannes et lillafarget kompleks. Det er strukturen av proteinet, antallet peptidbindinger og aminosyrene cystein, tryptofan og tyrosin som er ansvarlige for fargedannelsen ved reaksjon med BCA, men graden av fargedannelse kan påvirkes av mer enn summen av disse gruppene. Det vannløselige fargede komplekset viser en høy absorbanse ved 562 nm, og er lineær ved økende proteinkonsentrasjon i et gitt intervall.

Proteinkonsentrasjon kan beregnes ved hjelp av en standardkurve basert på kjente konsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA) (*Micro BCA Protein Assay Kit*).

Til analysen ble standardløsninger av BSA og Micro BCA Working Reagent (WR) tillaget i henhold til Thermo Fisher Scientific. Parallellene av løsningene fra fordøyelsen (U, M og T) ble sentrifugert ved 4000 *g* i 10 min, og den løselige delen ble fortynnet 100x og 1000x for henholdsvis T/U og M. Prøvene ble mikset 1:1 med WR og applisert i triplikater i 96-brønns mikroplater (Thermo Scientific™ Pierce™ Clear 96-Well Polystyrene Plates, Corner Notch). Platene ble forseglet med tape (Thermo Scientific™ Sealing Tape for 96-Well Plates) og inkubert i varmeskap (Incu-Shaker Mini, Benchmark Scientific, USA) ved 37 °C i 2 timer. Absorbansen ble målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved 562 nm. Det henvises til Thermo Fisher Scientific for en fullstendig beskrivelse av fremgangsmetoden.

### 3.4.1 Beregning av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen i den løselige delen av de to parallellene av alle fordøyde åkerbønneprøver (U, M og T) ble beregnet i mg protein per g fordøyd prøve (10 % protein) (mg/g). Det ble korrigert for den blanke prøven for å utelate protein fra fordøyelsesenzymene i beregningen. Videre ble det korrigert for fortynning ved prøvepreparering for BCA-analyse og for fortynningen under *in vitro* fordøyelse. Beregningene ble gjort ifølge formel 1:

$$\text{Formel 1:} \quad \text{Proteinkonsentrasjon (mg/g)} = \frac{A_{\text{prøve}} - A_{\text{blank}}}{\text{stigningstall (a)}} \times \frac{F_1}{1000} \times V$$

*Mat fordøyd (g)*

$A_{\text{prøve}}$  = absorbans ved 562 nm av åkerbønneprøvene og  $A_{\text{blank}}$  = absorbans ved 562 nm av den blanke prøven (fordøyelsesenzymet). *Stigningstallet (a)* = 0,0133; 0,0135; 0,0136; og 0,0139 (fra standardkurvene av BSA).  $F_1$  = fortynning ved prøvepreparering for BCA-analyse (100 for U og T, 1000 for M).  $V$  = volum etter fordøyelse (~8 ml for U og T, ~4 ml for M). Det divideres på 1000 for å regne om fra µg til mg. Mengde mat (åkerbønneprøve) fordøyd tilsvarte 1 g.

### 3.4.2 Beregning av proteinløselighet

Proteinløseligheten (%) ble beregnet fra proteinkonsentrasjonen (mg/g) av den løselige delen av de fordøyde åkerbønneprøvene (U, M og T) med følgende formel:

$$\text{Formel 2:} \quad \text{Proteinløselighet (\%)} = \frac{PK_{\text{beregnet}}}{PK_{\text{total}}} \times 100 \%$$

Hvor  $PK_{\text{beregnet}}$  er proteinkonsentrasjonen (mg/g) i prøver etter separering av uløselig protein.  $PK_{\text{total}}$  er proteinkonsentrasjonen som det ble standardisert for i alle prøver før fordøyelse (teoretisk proteinkonsentrasjon) = 10 % = 100 mg/g.

## 3.5 Analyse av proteinnedbrytning under *in vitro* fordøyelse ved SDS-PAGE

I etterkant av fordøyelsen ble natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) benyttet for å studere i hvilken grad proteinene fremdeles var intakte etter *in vitro* fordøyelse. Dette er en metode av gelelektroforese som separerer proteiner etter molekylvekt (MW). Til prøvene tilsettes både SDS og et reduserende stoff (vanligvis mercaptoetanol eller DTT). SDS og det reduserende stoffet vil under oppvarming sørge for at proteinet denaturerer og at enhver inter- og intramolekulære disulfidbinding (-S-S-) brytes. Denaturerte proteiner vil dekkes av negativt ladde SDS-molekyler i en mengde proporsjonal med molekylvekten. Bevegeshastigheten i det elektriske feltet av proteiner med lav MW vil være større sammenlignet med proteiner med en høyere MW. Ettersom det er et lineært forhold mellom distansen et protein har vandret og log MW, blir standarder inneholdende proteiner med kjent MW brukt til å bestemme molekylvekten av ukjente proteiner. Ulike geler med ulikt innhold av akrylamid og kryssbindinger (BIS-akrylamid) har varierende porestørrelser og nedre grense for hvor små proteiner som kan detekteres (Mathews et al., 2013).

I denne masteroppgaven ble SDS-PAGE gjennomført med Bio-Rad Mini-PROTEAN® 2-D Cell System og ferdigstøpte geler, i henhold til protokoll fra Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad, 2011). Det henvises til denne protokollen for en nærmere beskrivelse av fremgangsmetode. Totalt ble det utført fire ulike gelkjøringer. En kort oversikt over disse er vist i tabell 5, med videre beskrivelser i detalj under.

**Tabell 5.** Oversikt over de ulike kjøringene med SDS-PAGE. U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.

	Gelkjøring 1	Gelkjøring 2	Gelkjøring 3	Gelkjøring 4
<b>Type gel</b>	Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Gel (12 %)	Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Gel (12 %)	Mini-PROTEAN Tris-Tricine Gel (16,5 %)	Mini-PROTEAN Tris-Tricine Gel (16,5 %) – med «cut off» ved 10 kDa
<b>Formål</b>	Studere proteinenes nedbrytningsprofil	For å korrigere for fordøyelsesenzymer og intensitetsvariasjoner mellom/innad i geler ved beregning av båndintensitet i molekylære områder	Studere proteiner og småpeptider som forsvant ut av gelene til det lavmolekylære området ved gelkjøring 1 og 2	Samme som ved gelkjøring 3. Forsøke å tydeliggjøre båndene i det lavmolekylære området ved å fjerne proteiner med MW >10 kDa
<b>Prøver</b>	U, M og T av alle åkerbønneprøvene, samt grovfraksjonen (G) Blank prøve på egen gel	M og T av alle åkerbønneprøvene * Blank prøve på alle geler 3x MW standard per gel	U, M og T av tilfeldig valgt prøve	U, M og T av tilfeldig valgt prøve
<b>Farging</b>	Nei	Ja – for å fjerne skygger	Ja	Ja

\* Ikke ufordøyde prøver grunnet for få geler på lager og påfølgende stengte laboratorier som følge av covid-19, våren 2020.

SDS-PAGE ble kjørt med Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Gel (12 %) (Bio-Rad Laboratories, USA) med en nedre deteksjonsgrense på 10 kDa. 1x SDS-PAGE Running Buffer og 2x SDS-PAGE Sample Buffer med DTT som reduserende stoff ble benyttet. 1x Running Buffer ble tillaget i henhold til Bio-Rad (2011). 2x Sample Buffer ble tillaget med 0.125 M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % glyserol, 0,02 % bromfenolblå og dH<sub>2</sub>O, samt 0.2 M DTT tilsatt bufferen rett før bruk.

Alle ufordøyde prøver, mageprøver og tarmprøver (begge paralleller, både løselig og uløselig del), samt den stivelsesrike grovfraksjonen (G), ble fortynnet til en proteinkonsentrasjon på 0,5 %. Prøvene (0,5 % protein) ble deretter blandet 1:1 med 2x Sample Buffer og varmet i varmeblokk (Thermolyne, Dan Meszansky AS, Oslo) ved 95 °C i 5 min. 10 µl av de oppvarmede prøvene ble applisert per brønn. I tillegg ble 5 µl av MW standard (Precision Plus Protein™ Standard, Unstained, Bio-Rad) applisert i en egen brønn. Gelene ble kjørt ved 200 V i 40 min. Geler benyttet for intensitetsberegning (se beskrivelse under) ble farget for å fjerne tydelige skygger i det høymolekylære

området (som følge av fordøyelsesenzymene tilsatt tarmfasen). Dette ble gjort etter prosedyren for *Peptide Gel Staining* i henhold til Bio-Rad (2011), men med fikseringsløsning bestående av 20 % metanol og 80 % dH<sub>2</sub>O; fargeløsning bestående av 0,1 % Coomassie Blue G-250, 40 % metanol (95 %), 10 % eddiksyre og dH<sub>2</sub>O; og avfargingsløsning bestående av 10 % eddiksyre, 10 % metanol og 80 % dH<sub>2</sub>O. Farging og avfarging ble gjort under risting med 90 RPM (Orbital Shaker, OS-10, Biosan, BioNordika, Oslo). Det ble tatt bilde av gelene med Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA) til Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA).

Ved resultatbehandling for sammenligning av prøvene ble intensiteten av proteinbåndene i ulike molekylære områder på gelen målt. Det ble da oppdaget at intensiteten av MW standarden i stor grad varierte mellom gelene, slik at det derfor ikke ble riktig å korrigere for den blanke prøven (fordøyelsesenzymer), som kun var applisert til én av gelene. Derfor ble alle mage- og tarmprøver analysert en gang til med SDS-PAGE på samme måte som beskrevet over, men med MW standarden applisert til tre brønner per gel (en i hver ytterkant og en i midten), og med den blanke prøven på alle gelene (gelkjøring 2, tabell 5). Ved beregning av intensiteten av proteinbåndene i molekylære områder ble først Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) benyttet for detektering og intensitetsberegning av proteinbånd. Intensitetsverdiene ble eksportert til Excel (Microsoft® Excel® for Mac, 2011) for videre beregning av båndintensitet i fire molekylære områder: <20–25, 26–45, 46–59 og 60–250 kDa. Her ble alle prøver korrigert for de blanke prøvene, og for variasjonen i intensitet innad i en gel ved å se på forskjellene i intensitet mellom de tre MW standardene på gelen. Båndintensiteten i de ulike molekylære områdene ble beregnet i % av total intensitet for prøven.

### **3.5.1 Testkjøringer med lavmolekylær gel**

Det ble testet å kjøre en såkalt lavmolekylær gel av typen Mini-PROTEAN Tris-Tricine Gel (16,5 %) (Bio-Rad Laboratories, USA) med en nedre deteksjonsgrense på 2 kDa, også her i henhold til protokoll fra Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad, 2011). Til denne gelkjøringen (gelkjøring 3, tabell 5) ble det ifølge protokollen benyttet 10x Tris-Tricine Running Buffer og 2x Tricine Sample Buffer med DTT som reduserende stoff. Prosedyren var slik som for den fargefrie gelen, men her ble 5 µl applisert av både U, M og T av tilfeldig utvalgt prøve (0,5 % protein) og MW standard (Precision Plus Protein™

Dual Xtra Standards, Bio-Rad), og gelen ble kjørt ved 120 V i 90 min. Gelen ble deretter farget etter prosedyren for *Peptide Gel Staining* i henhold til protokollen (Bio-Rad, 2011), og under risting med 90 RPM. Deretter ble det tatt bilde av gelen på samme måte som med de fargefrie gelene.

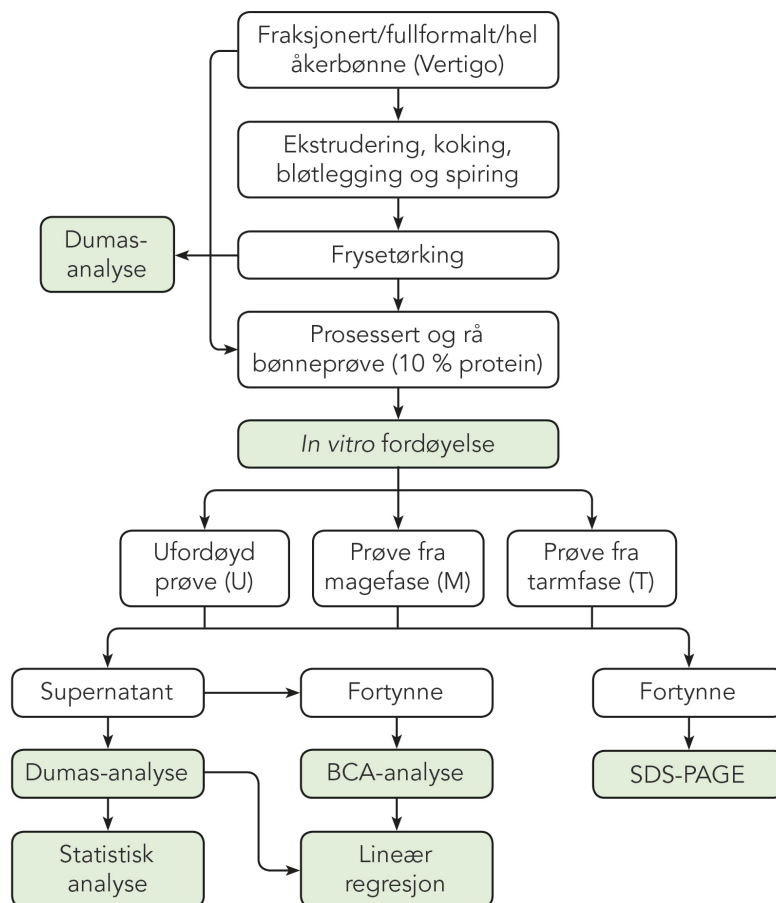
Det ble også testet å kjøre den lavmolekylære gelen med en «cut off» ved 10 kDa (gelkjøring 4, tabell 5). U, M og T av tilfeldig utvalgt prøve (0,5 % protein) ble sentrifugert (Thermo IEC® Micromax Centrifuge) ved 14000 *g* i 30 min med 10 kDa cut off-filter (Microcon® Centrifugal Filters, Ultracel YM-10, Millipore, Ireland) før blanding 1:1 med 2x Tricine Sample Buffer. Prosedyren var ellers lik som ved gelkjøring 3.

### 3.6 Resultatbehandling og statistisk analyse

Microsoft® Excel® for Mac (2011) ble benyttet ved databehandling og til fremstilling av resultater i figurer. Rådata og utregninger fra databehandlingen er sendt til veiledere. Lineær regresjon ble utført i Excel for å undersøke samsvaret mellom Dumas-metoden og BCA-metoden (se vedlegg 2–3). Statistisk analyse ble utført i R Commander for å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i løselighet av åkerbønneprøvene som følge av de ulike prosesseringene. Det ble benyttet enveis variansanalyse (ANOVA) og Tukey test. ANOVA ble utført med prosessering som faktor og proteinløselighet fra Dumas-analysen som responsvariabel for å avdekke eventuelle forskjeller i løselighet forårsaket av prosesseringer. Analysen ble gjort på de ulike fordøyelsesfasene (U, M og T) hver for seg. Tukey test ble utført for å kunne angi hvor eventuelle forskjeller eksisterte. Analysen ble gjort på den proteinanrikede delen av prøvematerialet og på prøvene fra fullformalte og hele bønner – hver for seg. I tillegg ble analysen gjort samlet på de rå og de kokte prøvene (FF, FF-K, MB og MB-K). Testen ble gjort med 5 % signifikansnivå; hvor man med 95 % sikkerhet kan avdekke signifikans dersom  $p < 0,05$ . Output fra statistiske analyser er vist i vedlegg 4–6.

### 3.7 Oppsummert oversikt over forsøksoppsettet

Dette forsøket ble gjennomført med rå (tørre) og prosesserte (frysetørkede) åkerbønneprøver fra fraksjonerte bønner og fra fullformalte og hele bønner. Etter *in vitro* fordøyelse ble analyser gjort på ufordøyde prøver (U), mageprøver (M) og tarmprøver (T). Dumas-analysen og BCA-analysen ble gjort på løselig del av U, M og T, slik at kun løselig protein detekteres. SDS-PAGE ble gjort på hele prøven (både løselig og uløselig del), slik at alle proteiner som lar seg løse opp i SDS-PAGE-bufferen vil vises. En forenklet oversikt over forsøksoppsettet er illustrert i figur 5.



**Figur 5.** Forenklet oversikt over forsøksoppsettet. Grovfraksjonen (G) ble kun analysert ved SDS-PAGE og Dumas-analyse (tørr prøve). Grønn = analysemetoder.



## 4. RESULTATER

Ved presentasjon av resultatene er prøvematerialet delt i to: Prøvene fra den proteinrike fraksjonen (FF, FF-K, FF-VE og FF-TE) er presentert sammen, mens prøvene fra de fullformalte og hele åkerbønnene (MB, MB-K, HB-B-0-K, HB-B-24-K, HB-B-48-K og HB-B-72-K) er presentert sammen. Alle resultater fra de ulike analysene av fordøyde prøver er korrigert for innhold av protein fra enzymer tilsatt under *in vitro* fordøyelsen.

### 4.1 Proteininnhold i bønneprøver før *in vitro* fordøyelse

Med *proteininnhold* vises det til mengde protein i tørre og frysetørkede åkerbønneprøver før *in vitro* fordøyelse. Proteininnholdet (%) ble beregnet fra målt mengde (%) nitrogen (N) etter Dumas-analysen, hvor N ble multiplisert med 6,25 (Kjeldahl-faktor). Proteininnholdet av de ulike prøvene er vist i tabell 6.

**Tabell 6.** Proteininnhold (%) i tørre/frysetørkede åkerbønneprøver beregnet fra målt mengde (%) nitrogen (N) fra Dumas-analysen. N er multiplisert med Kjeldahl-faktoren (6,25). (Tykke linjer skiller stivelsesrik fraksjon, proteinanrikede prøver og prøver av fullformalte og hele åkerbønner.)

Prøve	Forklaring	Protein (%)
G	Stivelsesrik grovfraksjon, rå	22,00
FF	Finfraksjon, rå (referanse)	63,50
FF-K	Finfraksjon, kokt grøt	65,63
FF-VE	Finfraksjon, våtekstrudert	63,50
FF-TE	Finfraksjon, tørrekstrudert	63,50
MB	Fullformalt bønne, rå (referanse)	27,50
MB-K	Fullformalt bønne, kokt grøt	30,63
HB-B-0-K	Hel bønne, bløtlagt og kokt	33,13
HB-B-24-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 24 t og kokt	32,50
HB-B-48-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 48 t og kokt	33,13
HB-B-72-K	Hel bønne, bløtlagt, spirt 72 t og kokt	33,13

Tre av de proteinanrikede åkerbønneprøvene hadde et proteininnhold på 63,5 %, mens den kokte grøten (FF-K) fikk målt et noe høyere innhold (65,63 %). Grovfraksjonen hadde et proteininnhold på 22 % (oppgitt av Nofima, beregnet via Dumas-analyse). Prøvene tillaget fra de fullformalte og hele bønnene hadde et proteininnhold omtrent halvparten av de proteinanrikede prøvene (~30 %). Grøten (MB-K) hadde et høyere

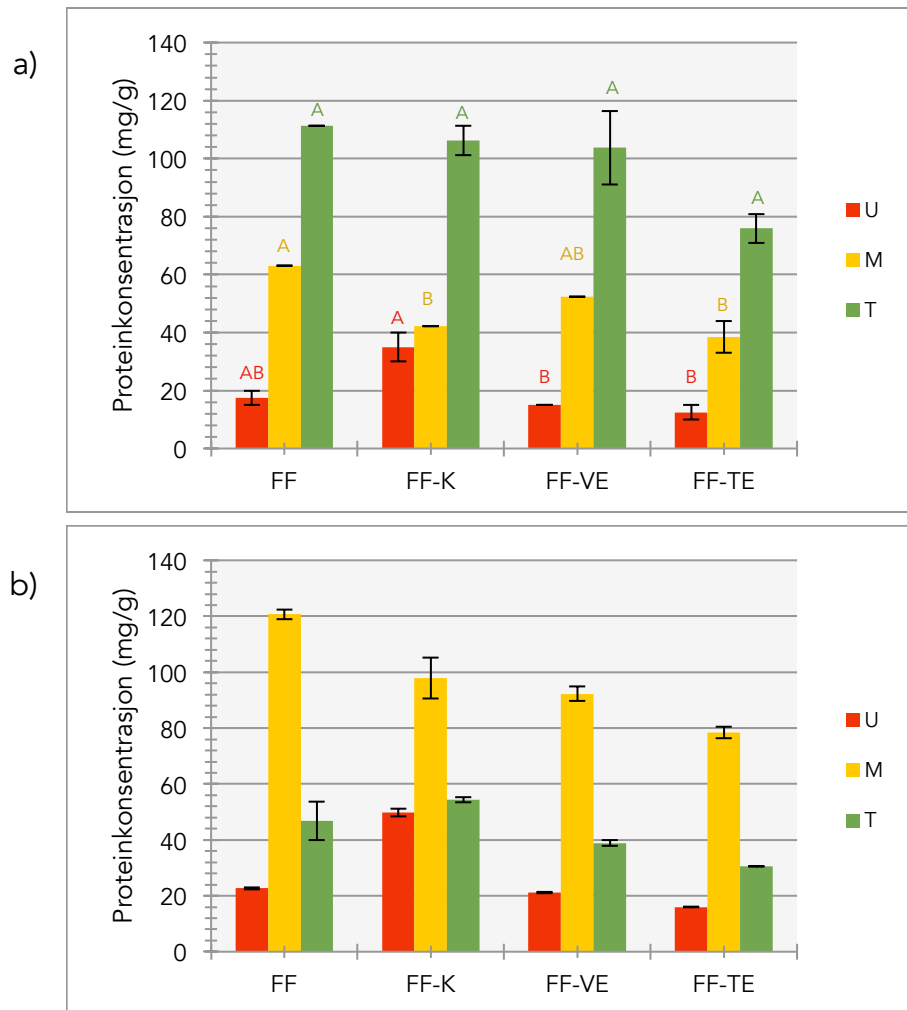
proteininnhold sammenlignet med det rå melet (MB). Bløtlegging og spiring ga igjen et noe høyere proteininnhold. De bløtlagte og spirte prøvene hadde omtrent det samme proteininnholdet (33,13 %), men noe lavere for 24 timer spirt prøve (32,5 %). MB hadde et stivelsesinnhold på 41,56 % i tørrstoff (DM), mens FF hadde et stivelses- og fiberinnhold på henholdsvis 3,5 og 9,8 % DM (målt ved Nofima).

## 4.2 Proteinkonsentrasjon og proteinløselighet i fordøyde åkerbønneprøver

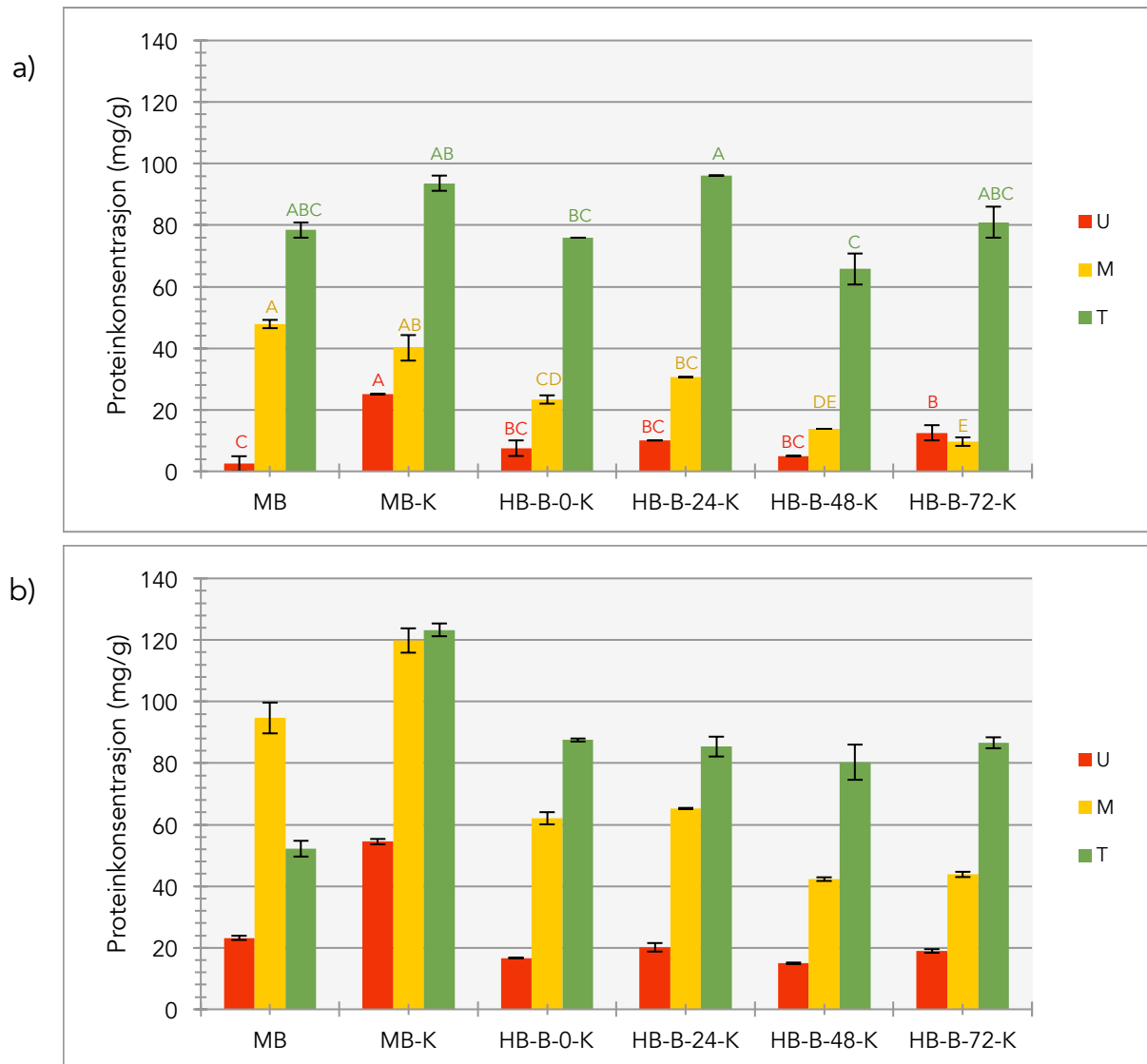
*Proteinkonsentrasjon* viser til mengden protein/peptider i løsningene før (U), under (M) og etter (T) *in vitro* fordøyelse. Betegnelsen *proteinkonsentrasjon* benyttes for mage- og tarmprøver selv om det meste av proteinet blir brutt ned til *peptider* under fordøyelse. *Proteinløselighet* viser til mengde protein tilgjengelig i U, M og T etter *in vitro* fordøyelse.

Utgangspunktet i fordøyelsen var 1 g åkerbønneprøve med 100 mg protein, hvilket ga like verdier for proteinkonsentrasjon og proteinløselighet ved omgjøring fra henholdsvis mg/g til %. Proteinkonsentrasjonen (mg/g) og proteinløseligheten (%) er fremstilt i ulike figurer, men av ovennevnte årsak er resultatbeskrivelsen for disse figurene slått sammen.

Proteinkonsentrasjonen (mg protein per g fordøyd åkerbønneprøve, mg/g) ble beregnet i henhold til formel 1. Proteinkonsentrasjonen i løselig del av U, M og T ble beregnet både fra nitrogeninnholdet målt via Dumas-metoden, og etter kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit med BSA som standard. Begge analysemetoder ble benyttet for sammenligning av metodene, for å undersøke om BCA-metoden er egnet ved vurdering av proteinfordøyelighet. Den beregnede proteinkonsentrasjonen i løsningene etter de to analysemetodene, samt output fra statistisk analyse av verdiene fra Dumas-analysen, er vist i figur 6 og 7.

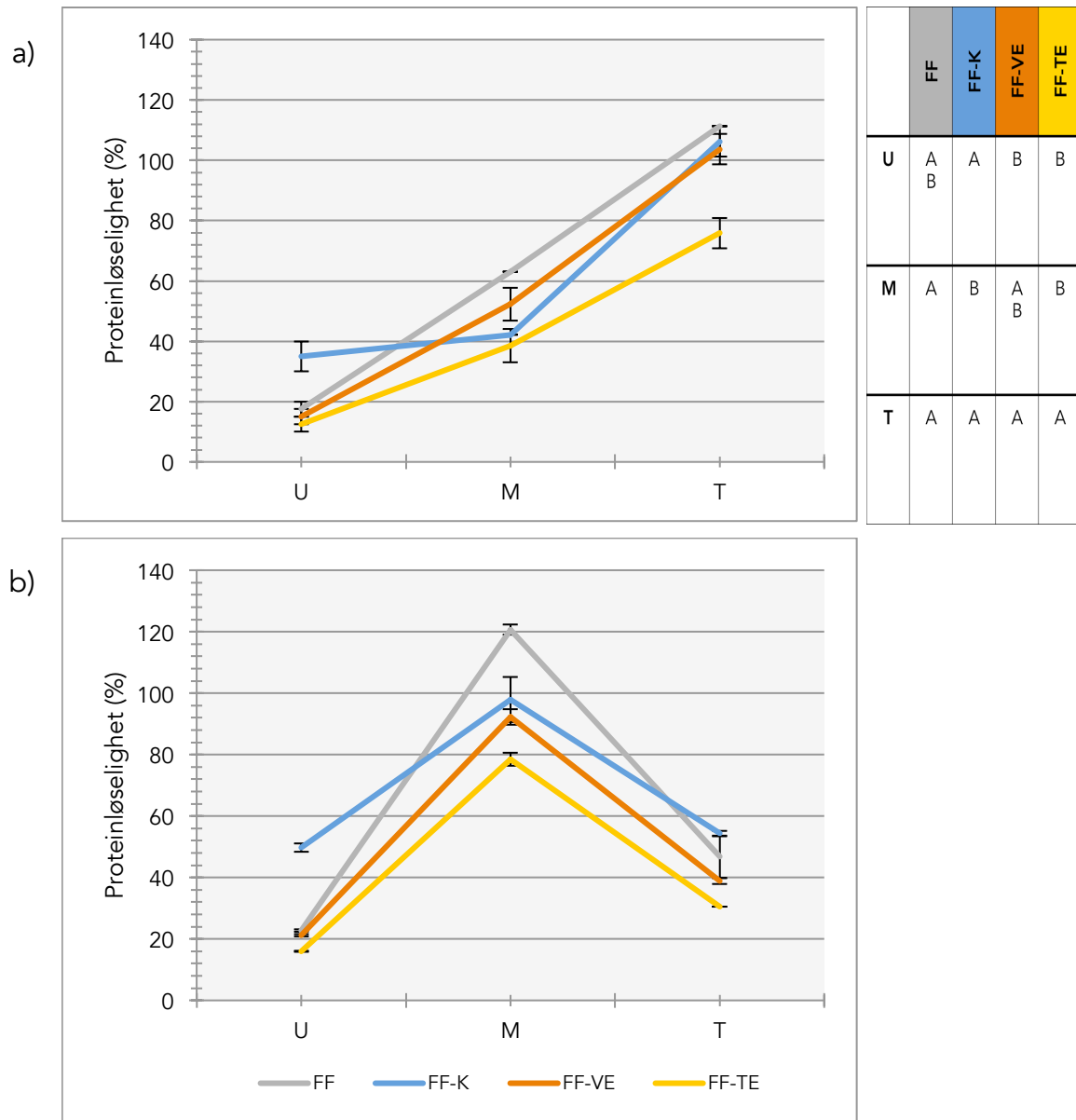


**Figur 6.** Proteinkonsentrasjon (mg/g fordøyd åkerbønneprøve) med standardavvik i de proteinerikede fordøyde bønneprøvene (løselig del, to paralleller), beregnet etter formel 1. a) beregnet etter resultater fra Dumas-analyse; ulike bokstaver innad i hver fordøyelsesfase (U, M og T) indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ), b) beregnet etter resultater fra kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit. U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve; FF, finfraksjon, rå; FF-K, finfraksjon, kokt grøt; FF-VE, finfraksjon, våtekstrudert; FF-TE, finfraksjon, tørrekstrudert. Korrelasjon mellom Dumas (a) og BCA-analysen (b): alle prøver,  $R^2 = 0,02223$ ; ufordøyde prøver,  $R^2 = 0,9964$ ; mageprøver,  $R^2 = 0,75534$ ; tarmprøver,  $R^2 = 0,66247$ .

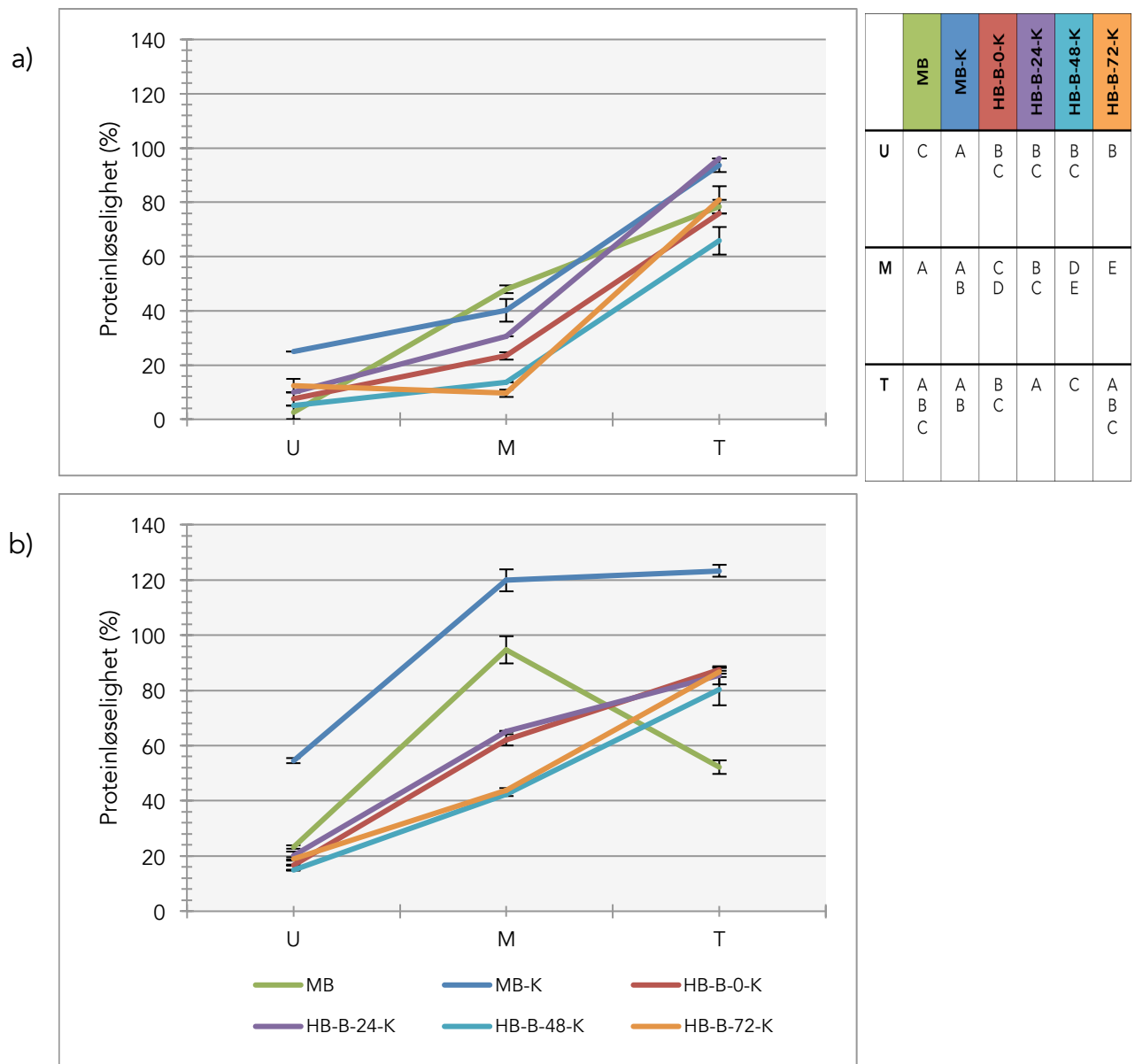


**Figur 7.** Proteinkonsentrasjon (mg/g fordøyd åkerbønneprøve) med standardavvik i fordøyde prøver (løselig del, to paralleller) tillaget fra de fullformalte og hele bønnene, beregnet etter formel 1. a) beregnet etter resultater fra Dumas-analyse; ulike bokstaver innad i hver fordøyelsesfase (U, M og T) indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ), b) beregnet etter resultater fra kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit. U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve; MB, fullformalt bønne, rå; MB-K, fullformalt bønne, kokt grøt; HB-B-0-K, hel bønne, bløtlagt og kokt; HB-B-24-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 24 t og kokt; HB-B-48-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 48 t og kokt; HB-B-72-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 72 t og kokt. Korrelasjon mellom Dumas (a) og BCA-analysen (b): alle prøver,  $R^2 = 0,58837$ ; ufordøyde prøver,  $R^2 = 0,74918$ ; mageprøver,  $R^2 = 0,77899$ ; tarmprøver,  $R^2 = 0,2359$ .

Proteinløseligheten (%) i U, M og T av åkerbønneprøvene ble beregnet fra teoretisk proteinkonsentrasjon (korrigert for fortyninger under fordøyelse) og målt proteinkonsentrasjon fra Dumas-analysen og Micro BCA Protein Assay Kit i henhold til formel 2. Beregnet proteinløselighet fra begge analysemetoder, samt output fra statistisk analyse av verdiene fra Dumas-analysen, er vist i figur 8 og 9.



**Figur 8.** Proteinløselighet (%) med standardavvik i de proteinanrikede fordøyde bønneprøvene (løselig del, to paralleller), beregnet etter formel 2. a) beregnet etter resultater fra Dumas-analyse; ulike bokstaver innad i hver fordøyelsesfase (U, M og T) indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ), b) beregnet etter resultater fra kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit. U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve; FF, finfraksjon, rå; FF-K, finfraksjon, kokt grøt; FF-VE, finfraksjon, våtekstrudert; FF-TE, finfraksjon, tørrekstrudert. Korrelasjon mellom Dumas-analysen (a) og BCA-analysen (b): alle prøver,  $R^2 = 0,02223$ ; ufordøyde prøver,  $R^2 = 0,9964$ ; mageprøver,  $R^2 = 0,75534$ ; tarmprøver,  $R^2 = 0,66247$ .



**Figur 9.** Proteinløselighet (%) med standardavvik i fordøyde prøver (løselig del, to paralleller) tillaget fra de fullformalte og hele bønnene, beregnet etter formel 2. a) beregnet etter resultater fra Dumas-analyse; ulike bokstaver innad i hver fordøyelsesfase (U, M og T) indikerer signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ), b) beregnet etter resultater fra kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit. U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve; MB, fullformalt bønne, rå; MB-K, fullformalt bønne, kokt grøt; HB-B-0-K, hel bønne, bløtlagt og kokt; HB-B-24-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 24 t og kokt; HB-B-48-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 48 t og kokt; HB-B-72-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 72 t og kokt. Korrelasjon mellom Dumas (a) og BCA-analysen (b): alle prøver,  $R^2 = 0,58837$ ; ufordøyde prøver,  $R^2 = 0,74918$ ; mageprøver,  $R^2 = 0,77899$ ; tarmprøver,  $R^2 = 0,2359$ .

Det ble utført lineær regresjon i Excel (se vedlegg 2–3) for å vurdere samsvaret mellom de to analysemetodene (Dumas og BCA). Hele *in vitro* fordøyelsesprosessen sett under ett ga ingen korrelasjon mellom analysemetodene etter måling av de proteinanrikede

prøvene ( $R^2 = 0,02223$ ), mens korrelasjonen var lav etter måling av prøvene fra fullformalte og hele bønner ( $R^2 = 0,58837$ ). Analysemetodene viste en sterkt positiv korrelasjon etter måling av de ufordøyde proteinanrikede prøvene ( $R^2 = 0,9964$ ), mens denne korrelasjonen var lavere etter måling av prøvene fra fullformalte og hele bønner ( $R^2 = 0,74918$ ). Måling av mageprøvene ga en relativt lav korrelasjonen mellom analysemetodene, men her var korrelasjonen ganske lik etter måling av de proteinanrikede bønneprøvene ( $R^2 = 0,75534$ ) og prøvene fra fullformalte og hele bønner ( $R^2 = 0,77899$ ). Dumas-metoden og BCA-metoden ga en lav korrelasjon etter måling av de proteinanrikede tarmprøvene ( $R^2 = 0,66247$ ), og en veldig lav korrelasjon etter måling av tarmprøvene fra fullformalte og hele bønner ( $R^2 = 0,2359$ ).

Beregninger etter nitrogeninnholdet fra Dumas-analysen ga størst proteinkonsentrasjon og proteinløselighet i alle tarmprøver (figur 6a–9a), mens disse verdiene var størst i mageprøvene for alle de proteinanrikede prøvene og det rå melet (MB) etter beregninger fra BCA-analysen (figur 6b–9b). For de resterende prøvene (MB-K, HB-B-0-K, HB-B-24-K, HB-B-48-K og HB-B-72-K) viste beregninger etter BCA-analysen størst proteinkonsentrasjon og proteinløselighet i tarmprøvene, i likhet med beregningene etter Dumas-analysen. Tre av de proteinanrikede tarmprøvene (FF, FF-K og FF-VE) fikk beregnet en proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) på  $>100$  etter Dumas-analysen. Beregninger fra BCA-analysen viste verdier på  $>100$  i mageprøven av FF og i mage- og tarmprøven av MB-K.

Blant de proteinanrikede tarmprøvene (figur 6 og 8) viste beregningene etter Dumas-analysen og BCA-analysen størst proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) i henholdsvis FF (111,3) og FF-K (54,3), og lavest proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) i FF-TE (75,9 fra Dumas og 30,5 fra BCA). FF-TE hadde lavest proteinkonsentrasjonen/proteinløseligheten både før (ufordøyd prøve), under (mageprøve) og etter (tarmprøve) *in vitro* fordøyelse. Blant tarmprøvene fra de fullformalte og hele bønnene (figur 7 og 9) var proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) beregnet etter Dumas-analysen størst i henholdsvis 24 timer spirt prøve (HB-B-24-K) (96,1), kokt grøt (MB-K) (93,6) og 72 timer spirt prøve (HB-B-72-K) (81,0), og lavest i henholdsvis 48 timer spirt prøve (HB-B-48-K) (65,8), 0 timer spirt prøve (HB-B-0-K) (75,9) og det rå melet (MB) (78,4). Noe tilsvarende resultat for tarmprøvene var å se

etter beregninger fra BCA-analysen, men her hadde de bløtlagte og spirte prøvene en mer lik proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) (80,3–87,5). I tillegg viste tarmprøven av MB en mye lavere proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) (52,2) sammenlignet med de andre prøvene. Blant de ufordøyde prøvene var proteinkonsentrasjonen og proteinløseligheten størst i den kokte grøten (FF-K og MB-K) etter beregning fra begge analysemetoder.

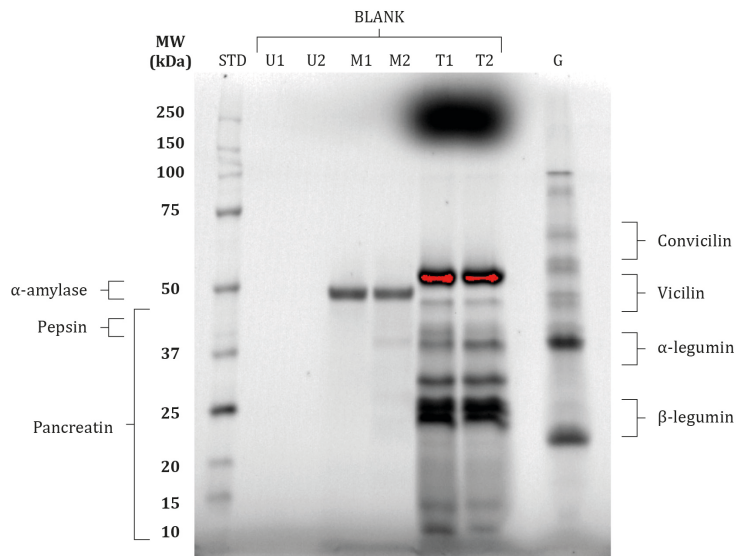
For å undersøke om det var signifikante forskjeller i proteinløselighet mellom prøvene, og hvor disse forskjellene eventuelt eksisterte, ble det utført enveis ANOVA og Tukey test i R Commander med verdiene fra Dumas-analysen (se vedlegg 4–6). Blant de proteinanrikede prøvene før (ufordøyde prøver) *in vitro* fordøyelse var den kokte grøten (FF-K) signifikant ( $p < 0,05$ ) mer løselig enn begge de ekstruderte prøvene. Under (mageprøver) fordøyelsen viste rå finfraksjon (FF) signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere løselighet FF-K og den tørrekstruderte bønneprøven (FF-TE). Etter *in vitro* fordøyelse (tarmprøver) var det imidlertid ingen signifikante forskjeller på et 5 % signifikansnivå, men FF-TE viste en lavere løselighet enn FF på et 10 % signifikansnivå. Når det gjelder prøvene fra fullformalte og hele åkerbønner før *in vitro* fordøyelse (ufordøyde prøver) hadde den kokte grøten (MB-K) en signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere løselighet enn alle de andre prøvene. Her var det kun MB-K ( $p < 0,001$ ) og 72 timer spirt prøve ( $p < 0,05$ ) som var signifikant mer løselig enn den rå prøven (MB). Etter *in vitro* fordøyelse (tarmprøver) hadde 24 timer spirt prøve en signifikant høyere løselighet enn både 0 timer spirt prøve ( $p < 0,05$ ) og 48 timer spirt prøve ( $p < 0,01$ ). 24 timer spirt prøve viste også en høyere løselighet enn MB (på et 10 % signifikansnivå). Ved sammenligning av de rå bønneprøvene (FF og MB) og den kokte grøten (FF-K og MB-K), viste det rå melet (MB) signifikant ( $p < 0,05$ ) lavere løselighet enn FF-K og MB-K før *in vitro* fordøyelse. I tarmprøvene viste MB signifikant ( $p < 0,05$ ) lavere løselighet enn både FF og FF-K.

### 4.3 Proteinprofil før, under og etter *in vitro* fordøyelse

Sammensetningen av proteiner (proteinprofilen) i de ulike åkerbønneprøvene før fordøyelse, og endringene av denne proteinprofilen som fant sted under *in vitro* fordøyelse ble analysert ved SDS-PAGE. Både løselig og uløselig del (sammen) av de ufordøyde åkerbønneprøvene, mageprøvene og tarmprøvene, samt den blanke prøven

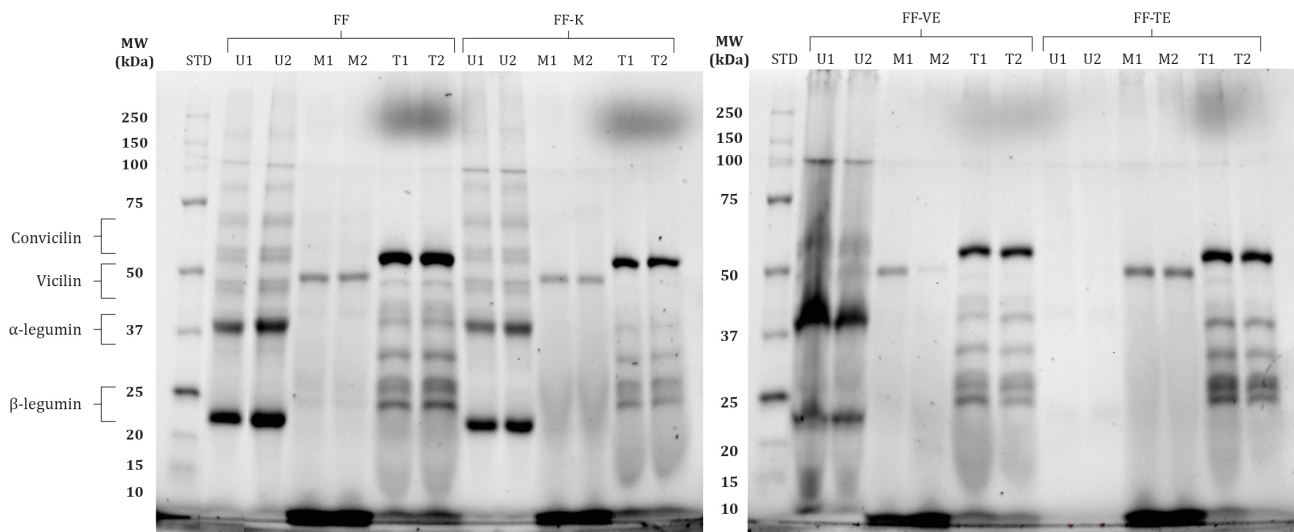


(fordøyelsesenzymer) og den stivelsesrike grovfraksjonen (G), ble separert ved hjelp av gelelektroforese for å studere nedbrytningsveiene av de ulike typene av åkerbønnprotein, som convicilin, vicilin,  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin. Resultatene av gelelektroforesen er vist i figur 10–13.



**Figur 10.** Proteinprofil i grovfraksjonen (G), samt profil av fordøyelsesenzymene i den blanke prøven etter SDS-PAGE (ikke farget). Molekylvekten (MW) av subenheter av hovedlagerproteinene (convicilin, vicilin,  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin) er markert i henhold til Bennetau-Pelissero (2019), Shevkani et al. (2019) og Warsame et al. (2018). MW av enzymer tilsatt i fordøyelsesprosessen ( $\alpha$ -amylase, pepsin og proteinsammensetning i pancreatin) er også markert, i henhold til UniProt (2020). STD, standardprøve med proteiner av kjent MW; U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.

Figur 10 viser at den blanke prøven (fordøyelsesenzymer, ingen bønneproteiner) kun ga proteinbånd i mage- og tarmprøver. Mageprøven viste ett proteinbånd ved 50 kDa, som svarer til  $\alpha$ -amylase tilsatt i munnfasen. Tarmprøven hadde sterke proteinbånd fra i underkant av 25 til litt over 50 kDa. Disse proteinbåndene svarer til pepsin, som har en molekylvekt på rundt 42 kDa, og pancreatin; blandingsprodukt av enzymer med molekylvekt fra rundt 18–55 kDa. Proteinbåndet ved litt over 50 kDa var en del sterkere enn de andre båndene. Tarmprøven hadde også noen svakere proteinbånd ved 10, 15 og 20 kDa. Grovfraksjonen ga mange proteinbånd, fra rundt 22 til 250 kDa. Proteinbåndene ved 22 og 37 kDa, hvor  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin kan detekteres, var spesielt sterke. Et proteinbånd ved 100 kDa var relativt skarpt.

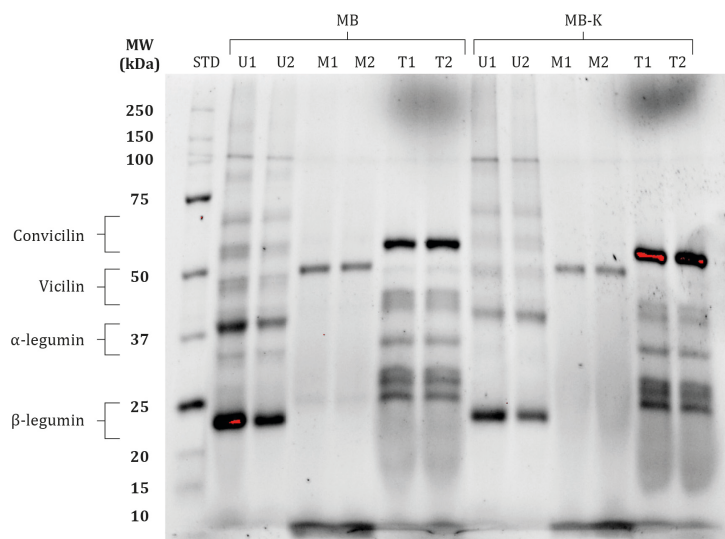


**Figur 11.** Proteinprofil før, under og etter in vitro fordøyelse i de proteinanrikede bønneprøvene (løselig og uløselig del) etter SDS-PAGE (ikke farget). Molekylvekten (MW) av subenheter av hovedlagerproteinene (convicilin, vicilin,  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin) er markert i henhold til Bennetau-Pelissero (2019), Shevkani et al. (2019) og Warsame et al. (2018). STD, standardprøve med proteiner av kjent MW; FF, finfraksjon rå; FF-K, finfraksjon, kokt grøt; FF-VE, finfraksjon, våtekstrudert; FF-TE, finfraksjon, tørrekstrudert; U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.

Figur 11 viser resultatene av SDS-PAGE for de proteinanrikede bønneprøvene (FF, FF-K, FF-VE og FF-TE). Proteinprofilen av de ufordøyde prøvene (U) var ganske lik mellom FF og FF-K. Disse viste mange proteinbånd fra rundt 22 til 250 kDa, hvor konsentrasjonen var størst av proteiner med MW på 22 og 37 kDa; hvor  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin kan detekteres. Den våtekstruderte ga tydelige bånd ved 22 og 37 kDa, samt et relativt skarpt bånd ved 100 kDa. Proteinbåndet nær 37 kDa var spesielt tydelig. Den tørrekstruderte ga imidlertid veldig svake proteinbånd, og denne ble analysert på nytt for å se om det kunne ha skjedd en feil i forbindelse med første gelkjøring. Ny kjøring ga noe tydeligere proteinbånd, men ikke mye, og det ansees derfor riktig at proteinbåndene i ufordøyd tørrekstrudert prøve er svakere enn våtekstrudert prøve.

Proteinprofilen av mage- og tarmprøvene (M og T) var nokså lik mellom FF, FF-K, FF-VE og FF-TE. Mageprøvene viste lave konsentrasjoner av intakte proteiner sammenlignet med ufordøyde prøver, med unntak av ett sterkere proteinbånd rundt 50 kDa. Dette båndet svarer til enzymet  $\alpha$ -amylase tilsatt i munnfasen. I tillegg har mageprøvene et tydelig felt med peptider i det lavmolekylære området (<10 kDa) som ikke er tilstede i

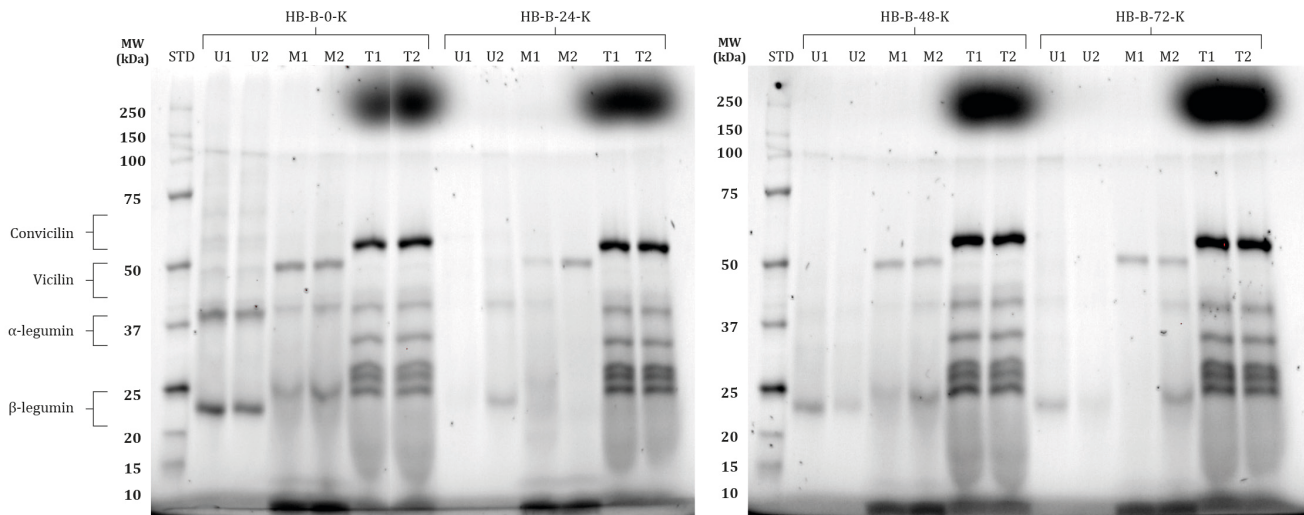
ufordøyde prøver. Prøvene fra tarmfasen viste flere og sterkere proteinbånd i underkant av 25 til litt over 50 kDa. Proteinbåndet ved 50 kDa er sterkest, og de nederste (ved 25 kDa) er også tydeligere enn de midtre proteinbåndene (ved 37 kDa). Alle de nevnte proteinbåndene i tarmprøvene ble også detektert i den blanke prøven (figur 10), og svarer derfor til fordøyelsesenzymmer. I tarmprøvene for alle de fire proteinanrikede bønneprøvene er det også et felt med peptidbånd i det lavmolekylære området, men disse er svakere enn i mageprøvene.



**Figur 12.** Proteinprofil før, under og etter in vitro fordøyelse i det rå melet (MB) og den kokte grøten av fullformalte bønner (MB-K) (løselig og uløselig del) etter SDS-PAGE (ikke farget). Molekylvekten (MW) av subenheter av hovedlagerproteinene (convicilin, vicilin,  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin) er markert, i henhold til Bennetau-Pelissero (2019), Shevkani et al. (2019) og Warsame et al. (2018). STD, standardprøve med proteiner av kjent MW; U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.

Figur 12 viser proteinprofilen av prøvene fra de fullformalte bønnene. Profilen av både ufordøyd prøve, mageprøve og tarmprøve er nokså lik mellom MB og MB-K, og den er igjen liknende proteinprofilen for FF og FF-K (figur 11). De ufordøyde prøvene viste proteinbånd fra i underkant av 25 til rundt 250 kDa, med sterkest konsentrasjon av protein/peptider ved 22 og 37 kDa; hvor  $\alpha$ - og  $\beta$ -legumin kan detekteres. Mageprøvene hadde ett tydelig proteinbånd ved 50 kDa, tilsvarende  $\alpha$ -amylase, samt et felt peptider i det lavmolekylære området (<10 kDa). Tarmprøvene viste proteinbånd fra i underkant av 25 til litt over 50 kDa, med sterkest konsentrasjon av protein med MW på i overkant av 50 kDa. De nedre proteinbåndene (ved 25 kDa) var noe sterkere enn de midtre proteinbåndene (ved 37 kDa). De nevnte proteinbåndene i tarmprøvene svarer til

fordøyelsesenzymmer tilsatt i mage- og tarmfasen, ettersom disse proteinbåndene også ble detektert i den blanke prøven (figur 10). Tarmprøvene av MB og MB-K viste, i likhet med mageprøvene, et felt med peptider i det lavmolekylære området, men med noe lavere konsentrasjon.



**Figur 13.** Proteinprofil før, under og etter *in vitro* fordøyelse i prøvene (løselig og uløselig del) av de bløtlagte og kokte hele bønnene spirt i 0 (HB-B-0-K), 24 (HB-B-24-K), 48 (HB-B-48-K) og 72 (HB-B-72-K) timer etter SDS-PAGE (ikke farget). Molekylvekten (MW) av subenheter av hovedlagerproteinene (convicilin, vicilin,  $\alpha$ -legumin og  $\beta$ -legumin) er markert i henhold til Bennetau-Pelissero (2019), Shevkani et al. (2019) og Warsame et al. (2018). STD, standardprøve med proteiner av kjent MW; U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.

Resultatene fra SDS-PAGE av de bløtlagte og kokte bønneneprøvene med ulike spiretider er vist i figur 13. Disse prøvene viste tilsvarende proteinprofil i tarmprøvene som FF, FF-K, FF-VE, FF-TE, MB og MB-K, (figur 11 og 12) med proteinbånd fra rundt 25 til litt over 50 kDa, tilsvarende enzymer tilsatt under *in vitro* fordøyelse. Tarmprøvene viste også et felt peptidbånd i det lavmolekylære området (<10 kDa). I ufordøyde prøver ble proteinbånd detektert ved 25, 37 og 100 kDa, men båndene var veldig svake i de spirte prøvene, spesielt båndet ved 37 kDa i 48 og 72 timer spirt prøve. Den ene parallellen av de ufordøyde spirte prøvene var generelt svakere. Proteiner/peptider ble detektert i området 22 til 100 kDa, med størst konsentrasjon rundt 22 og 37 kDa. Mageprøvene viste proteinbånd ved 25, 37 og 50 kDa, samt i det lavmolekylære området. Proteinbåndet ved 50 kDa svarer til enzymet  $\alpha$ -amylase. Ufordøyde prøver og mageprøver av HB-B-24-K og HB-B-72-K viste forskjell i de to parallellene. Disse

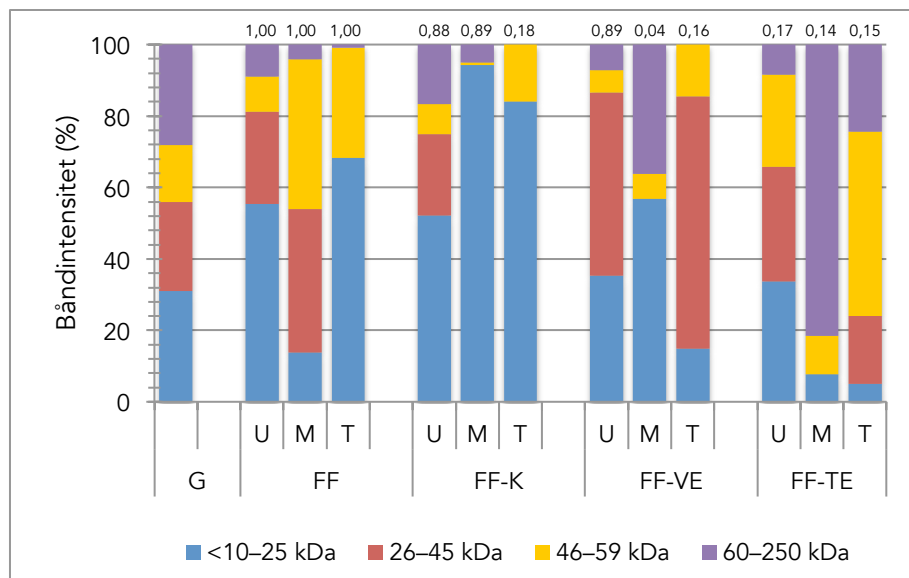
prøvene ble derfor analysert på nytt for å se om det kunne ha skjedd en feil ved applisering av prøvene, men den nye gelen viste liknende resultater.

I alle tarmprøver ble det detektert en tydelig skygge i det høymolekylære området. Dette er ikke del av proteinfraksjonen fra åkerbønnen, men et resultat av pancreatin-enzymene tilsatt i tarmfasen under *in vitro* fordøyelse ettersom denne skyggen også detekteres i den blanke prøven (figur 10). Ved farging av gelene ville disse tydelige skyggene blitt fjernet.

De lavmolekylære gelene med og uten «cut off» ved 10 kDa (se vedlegg 1) ga veldig utydelige proteinbånd i det lavmolekylære området (2–10 kDa). Etter «cut off» ble det kun detektert proteinbånd i mageprøven.

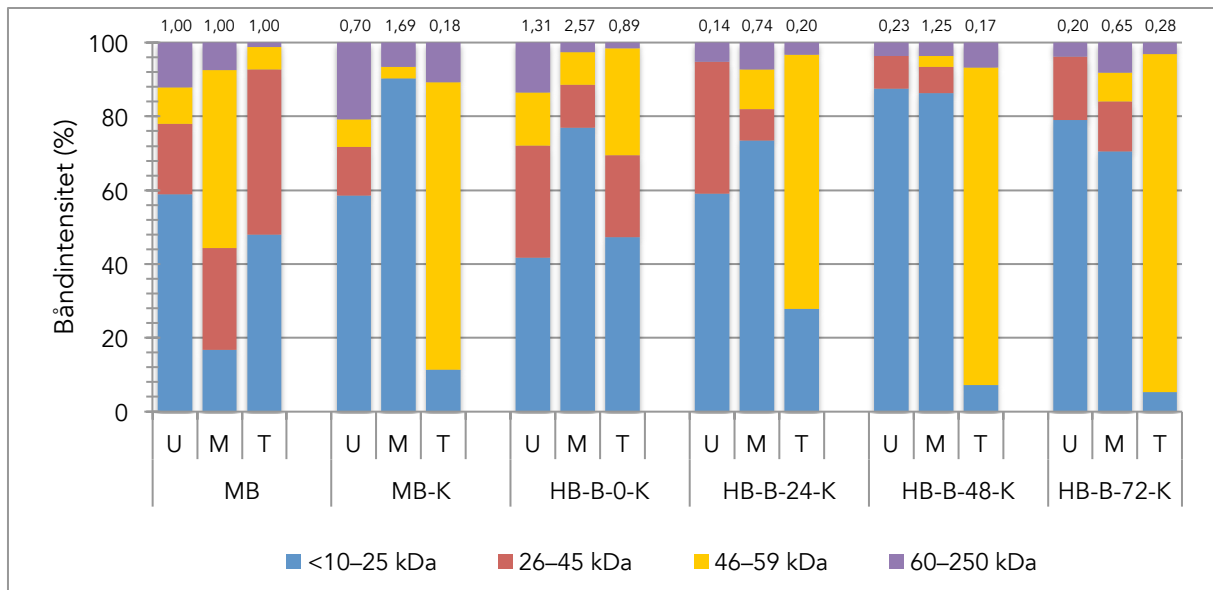
#### **4.3.1 Semikvantitativ bestemmelse av proteiner etter SDS-PAGE**

Før intensitetsberegning av proteinene i alle fordøyde åkerbønneprøver ble det gjort en ny analyse med SDS-PAGE (gelkjøring 2, tabell 5). Her ble MW standarden applisert tre ganger per gel (helt til venstre, i midten og helt til høyre) for å kunne korrigere for variasjon i intensitet innad i en gel og mellom gelene, og derved unngå gel-til-gel-variasjon etter beregning. Her ble også de blanke prøvene (enzymet) applisert til alle gelene (ettersom intensiteten var ulik mellom geler), for å kunne korrigere for proteinet i fordøyelsesekstraktene ved beregning av mengde protein. Alle gelene ble farget for å tydeliggjøre proteinbåndene og for å fjerne skygger som oppsto i det høymolekylære området av alle tarmprøver, slik at ikke eventuelt støy ble medberegnet. Ved intensitetsberegning med bruk av Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) ble mengden protein slått sammen i fire molekylære områder (<10–25, 26–45, 46–59 og 60–250 kDa), tilsvarende områdene på gelen med protein av henholdsvis  $\beta$ -legumin,  $\alpha$ -legumin, vicilin og convicilin. Figur 14 og 15 viser den beregnede båndintensiteten i de fire molekylære områdene i % av total intensitet for prøvene. Alle prøver ble normalisert til 100 %.



**Figur 14.** Båndintensitet (% av total intensitet for prøven) i fire molekylære områder for de fraksjonerte bønneprøvene (begge paralleller fra fordøyelsen; løselig og uløselig del) etter SDS-PAGE. Verdiene er normalisert til 100 %. Verdiene over stolpene viser forholdstallet med rå prøve (FF). U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, Tarmprøve; G, grovfraksjon, rå; FF, finfraksjon, rå; FF-K, finfraksjon, kokt grøt; FF-VE, finfraksjon, våtekstrudert; FF-TE, finfraksjon, tørrekstrudert.

Figur 14 viser båndintensitetsprofilen for de fordøyde proteinanrikkede bønneprøvene og den stivelsesrike grovfraksjonen (G). Mageprøven av rå prøve (FF) ga proteinbånd i alle de molekylære områdene, med størst intensitet ved 26–59 kDa, tilsvarende  $\alpha$ -legumin og vicilin. Grøten (FF-K) hadde derimot størst intensitet i det lavmolekylære området (<10–25 kDa) etter fordøyelse i mage. Dette gjelder også for våtekstrudert prøve (FF-VE), men her er intensiteten av proteinbåndene i det høymolekylære området (60–250 kDa), tilsvarende convicilin, større sammenlignet med FF-K. Mageprøven av FF-TE hadde størst intensitet av proteinbånd i området 60–250 kDa, og lavere intensitet i det lavmolekylære området (motsatt av FF-VE). Totalt sett er det mer lavmolekylært protein i FF-K, og mer høymolekylært protein i FF-VE og FF-TE. Når det gjelder tarmprøvene, er båndintensiteten størst i området <10–25 kDa for FF og FF-K. Intensiteten i dette området var større enn i mageprøven for FF, mens den var lavere for FF-K. De ekstruderte tarmprøvene hadde lavere båndintensitet i det lavmolekylære området sammenlignet med FF og FF-K. Tarmprøvene av FF-VE og FF-TE hadde proteinbånd fordelt over flere molekylære områder, med størst spredning og flere høymolekylære bånd for FF-TE. De ufordøyde prøvene hadde en nokså lik intensitetsprofil, men FF-TE hadde noe høyere intensitet i høymolekylært område. G fikk en liknende proteinprofil som den ufordøyde prøven av FF-TE.



**Figur 15.** Båndintensitet (% av total intensitet for prøven) i fire molekulære områder for prøvene fra fullformalte og hele bønner (begge paralleller fra fordøyelsen; løselig og uløselig del) etter SDS-PAGE. Verdiene er normalisert til 100 %. Verdiene over stolpene viser forholdstallet med rå prøve (MB). U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, Tarmprøve; MB, fullformalt bønne, rå; MB-K, fullformalt bønne, kokt grøt; HB-B-0-K, hel bønne, bløtlagt og kokt; HB-B-24-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 24 t og kokt; HB-B-48-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 48 t og kokt; HB-B-72-K, hel bønne, bløtlagt, spirt 72 t og kokt.

Figur 15 viser båndintensitetsprofilen for prøvene fra de fullformalte og hele bønnene. I mageprøvene er intensiteten av proteinbånd størst i det lavmolekulære området (<10–25 kDa), utenom for den rå prøven (MB). Intensiteten i det lavmolekulære området er størst i mageprøven av grøten (MB-K), etterfulgt av 48 timer spirt prøve (HB-B-48-K). Når det gjelder tarmprøvene er proteinprofilen i MB og HB-B-0-K ulik fra de andre bønneprøvene ved at proteinbåndene er representert i alle de molekulære områdene, med størst intensitet også her i området <10–25 kDa. MB-K og de spirte prøvene har liten intensitet i lavmolekulært område, og størst intensitet i området 46–59 kDa. Intensiteten av proteinbåndene i området <10–25 kDa er lavest i 72 timer spirt prøve (HB-B-72-K), etterfulgt av 48 timer spirt prøve (HB-B-48-K) og MB-K. I ufordøyde prøver var intensiteten størst i lavmolekulært område (spesielt for de spirte prøvene) i alle bønneprøver utenom HB-B-0-K. Profilen av ufordøyde prøver fra MB-K var ganske lik profilen for MB.





## 5. DISKUSJON

I denne masteroppgaven ble det undersøkt effekten av våtekstrudering, tørr-ekstrudering, bløtlegging, spiring ved tre ulike tider (24, 48 og 72 timer) og koking på *in vitro* proteinfordøyelighet av åkerbønner (*V. faba*) av sorten Vertigo dyrket i Norge. Hensikten med denne studien var å bidra med kunnskap og data til forskningsprosjektet FoodProFuture, hvor hovedmålet er å øke mangfoldet av norskproduserte plantebaserte råvarer med god ernæringsmessig kvalitet og som samtidig er attraktive for forbrukerne. Ernæringsverdien av matvarer avhenger i stor grad av ernæringskvaliteten til proteinene, og ernæringskvaliteten av proteiner avgjøres av fordelingen av aminosyrer og fordøyeligheten (Drulyte & Orlien, 2019).

For at kroppen skal ha god nytte av et proteinrikt produkt er det avgjørende at mest mulig av proteinet blir absorbert etter fordøyelse. Dersom proteinfordøyeligheten er lav vil næringsutbyttet reduseres, hvilket vil være kritisk for matsikkerheten i den raskt voksende befolkningen. Proteiner som ikke absorberes vil føres til tykktarmen hvor de blir fermentert av tykktarmbakteriene. Spesielt er dette tilfellet for planteprotein, som i mindre grad fordøyes i den øvre delen av tynntarmen slik at mengden N fra protein øker i tykktarmen (Tomé, 2013). En større andel protein og N i tykktarmen som følge av lav proteinfordøyelighet er vist å ha negativ påvirkning på tarmhelsen da potensielt patogene og proinflammatoriske bakterier favoriseres (Yao et al., 2016). Dette gir redusert produksjon av kortkjedede fettsyrer og økt konsentrasjon av ammoniakk, fenoler og hydrogensulfider; som kan ha en negativ innvirkning på tarmepitelstrukturen, forårsake slimhinnebetennelse og modulere det enteriske nervesystemet og tarmens bevegelighet (Yao et al., 2016). Fordøyeligheten av planteprotein er i utgangspunktet (i nativ tilstand) lavere sammenlignet med animalsk protein (Damodaran et al., 2008; Tomé, 2013). En faktor som påvirker fordøyeligheten omhandler strukturen av proteinet, som vil kunne endres under forhold som medfører proteindenaturering, deriblant høye temperaturer (Damodaran et al., 2008). Prosesseringer med bruk av varme er derfor forventet å gi endret proteinfordøyelighet. Andre faktorer relaterer til matmatrisen og proteininteraksjoner med komponenter som karbohydrater, lipider og spesielt antinæringsstoffer; deriblant proteaseinhibitorer,

tanniner og fytinsyre (Drulyte & Orlien, 2019). I tillegg vil konsumentens helse og alder, prepareringen av matvaren og kostholdet i sin helhet være medvirkende faktorer til graden av fordøyelighet (Tulbek et al., 2017).

Ved beregning av proteinfordøyelighet anslås mengden N og aminosyrer som er tilgjengelige for organismen etter fordøyelse og absorpsjon (Tomé, 2013). Fordøyeligheten kan i denne sammenheng (*in vitro* fordøyelse) bestemmes fra mengden løselig protein i de simulerte tynntarmprøvene, og begrepet *proteinfordøyelighet* blir derfor benyttet ved omtale av løselighet *etter* fordøyelse (tarmprøver). Begrepet *proteinløselighet* blir likevel i stor grad benyttet videre, ettersom proteinløseligheten ble beregnet som et mål på proteinfordøyelighet.

## 5.1 BCA-analyse og Dumas-analyse som metoder for måling av proteinløselighet

Løseligheten av proteiner påvirker funksjonaliteten til proteinene, som evnen til viskositetsøkning og å danne skum, geler og emulsjoner. Et uløselig protein har svært begrensede bruksområder som funksjonell egenskap i næringsmidler (Damodaran et al., 2008). Samtidig vil løseligheten påvirke i hvilken grad proteinet fordøyes. Hensikten med å analysere løselig protein i de fordøyde preparatene var å vurdere graden av tilgjengelig protein i tynntarmen, altså hvor mye av proteinet i åkerbønneprøvene som kan sies å ha blitt fordøyd. Det er viktig å bemerke at det målte proteinet i de simulerte tarmprøvene ikke nødvendigvis er tilgjengelig for absorpsjon, da noe av proteinet og større peptider mest sannsynlig må bli videre brutt ned av peptidaser i børstesømmen. Proteinløseligheten ble målt på den løselige delen av åkerbønneprøvene etter *in vitro* fordøyelse ved både å måle nitrogeninnhold med Dumas-metoden og ved kolorimetrisk analyse med Micro BCA Protein Assay Kit. Hensikten med å utføre begge analysene for beregning av proteinløselighet var i all hovedsak å sammenligne resultatene fra BCA-analysen med resultatene fra Dumas-analysen for å undersøke om BCA-metoden gir et pålitelig mål på løselig protein, og om denne analysen kan benyttes ved vurdering av proteinfordøyelighet.

I BCA-analysen er det blant annet peptidbindinger som driver reaksjonen som danner BCA-Cu-komplekset som blir målt, og her kan lave verdier for proteinløselighet etter *in vitro* fordøyelse enten bety 1) at det er lite protein i den løselige delen, hvilket indikerer en lav fordøyelighet, eller 2) at det er få peptidbindinger i den løselige delen fordi mye av proteinet er brutt opp til peptider og aminosyrer, hvilket indikerer en høy fordøyelighet. For å vurdere resultatene fra BCA-analysen riktig – om det er scenario 1 eller 2 som er tilfellet for prøven – ble innholdet av N målt etter Dumas-metoden i den løselige delen av fordøyde prøver. I Dumas-analysen måles N både i form av aminosyrer, peptider og proteiner (i tillegg til ikke-protein N), altså må ikke peptidbindinger være intakte for at proteinet skal bli medberegnet. En høy andel N forteller i dette tilfellet (fordøyelse) at det er mye protein, peptider og/eller aminosyrer i den løselige delen av prøven, altså er en større andel av proteinet blitt fordøyd.

Beregninger etter BCA-analysen ga varierende og usystematiske resultater som hadde en lav korrelasjon med Dumas-analysen ( $R^2 = 0,02223$  for proteinanrikede prøver,  $R^2 = 0,58837$  for prøver av fullformalte og hele bønner). Beregninger fra BCA-analysen ga tilsynelatende lavere proteinløselighet i tarmprøvene sammenlignet med mageprøvene for flere av åkerbønneprøvene, og spesielt påfallende er dette for de proteinanrikede prøvene. Det var imidlertid å forvente en høyere proteinløselighet i tarmprøvene sammenlignet med mageprøvene ettersom proteolysen, med dannelse av mindre og mer løselige komponenter (peptider og aminosyrer), hovedsakelig skjer i tynntarmen. Dette viste beregningene fra Dumas-analysen. Forventningen om størst løselighet i tarmprøvene kan også, i tillegg til økt proteolytisk aktivitet, forklares av det faktum at løselighet av proteiner oftest vil være lavest ved pH rundt det isoelektriske punkt (pI) av proteinet. Åkerbønneprotein har en lav pI ettersom summen av Asp og Glu er større enn summen av Lys, Arg og His (Damodaran et al., 2008). Åkerbønneprotein vil derfor naturlig vise lavere løselighet i mageprøvene (~pH 3) sammenlignet med tarmprøvene (~pH 7). I hvilken grad pH har påvirket løseligheten er likevel vanskelig å si ettersom det er vanskelig å skille effektene av proteolytisk aktivitet og pH. Et fordøyelsesoppsett uten tilsetning av fordøyelsesenzymmer ville eventuelt gitt et klarere bilde på effekten av pH.

Høyere løselighet i tarmprøvene sammenlignet med ufordøyde prøver og mageprøver etter beregninger fra Dumas-analysen betyr at tarmprøvene hadde størst konsentrasjon av N, altså mer løselig og tilgjengelig protein, peptider og/eller aminosyrer. De lave verdiene for proteinløselighet i tarmprøvene etter beregninger fra BCA-analysen betyr i dette tilfellet derfor en høy hydrolysegrad (scenario 2). En forklaring på tilsynelatende lav proteinløselighet i tarmprøvene etter beregninger fra BCA-analysen er at denne analysen (blant annet) detekterer peptidbindinger, og at signaler har gått tapt som følge av økt hydrolysegrad (tap av peptidbindinger) med dannelse av kortkjedede peptider og frie aminosyrer. Mageprøvene fikk en tilsynelatende høyere proteinløselighet enn tarmprøvene grunnet en lavere proteolytisk aktivitet i magen, hvor kun en mindre andel av proteinet vil være brutt opp i større peptider slik at de fleste peptidbindinger fremdeles er intakte og blir målt i BCA-analysen. Dette vil si at man i BCA-analysen mister mye signal på grunn av tap av peptidbindinger under proteolyse.

Resultatene fra Dumas-analysen er derfor viktige for å kunne tolke resultatene fra BCA-analysen i den retning at tarmprøvene hadde størst proteinløselighet og hydrolysegrad, og derved mest tilgjengelig protein, som også er logisk ettersom proteinfordøyelsen hovedsakelig skjer i tynntarmen. Det kan tyde på at BCA-metoden ikke fungerer til den hensikten å analysere proteinfordøyelse. Selv om Dumas-analysen tilsynelatende gir mer korrekte resultater ved beregning av proteinløselighet, finnes også ulemper ved denne analysen. Blant annet er det en fare for å overestimere mengden protein ettersom alt N som måles blir regnet som protein, også ikke-protein N. Nitrogenforbindelsene i åkerbønner består av 75 % rent protein (Hellen, 1974), samt ikke-protein N i form av blant annet frie aminosyrer, aminer, puriner, pyrimidiner, nukleosider og alkaloider (Damodaran et al., 2008). Proteinanrikede åkerbønneprøver er tidligere blitt målt ved Dumas-metoden og Kjeldahl-metoden til å ha et innhold av ikke-protein N på 0,92 % (Steien, 2018). Inkludering av noen former for N som ikke stammer fra protein, kan være en forklaring på at flere av de fordøyde proteinanrikede bønneprøvene fikk beregnet en proteinkonsentrasjon (mg/g) og proteinløselighet (%) på >100 etter Dumas-analysen. Alle prøvene fra fullformalte og hele bønner, derimot, fikk verdier <100 da disse sannsynligvis inneholdt en mindre andel ikke-protein N. Eksempelvis har bløtlegging, som var en av prosesseringene gjort på de hele åkerbønnene, vist å redusere innholdet av ikke-protein N (El-Adawy et al., 2000). De målte verdiene av protein på

>100 mg/g og >100 % av både proteinanrikede prøver og prøver fra fullformalte og hele bønner ved BCA-metoden kan imidlertid ikke forklares av innhold av ikke-protein N (ettersom det blant annet er peptidbindinger, og ikke N, som måles), men heller av andre komponenter, som diskutert videre.

### 5.1.1 Mulige forstyrrelser fra tanniner under BCA-analyse

Resultatene fra BCA-målingene ga som nevnt usystematiske resultater, spesielt for de proteinanrikede prøvene, med tilsynelatende høyere proteinløselighet i mageprøvene sammenlignet med tarmprøvene. Prøvene av fullformalte og hele åkerbønner ga imidlertid, utenom for det rå melet (MB), en høyere proteinløselighet i tarmprøvene sammenlignet med mageprøvene. Dette kan tyde på at enkelte komponenter har gitt forstyrrelser under BCA-målingene, og at disse komponentene har blitt påvirket av de ulike prosesseringene og mengden protein og stivelse i prøven.

BCA-analysen er relativt uspesifikk, og enhver komponent som kan redusere  $\text{Cu}^{2+}$  til  $\text{Cu}^{+}$  vil gi utslag på målingene. Dette er vist ved at prøver uten fargedannende aminosyrer (cystein, tyrosin og tryptofan) likevel viste fargedannelse; forårsaket av komponenter som askorbinsyre, acetamidofenool, 3,4-dihydroksyfenylalanin, dithiothreitol, glutation og penicillamin (Wiechelman et al., 1988). Mange standardmetoder for bestemmelse av protein, inkludert BCA, Bradford og  $A_{280}$ , kan også være utsatt for forstyrrelse av polyfenoler, deriblant tanniner (Adamczyk et al., 2011; Cheynier et al., 2012; Moya et al., 2008). Tanniner kan ha bidratt til signal i seg selv i den spektrofotometriske målingen, ettersom disse stoffene momentant vil kunne reagere med  $\text{Cu}^{2+}$ , eller de kan ha påvirket løseligheten av proteinene gjennom kompleksdannelse (Moya et al., 2008)

Det er nærliggende å tro at tanniner fra åkerbønneskallet har påvirket resultatene av BCA-analysen, da disse stoffene har evnen til å felle ut proteiner som følge av kompleksdannelse. Ettersom tanniner er varmemestabile og mest effektivt vil kunne reduseres ved prosesseringer som bløtlegging og spiring (Muzquiz et al., 2012), er det hensiktsmessig å sammenligne åkerbønneprøvene som ble bløttagt og spirt (HB-B-0-K, HB-B-24-K, HB-B-48-K, HB-B-72-K) med den rå (MB) og den kokte (MB-K) bønneprøven. De bløtlagte og spirte bønneprøvene ga resultater fra BCA-analysen som korrelerte relativt godt med resultatene fra Dumas-analysen ( $R^2 = 0,8084$ ). Lengre

spiretid (48 og 72 timer) viste bedre korrelasjon ( $R^2 = 0,86825$ ) sammenlignet med kortere spiretid (0 og 24 timer) ( $R^2 = 0,75277$ ), som kan bety at tanninene reduseres ytterligere med spiretiden. Sannsynligvis har tanninene i stor grad gått i løsning og blitt vasket bort i vaskevannet/spirevannet under bløtlegging og spiring, og derved ikke hatt like stor grad av påvirkning på den spektrofotometriske målingen som for rå og kokt prøve ( $R^2 = 0,33716$ ), hvor varmebehandling er eneste prosessering. Dette samsvarer med en tidligere studie av Alonso et al. (2000), hvor mengde tannin i åkerbønner viste signifikant ( $p < 0,05$ ) reduksjon etter både bløtlegging og spiring (24–72 timer) (økt reduksjon med spiretiden).

Det forholdsvis høye nivået av polysakkarider i prøvene av fullformalte og hele bønner, hvorav et stivelsesinnhold på 41,56 % i tørrstoff (DM) (fiberinnhold ble ikke målt), kan være en medvirkende årsak til at beregningene fra BCA-analysen og Dumas-analysen totalt sett viste større korrelasjon ( $R^2 = 0,58837$ ) for disse bønneprøvene sammenlignet med de proteinanrikede prøvene ( $R^2 = 0,02223$ ). Polysakkaridene kan ha forhindret kompleksdannelse mellom tanniner og protein, som tidligere vist i en studie av Lu og Bennick (1998). I de proteinanrikede prøvene er det lite stivelse (3,5 % DM) og fiber (9,8 % DM) som kan ha forhindret denne reaksjonen. Samtidig er det vist at forholdet av protein og tannin avgjør om tannin-protein-kompleksene blir løselige og fordøyelige eller uløselige og mindre fordøyelige. Vanligvis blir kompleksene uløselige, men ved et forhold av protein til tannin større enn optimalt dannes løselige komplekser fremfor uløselige (Barbehenn & Peter Constabel, 2011; Hagerman & Robbins, 1987). Med dette kan det tyde på at tannin-protein-kompleksene, som sannsynligvis er dannet i åkerbønneprøvene, er uløselige i prøvene av fullformalte og hele bønner (mindre protein), mens de i større grad er løselige i de proteinanrikede prøvene (mye protein).

Likevel kan man ikke med sikkerhet si at tanniner har påvirket resultatene uten å ha studert tanninene, da blant annet molekylstørrelse, form og mengde av tanniner har en innvirkning. Tanniner av større molekylvekt er bedre i å felle ut proteiner sammenlignet med mindre tanniner, og ratioen tannin til protein påvirker som nevnt utfellingsgraden (Barbehenn & Peter Constabel, 2011). Ettersom tanniner ikke inneholder N vil de ikke kunne forstyrre målingene i Dumas-analysen, og Dumas-analyse vil derfor være en bedre egnet metode enn BCA-analyse ved måling av tanninrike produkter.

## 5.2 Proteinenes nedbrytningsprofil målt med SDS-PAGE

SDS-PAGE og beregning av intensitet av proteinbånd i ulike molekyllære områder ble gjort på alle prøver av U, M og T (løselig og uløselig del) for å kunne analysere proteinenes nedbrytningsprofil. Den beregnede mengden av høymolekylært og lavmolekylært protein stemmer overens med den beregnede løseligheten, og spesielt tydelig er dette ved sammenligning av de proteinanrikede tarmprøvene: Kopt finfraksjon (FF-K) fikk beregnet både en større andel lavmolekylært protein og en høyere løselighet enn de ekstruderte prøvene, og den tørre ekstruderte (FF-TE) fikk beregnet en større andel høymolekylært protein og samtidig en lavere løselighet sammenlignet med de andre proteinanrikede bønneprøvene. Dette viser at intensitetsberegningene fra SDS-PAGE samsvarer godt med beregningene av løselighet fra Dumas-analysen og BCA-analysen, og at løseligheten derfor i stor grad bestemmes av mengden høy- og lavmolekylært protein.

Generelt var det kun det tilsatte fordøyelsesenzymet  $\alpha$ -amylase (proteinbåndet rundt 50 kDa) og ett proteinbånd ved 100 kDa som ble detektert i mageprøvene. Ifølge Park et al. (2010) kan proteinbåndet ved 100 kDa svare til lipoxygenase, som del av albuminfraksjonen. Dette proteinet viste å være ganske stabilt gjennom *in vitro* fordøyelse, da proteinet også ble detektert i tarmprøvene. Det er vanskelig å si om alle proteiner ble fullstendig brutt ned til mindre peptider og aminosyrer, eller om noen proteiner fremdeles er tilstede i nativ form. Ifølge den beregnede båndintensiteten er fremdeles noen høymolekylære proteiner tilstede i tarmprøvene, men man vet ikke i hvilken grad disse proteinene er brutt ned. I en studie av Sousa et al. (2020) med løselige og uløselige fraksjoner av *in vitro* tarmprøver av blant annet erter og bønner ble det detektert protein i alle substrater etter tarmfasen som var resistente mot fordøyelse. Dette kan korrespondere med proteinbåndene som fremdeles observeres mellom 60 og 250 kDa i tarmprøvene.

SDS-PAGE og beregninger av båndintensitet er nyttig for å oppnå kvantitative resultater av proteinnedbrytning, men usikkerheten i disse beregningene kan være stor. Dersom intensiteten i et område blir svakere etter fordøyelse kan det tyde på at proteinet er blitt hydrolysert, men det er usikkert hvor mye av proteinet som eventuelt er blitt hydrolysert eller hvor langt disse peptidene eventuelt har vandret i gelen. Gelbildene

viser tydelig at noen (store) proteiner forsvinner, mens andre mindre proteiner blir synlige, men det er vanskelig å si hvilke store proteiner disse nedbrytningsproduktene har opphav i. Polyakrylamidgelene benyttet i dette forsøket er optimale for identifisering av proteinbånd i området 10–25 kDa. Under og etter fordøyelse vil det med stor sannsynlighet eksistere nedbrutt protein/peptider i størrelse <10 kDa, som ble observert ved sterke bånd nederst i gelen (undefinerbar MW) for mage- og tarmprøvene. Man har derfor ikke kontroll på hovedproduktet (småpeptider) av proteinfordøyelse eller den generelle massebalansen. Av denne årsaken ble det testet å analysere prøvene i en lavmolekylær gel (se vedlegg 1), men resultatene viste veldig uskarpe proteinbånd som var vanskelig å adskille, og det ble derfor valgt å ikke benytte denne typen lavmolekylær gel videre i forsøket.

Dataene for båndintensitet er normalisert til 100 % for lettere å kunne sammenligne prøvene, og dette bør tas i betraktning ved tyding av resultatene. Normaliseringen gjør at man ikke har oversikt over hvor mye proteinene representerer totalt, da en del proteiner er brutt ned til småpeptider med molekylvekt lavere enn det denne gelen kunne detektere. Derfor vil ikke resultatene av den beregnede båndintensiteten nødvendigvis gi et korrekt bilde på hva som har skjedd under fordøyelsen. Båndintensitetsberegningen kan til en viss grad være unøyaktig ettersom forstyrrelser i gelen og ulik intensitet innad i en gel og mellom geler kan virke inn på resultatet, selv om dette skal være korrigert for. En fordel kunne vært å inkludere en kromatografisk metode for identifisering av proteiner for å få en oversikt over størrelsesfordelingen til de minste peptidene.

### **5.2.1 Proteinprofil i grovfraksjonen**

Den rå stivelsesrike grovfraksjonen (G) ble analysert med SDS-PAGE på lik linje med de fordøyde åkerbønneprøvene, altså ble denne også fortynnet til 0,5 % protein før analyse. Båndintensitetsprofilen av G ble relativt lik profilen for ufordøyd prøve av finfraksjonen (FF). Forskjellen ligger i at det ble detektert mer høymolekylært protein, deriblant vicilin og convicilin, i G sammenlignet med FF. Det kan virke som om det er mer albumin i G ettersom eksempelvis proteinbåndet ved 100 kDa, som kan representere lipoxygenase, er sterkere. Ettersom albumin har en forholdsvis kompakt struktur og fordi det gjerne følger med en del antinæringsstoffer (ANFs) med albuminene, kan



fordøyeligheten være redusert. Det kunne vært interessant å gjøre en *in vitro* fordøyelse på grovfraksjonen for å se om disse faktorene eventuelt virker inn på fordøyeligheten. Det kan muligens være tilfellet at den store mengden polysakkarider vil påvirke proteinfordøyeligheten ved enten å gi redusert fordøyelighet som følge av redusert hastighet og grad av proteolyse og økt tap av protein i tarmen (Damodaran et al., 2008; Sousa et al., 2020), eller økt fordøyelighet som følge av en forhindret kompleksdannelse mellom tanniner og proteiner (Lu & Bennick, 1998). Det er viktig å finne prosesseringer som reduserer/inaktiverer mest mulig av ANFs og som bidrar til økt løselighet også av albumin slik at dette biproduktet får en størst mulig utnyttelse. En utnyttelse av dette biproduktet vil gi et større utbytte og økonomisk gevinst, samt mindre avfall.

### 5.3 Den generelle effekten av prosesseringer

Fullformalte og hele åkerbønner som var prosessert (bløtlagt/spirt/kokt) viste et proteininnhold (30,63–33,13 %) (~60 % for de proteinanrikede prøvene) på linje med varmebehandlet kjøtt, hvor innholdet av protein ligger på 28–36 % (Henchion et al., 2017). Samtidig er fordøyeligheten av animalsk protein høy, og som alternativ proteinkilde til animalske produkter er det avgjørende at åkerbønner også viser en høy proteinfordøyelighet.

En høy (>95 %) fordøyelighet blir ofte observert for animalsk protein (egg, melk og kjøtt) og konsentrert planteprotein (Tomé, 2013). Dette ble også observert i alle de proteinanrikede prøvene (~103–111 %), utenom den tørrekstruderte (75,9 %). Prøven spirt i 24 timer og den kokte grøten (MB-K) viste også en fordøyelighet på linje med animalsk protein, som de eneste prøvene fra de fullformalte og hele åkerbønnene. De resterende bønneprøvene viste en fordøyelighet på rundt 60–80 %, som kan assosieres med en høy andel av plantecellevegg, innhold av ANFs eller omfattende proteindenaturering (Tomé, 2013), som diskutert videre.

Det er kjent at rå åkerbønner i utgangspunktet har en lav fordøyelighet på grunn av en stor andel  $\beta$ -sheets og fordi innholdet av hydrofobe aminosyrer er relativt høyt (29,28 mol% av det totale aminosyreinnholdet), hvilket gir åkerbønneproteiner en større evne til naturlig å danne protein-protein-interaksjoner (Damodaran et al., 2008). De rå åkerbønnene viste likevel, uforventet, generelt en fordøyelighet på linje med eller

høyere enn de prosesserte. Ingen av prøvene viste signifikant høyere løselighet enn rå referanseprøve. Hvorfor de rå åkerbønnene viste en høyere fordøyelighet sammenlignet med flere av de prosesserte er vanskelig å forklare. Sannsynligvis er det prosesseringene som ikke viste like positiv effekt på fordøyeligheten i forhold til hva som var forventet.

## 5.4 Effekt av ekstrudering på proteinfoerdøyelighet

Prosessering med en kombinasjon av høy temperatur og høyt trykk har i tidligere studier vist positive effekter på ernæringsverdi av belgvekster (bønner, erter, linser og kikerter), blant annet ved en signifikant økning i både *in vitro* og *in vivo* proteinfoerdøyelighet (Drulyte & Orlien, 2019). Andre studier har vist en reduksjon i fordøyelighet etter ekstrudering (Habiba, 2002). I dette forsøket viste de proteinanrikede åkerbønnene en reduksjon i proteinløselighet etter både våt- og tørrestrudering. Redusert løselighet av protein etter ekstrudering kan skyldes proteinaggregeringer som følge av omfattende proteindenaturering, Maillardreaksjoner og/eller dannelse av komplekser mellom proteiner og ANFs (Habiba, 2002).

De høye temperaturene og den mekaniske bearbeidingen under ekstruderingen kan ha forårsaket en omfattende proteindenaturering, med følgelig økt sjanse for intra- og intermolekylære interaksjoner (disulfidbindinger) mellom aminosyrer slik at proteinene blir mindre løselige (Damodaran et al., 2008; Drulyte & Orlien, 2019; Sá et al., 2019). Dette kan være forklaring på at de ekstruderte åkerbønneprøvene (FF-VE og FF-TE) fikk en lavere proteinløselighet sammenlignet med den rå (FF) og den kokte (FF-K) prøven; hvor prosesseringen var mildere. Proteinløseligheten var lavere i tørrestrudert tarmprøve sammenlignet med våtekstrudert tarmprøve, som kan forklares av forskjellene i temperatur og vanntilførsel under ekstrudering. En høyere temperatur benyttet under tørrestruderingen kan ha gitt en mer omfattende proteindenaturering av FF-TE, og derved følgelig en mer kompakt proteinstruktur som er mindre tilgjengelig for proteolyse. Dette kan man også lese av intensitetsprofilen fra SDS-PAGE, hvor tarmprøven av FF-TE viste mer høymolekylært protein sammenlignet med tarmprøven av FF-VE, som kan tyde på høyere proteolysegrad i FF-VE grunnet noe færre proteinaggregeringer.

Proteinprofilen fra SDS-PAGE av FF-VE og FF-TE var veldig ulik mellom de ufordøyde prøvene (svakere proteinbånd i FF-TE), men mer like for mage- og tarmprøvene. Ettersom løseligheten av protein øker under magefasen (fordi proteinfordøyelsen starter) blir de opprinnelige forskjellene i utgangspunktet mindre merkbare, som antydnet av gelbildene. Likevel er forskjellene mer merkbare om man ser på beregningene av båndintensiteten, hvor det relativt sett er mer høymolekylært protein i både mage- og tarmprøver av FF-TE sammenlignet med FF-VE, og mer lavmolekylært protein i mage- og tarmprøver av FF-VE sammenlignet med FF-TE. Dette korrelerer med løselighetsberegningene fra Dumas-analysen og BCA-analysen, hvor løseligheten var lavere i FF-TE sammenlignet med FF-VE. Det faktum at den ufordøyde prøven av FF-TE hadde svakere proteinbånd i gelen etter SDS-PAGE sammenlignet med ufordøyd prøve av FF-VE kan forklares av at proteinene i FF-TE kan ha vært i komplekser med «noe» (for eksempel ANFs), og derved ikke blitt tilgjengelig i monomer form under prøvepreparering for SDS-PAGE. I så tilfelle vil ikke proteinene bli separert og farget, slik at eventuelle proteinbånd blir veldig svake i gelen.

Overoppheting med påfølgende kryssbindinger av enkelte aminosyrer kan spesielt sees for proteinrik mat lave på karbohydrat, slik som FF. Kryssbindinger vil da kunne skje mellom lysin og glutamin eller asparagin, og denne formen for aggregering kalles isopeptidbindinger. Isopeptidbindinger motstår hydrolyse i tarmen, og forhindrer derved fordøyelse og biotilgjengelighet av lysin (Damodaran et al., 2008). Proteinanrikningen kan derfor ha vært en medvirkende faktor til redusert løselighet som følge av ekstrudering, men en lav proteinløselighet etter ekstrudering er også observert av Røstad (2019) i prøver (erter) med kun 10 % protein. Dette fordi det kan skje interaksjoner mellom proteiner, stivelse og kostfiber, hvilket reduserer hastighet og grad av proteolyse (Damodaran et al., 2008). Interaksjoner mellom proteiner og polysakkarider kan være forklaring på en signifikant ( $p < 0,01$ ) ulik proteinfordøyelighet mellom de rå bønneprøvene (FF og MB), hvor MB (41,56 % stivelse i tørrstoff) fikk en løselighet i tarmen på  $< 80$  %, mens FF (stivelse og fiber på til sammen 13,3 % DM) fikk en løselighet i tarmen på  $> 110$  %. Redusert proteinfordøyelighet som følge av økt mengde polysakkarider kan forklares av et økt tap av endogent og eksogent protein i tarmen (Sousa et al., 2020).

De høye temperaturene (140–160 °C) benyttet under ekstruderingen kan, i tillegg til omfattende proteindenaturering, ha forårsaket ikke-enzymatiske bruningsreaksjoner (Maillardreaksjoner). Maillardreaksjoner skjer ved 140–160 °C og involverer reaksjon mellom reduserende sukker og aminosyrer (Damodaran et al., 2008; UiO, 2011a). Dette vil gjøre aminosyrer (spesielt lysin) mindre tilgjengelige, og produktet som formes har proteolytisk hemmende aktivitet og vil derved gi redusert proteinfordøyelighet (Sá et al., 2019). Dette kan være årsak til lavere løselighet av de ekstruderte åkerbønnene sammenlignet med for eksempel kokt finfraksjon (FF-K), hvor varmebehandlingen var mildere (<100 °C). Maillardreaksjonen kan ha vært mer omfattende under tørrekstruderingen hvor det ble benyttet høyere temperatur enn ved våtekstrudering, som kan være forklaring på en lavere proteinløselighet av FF-TE. Benyttelse av mer vann under våtekstrudering kan være en innvirkende faktor til en høyere proteinløselighet av FF-VE, da det er mulig å gjenopprette proteinstrukturer med løsning i vannfase (UiO, 2011b).

Mengden ANFs er ikke målt i dette forsøket, og man kan derfor ikke med sikkerhet si at ekstruderingen har hatt noen effekt på disse stoffene. Det forventes likevel en økt fordøyelighet etter ekstrudering som følge av en sannsynlig reduksjon/inaktivering av ANFs, som proteaseinhibitorer, tanniner, fytinsyre, oligosakkarider og lektiner, som vist i flere studier med belgvekster (Alonso et al., 2000; Drulyte & Orlien, 2019; Muzquiz et al., 2012; Røstad, 2019; Tulbek et al., 2017). Generelt har våt prosessering vist å være mest effektiv for fjerning av alle ANFs (Bennetau-Pelissero, 2019), og dette kan være en forklaring på at våtekstrudert prøve viste en høyere fordøyelighet enn den tørrekstruderte (ikke signifikant).

## 5.5 Effekt av koking på proteinfordøyelighet

Koking er en tradisjonell prosesseringsteknologi som spiller en viktig rolle ved behandling av belgvekster da det påvirker fordøyelighet og ernæringsverdi. Flere studier viser reduksjon i proteinkonsentrasjon og proteinløselighet som følge av koking av belgvekster, som forklares av en mulig utvasking av vannløselige proteiner til kokevannet (Drulyte & Orlien, 2019; Habiba, 2002). Ettersom kokevannet ble beholdt i prøvene tillaget som en grøt (FF-K og MB-K), vil det naturlig være en større andel

vannløselige proteiner i disse prøvene. Bevaring av kokevannet kan være en forklaring på signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere løselighet før *in vitro* fordøyelse (ufordøyde prøver) i MB-K sammenlignet med prøvene av de hele bønnene som ble kokt, men hvor kokevannet ble fjernet. FF-K og MB-K var forventet å få den samme proteinkonsentrasjonen som henholdsvis FF og MB, men denne ble større i begge prøver, og signifikant ( $p < 0,001$ ) større for MB-K. Økningen kan skyldes et ulikt tørrstoffinnhold mellom rå og kokt prøve som følge av frysetørkingen, som ble gjort på kun den kokte prøven, samt forskjeller i luftfuktighet under oppbevaring og rundt prøveuttak, da vanninnholdet vil endres med luftfuktigheten (Damodaran et al., 2008). Tørrstoffinnholdet i de frysetørkede prøvene (FF-K og MB-K) ble ikke målt, men det er nærliggende å tro at vanninnholdet i disse prøvene var lavere enn i FF og MB, som ikke ble frysetørket.

Koking var forventet å gi en økning i fordøyelighet som følge av varmebehandlingen, ettersom moderate temperaturer (60–90 °C) i en time eller mindre medfører en delvis denaturering av proteiner (Damodaran et al., 2008), som gir større tilgang for fordøyelsesenzymmer under proteolyse. Før *in vitro* fordøyelse hadde FF-K og MB-K en signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere proteinløselighet sammenlignet med de andre prøvene, og av alle prøvene fra de fullformalte og hele åkerbønnene var det kun MB-K og 72 timer spirt prøve som var signifikant (henholdsvis  $p < 0,001$  og  $p < 0,05$ ) mer løselig sammenlignet med det rå melet (MB). Dette må bety at proteindenatureringen har vært moderat og derved medført protein-vann-interaksjoner fremfor protein-protein-interaksjoner. Åkerbønnelegumin har en denaturerings-temperatur på 94 °C, som er relativt høyt grunnet en stor andel  $\beta$ -sheet-strukturer (egg albumin, med mer  $\alpha$ -helix-strukturer, denaturerer ved 76 °C) (Damodaran et al., 2008). Temperaturen under koking (~96 °C) var derfor optimal for en delvis proteindenaturering. Ved sammenligning av FF-K og MB-K med rå referanseprøver etter *in vitro* fordøyelse (tarmprøver), viste grøten av det fullformalte melet (MB-K) en høyere fordøyelighet, mens grøten av den proteinanrikede fraksjonen (FF-K) fikk en noe redusert fordøyelighet (ikke signifikant). Økning i løselighet av MB-K korrelerer med tidligere studier av Elsheikh et al. (2000), hvor koking av åkerbønner ga en signifikant økning i fordøyelighet *in vitro*. Reduksjonen i løselighet av FF-K kan skyldes det faktum at prøven inneholder veldig mye protein. Den høye hydrofobisiteten av  $\beta$ -sheet-strukturene av

åkerbønneprotein kan bidra til å fremme aggregeringer mellom proteiner under termisk behandling slik at løseligheten reduseres (Carbonaro et al., 2012).

Selv om den kokte finfraksjonen (FF-K) hadde en noe lavere fordøyelighet sammenlignet med den rå prøven (FF), viste FF-K en større løselighet enn det kokte fullformalte melet (MB-K). Dette kan forklares av forholdet av protein og stivelse. Større mengder stivelsesgranuler kan begrense tilgjengeligheten av proteinet under proteolyse, og spesielt er dette tilfellet ved stivelsesgelatinisering under koking (Wong et al., 2009). Under koking mykner plantecellevegger, og stivelsesrik mat absorberer vann og sveller (Geissler & Powers, 2010). Som følge av stivelsesgelatinisering og ekspansjon av stivelsesgranuler under vannopptak vil proteinmatrisen ekspandere og til en viss grad brytes opp. Kokingen medfører dannelse av disulfidbindinger og en økning i  $\beta$ -sheet-strukturer (Ezeogu et al., 2008). Disulfidbindingene og den høye graden av hydrofobisitet av  $\beta$ -sheet-strukturene vil stabilisere proteinstrukturen og fremme protein-protein-interaksjoner slik at proteinfordøyeligheten reduseres (Wong et al., 2009). Fordøyeligheten av stivelse vil også bli redusert som følge av disulfidbindingene fordi det begrenser ekspansjonen av stivelsesgranuler og derved tilgangen for  $\alpha$ -amylase under hydrolyse (Ezeogu et al., 2008).

Studier har vist at fordøyeligheten av termisk denaturerte belgvekstproteiner avhenger av typen globulin. Med varmebehandling er det vist at proteolyse reduseres i vicilin, mens en økning er vist for leguminer og conviciliner (Park et al., 2010). Dette kan være en forklaring på at man ser en økning i båndintensitet i det molekylære området 46–59 kDa, tilsvarende vicilin, for alle de termisk behandlede prøvene. I de rå prøvene (FF og MB) ser man derimot en reduksjon i båndintensitet i dette området. Økningen i båndintensitet ved 46–59 kDa for de prosesserte prøvene fra magefase til tarmfase kan også skyldes det faktum at en større andel av proteinene er blitt brutt opp i mindre bestanddeler etter tarmfasen slik at de har gått ut av gelen. Da blir proteinene ved 46–59 kDa *relativt* mer tilstede.

Økning i fordøyelighet som følge av koking kan tilskrives en reduksjon av ANFs, spesielt varmelabile proteasehitorer og lektiner (Damodaran et al., 2008; Muzquiz et al., 2012). Dette er vist i flere studier, hvor belgvekster fikk en økt fordøyelighet etter koking, med en samtidig inaktivering av disse ANFs (Bennetau-Pelissero, 2019; Drulyte

& Orlien, 2019; Habiba, 2002; Han et al., 2007; Muzquiz et al., 2012; Tulbek et al., 2017). Studier viser også en økning i *in vitro* proteinfordøyelighet av åkerbønner etter en signifikant reduksjon av tanniner og fytinsyre etter koking (Elsheikh et al., 2000). Kompleksdannelse mellom tanniner og proteiner kan skje under koking (Carbonaro et al., 2012), og kokevann er vist å inneholde en del tanniner og tannin-komplekser (Barroga et al., 1985). Ettersom kokevannet ble beholdt ved koking av grøten, kan det bety at det var en del tanniner i denne prøven. Forstyrrelser av tanniner i BCA-analysen kan være forklaring på at MB og MB-K fikk en ulik løselighetsprofil sammenlignet med de kokte prøvene av de hele bønnene hvor kokevannet ble fjernet. Det er vist at innholdet av ANFs reduseres med økt koketid (Habiba, 2002), og 30 min koketid kan ha vært for kort til at ANFs ble fullstendig inaktivert/reduisert. Det er vanskelig å si med sikkerhet at kokingen har påvirket ANFs, ettersom disse stoffene ikke ble analysert i dette forsøket. Det ville vært interessant å analysere kokevannet av de hele bønnene for mengde tanniner.

Selv om koking viste å gi økt fordøyelighet er det en fare for at verdifulle næringsstoffer, som vannløselige vitaminer, tapes til kokevannet, og det er samtidig vanskelig å kontrollere og justere temperaturen (Drulyte & Orlien, 2019). Trykkoking er et alternativ til vanlig tradisjonell koking. Denne prosessen er vist mer effektiv i å forbedre proteinfordøyeligheten (Drulyte & Orlien, 2019; Habiba, 2002), og prosesstiden blir ofte kortere ved utnyttelse av høy-energi-tilførsel (Drulyte & Orlien, 2019).

## 5.6 Effekt av bløtlegging på proteinfordøyelighet

Bløtlegging blir ofte benyttet for å redusere koketiden av belgfrø, men det er også vist å gi en reduksjon i innhold av ANFs og en økt fordøyelighet (Drulyte & Orlien, 2019; Muzquiz et al., 2012). Den bløtlagte (og kokte) åkerbønneprøven viste en signifikant ( $p < 0,01$ ) lavere proteinløselighet i ufordøyd prøve sammenlignet med den kokte grøten (MB-K). En reduksjon i proteinløselighet som følge av bløtlegging samsvarer med en studie av El-Hady og Habiba (2003), og kan forklares ved en utvanning av vannløselige proteiner til vaskevannet. Den observerte økningen i proteininnhold av de frysetørkede bløtlagte prøvene i forhold til det tørre rå melet (MB) kan skyldes en samtidig fjerning av komponenter, som sukker og mineraler, under bløtlegging (El-Adawy et al., 2000).

Samtidig ble ikke MB frysetørket, slik som de bløtlagte prøvene, og vil derfor inneholde noe mer vann, som har innvirkning på proteininnholdet.

I mageprøvene av de bløtlagte, spirte og kokte åkerbønnene ble det detektert sterke proteinbånd rundt 25 og 40 kDa, som ikke var tilfellet i de andre bønneprøvene. En kan tenke at de ekstra proteinbåndene skyldes aktivering eller syntetisering av enzymer i spireprosessen, ettersom mange enzymer aktiviseres i en spireprosess (Uhlen, 2020). Likevel ble disse proteinbåndene også detektert i prøven som ikke ble spirt (HB-B-0-K), og det er derfor lite trolig spireenzymer som vises. Det kan tenkes at proteiner er blitt mer løselige som følge av bløtleggingen, men den beregnede løseligheten i bløtlagte prøver var ikke høyere enn rå eller kokt bønneprøve. Mest sannsynlig er det degraderingsprodukter av lagerprotein, ettersom proteinbåndene også vises i de ufordøyde prøvene.

Det ble observert en større proteinfordøyelighet sammenlignet med rå prøve (MB) etter *in vitro* fordøyelse for den bløtlagte prøven som også ble spirt i 24 timer (signifikant på et 10 % nivå). Økning i fordøyelighet av bløtlagte åkerbønner ble også observert av Alonso et al. (2000), som forklares med en reduksjon av tanniner, fytinsyre, oligosakkarider og enzyminhibitorer. Bløtlegging kan også redusere innholdet av vicin og convicin (Khazaei et al., 2019), som vil være fordelaktig da disse ANFs kan ha store negative konsekvenser for individer som er predisponert for å utvikle favisme. Reduksjon av ANFs under bløtlegging kan skyldes en økt løselighet av stoffene og utvasking til vaskevannet (Alonso et al., 2000), og det ville derfor vært interessant å analysere innholdet av ANFs i vaskevannet (på lik linje som med kokevannet etter koking). De bløtlagte prøvene som viste økt fordøyelighet var samtidig spirt, og den mulige reduksjonen av ANFs kan også tilskrives spiringen.

Åkerbønneprøven som kun ble bløtlagt og kokt (uten spiring) (HB-B-0-K) viste en lavere (ikke signifikant) proteinfordøyelighet etter *in vitro* fordøyelse sammenlignet med det rå melet (MB). Dette er også rapportert for bønner (*Phaseolus vulgaris*), og kan skyldes en økt kondensering av tanniner i bønnene under bløtlegging (Aw & Swanson, 1985). Bløtleggingsprosessen fremmer proteolyse (proteaser stimuleres), og påfølgende konformasjonsendringer gjør lysin mer tilgjengelig. Blant annet har tanniner evnen til å binde til  $\epsilon$ -amino-grupper av lysin (El-Adawy et al., 2000), som kan være forklaring på



en lavere proteinfordøyelighet av den bløtlagte prøven sammenlignet med MB. De høye konsentrasjonene av lysin i åkerbønner gjør proteinene generelt mer utsatt for spontan glykosylering (påheking av sukker på proteinet) under lagring og prosessering, og glykosylert protein kan unngå enzymatisk nedbrytning tidlig i tynntarmen (Dahl et al., 2012).

Det kunne vært å forvente en høyere fordøyelighet av HB-B-0-K sammenlignet med MB-K, ettersom en kombinasjon av bløtlegging og koking er vist å forbedre *in vitro* proteinfordøyelighet i forhold til kun koking (Han et al., 2007). MB-K viste imidlertid en høyere proteinfordøyelighet og dette kan, som tidligere diskutert, forklares av at kokevannet ble beholdt i MB-K. For en mer korrekt sammenligning med HB-B-0-K burde det vært inkludert en prøve med kun kokte eller kun bløtlagte hele bønner hvor kokevannet/vaskevannet ble fjernet. Ettersom alle de bløtlagte prøvene også ble kokt, er det vanskelig å si om det er kokingen eller bløtleggingen eller kombinasjonen som har hatt størst effekt på fordøyeligheten.

En ulempe ved bløtlegging er at det krever en del tid, og det er en fare for at vitaminer og mineraler tapes til bløtleggingsvannet. Bløtlegging under høyt trykk (HHP, high hydrostatic pressure) kunne ha forbedret fordøyeligheten ytterligere, og samtidig forkortet bløtleggingstiden. Han et al. (2007) viste en lik eller økt fordøyelighet når HHP ble inkludert under bløtlegging (med påfølgende oppvarming), og tiden ble redusert fra 12 timer til 1 time. Dette kan forklares ved en delvis denaturering av proteinene, og derved økt tilgjengelighet for enzymer under proteolyse.

## 5.7 Effekt av spiring på proteinfordøyelighet

Ettersom det er viktig at temperaturen er optimal under spiring (Berner, 2014), kan det faktisk at det var utfordringer med å holde konstant temperatur (16 °C) være en medvirkende faktor til at resultatene ikke ble helt som forventet. De spirte prøvene fikk et høyere proteininnhold sammenlignet med rå prøve (MB), men det var forventet å se en økning i proteininnhold med spiretiden grunnet utnyttelse av glukose som energikilde (gjennom respirasjon) (Alonso et al., 2000; Berner, 2014), men dette ble ikke observert. Under spireprosessen ble det ved alle spiretider observert utvikling av rotspire på åkerbønnefrøene (økt lengde med økt spiretid) som må ha krevd noe energi,

enten fra lavmolekylært sukker tilstede, eller fra nedbrytning av stivelse (Jørgensen, 2020; Uhlen, 2020). Likevel kan den total spiretiden (72 timer) ha vært for kort til at det var merkbare forskjeller i nedbrytning av stivelse mellom 24 og 72 timer. 24 timer spirt prøve fikk et noe lavere proteininnhold sammenlignet med de andre spirte prøvene, men dette kan skyldes variasjon ved prøveuttak til Dumas-analysen, ettersom 24 timer spirt prøve ble analysert på et annet tidspunkt enn de andre spirte prøvene. Forskjeller i vanninnhold etter frysetørking kan også være en forklaring på ulikt proteininnhold.

24 timer spirt prøve viste en høyere fordøyelighet (signifikant på et 10 % nivå) sammenlignet med den rå åkerbønneprøven (MB). Ettersom denne prøven også ble bløtlagt og kokt er det hensiktsmessig å sammenligne HB-B-24-K med prøven som ikke ble spirt (HB-B-0-K) for å se om det er spiringen som har gitt økt fordøyelighet. 24 timer spirt prøve viste en signifikant ( $p < 0,05$ ) høyere fordøyelighet etter *in vitro* fordøyelse sammenlignet med HB-B-0-K, og det kan derfor tyde på at denne spiretiden har hatt en positiv effekt på proteinfordøyeligheten. Økt fordøyelighet kan tilskrives en økning i løselige proteiner grunnet aktivering av proteolytiske enzymer under spiring, som også er effektive i å hydrolysere protein-tannin-komplekser i frøet (Sá et al., 2019). Likevel er det viktig å være oppmerksom på at spesielt 24 timer spirt prøve viste forskjeller i de to parallellene av ufordøyde prøver på gelen etter SDS-PAGE, og at gjennomføring av en ny *in vitro* fordøyelse kunne vært optimalt.

Ufordøyde prøver av de spirte åkerbønnene fikk veldig svake proteinbånd i gelen etter SDS-PAGE, med mye svakere intensitet sammenlignet med HB-B-0-K. Dette samsvarer med andre studier og kan skyldes en økt grad av enzymatisk hydrolyse under spiring, da spireprosessen gjerne aktiverer eller syntetiserer enzymer (økning med spiretiden) som kan bryte ned lagerprotein (Müntz, 1996; Schwediauer et al., 2018; Youssef et al., 1987). Cystein endopeptidase, tilhørende papain-klassen av proteinaser (Proteinase A og B), er et eksempel på enzymer som syntetiseres under spiring av åkerbønner (Müntz, 1996). Med spiretiden ble det observert en reduksjon i proteinbåndintensitet i det lavmolekylære området, som mest sannsynlig ikke betyr at det har skjedd en mindre grad av proteolyse med spiretiden, men heller en økt grad av proteolyse slik at proteinene er blitt brutt ned til komponenter med så lav MW (<10 kDa) at de har gått ut av gelen. Likevel korrelerer ikke dette med resultatene av proteinløselighet fra Dumas-

analysen og BCA-analysen. Disse beregningene viste ingen systematisk økning i løselighet med spiretiden.

Med spiretiden blir proteinbåndet rundt 37 kDa, hvor  $\alpha$ -legumin kan detekteres, nærmest borte, mens proteinbåndet rundt 22 kDa, hvor  $\beta$ -legumin kan detekteres, blir mer synlig (men svakere enn i HB-B-0-K). Dette har sammenheng med at  $\alpha$ -legumin blir brutt ned før  $\beta$ -legumin (Müntz, 1996), som er forventet ettersom  $\alpha$ -legumin er lokalisert på overflaten av legumin-protein-komplekset, mens  $\beta$ -legumin danner proteinets indre, hydrofobe kjerne.  $\beta$ -legumin vil fremdeles være intakt etter 5–6 dager etter vannopptak (Müntz, 1996), og spiretiden er derfor for kort til at  $\beta$ -legumin blir fullstendig brutt ned. Proteinbåndet ved 25 kDa som observeres i mageprøvene av bløtlagte og spirte prøver kan være nedbrytningsprodukter av lagerprotein som følge av vannopptaket. Dette korrelerer med at nedbrytningsprodukter av  $\alpha$ -legumin har en MW på rundt 24–30 kDa, altså noe høyere enn  $\beta$ -legumin (Müntz, 1996). I de spirte prøvene er proteinbåndene som kan representere vicilin og convicilin veldig svake, og spesielt ved økt spiretid. Dette har også sammenheng med den økte graden av enzymatisk hydrolyse under spiring, hvor det meste av vicilinet brytes ned etter 2–5 dager etter vannopptak (Müntz, 1996). De ufordøyde prøvene av 48 og 72 timer spirt åkerbønne var ganske like, men med svakere proteinbånd enn 24 timer spirt prøve, som har sammenheng med at aktiviteten av proteinasene når en topp 36 timer etter vannopptak, før aktiviteten reduseres og når en bunn etter 72 timer (Müntz, 1996).

Økning i proteinløselighet som følge av spiring kan forklares av en reduksjon av fytinsyre, ettersom spiring aktiverer enzymet fytase som bryter ned fytat, noe som vil forhindre kompleksdannelse mellom fytinsyre og proteiner eller mineraler (Albarracín et al., 2015; Alonso et al., 2000; Singh et al., 2017). Med spiretiden ble det av en annen masterstudent ved NMBU observert et redusert fytinsyreinnhold, og denne reduksjonen var signifikant etter 72 timer spiring (Jørgensen, 2020). Også enzyminhibitorer, tanniner, oligosakkarider og lektiner har i tidligere forsøk vist signifikant reduksjon (Bennetau-Pelissero, 2019; Li & Luo, 2017; Schwediauer et al., 2018; Tulbek et al., 2017). Tanniner har spesielt vist en signifikant reduksjon etter 24 og 72 timer spiring (Schwediauer et al., 2018), og dette kan ha sammenheng med at 24 og 72 timer spirt prøve viste en høyere fordøyelighet sammenlignet med rå bønneprøve (MB). Effektene

av reduksjon av ANFs etter spiring er vist enda større dersom bløtlegging også inkluderes (Muzquiz et al., 2012). Man kan ikke med sikkerhet si om spiringen har hatt en effekt på ANFs ettersom dette aldri var eneste prosessering. Det faktum at Jørgensen (2020) observerte en nedgang i fytinsyreinnhold med spiretiden i det samme prøvematerialet, burde bønnepreven spirt i 72 timer vist en høyere fordøyelighet sammenlignet med 0 timer spirt prøve. Økende spiretid viste imidlertid ingen systematisk forbedring av *in vitro* proteinfordøyelighet. Selv om 24 timer spiring ga den høyeste fordøyeligheten etter beregninger fra Dumas-analysen, viste 48 timer spiring den laveste fordøyeligheten, bak 0 timer spiring. Det er mulig man kunne sett en korrelasjon mellom proteinløselighet og spiretid dersom det hadde blitt utført mange spireforsøk.

Faktorer som stivheten av celleveggen og innholdet av fiber kan ha en innvirkning på proteinfordøyeligheten. Dette er vist ved at selv om innholdet av ANFs i tilfeller har økt, har likevel proteinfordøyeligheten blitt høyere fordi fiberkomponenter brytes ned under spiring (Drulyte et al., 2019).

## 5.8 Konklusjon

I denne oppgaven ble det studert effekten av våtekstrudering, tørrekstrudering, bløtlegging, spiring ved tre ulike tider (24, 48 og 72 timer) og koking på *in vitro* fordøyelighet av åkerbønneprotein. Ingen av de prosesserte åkerbønneprøvene viste en signifikant høyere proteinfordøyelighet sammenlignet med rå åkerbønner, og prosesseringene hadde generelt en noe mindre merkbar effekt på proteinfordøyeligheten enn hva som var forventet. Koking til grøt, 24 timer spiring og tørrekstrudering var de prosesseringene som viste størst effekt på proteinfordøyeligheten. Koking til grøt av fullformalte åkerbønner viste en høyere proteinfordøyelighet sammenlignet med rå referanseprøve, som blant annet kan forklares av en delvis proteindenaturering og bevaring av kokevannet inneholdende vannløselige proteiner. Ekstrudering, og da spesielt tørrekstrudering, viste å ha en mer negativ effekt på proteinfordøyeligheten, sannsynligvis grunnet en mer omfattende proteindenaturering som har gitt en lavere løselighet og redusert tilgjengelighet av aminosyrer under proteolyse. Det er vanskelig å si effekten av bløtleggingen ettersom de

bløtlagte åkerbønnene også ble kokt, men tap av vannløselige proteiner til vaskevannet og økt kondensering av tanniner under bløtlegging (ikke målt) kan være forklaring på en noe lavere proteinfordøyelighet (ikke signifikant) sammenlignet med rå referanseprøve. 24 timer var den spiretiden som viste mest positiv effekt på proteinfordøyeligheten sammenlignet med rå referanseprøve. 24 timer spirt åkerbønneprøve skilte seg derimot fra de andre spirte prøvene etter både SDS-PAGE og Dumas-analyse, og nye analyser med denne prøven ville vært optimalt. Det ble ikke observert en sammenheng mellom spiretid og proteinfordøyelighet.

Mengden protein og stivelse i åkerbønneprøvene hadde en innvirkning på proteinfordøyeligheten. Rå proteinanrikt åkerbønneprøve viste en signifikant ( $p < 0,01$ ) høyere fordøyelighet enn den rå åkerbønneprøven med mer stivelse, som kan skyldes at stivelsesgranuler begrenser tilgjengeligheten av protein under proteolyse. Spesielt er dette tilfellet ved stivelsesgelatinisering under koking, som ble observert ved at den proteinrike grøten viste en større proteinfordøyelighet enn grøten av fullformalte åkerbønner (mindre protein, mer stivelse). Høyt nivå av stivelse kan også ha forhindret kompleksdannelse mellom tannin og protein, og derved gitt en større korrelasjon mellom Dumas-metoden og BCA-metoden for de stivelsesrike bønneprøvene ( $R^2 = 0,58837$ ) sammenlignet med de proteinanrikede ( $R^2 = 0,02223$ ).

Gjennom forsøket ble det undersøkt om BCA-metoden, som alternativ til Dumas-metoden, er egnet for vurdering av proteinfordøyelighet. Dumas-analysen og BCA-analysen viste til tider en svært lav korrelasjon, og resultatene fra Dumas-analysen var nødvendig for ikke å mistolke resultatene fra BCA-analysen. Tap av peptidbindinger under proteolyse og mulige forstyrrelser fra tanniner under måling kan være forklaringer på usystematiske resultater fra BCA-analysen. Prosesseringer hvor varmemestabile tanniner sannsynligvis reduseres, som bløtlegging og spiring, ga en høyere korrelasjon mellom analysemetodene ( $R^2 = 0,8084$ ) enn ved måling av åkerbønner med varmebehandling som eneste prosessering ( $R^2 = 0,33716$ ). Det ble konkludert med at BCA-metoden ikke fungerer til den hensikten å analysere proteinfordøyelighet. Selv om Dumas-analyse ofte kan være et dyrere og mindre tilgjengelig alternativ sammenlignet med BCA-analyse, er denne metoden å anbefale i sammenheng med senere *in vitro* fordøyelsesforsøk.



## 6. TIL ETTERTANKE OG VIDERE FORSKNING

En stor del av diskusjonen om fordøyeligheten av belgvekster i allerede publisert litteratur omhandler innvirkningene av antinæringsstoffer. Innholdet av disse stoffene ble ikke analysert i dette forsøket, men som utgangspunktet var det planlagt at en annen masterstudent ved NMBU skulle analysere for innhold av fytinsyre, oligosakkarider og proteaseinhibitorer i det samme prøvematerialet som ble benyttet i denne oppgaven. Grunnet restriksjonene med stengte laboratorier i forbindelse med covid-19, våren 2020, ble dette dessverre utsatt. En slik studie på tvers av *in vitro* fordøyelsen ville gitt et klarere bilde på effekten av disse stoffene på proteinfordøyelse. Spesielt vil det være nyttig ved en senere anledning å analysere for tanniner i åkerbønner, ettersom disse stoffene sannsynligvis hadde en stor innvirkning både på proteinfordøyelighet og måling i BCA-analysen.

Normaliseringen til 100 % av den beregnede båndintensiteten etter SDS-PAGE er i utgangspunktet ikke en optimal fremstilling, som allerede diskutert, men det forenklet sammenligningen av bønneprøvene. Alternativt kunne de rå prøvene bli satt til 100 %, med beregning av prosentandel av denne for hver av de andre prøvene. Med denne typen fremstilling kan det likevel være utfordrende å tolke resultatene, ettersom man ikke vet hvor mye som kan sies å være fordøyd. Den beregnede båndintensiteten i ulike molekylære områder kan muligens ha vært noe unøyaktig, blant annet fordi intensiteten av mage- og tarmprøver ble beregnet fra fargede geler, mens intensiteten av ufordøyde prøver ble beregnet fra ufargede geler. Dette er i utgangspunktet ikke optimalt grunnet intensitetsvariasjoner mellom fargede og ufargede geler, selv om dette skal være korrigert for. De ufordøyde prøvene ble ikke inkludert i analysen med fargede geler grunnet for få geler på lager og påfølgende stengte laboratorier som følge av covid-19.

Intensitetsberegningene etter SDS-PAGE og beregningene av proteinløselighet etter Dumas-analysen var til tider lite overensstemmende, som kan tyde på at man ikke har fått med en representativ prøve ved uttak til SDS-PAGE. Dette kan være utfordrende i prøver med dårlig løselighet og hvor både løselig og uløselig del benyttes samlet. Det var en del partikler igjen i de fordøyde prøvene som gjorde prøveuttaket utfordrende, og

som kan ha ført til at mye uløselig protein gikk tapt. Alternativt kunne man separert løselig og uløselig del (pelleten bør i tilfelle frysetørkes) og analysert disse hver for seg ved SDS-PAGE. Dette ville gitt en større kontroll på hva som analyseres, og sannsynligvis ville resultatene av løselig del vært i større overensstemmelse med resultatene fra Dumas-analysen. Likevel vil dette kreve mer arbeid, og en utfordring blir å standardisere mengde buffer som settes til den uløselige delen (pelleten). Ved en senere anledning er det uansett viktig å jobbe mer med prøveprepareringen før SDS-PAGE for å oppnå mer representative prøver.

Ved videre arbeid kan det være nyttig å inkludere alternative metoder til SDS-PAGE og metoder for identifisering av proteiner og kvantifisering av peptider i ulike størrelser. Kromatografi, som væskechromatografi-massespektrometri (LC-MS), kan eksempelvis benyttes ved identifisering av proteiner i prøver før fordøyelse, og deretter for å undersøke peptidprofilen i fordøyde preparater. Dette gir et mål på i hvilken grad proteiner er brutt ned under fordøyelse. LC-MS er likevel relativt tidkrevende. Gelfiltrering er også en alternativ analysemetode for å undersøke intakte proteiner, og ved NMBU blir det i skrivende stund undersøkt om et slikt studium kan gjøres i en kapillærelektroforese. Et mål på fordøyelighet kan hentes gjennom analyse av frie aminogruupper, hvor en større andel frie aminogruupper vil indikere en høyere hydrolysegrad (fordøyelighet).

En nyttig del av videre arbeid med undersøkelser av fordøyelighet av åkerbønnprotein vil være å inkludere andre prosesseringer, som avskalling, baking, fermentering, trykkoking og hermetisering. For optimalt næringsutbytte av åkerbønnene vil det være av betydning også å se på effekten av prosesseringene på andre næringsstoffer enn protein, som vitaminer, samt på den sensoriske kvaliteten, som tekstur, farge og smak. Når det gjelder avskalling kan dette være nyttig for å redusere innholdet av tanniner, men det vil samtidig bidra til et redusert utbytte av åkerbønnene om det ikke blir funnet bruksområder for biproduktet (frøskallet). Det er alltid viktig å finne bruksområder for biprodukter. Dette gjelder også for stivelsesrike fraksjoner etter fraksjonering, som den stivelsesrike grovfraksjonen benyttet i dette forsøket. Stivelsesrike fraksjoner kan brukes som gode energikilder i fôr, eller i produkter for human ernæring. Uansett har



det stor nytteverdi å gjøre nærmere analyser på et slikt biprodukt for å se hvordan denne kan utnyttes, både med tanke på stivelses- og proteinfordøyelighet.

Selv om *in vitro* forsøk gir en god indikasjon på fordøyelighet, kan det være fordelaktig ved en senere anledning å måle proteinfordøyeligheten av åkerbønner *in vivo*. Ved måling *in vivo* kan man med større sikkerhet si hvor mye av proteinet som absorberes, og man kan ta hensyn til de dynamiske forholdene i menneskets fordøyelsesprosess. Dette er nyttig kunnskap dersom planteprotein, inkludert åkerbønnprotein, skal utgjøre en større del av kosten. Åkerbønner vil mest sannsynlig ikke konsumeres alene, men inngå som del av et måltid (for eksempel erstatning for kjøtt) eller som ingrediens i et produkt. Påvirkningen på fordøyeligheten av åkerbønner fra andre matvarer og ingredienser bør undersøkes for å kunne gi gode råd for måltidssammensetninger og bruk av åkerbønner, samt for å utvikle høykvalitetsprodukter med åkerbønner som ingrediens. Med dette vil det være nyttig å utføre fordøyelsesforsøk hvor åkerbønner fordøyes sammen med andre matvarer, eller som ingrediens blant andre råvarer for å vurdere matriseeffekten i et sammensatt produkt. Studier av både ernæringsmessige, funksjonelle og sensoriske egenskaper av åkerbønner og andre plantevekster er viktige bidrag i forskningen.



## 7. LITTERATURLISTE

- Abrahamsen, U., Uhlen, A. K., Waalen, W. & Stabbetorp, H. (2019). Muligheter for økt proteinproduksjon på kornarealene. *Jord-og Plantekultur 2019. Forsøk i korn, olje- og proteinvekster, engfrøavl og potet 2018*.
- Adamczyk, B., Adamczyk, S., Smolander, A. & Kitunen, V. (2011). Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, 43 (3): 628-637. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.034>.
- Albarracín, M., De Greef, D. M., González, R. J. & Drago, S. R. (2015). Germination and extrusion as combined processes for reducing phytates and increasing phenolics content and antioxidant capacity of *Oryza sativa* L. whole grain flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66 (8): 904-911. doi: 10.3109/09637486.2015.1110689.
- Alonso, R., Aguirre, A. & Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68 (2): 159-165. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7).
- Aw, T. L. & Swanson, B. (1985). Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. *Journal of Food Science*, 50 (1): 67-71.
- Barbehenn, R. V. & Peter Constabel, C. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72 (13): 1551-1565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040>.
- Barroga, C. F., Laurena, A. C. & Mendoza, E. M. T. (1985). Effect of condensed tannins on the in vitro protein digestibility of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33 (6): 1157-1159.
- Bennetau-Pelissero, C. (2019). Plant Proteins from Legumes. I: Mérillon, J.-M. & Ramawat, K. G. (red.) *Bioactive Molecules in Food*, s. 223-265. Cham: Springer International Publishing.
- Berner, E. j. (2014). *spiring*. snl.no: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/spiring> (lest 02.04.20).
- Bio-Rad. (2011). *Mini-PROTEAN® Precast Gels. Instruction Manual and Application Guide*: Bio-Rad Laboratories.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., et al. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (13): 2239-2261. doi: 10.1080/10408398.2017.1315362.
- Branden, C. I. & Tooze, J. (2012). *Introduction to protein structure*: Garland Science.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R. & Carrière, F. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14 (4): 991.
- Bugge, A. & Alfnes, F. (2018). *Kjøttfrie spisevaner. Hva tenker forbrukerne*: SIFO-rapport.
- Calles, T. (2016). The International Year of Pulses: What are they and why are they important. *Agriculture for Development*, 26: 40-42.

- Carbonaro, M., Maselli, P. & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43 (2): 911-921. doi: 10.1007/s00726-011-1151-4.
- Cheyrier, V., Sarni-Manchado, P. & Quideau, S. (2012). *Recent Advances in Polyphenol Research*: Wiley.
- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 108 (S1): S3-S10.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32 (1): 25-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>.
- de Boer, J., Helms, M. & Aiking, H. (2006). Protein consumption and sustainability: Diet diversity in EU-15. *Ecological Economics*, 59 (3): 267-274. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2005.10.011>.
- Drulyte, D. & Orlien, V. (2019). The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8 (6): 224. doi: 10.3390/foods8060224.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawy, A. A. & Sobihah, T. Y. (2000). Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. *Food / Nahrung*, 44 (5): 339-343. doi: 10.1002/1521-3803(20001001)44:5<339::Aid-food339>3.0.Co;2-t.
- El-Hady, E. A. & Habiba, R. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (3): 285-293.
- Elsheikh, E. A. E., Fadul, I. A. & El Tinay, A. H. (2000). Effect of cooking on anti-nutritional factors and in vitro protein digestibility (IVPD) of faba bean grown with different nutritional regimes. *Food Chemistry*, 68 (2): 211-212. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00153-3).
- Etemadi, F., Hashemi, M., Barker, A. V., Zandvakili, O. R. & Liu, X. (2019). Agronomy, Nutritional Value, and Medicinal Application of Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Horticultural Plant Journal*.
- Ezeogu, L. I., Duodu, K. G., Emmambux, M. N. & Taylor, J. R. N. (2008). Influence of Cooking Conditions on the Protein Matrix of Sorghum and Maize Endosperm Flours. *Cereal Chemistry*, 85 (3): 397-402. doi: 10.1094/cchem-85-3-0397.
- FN-Sambandet. (2019). *Befolkning, migrasjon og urbanisering*: United Nations Association of Norway. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/Tema/Fattigdom/Befolkning> (lest 20.02.20).
- Frøseth, R. B. (2009). *Erter og åkerbønner*. Agropub. Nettside for økologisk landbruk. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/erter-og-akerbonner> (lest 09.01.20).
- Frøseth, R. B. (2017). *Belgvekster til modning*. Agropub. Nettside for økologisk landbruk. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/belgvekster-til-modning> (lest 09.01.20).
- Geissler, C. & Powers, H. (2010). *Human Nutrition - E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Gibson, R. S., Hotz, C., Temple, L., Yeudall, F., Mtitimuni, B. & Ferguson, E. (2000). Dietary Strategies to Combat Deficiencies of Iron, Zinc, and Vitamin A in Developing

- Countries: Development, Implementation, Monitoring, and Evaluation. *Food and Nutrition Bulletin*, 21 (2): 219-231. doi: 10.1177/156482650002100218.
- Gladheim, K. & Foerster, N. M. (2010). *Testing for G6PD-defekt før primakinbehandling: praksis ved norske sykehus*.
- Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M. & Jebb, S. A. (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 361 (6399): eaam5324. doi: 10.1126/science.aam5324.
- Habiba, R. A. (2002). Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry*, 77 (2): 187-192. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00335-1).
- Hagerman, A. E. & Robbins, C. T. (1987). Implications of soluble tannin-protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemical Ecology*, 13 (5): 1243-1259. doi: 10.1007/BF01020552.
- Hagerman, A. E., Robbins, C. T., Weerasuriya, Y., Wilson, T. C. & McArthur, C. (1992). Tannin chemistry in relation to digestion. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 45 (1): 57-62.
- Han, I. H., Swanson, B. G. & Baik, B. K. (2007). Protein digestibility of selected legumes treated with ultrasound and high hydrostatic pressure during soaking. *Cereal chemistry*, 84 (5): 518-521.
- Hellen, A. (1974). Protein i grønnsaker: en oversikt og en særlig omtale av protein i bondebønner, hagebønne, konservert og spinat. Helsedirektoratet. (2016). *Protein*. helsedirektoratet.no. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/inntak-av-naeringsstoffer/protein> (lest 03.03.20).
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M. & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 6 (7): 53.
- Hustoft, H. K. & Johnsen, E. F. (2020). *Personlig kommunikasjon: Feilvariasjon Dumas-metoden*: LabTek, NMBU (11.05.20).
- Hægermark, W. A. (2019). *Plantebasert og proteinrikt*: Nofima. Tilgjengelig fra: <https://nofima.no/nyhet/2019/10/plantebasert-og-proteinrikt/> (lest 06.03.20).
- ISO 16634. (2008). 16634-1: 2008: Food Products—Determination of the Total Nitrogen Content by Combustion According to the Dumas Principle and Calculation of the Crude Protein Content—part 1: Oilseeds and Animal Feeding Stuffs. *Geneva: International Organization for Standardization*.
- Jebsen, H. (1986). *Korn, pasta og belgfrukter*. Oslo: Gyldendal.
- Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A. & Murphy, P. A. (2003). Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (12): 1169. doi: 10.1007/s11746-003-0837-3.
- Jørgensen, E. G. (2020). *Personlig kommunikasjon: Resultater fra spireprosessen* (29.05.20).
- Khazaei, H., Purves, R. W., Hughes, J., Link, W., O'Sullivan, D. M., Schulman, A. H., Bjørnsdotter, E., Flores, F. G., Nadzieja, M. & Andersen, S. U. (2019). Eliminating vicine and convicine, the main anti-nutritional factors restricting faba bean usage. *Trends in Food Science & Technology*.

- Lam, A., Can Karaca, A., Tyler, R. & Nickerson, M. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food reviews international*, 34 (2): 126-147.
- Li, H., Wang, Z. & Liu, Y. (2003). [Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials*, 26 (6): 444-448.
- Li, J. & Luo, Y.-W. (2017). Soluble sugars and myo-inositol phosphates during germination and seedling growth of green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *Legume Research-An International Journal*, 40 (1): 47-54.
- Lu, Y. & Bennick, A. (1998). Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43 (9): 717-728. doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(98)00040-5).
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R. & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. Toronto: Pearson.
- McGee, H. (2007). *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen*: Scribner.
- Micro BCA Protein Assay Kit. 0412.6. USA: Thermo Fisher Scientific.
- Moen, B. & Sahlstrøm, S. (2016). *Kornekstrudering og tarmflora*: Nofima. Tilgjengelig fra: <https://nofima.no/forskning/naringsnytte/kornekstrudering-og-tarmflora/> (lest 10.01.2020).
- Moya, H. D., Dantoni, P., Rocha, F. R. P. & Coichev, N. (2008). A multicommuted flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu(I)/BCA complex formation. *Microchemical Journal*, 88 (1): 21-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.08.006>.
- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E. & Pedrosa, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11 (2): 227-244. doi: 10.1007/s11101-012-9233-9.
- Müntz, K. (1996). Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*, 47 (5): 605-622.
- Neumann, C., Harris, D. M. & Rogers, L. M. (2002). Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. *Nutrition Research*, 22 (1): 193-220. doi: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00374-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00374-8).
- Nosworthy, M. G. & House, J. D. (2017). Factors influencing the quality of dietary proteins: Implications for pulses. *Cereal Chemistry*, 94 (1): 49-57.
- Park, S. J., Kim, T. W. & Baik, B.-K. (2010). Relationship between proportion and composition of albumins, and in vitro protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (10): 1719-1725. doi: 10.1002/jsfa.4007.
- Pedersen, I., Hjartåker, A., Müller, H. & Anderssen, S. (2013). *Grunnleggende ernæringslære [Basic nutrition]*. 2nd utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
- Peltonen-Sainio, P., Hannukkala, A., Huusela-Veistola, E., Voutilainen, L., Niemi, J., Valaja, J., Jauhiainen, L. & Hakala, K. (2013). Potential and realities of enhancing rapeseed- and grain legume-based protein production in a northern climate. *The Journal of Agricultural Science*, 151 (3): 303-321.
- Prigent, S. V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., van Koningsveld, G. A., de Jong, G. A. H. & Voragen, A. G. J. (2003). Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of

- Globular Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (17): 5088-5095. doi: 10.1021/jf021229w.
- Robinson, G. H. J., Balk, J. & Domoney, C. (2019). Improving pulse crops as a source of protein, starch and micronutrients. *Nutrition Bulletin*, 44 (3): 202-215. doi: 10.1111/nbu.12399.
- Rupérez, P. (1998). Oligosaccharides in raw and processed legumes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 206 (2): 130-133. doi: 10.1007/s002170050228.
- Røstad, I. (2019). *Antinæringsstoffer i planteprodukter: effekt av prosess*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F. & Garciofi, B. A. M. (2019). Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1-20. doi: 10.1080/10408398.2019.1688249.
- Sabaté, J. & Soret, S. (2014). Sustainability of plant-based diets: back to the future. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100 (suppl\_1): 476S-482S. doi: 10.3945/ajcn.113.071522.
- Saldanha do Carmo, C., Varela, P., Poudroux, C., Dessev, T., Myhrer, K., Rieder, A., Zobel, H., Sahlstrøm, S. & Knutsen, S. H. (2019). The impact of extrusion parameters on physicochemical, nutritional and sensorial properties of expanded snacks from pea and oat fractions. *LWT*, 112: 108252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108252>.
- Schwediauer, P., Hagmüller, W. & Zollitsch, W. (2018). Germination of faba beans (*Vicia faba* L.) for organic weaning piglets. *Organic Agriculture*, 8 (3): 249-258. doi: 10.1007/s13165-017-0195-5.
- Serikstad, G. L., Hansen, S. & de Boer, A. (2013). Biologisk nitrogenbinding – belgvekster som kilde til nitrogen. *Bioforsk Fokus*.
- Serrano, J., Puupponen - Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M. & Saura - Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research*, 53 (S2): S310-S329.
- Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A. & Yu, L. (2019). Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. *Journal of food science and technology*: 1-12.
- Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N. & Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of food science and technology*, 54 (4): 858-870.
- Sjaastad, O. V., Hove, K. & Sand, O. (2010). *Physiology of Domestic Animals*: Scandinavian Veterinary Press.
- Smil, V. (2002). Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (3): 305-311. doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00504-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00504-X).
- Sousa, R., Portmann, R., Dubois, S., Recio, I. & Egger, L. (2020). Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*: 108996. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>.
- Steien, S. M. (2018). *Funksjonelle egenskaper i fababønner (Vicia faba L.) ved varierende pH og ionestyrke*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.

- Tomé, D. (2013). Digestibility issues of vegetable versus animal proteins: Protein and amino acid requirements—Functional aspects. *Food and nutrition bulletin*, 34 (2): 272-274.
- Tulbek, M., Lam, R., Asavajaru, P. & Lam, A. (2017). Pea: a sustainable vegetable protein crop. I: *Sustainable protein sources*, s. 145-164: Elsevier.
- Uhlen, A. K. (2020). *Personlig kommunikasjon: Spireprosessen* (10.05.20).
- UiO. (2011a). *Maillardreaksjoner*. uio.no: UiO: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/m/maillard.html> (lest 21.04.20).
- UiO. (2011b). *Protein*. uio.no: UiO: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/protein.html> (lest 06.04.20).
- UiO. (2019). *Bønner*. uio.no: UiO: Institutt for biovitenskap. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/bonner.html> (lest 07.05.20).
- UniProt. (2020). uniprot.org: UniProt Consortium. Tilgjengelig fra: <https://www.uniprot.org/>.
- Villarreal, M. R. & Aurebekk, B. E. B. (2018). *Fordøyelsessystemet*. ndla.no.
- Warsame, A. O., O'Sullivan, D. M. & Tosi, P. (2018). Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia faba* L): Current Status and Prospects for Genetic Improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (48): 12617-12626. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04992.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175 (1): 231-237. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90383-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90383-1).
- Wong, J. H., Lau, T., Cai, N., Singh, J., Pedersen, J. F., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., Wilson, J. D., Lemaux, P. G. & Buchanan, B. B. (2009). Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *Journal of Cereal Science*, 49 (1): 73-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.013>.
- Yao, C. K., Muir, J. G. & Gibson, P. R. (2016). Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther*, 43 (2): 181-96. doi: 10.1111/apt.13456.
- Youssef, M. M., Abd El-Aal, M. H., Shekib, L. A. E. & Ziena, H. M. (1987). Effects of dehulling, soaking and germination on chemical composition, mineral elements and protein patterns of faba beans (*Vicia faba* L.). *Food Chemistry*, 23 (2): 129-138. doi: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90006-9).



# VEDLEGG

## Oversikt over vedlegg

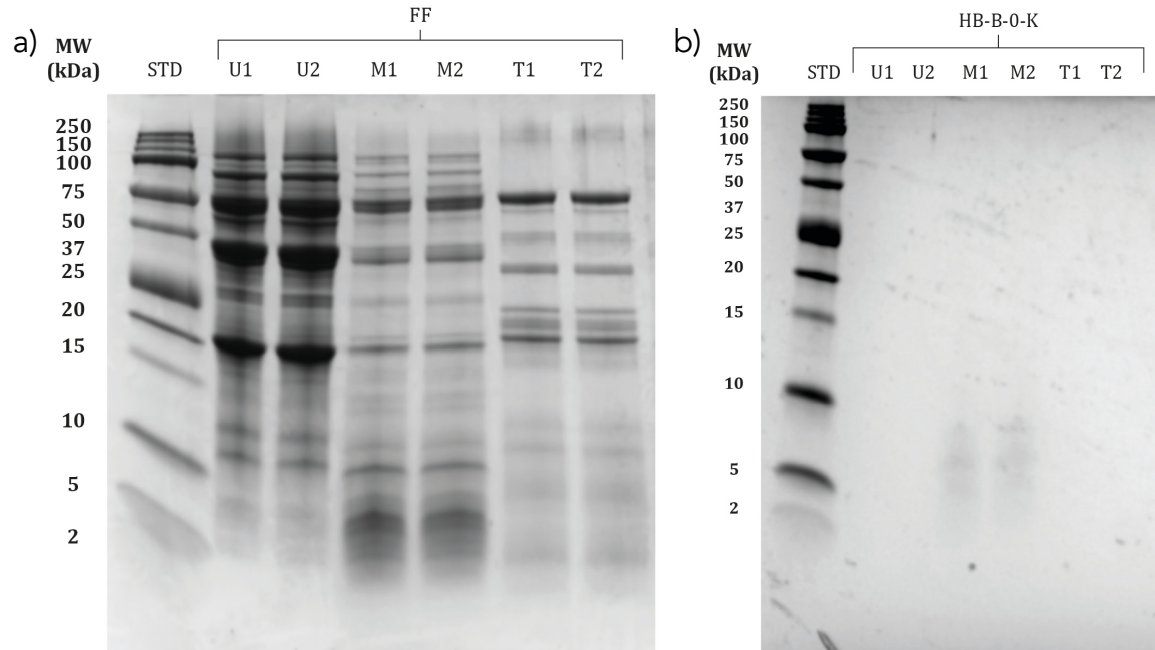
**Vedlegg 1:** SDS-PAGE med lavmolekylær gel

**Vedlegg 2-3:** Lineær regresjon – Korrelasjon mellom Dumas og BCA

**Vedlegg 4-6:** Statistiske modeller

# SDS-PAGE med lavmolekylær gel

## Vedlegg 1. Testkjøringer med lavmolekylær gel

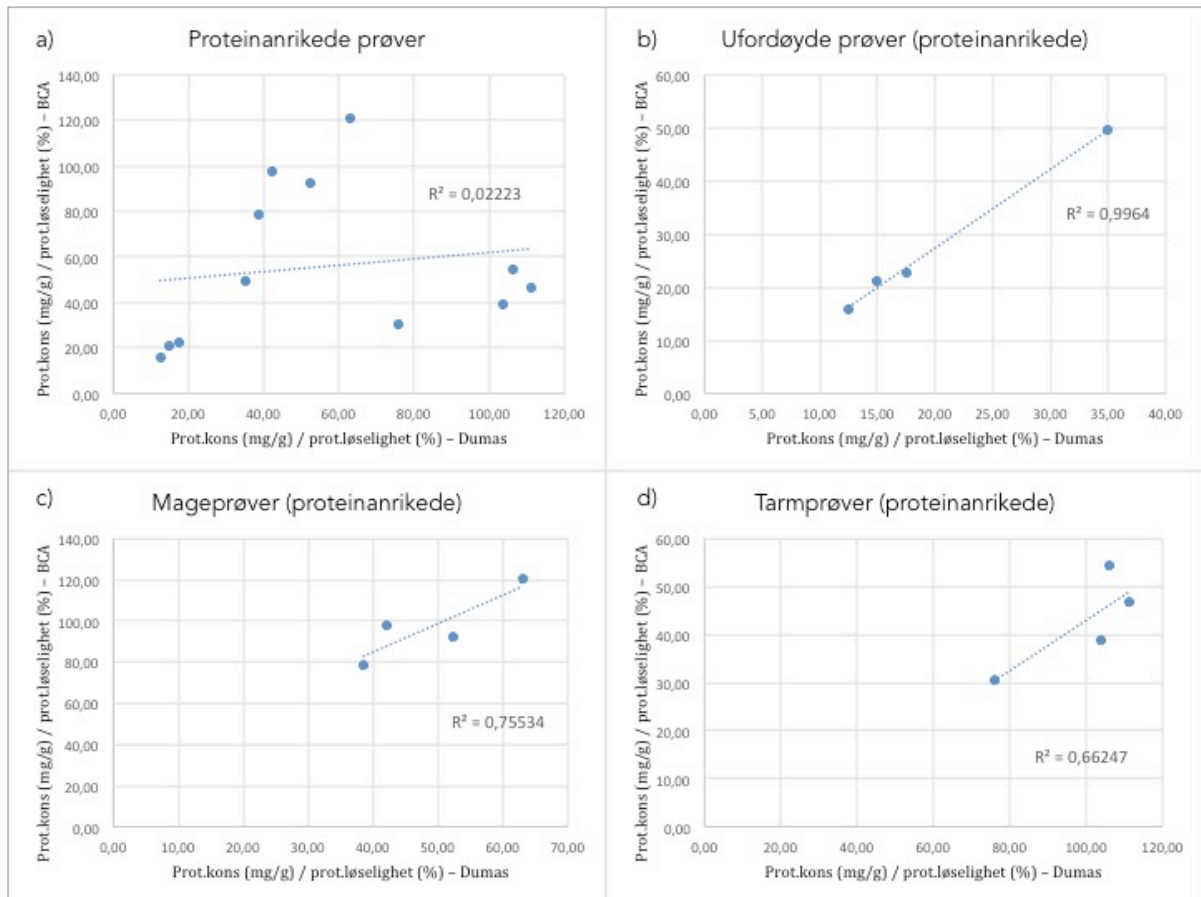


**Figur vedlegg 1.** *Bilde av lavmolekylære geler (Tris-Tricine, 16.5 %) etter SDS-PAGE. a) rå finfraksjon (FF), b) bløtlagt og kokt hel åkerbønne (HB-B-0-K) med «cut off» ved 10 kDa. Gelene er farget. STD, standardprøve med proteiner av kjent molekylvekt; U, ufordøyd prøve; M, mageprøve; T, tarmprøve.*

# Lineær regresjon

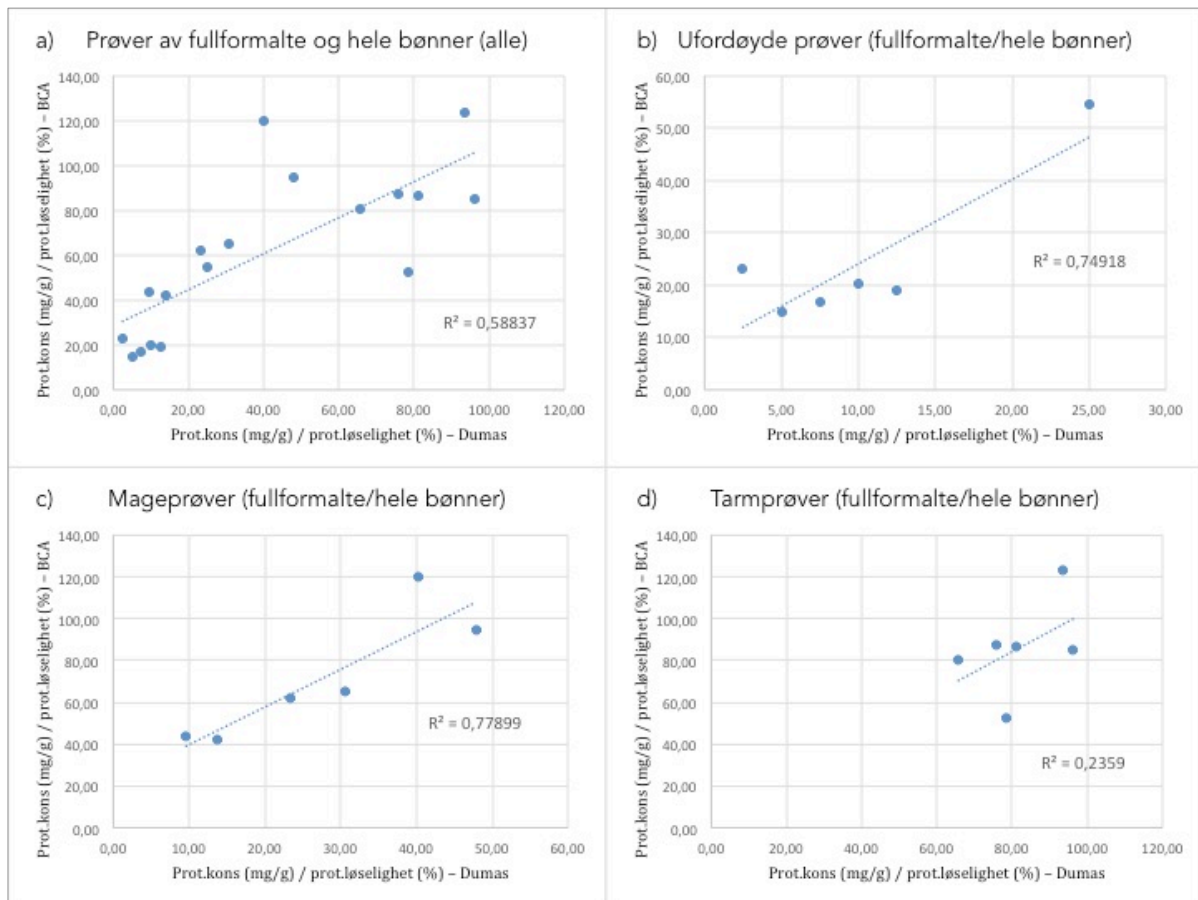
## Vedlegg 2. Korrelasjon mellom Dumas-analysen og BCA-analysen

### Data: Proteinanrikede åkerbønneprøver

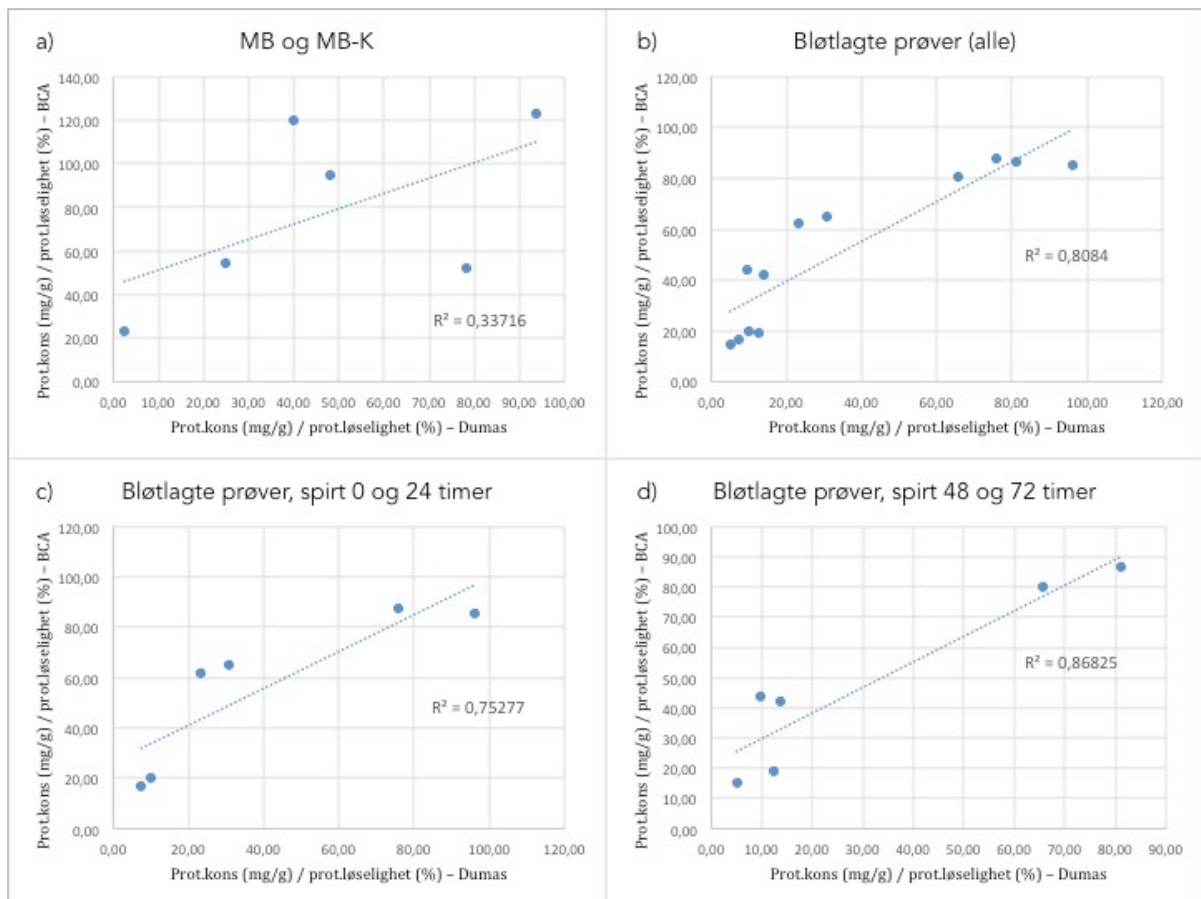


**Figur vedlegg 2.** Lineær regresjon for sammenligning av resultater fra Dumas-analysen og BCA-analysen for de proteinanrikede prøvene. a) alle prøver, b) ufordøyde prøver, c) mageprøver, d) tarmprøver.

### Vedlegg 3. Korrelasjon mellom Dumas-analysen og BCA-analysen Data: Prøver fra fullformalte og hele åkerbønner



**Figur vedlegg 3.** Lineær regresjon for sammenligning av resultater fra Dumas-analysen og BCA-analysen for prøvene av fullformalte og hele åkerbønner. a) alle prøver, b) ufordøyde prøver, c) mageprøver, d) tarmprøver.



**Figur vedlegg 4.** Lineær regresjon for sammenligning av resultater fra Dumas-analysen og BCA-analysen for prøvene av fullformalte og hele åkerbønner. a) MB og MB-K; b) HB-B-0-K, HB-B-24-K, HB-B-48-K og HB-B-72-K; c) HB-B-0-K og HB-B-24-K; d) HB-B-48-K og HB-B-72-K.

# Statistiske modeller

## Vedlegg 4. Enveis ANOVA: Proteinløselighet ~ prosessering

### Data: Proteinrikede åkerbønneprøver

#### 4.1 Ufordøyde prøver

```
> AnovaModel.1 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=Proteinrik_U_Dataset)

> summary(AnovaModel.1)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3    625   208.33   11.11 0.0207 *
Residuals  4     75    18.75
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(Proteinrik_U_Dataset$DUMAS , groups=Proteinrik_U_Dataset$PROSESS,
+ statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 35.0 7.071068     2
Raa-FF  17.5 3.535534     2
Torr    12.5 3.535534     2
Vaat    15.0 0.000000     2

> print(simple.glht(AnovaModel.1,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = Proteinrik_U_Dataset)
Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 17.6273
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value P(>t)
Kokt-FF-Raa-FF -0.1273 17.5000 35.1273 4.3301 4.041 0.0512 .
Kokt-FF-Torr   4.8727 22.5000 40.1273 4.3301 5.196 0.0221 *
Kokt-FF-Vaat   2.3727 20.0000 37.6273 4.3301 4.619 0.0330 *
Raa-FF-Torr  -12.6273  5.0000 22.6273 4.3301 1.155 0.6810
Raa-FF-Vaat  -15.1273  2.5000 20.1273 4.3301 0.577 0.9339
Torr-Vaat    -20.1273 -2.5000 15.1273 4.3301 -0.577 0.9339
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.1,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Kokt-FF 35.0 A
Raa-FF  17.5 A B
Vaat    15.0 B
Torr    12.5 B
```

*Figur vedlegg 5. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av proteinrikede ufordøyde åkerbønneprøver: Proteinløselighet ~ prosessering.*

## 4.2 Mageprøver

```
> AnovaModel.2 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=Proteinrik_M_Dataset)
> summary(AnovaModel.2)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3  729.8   243.25  16.05 0.0107 *
Residuals  4   60.6    15.15
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(Proteinrik_M_Dataset$DUMAS , groups=Proteinrik_M_Dataset$PROSESS,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 42.190 0.000000     2
Raa-FF  63.080 0.000000     2
Torr    38.545 7.785246     2
Vaat    52.310 0.000000     2

> print(simple.glht(AnovaModel.2,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = Proteinrik_M_Dataset)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 15.8463
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center  Upper Std.Err t value  P(>t)
Kokt-FF-Raa-FF -36.736 -20.890  -5.044  3.893  -5.367 0.0197 *
Kokt-FF-Torr   -12.201  3.645  19.491  3.893   0.936 0.7895
Kokt-FF-Vaat   -25.966 -10.120   5.726  3.893  -2.600 0.1807
Raa-FF-Torr     8.689  24.535  40.381  3.893   6.303 0.0111 *
Raa-FF-Vaat    -5.076  10.770  26.616  3.893   2.767 0.1544
Torr-Vaat      -29.611 -13.765   2.081  3.893  -3.536 0.0775 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.2,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Raa-FF 63.080 A
Vaat   52.310 A B
Kokt-FF 42.190 B
Torr   38.545 B
```

*Figur vedlegg 6. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av mageprøver fra proteinrikede åkerbønneprøver: Proteinløselighet ~ prosessering.*

### 4.3 Tarmprøver

```
> AnovaModel.3 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=Proteinrik_T_Dataset)
> summary(AnovaModel.3)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3 1520.2   506.7   4.798  0.082 .
Residuals  4  422.5   105.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(Proteinrik_T_Dataset$DUMAS , groups=Proteinrik_T_Dataset$PROSESS,
  statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 106.26  7.155921     2
Raa-FF  111.32  0.000000     2
Torr    75.90  7.155921     2
Vaat   103.73 17.889802     2

> print(simple.glht(AnovaModel.3,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = Proteinrik_T_Dataset)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 41.8358
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower Center  Upper Std.Err t value P(>t)
Kokt-FF-Raa-FF -46.896  -5.060  36.776  10.277  -0.492 0.9567
Kokt-FF-Torr   -11.476  30.360  72.196  10.277   2.954 0.1298
Kokt-FF-Vaat   -39.306   2.530  44.366  10.277   0.246 0.9939
Raa-FF-Torr     -6.416  35.420  77.256  10.277   3.447 0.0837 .
Raa-FF-Vaat    -34.246   7.590  49.426  10.277   0.739 0.8773
Torr-Vaat      -69.666 -27.830  14.006  10.277  -2.708 0.1632
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.3,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1
Raa-FF 111.32 A
Kokt-FF 106.26 A
Vaat   103.73 A
Torr   75.90  A
```

*Figur vedlegg 7. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av tarmprøver fra proteinanrikede åkerbønneprøver: Proteinløselighet ~ prosessering.*



## Vedlegg 5. Enveis ANOVA: Proteinløselighet ~ prosessering

### Data: Prøver fra fullformalte og hele åkerbønner

#### 5.1 Ufordøyde prøver

```
> AnovaModel.4 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=MaltogHel_U_Dataset)
> summary(AnovaModel.4)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS       5  635.4  127.08   20.33 0.00107 **
Residuals     6   37.5    6.25
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(MaltogHel_U_Dataset$DUMAS , groups=MaltogHel_U_Dataset$PROSESS,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
0t      7.5 3.535534      2
24t     10.0 0.000000      2
48t      5.0 0.000000      2
72t     12.5 3.535534      2
Kokt-M  25.0 0.000000      2
Raa-M   2.5 3.535534      2

> print(simple.glht(AnovaModel.4,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = MaltogHel_U_Dataset)

Quantile = 3.9798
Minimum significant difference = 9.9496
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper      Std.Err t value      P(>t)
0t-24t   -12.44962   -2.50000    7.44962    2.50000     -1 0.902396
0t-48t    -7.44962    2.50000   12.44962    2.50000     1 0.902396
0t-72t   -14.94962   -5.00000    4.94962    2.50000    -2 0.434313
0t-Kokt-M -27.44962  -17.50000   -7.55038    2.50000    -7 0.003280 **
0t-Raa-M  -4.94962     5.00000   14.94962    2.50000     2 0.434313
24t-48t   -4.94962     5.00000   14.94962    2.50000     2 0.434313
24t-72t  -12.44962   -2.50000    7.44962    2.50000    -1 0.902396
24t-Kokt-M -24.94962  -15.00000   -5.05038    2.50000    -6 0.007307 **
24t-Raa-M  -2.44962     7.50000   17.44962    2.50000     3 0.146543
48t-72t  -17.44962   -7.50000    2.44962    2.50000    -3 0.146543
48t-Kokt-M -29.94962  -20.00000  -10.05038    2.50000    -8 0.001599 **
48t-Raa-M  -7.44962     2.50000   12.44962    2.50000     1 0.902396
72t-Kokt-M -22.44962  -12.50000   -2.55038    2.50000    -5 0.017931 *
72t-Raa-M   0.05038    10.00000   19.94962    2.50000     4 0.048946 *
Kokt-M-Raa-M 12.55038    22.50000   32.44962    2.50000     9 0.000836 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.4,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
Kokt-M 25.0 A
72t    12.5 B
24t    10.0 B C
0t      7.5 B C
48t     5.0 B C
Raa-M  2.5 C
```

**Figur vedlegg 8.** Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av ufordøyde prøver fra fullformalte og hele åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.

## 5.2 Mageprøver

```

> AnovaModel.5 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=MaltogHel_M_Dataset)

> summary(AnovaModel.5)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
PROSESS    5 2223.2   444.6    58.19 0.0000529 ***
Residuals  6   45.8     7.6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(MaltogHel_M_Dataset$DUMAS , groups=MaltogHel_M_Dataset$PROSESS,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
0t      23.375 1.944544     2
24t     30.590 0.000000     2
48t     13.750 0.000000     2
72t      9.625 1.944544     2
Kokt-M  40.145 5.876057     2
Raa-M   47.910 1.937473     2

> print(simple.glht(AnovaModel.5,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = MaltogHel_M_Dataset)

Quantile = 3.9798
Minimum significant difference = 11.001
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value    P(>t)
0t-24t   -18.216  -7.215   3.786   2.764  -2.610  0.226702
0t-48t   -1.376   9.625  20.626   2.764   3.482  0.085647 .
0t-72t    2.749  13.750  24.751   2.764   4.974  0.018375 *
0t-Kokt-M -27.771 -16.770  -5.769   2.764  -6.067  0.006906 **
0t-Raa-M  -35.536 -24.535 -13.534   2.764  -8.876  0.000903 ***
24t-48t    5.839  16.840  27.841   2.764   6.092  0.006760 **
24t-72t    9.964  20.965  31.966   2.764   7.585  0.002135 **
24t-Kokt-M -20.556  -9.555   1.446   2.764  -3.457  0.088071 .
24t-Raa-M  -28.321 -17.320  -6.319   2.764  -6.266  0.005853 **
48t-72t   -6.876   4.125  15.126   2.764   1.492  0.681229
48t-Kokt-M -37.396 -26.395 -15.394   2.764  -9.549  0.000600 ***
48t-Raa-M  -45.161 -34.160 -23.159   2.764 -12.358  0.000139 ***
72t-Kokt-M -41.521 -30.520 -19.519   2.764 -11.041  0.000265 ***
72t-Raa-M  -49.286 -38.285 -27.284   2.764 -13.850  0.0000723 ***
Kokt-M-Raa-M -18.766  -7.765   3.236   2.764  -2.809  0.181541
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.5,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3 G4 G5
Raa-M  47.910 A
Kokt-M 40.145 A B
24t    30.590 B C
0t     23.375 C D
48t    13.750 D E
72t     9.625 E

```

**Figur vedlegg 9.** Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av mageprøver fra fullformalte og hele åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.

### 5.3 Tarmprøver

```

> AnovaModel.6 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=MaltogHel_T_Dataset)

> summary(AnovaModel.6)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    5  1297   259.45  12.16 0.00428 **
Residuals  6    128    21.34
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(MaltogHel_T_Dataset$DUMAS , groups=MaltogHel_T_Dataset$PROSESS,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
0t      75.90 0.000000      2
24t     96.14 0.000000      2
48t     65.78 7.155921      2
72t     80.96 7.155921      2
Kokt-M  93.61 3.577960      2
Raa-M   78.43 3.577960      2

> print(simple.glht(AnovaModel.6,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = MaltogHel_T_Dataset)

Quantile = 3.9798
Minimum significant difference = 18.3834
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper Std.Err t value P(>t)
0t-24t   -38.6234 -20.2400  -1.8566  4.6191  -4.382 0.03294 *
0t-48t   -8.2634  10.1200  28.5034  4.6191   2.191 0.35726
0t-72t  -23.4434  -5.0600  13.3234  4.6191  -1.095 0.86737
0t-Kokt-M -36.0934 -17.7100   0.6734  4.6191  -3.834 0.05840 .
0t-Raa-M  -20.9134  -2.5300  15.8534  4.6191  -0.548 0.99134
24t-48t   11.9766  30.3600  48.7434  4.6191   6.573 0.00457 **
24t-72t   -3.2034  15.1800  33.5634  4.6191   3.286 0.10638
24t-Kokt-M -15.8534   2.5300  20.9134  4.6191   0.548 0.99134
24t-Raa-M  -0.6734  17.7100  36.0934  4.6191   3.834 0.05840 .
48t-72t  -33.5634 -15.1800   3.2034  4.6191  -3.286 0.10638
48t-Kokt-M -46.2134 -27.8300  -9.4466  4.6191  -6.025 0.00715 **
48t-Raa-M  -31.0334 -12.6500   5.7334  4.6191  -2.739 0.19646
72t-Kokt-M -31.0334 -12.6500   5.7334  4.6191  -2.739 0.19646
72t-Raa-M  -15.8534   2.5300  20.9134  4.6191   0.548 0.99134
Kokt-M-Raa-M -3.2034  15.1800  33.5634  4.6191   3.286 0.10638
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.6,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2 G3
24t     96.14 A
Kokt-M  93.61 A B
72t     80.96 A B C
Raa-M   78.43 A B C
0t      75.90 B C
48t     65.78 C

```

Figur vedlegg 10. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av tarmprøver fra fullformalte og hele åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.

## Vedlegg 6. Enveis ANOVA: Proteinløselighet ~ prosessering Data: Rå og kokte åkerbønnprøver

### 6.1 Ufordøyde prøver

```
> AnovaModel.7 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=RaaogKokte_U_Dataset)

> summary(AnovaModel.7)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3  1125   375.0     20 0.00717 **
Residuals  4    75    18.8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(RaaogKokte_U_Dataset$DUMAS , groups=RaaogKokte_U_Dataset$PROSESS,
+  statistics=c("mean",
+  "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 35.0 7.071068     2
Kokt-M  25.0 0.000000     2
Raa-FF  17.5 3.535534     2
Raa-M   2.5 3.535534     2

> print(simple.glht(AnovaModel.7,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = RaaogKokte_U_Dataset)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 17.6273
95% confidence level

Linear Hypotheses:
          Lower      Center      Upper  Std.Err t value  P(>t)
Kokt-FF-Kokt-M -7.6273  10.0000  27.6273   4.3301   2.309 0.23875
Kokt-FF-Raa-FF -0.1273  17.5000  35.1273   4.3301   4.041 0.05118 .
Kokt-FF-Raa-M  14.8727  32.5000  50.1273   4.3301   7.506 0.00583 **
Kokt-M-Raa-FF -10.1273   7.5000  25.1273   4.3301   1.732 0.41533
Kokt-M-Raa-M   4.8727  22.5000  40.1273   4.3301   5.196 0.02207 *
Raa-FF-Raa-M   -2.6273  15.0000  32.6273   4.3301   3.464 0.08244 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.7,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Kokt-FF 35.0 A
Kokt-M  25.0 A
Raa-FF  17.5 A B
Raa-M   2.5  B
```

*Figur vedlegg 11. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av ufordøyde prøver fra rå og kokte åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.*

## 6.2 Mageprøver

```
> AnovaModel.8 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=RaaogKokte_M_Dataset)
> summary(AnovaModel.8)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3  644.9   214.96   22.46 0.00578 **
Residuals  4    38.3     9.57
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(RaaogKokte_M_Dataset$DUMAS , groups=RaaogKokte_M_Dataset$PROSESS,
+  statistics=c("mean",
+  "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 42.190 0.000000      2
Kokt-M  40.145 5.876057      2
Raa-FF  63.080 0.000000      2
Raa-M   47.910 1.937473      2

> print(simple.glht(AnovaModel.8,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = RaaogKokte_M_Dataset)
Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 12.5937
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower Center Upper Std.Err t value P(>t)
Kokt-FF-Kokt-M -10.549  2.045  14.639  3.094  0.661 0.90656
Kokt-FF-Raa-FF -33.484 -20.890  -8.296  3.094  -6.753 0.00863 **
Kokt-FF-Raa-M  -18.314  -5.720   6.874  3.094  -1.849 0.37197
Kokt-M-Raa-FF  -35.529 -22.935 -10.341  3.094  -7.414 0.00611 **
Kokt-M-Raa-M   -20.359  -7.765   4.829  3.094  -2.510 0.19688
Raa-FF-Raa-M    2.576  15.170  27.764  3.094   4.904 0.02695 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.8,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Raa-FF 63.080 A
Raa-M  47.910 B
Kokt-FF 42.190 B
Kokt-M  40.145 B
```

*Figur vedlegg 12. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av mageprøver fra rå og kokte åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.*

### 6.3 Tarmprøver

```
> AnovaModel.9 <- aov(DUMAS ~ PROSESS, data=RaaogKokte_T_Dataset)
> summary(AnovaModel.9)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
PROSESS    3 1293.0   431.0   22.44 0.00578 **
Residuals  4   76.8    19.2
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(RaaogKokte_T_Dataset$DUMAS , groups=RaaogKokte_T_Dataset$PROSESS,
+ statistics=c("mean",
+ "sd"))
      mean      sd data:n
Kokt-FF 106.26 7.155921     2
Kokt-M   93.61 3.577960     2
Raa-FF  111.32 0.000000     2
Raa-M    78.43 3.577960     2

> print(simple.glht(AnovaModel.9,'PROSESS', level=0.95))

      Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = DUMAS ~ PROSESS, data = RaaogKokte_T_Dataset)

Quantile = 4.0709
Minimum significant difference = 17.8388
95% confidence level

Linear Hypotheses:
      Lower      Center      Upper  Std.Err t value  P(>t)
Kokt-FF-Kokt-M -5.1888  12.6500  30.4888   4.3821  2.887 0.13808
Kokt-FF-Raa-FF -22.8988 -5.0600  12.7788   4.3821 -1.155 0.68098
Kokt-FF-Raa-M   9.9912  27.8300  45.6688   4.3821  6.351 0.01080 *
Kokt-M-Raa-FF -35.5488 -17.7100   0.1288   4.3821 -4.041 0.05118 .
Kokt-M-Raa-M   -2.6588  15.1800  33.0188   4.3821  3.464 0.08244 .
Raa-FF-Raa-M   15.0512  32.8900  50.7288   4.3821  7.506 0.00583 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

> cld(simple.glht(AnovaModel.9,'PROSESS', level=0.95))
Tukey's HSD
Alpha: 0.05

      Mean G1 G2
Raa-FF 111.32 A
Kokt-FF 106.26 A
Kokt-M  93.61 A B
Raa-M   78.43 B
```

*Figur vedlegg 13. Output fra enveis ANOVA med påfølgende Tukey test i R Commander av tarmprøver fra rå og kokte åkerbønner: Proteinløselighet ~ prosessering.*





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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway