



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Tove G. Devold

Effekt av bløtlegging, koking og spiring på innhold av protein og antinæringsstoffer i to sorter av erter (*Pisum sativum*) og fababønner (*Vicia faba* L.)

Effect of soaking, cooking and germination on
protein and antinutrient content in two varieties of
pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba* L.)

Emilie Gullberg Jørgensen

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble skrevet i forbindelse med en toårig masterutdannelse i Matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø – og biovitenskapelige universitet. Oppgaven ble skrevet som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture ved universitetet. Laboratoriearbeid forbundet med oppgaven ble utført ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap våren 2020. Analyse av proteininnhold ble utført av LAB-Tek på Fakultetet for biovitenskap.

Jeg vil gjerne takke min hovedveileder Tove G. Devold for å ha vært en konstant kilde til kunnskap og gode råd, og for alle konstruktive tilbakemeldinger jeg har fått underveis. Jeg vil også takke biveileder Svein Halvor Knutsen og prosjektleder for FoodProFuture Anne Kjersti Uhlen for tilbakemeldinger og råd. Jeg vil takke Tora Asledottir for hjelp rundt den praktiske gjennomførelsen av analysene og Irene Comi for all hjelp jeg har fått på laboratoriet. Tusen takk til FoodProFuture for den økonomiske støtten til oppgaven og at jeg har fått være en del av prosjektet, og takk til Biovit og Nofima for medvirkning til analyser.

Jeg vil også rette en takk til mine medstudenter for godt samhold på lesesalen, og for all støtte og hjelp utenfor lesesalen da universitetet stengte. Til slutt vil jeg takke familie og venner for alle oppmuntrende ord, spesielt vil jeg takke de jeg har delt kollektiv med det siste semesteret. Takk for støtten i stressende stunder med hjemmekontor, og for å ha vært der når jeg trengte avkobling og sosialt samvær.

Norges miljø – og biovitenskapelige universitet

Ås, juli 2020

Emilie Gullberg Jørgensen

Sammendrag

Med en raskt økende befolkning og stadig stigende tall over underernærte mennesker, vil det fremover bli et større behov for produksjon av proteinrike næringsmidler med høy næringsverdi. Det er et stigende inntak på verdensbasis av animalske proteinkilder som kjøtt, melk og egg, noe som har en svært ressurskrevende produksjon og er en av de største bidragsyterne til klimagassutslipp. Basert på denne informasjonen er det et behov for en mer bærekraftig matproduksjon, og det er ønskelig å utnytte proteinrike plantevekster i større grad. Belgvekster er noen av de mest proteinrike plantevekstene, og ved gå over til større produksjon av belgvekster kan en redusere klimagassutslipp relatert til matproduksjon betraktelig. Store deler av verden benytter allerede belgvekster i kosten som proteinkilde, men størsteparten av planteproteinene som dyrkes i dag benyttes som dyrefôr til produksjon av nettopp kjøtt, melk og egg. I tillegg til å være en god kilde til proteiner, inneholder også belgvekster mange viktig mineraler og vitaminer, og har et høyt innhold av kostfiber. Det vil dermed også være positive helseeffekter knyttet til å legge om til et kosthold mer basert på plantebasert protein. På tross av de mange positive aspektene ved belgvekster, er de også assosiert med et høyt innhold av forskjellige antinæringsstoffer. Antinæringsstoffer kan igjen ha negative helseeffekter, som redusert opptak av mineraler og proteiner. For at plantebasert protein skal kunne erstatte animalsk protein er det derfor ønskelig å redusere innholdet av antinæringsstoffer i plantebasert mat. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekt av ulike prosessering på innholdet av to vanlige antinæringsstoffer i ulike sorter av erter og fababønner. Det ble utført analyser av fytinsyre og galaktosyl-sukrose oligosakkarider (GOS) på ulike sorter av erter og fababønner som hadde gjennomgått bløtlegging, ulike grader av spiring, og koking, samt på uprosesserte erter og fababønner.

Resultatene viste at sortene av erter oppnådde signifikant større grad av spiring i form av lenger rotlengde enn sortene av fababønner etter 72 timer. Det var signifikante variasjoner i proteininnhold mellom de ulike sortene, men spiretid hadde ingen signifikant effekt på proteininnholdet. Spiring og koking hadde en signifikant reduserende effekt på innhold av fytinsyre, som varierte mellom 18,72% til 33,14% reduksjon etter 72 timers spiring. Det var ingen korrelasjon mellom graden av reduksjon og art. Spiring og koking hadde stor effekt på innholdet av GOS, der den laveste graden av reduksjon etter 72 timers spiring var 96,9%. Spiring og koking hadde en reduserende effekt på antinæringsstoffene fytinsyre og GOS, og kan benyttes som prosesseringsteknikker for å minske innholdet av disse i hele erter og fababønner.

Abstract

With a rapidly growing population and an ever-rising number of under nourished, there will become a larger need for producing protein rich foods with a high nutritional value. There is currently a rising intake of animal derived protein such as meat, dairy and eggs worldwide. This industry demands a lot of resources and is one of the largest contributors to greenhouse gas emissions. Based on this information there is a need for a more sustainable food production, and a wish to increase the utilization of protein rich plants. Legumes are abundant in protein, and by transitioning to a more substantial legume production the greenhouse gas emissions related to food production could be reduced significantly. Many parts of the world already take advantage of legumes in the diet as a protein source, but the bulk of plant proteins produced today are utilized as animal feed in the production of meat, dairy and eggs. In addition to being an excellent source of protein, legumes additionally contain many essential minerals and vitamins as well as being a good source of dietary fiber. The positive health effects tied to a more legume rich diet only adds to the environmental benefits of plant protein production. Despite the numerous indisputable advantages of legumes, they are also associated with a high content of antinutritional factors. Antinutrients on the other hand may pose a risk of having negative effects on health, such as reduced intake of proteins and minerals. To replace animal derived protein with plant-based alternatives, the content of antinutrients should be reduced. The aim of the thesis was to investigate the effects of processing on two regularly occurring antinutritional factors in different varieties of peas and faba beans. Analysis of phytic acid and galactosyl-sucrose oligosaccharides (GOS) were conducted on different varieties of pea and faba bean which had undergone soaking, germination to different extents, and cooking, as well as non-processed peas and faba beans.

The results determined that the varieties of pea had a higher degree of germination in terms of radicle length than the varieties of faba beans after 72 hours. There were significant variations in protein content between the varieties, but length of germination did not have a significant effect on protein content. Germination and cooking did have a significant effect on phytic acid content, which varied from a reduction of 18,72% to 33,14% between the varieties after a 72-hour germination period. There was no correlation between the extent of reduction and species. Germination and cooking did have a considerable effect on the content of GOS, where the lowest degree of reduction detected after 72 hours germination was 96,9%. Antinutrients phytic acid and GOS were reduced during germination and cooking, and these processing techniques can be utilized to reduce the content of these in whole pea and faba bean.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract	IV
Forkortelser	VIII
1. Innledning	1
1.1 Plantebaserte proteinkilder	1
1.2 Hensikt med oppgaven	2
2. Teori	4
2.1 Belgvekster	4
2.1.1 Erter.....	5
2.1.2 Fababønner.....	6
2.2 Antinæringsstoffer	7
2.2.1 Fytinsyre	9
2.2.2 Galaktosyl-sukrose oligosakkarider	11
3. Materialer og metoder	14
3.1 Produkter benyttet i oppgaven	14
3.2 Beregning av proteininnhold	17
3.3 Prosessering av erter og fababønner	18
3.4 Analyse av fytinsyre	21
3.5 Analyse av galaktosyl-sukrose oligosakkarider	23
3.6 Resultatbehandling og statistisk analyse	25
4. Resultater	27
4.1 Spiring av erter og fababønner	27
4.2 Proteininnhold i erter og fababønner	28
4.3 Innhold av fytinsyre.....	29
4.4 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider	31

5. Diskusjon.....	34
5.1 Spiring av erter og fababønner	35
5.2 Proteininnhold	36
5.3 Innhold av fytinsyre.....	37
5.4 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider	41
5.5 Oppsummering	44
6. Til ettertanke og videre forskning	46
7. Litteratur.....	49
Vedlegg	I

Forkortelser

A/I/S/V – 0/1/2/3/4	Sort (A = Astronaut, I = Ingrid, S = Sampo, V = Vertigo) – Spiretid timer (0 = uprosessert, 1 = 0, 2 = 24, 3 = 48, 4 = 72)
ALP	Alkalisk fosfatase
ANOVA	Variansanalyse (fra engelsk; analysis of variance)
Cu ²⁺	Toverdige kobberion
CuO	Kobber(II)oksid
DM	Tørrstoff (fra engelsk; dry matter)
FoodProFuture	Food Protein Future (fullt prosjektnavn; innovativ og bærekraftig utnyttelse av planteproteiner i fremtidsmat)
GOS	Galaktosyl-sukrose oligosakkarider
HCl	Saltsyre
HPLC	Høypresisjonsvæskeskromatografi (fra engelsk; High Performance Liquid Chromatography)
IP6	Myo-inositol heksafosforsyre (fytinsyre)
KOH	Kaliumhydroksid
mM	Millimolar
N ₂	Nitrogengass
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
RPM	Rotasjoner per minutt
UV	Ultrafiolett (fra engelsk; ultraviolet)

1. Innledning

1.1 Plantebaserte proteinkilder

De siste årene har det blitt en større trend å satse på mer plantebasert protein og mindre utnyttelse av protein i form av kjøtt eller dyreprodukter. Dette skyldes både et større fokus på dyrevelferd og mer miljøvennlig, bærekraftig matproduksjon. Store deler av planteprotein som blir produsert i dag, blir brukt som dyrefôr i produksjon av animalsk protein. Produksjonen av animalsk protein har større belastning på miljøet enn det plantebasert protein har. Produksjonen krever langt større mengder ferskvann enn ved produksjon av planteproteiner. Store klimagassutslipp er også forbundet med produksjon av animalsk protein, da særlig fra storfe under produksjon av kjøtt og melkeprodukter (Heller & Keoleian, 2014). Poore og Nemecek (2018) rapporterte at storfe hadde et utslipp på 60 kg CO₂ per kg produkt. Kjøtt fra melkekuer hadde et noe lavere utslipp på 21 kg CO₂ per kg. Svin og fjørfe er ikke drøvtyggere og har dermed noe lavere utslipp på henholdsvis 7 og 6 kg CO₂. Til sammenlikning hadde erter et utslipp på 0,9 kg CO₂ per kg.

Det krever store landarealer for å kunne produsere nok fôr til husdyr. Kun en tredjedel av energien fra dyrefôr blir omgjort til energi som mennesker kan nyttiggjøre seg av i form av dyreprodukter som kjøtt, melk og egg. Ved å omvende produksjonen av dyrefôr til produksjon av planter til menneskelig konsum kan tilgjengelig energi fra mat øke med hele 70%. Dette er nok til å mate fire milliarder mennesker, og kan være et viktig steg for å sikre matsikkerhet for en voksende populasjon i fremtiden (Cassidy, 2013).

En norsk undersøkelse gjennomført av Helsedirektoratet mellom 2010 og 2011 viser at nordmenn i gjennomsnitt får mest protein i kostholdet fra kjøtt og ost, og deretter fra kornprodukter (Totland, Melnæs, Lundberg-Hallén, Hellend-Kigen, Lund-Blix et al., 2012). Norge og mange andre land i verden har ikke gode forutsetninger for å legge om til produksjon av mer planter til menneskelig konsum grunnet et kaldere klima, kvalitet på jordsmonn og tilgjengelig areal (Frøseth, 2009). I Norge blir selv mye korn og andre planter beregnet til menneskelig konsum benyttet som dyrefôr fordi avlingene ikke møter kravene til næringsinnhold. Dette varierer fra år til år avhengig av dyrkningsbetingelser. Her til lands er det også tradisjoner knyttet til et kosthold sentrert rundt animalsk protein, og kjøttkonsumet blant nordmenn øker for hvert år (Helsedirektoratet, 2018). I nyere tid har det på tross av dette vært en økning av plantebaserte alternativer til kjøttprodukter, grunnet en økende etterspørsel fra forbrukere etter dette (Günther, 2019). For å utvikle trenden og skape muligheter for flere

plantebaserte proteinalternativer trengs det mer forskning rundt dyrking av proteinrike plantevekster i Norge.

1.2 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven er skrevet som en del av prosjektet FoodProFuture. Formålet med prosjektet er å skape en kunnskapsplattform for utnyttelse av norske plantematerialer til smakfulle og sunne produkter med høyt proteininnhold. Prosjektet vil ikke bare kunne være nyttig for produsenter i næringsmiddelindustrien, men også øke kunnskapen om plantebasert protein hos forbrukere. Kunnskap om råmaterialene og deres egenskaper er viktig for å kunne utvikle proteinrike plantebaserte produkter, og for bruk av uprosesserte erter og fababønner hos forbrukeren. Produkter basert på plantebasert protein går ofte gjennom flere prosesserinstrinn, som kan ha innvirkning på kjemiske og fysiske egenskaper. Belgvekster er kjent for å ha et høyt innhold av antinæringsstoffer. Antinæringsstoffer kan ha negative helseeffekter, og det er derfor ønskelig å redusere forekomsten av disse. Det har derfor blitt gjort forskning på om prosessering kan ha en effekt på innholdet av antinæringsstoffer (Popova & Mihaylova, 2019). I denne oppgaven blir erter og fababønner utsatt for prosessering i form av bløtlegging, spiring og koking. Spiring og koking har tidligere vist seg å ha en reduserende effekt på innhold av enkelte antinæringsstoffer, og denne oppgaven har som hensikt å undersøke om en kombinasjon av disse prosesseringsmetodene vil ha en innvirkning på antinæringsstoffer. Hensikten med denne oppgaven er å analysere antinæringsstoffer i ulike prøver av erter og fababønner. Antinæringsstoffene som skal undersøkes er fytinsyre og spesifikke oligosakkarider kalt galaktosyl-sukrose oligosakkarider (GOS).

Antinæringsstoffer er kjent for å ha uønskede effekter, og det kan derfor være nyttig å undersøke om prosessering av erter og fababønner kan redusere innholdet av disse. For å kunne utnytte mer plantebasert protein er det en fordel å ha kunnskap om hvordan en kan redusere innholdet av antinæringsstoffer. Gjennom å opparbeide denne kunnskapen kan en optimalisere utviklingen av plantebaserte produkter.

2. Teori

2.1 Belgvekster

Belgvekster har lenge vært en viktig del av menneskers kosthold, særlig i befolkningsgrupper med lav inntekt i utviklingsland. Belgvekster er en god kilde til proteiner med et gjennomsnittlig innhold på rundt 18-32% (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). I motsetning til korn som hvete og havre som er enfrøbladede planter, er belgvekster tofrøbladet. Endospermen er en del av frøbladene i mange belgvekster, mens endospermen og frøbladet er to separate deler i mange kornarter (Lack & Evans, 2005). Belgvekster lever i symbiose med nitrogenfikserende bakterier av slekten *Rhizobium*, som ikke bare bidrar til det høye proteininnholdet i frøene, men også minsker behovet for kunstgjødsel (Dhaliwal, 2017). Nitrogengass (N_2) fra atmosfæren blir omdannet til ammonium (NH_4^+) ved hjelp av nitrogenase produsert av *Rhizobium*-bakterier. Belgvekster består hovedsakelig av karbohydrater i form av stivelse og er en god kilde til kostfiber, og har et lavt innhold av mettet fett, kolesterol og natrium. Belgvekster inneholder også viktige vitaminer og mineraler som vitamin A, vitamin C, vitamin K, vitamin B6, folat, fosfor og kopper (Singh, Chang, Yan, Lee, Ucmak et al., 2017; Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Belgvekster kan inneholde noe resistent stivelse, som ikke er like fordøyelig grunnet et høyt innhold av amylose i forhold til amylopektin (Stephen, Philips & Williams, 2006). De essensielle aminosyrene lysin og tryptofan finner man mye av i belgvekster. Dette gjør erter og fababønner til et viktig tilskudd i et vegetarisk kosthold, da andre plantevekster som korn inneholder lite av dette. Korn har derimot et høyere innhold av de svovelrike aminosyrene metionin og cystein, som det er lite av i belgvekster. En kombinasjon av korn og belgvekster er derfor viktig for å sikre inntak av alle de essensielle aminosyrene i et plantebasert kosthold (Sáa, Morenob & Carciofi, 2020). Belgvekster har et høyt innhold av antinæringsstoffer, blant annet trypsininhibitorer. Trypsininhibitorer reduserer aktiviteten til enzymene trypsin og chymotrypsin, som dermed fører til redusert fordøyelse av proteiner og opptak av aminosyrer (Avilés-Gaxiola, Chuck-Hernández & Saldívar, 2017). Andre antinæringsstoffer som belgvekster inneholder mye av er blant annet fytinsyre og galaktosyl-sukrose oligosakkarider, som vil bli beskrevet i detalj i denne oppgaven. Erter og fababønner blir dyrket og høstet i løpet av den kjølige sesongen i sine opprinnelsesområder i Sentral-Asia, Midtøsten og rundt Middelhavet. Norge har på grunn av sitt kjølige klima ikke de samme mulighetene for dyrking av belgvekster som disse områdene, men erter og fababønner blir dyrket i løpet av sommerhalvåret (Serikstad, Hansen & de Boer, 2013).

2.1.1 Erter

Erter (*Pisum sativum*) er en plante i erteblomstfamilien (*Fabaceae*). Erter blir populært brukt i hele verden som et næringsmiddel og som fôr. På grunn av ertens toleranse for kjøligere klima kan den dyrkes i store deler av verden, der Canada er den største produsenten og eksportøren. Germinering av frøene kan skje mellom 4°C og 21°C, mens optimal temperatur for vekst er mellom 16°C og 18°C (Tulbek, Lam, Wang, Asavajaru & Lam, 2016). Det finnes flere ulike sorter av erter, som varierer i utseende og næringsinnhold (Wang, Hatcher & Gawalko, 2008).

Erter har et høyt proteininnhold på mellom 21-25% (Tulbek et al., 2016). Proteininnholdet kan variere grunnet ytre betingelser som klima, jordsmonn og skadedyr. Innvendige faktorer som art, sort og forskjell mellom enkeltplanter har også innvirkning på proteininnhold. Erter inneholder lite fett, mye karbohydrater i form av stivelse og lite fiber sammenliknet med andre belgvekster. Erter blir i hovedsak benyttet som dyrefôr på grunn av proteininnholdet, og proteinfraksjoner fra erter blir hyppig brukt som fôrtilskudd hos svin, storfe og fjørfe (Shen, Hou & Ding, 2016). Erteprotein er et godt alternativ til bruk av soyaprotein i fôr, ettersom erter inneholder 5-20% mindre trypsininhibitorer enn soyabønne (Dahl, Foster & Tyler, 2012). Produksjonen av soyabønner blir også forbundet med avskoging av tropisk regnskog på grunn av dens krav til et varmt klima.

Den proteinrike delen fra erter kan også benyttes i næringsmiddelindustri som emulgator, fortykningsmiddel og sudaner (Fredrikson, Biot, Alminger & Carlsson, 2001). For å isolere erteprotein kan ertene enten males til ertemel, eller det kan produseres som erteproteinkonsentrat eller erteproteinisolat. Produksjon av ertemel skjer ved tørrformaling av avskallede erter. Konsentrat og isolat produseres henholdsvis ved tørrfraksjonering og våtfraksjonering ved hjelp av syre eller base. Proteinisolat kan også produseres ved ultrafiltrering, som vil gi et høyere proteininnhold (Karaca, Low & Nickerson, 2011).

2.1.2 Fababønner

Fababønner (*Vicia faba*), også kalt hestebønne eller åkerbønne, er i likhet med erter en plante i erteblomstfamilien (*Fabaceae*). Fababønner ble opprinnelig dyrket under den kjølige sesongen i Midtøsten, og frø har vist seg å være spiredyktige ned mot 15°C. Fababønner blir delt inn i kategorier etter størrelse, de varierer fra store frø (> 1,0 g), mellomstore (0,5–1,0 g) og små frø (< 0,5 g). Større frø har vist høyere toleranse for kjølig klima, spirer raskere og gir større utbytte enn små frø. Små frø kan derimot være mer økonomisk hensiktsmessig å dyrke fordi det trengs færre frø, og dette kan senke produksjonskostnadene (Etemadi, Hashemi, Barker, Zandvakili & Liu, 2019). Sort har også innvirkning på frøenes spiringsevne og næringsinnhold (Micek, Kowalski, Kulig & Kański, 2014).

Fababønner har et høyt innhold av proteiner, og innholdet kan variere mellom sorter. Det er blitt rapportert en variasjon i proteininnhold mellom 19,5-33,3% protein i ulike sorter (Kumar, Prasad & Sinha, 2014). Fababønner har også et noe lavere innhold av stivelse enn erter, og inneholder mye av aminosyrene lysin og arginin. Disse aminosyrene er viktige i et plantebasert kosthold, og andre proteinrike vekster som korn inneholder lite av dem.

Fababønner er også verdifulle i industrien da de har et høyt innhold av levodihydroksyfenylalanin (L-dopa) som er forstadiet til dopamin. Inntak av dette har vist seg å gi forbedring hos pasienter med Parkinsons sykdom (Kumar et al., 2014). En utfordring ved benyttelse av fababønner er innholdet av vicin og convicin. Vicin og convicin er pyrimidin-glykosider som kan forårsake hemolytisk anemi hos personer som mangler enzymet glukose-6-fosfat dehydrogenase (G6PD). Det har derfor blitt dyrket frem varianter av fababønner med lavere innhold av vicin og convicin slik at personer med G6PD-mangel kan spise fababønner uten risiko (Khazaei, Purves, Hughes, Link, O'Sullivan et al., 2019).

2.2 Antinæringsstoffer

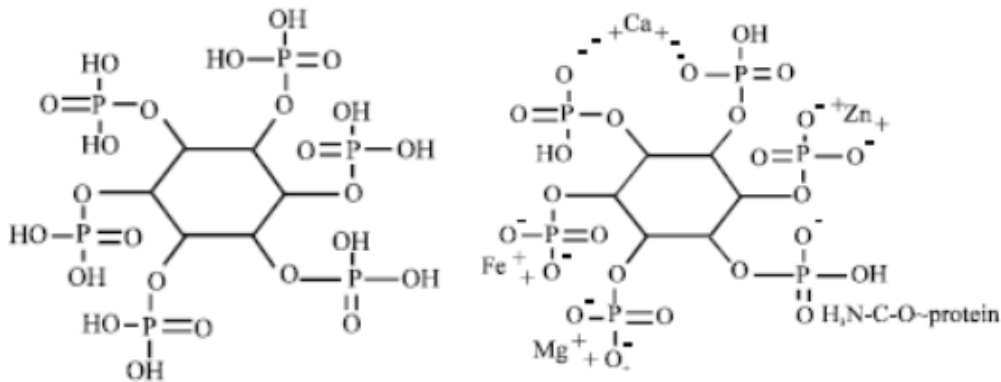
Å sørge for matsikkerhet i verden er en stor utfordring, og det er også viktig å sikre mat med riktig næringsverdi. Et plantebasert kosthold er ofte forbundet med høyt inntak av antinæringsstoffer, ettersom dette er noe mange planter syntetiserer. Antinæringsstoffer er funnet i høye konsentrasjoner i belgvekster. Med et økt fokus på omvending til et mer plantebasert kosthold er det også ønskelig med mer kunnskap rundt dette. Antinæringsstoffer er komponenter knyttet til utfordringer ved redusert fordøyelse eller biotilgjengelighet av ulike næringsstoffer i kroppen. Kjente effekter av antinæringsstoffer kan være kvalme, oppblåsthet, hodepine, utslett og mangelsykdommer. Enkelte antinæringsstoffer kan være giftige ved høyt inntak, noe som beskytter plantene mot skadedyr (Gemedé & Ratta, 2014). Noen antinæringsstoffer er også forbundet med positive helseeffekter, som redusert risiko for kreft, regulering av blodsukkernivå og reduksjon av kolesterol i blodet (Shahidi, 1997). På tross av dette er det et ønske om å redusere forekomsten av antinæringsstoffer i kostholdet basert på de negative effektene de kan ha. Innholdet av antinæringsstoffer varierer mellom ulike arter, sorter og enkeltplanter, og eksterne faktorer kan også ha innvirkning på dette. Det er muligheter for å selektere for planter med lavt innhold av antinæringsstoffer, men ettersom de ofte fungerer som naturlig beskyttelse mot sykdom og skadedyr for plantene kan dette virke negativt på vekstutbytte (Sandberg, 2000). Moderne bioteknologiske metoder kan brukes for å redusere nivået av allergener og antinæringsstoffer i mat. Gen-redigering ved bruk av TALENS (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) eller CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/CRISPR-Associated Systems (CAS) kan skape mutasjoner i DNA i cellene. Dette gir muligheter for å utvikle plantevarianter med alternative forsvarsmekanismer, og med redusert innhold av uønskede komponenter (Popova & Mihaylova, 2019). Dette er kostbar forskning, og antinæringsstoffer kan også reduseres ved hjelp av mer tradisjonelle metoder som ved mekanisk, biokjemisk og termisk behandling. Disse inkluderer bløtlegging, spiring, varmebehandling, ekstrudering, fermentering, strålebehandling og enzymbehandling. Ved å prosessere råvarene med disse metodene kan en redusere forekomsten av uønskede komponenter, og dermed forhindre de negative effektene forårsaket av antinæringsstoffer. Vanlige antinæringsstoffer i belgvekster er fytinsyre, lektiner, tanniner, alkaloider, galaktosyl-sukrose oligosakkarider og proteaseinhibitorer. En oversikt over antinæringsstoffer og effekt av prosessering finnes i tabell 1. I denne oppgaven fokuseres det på antinæringsstoffene fytinsyre og galaktosyl-sukrose oligosakkarider, som er de antinæringsstoffene det er høyest forekomst av i belgvekster (Popova & Mihaylova, 2019).

Tabell 1. Oversikt over effekter av ulike antinæringsstoffer funnet i belgvekster, og effektene av ulike prosesseringer. Referanser: (Popova & Mihaylova, 2019) [1], (Gemede & Ratta, 2014) [2], (Kalpanadevi & Mohan, 2013) [3], (Ibrahim, A., Shatta & Embaby, 2002) [4], (Shi, Arntfield & Nickerson, 2018) [5], (Savelkoul, Van der Poel & Tamminga, 1992) [6], (Khazaei et al., 2019) [7]

Antinæringsstoff	Fytinsyre	GOS	Proteaseinhibitorer/ trypsinhibitorer
<i>Effekt</i>	Redusert opptak av mineraler og proteiner. [1]	Produksjon av tarmgass, ubehag, oppblåsthet og diaré. [1]	Redusert fordøyelighet av proteiner. Inhibering av fordøyelsesenzym. [1]
<i>Bløtlegging</i>	Noe reduksjon ved bløtlegging, opptil 31% reduksjon rapportert [3]	Opptil 100% reduksjon i raffinose oppnådd etter 16 timer, noe mindre reduksjon av staktyose og verbaskose [3], [4]	Noe reduksjon, 8% er rapportert [3]
<i>Varme- behandling</i>	28% reduksjon ved koking, 70% reduksjon ved autoklaving [3]	100% reduksjon av raffinose ved koking [4], også rapportert 75% av totalt GOS ved koking [3]	34% reduksjon ved koking, 100% reduksjon ved autoklaving [3]
<i>Spiring</i>	Opptil 95% reduksjon rapportert ved 96 timers spiring [3]	100% reduksjon i GOS etter 96 timers spiring [3], [4]	19% reduksjon oppnådd ved 96 timers spiring [3]
Antinæringsstoff	Tanniner	Alkaloider	Lektiner
<i>Effekt</i>	Danner kompleks med proteiner og senker dermed proteinfordøyelighet. [1]	Negative effekter på nervesystemet, kan ved høyt inntak forårsake økt puls og paralysé. [2] Vicin og convicin kan forårsake hemolytisk anemi i personer med G6PD-mangel [7]	Kan binde til karbohydrater, bryter ned tarmveggen, kan forårsake autoimmun sykdom. [1]
<i>Bløtlegging</i>	26% reduksjon rapportert ved bløtlegging i 12 timer [3]	27% reduksjon rapportert ved 12 timer bløtlegging [3]	Svært liten til ingen reduksjon [5]
<i>Varmebehandlin- g</i>	37% reduksjon ved koking, og 82% reduksjon ved autoklaving [3]	31% reduksjon oppnådd ved koking, 71% reduksjon ved autoklaving [3]	93-100% reduksjon er rapportert etter koking [5]
<i>Spiring</i>	76% reduksjon er rapportert etter 96 timers spiring [3]	Opptil 74% reduksjon ved 96 timer spiring [3]	89% reduksjon ble oppnådd etter 6 dagers spiring i fababønne [6]

2.2.1 Fytinsyre

Fytinsyre eller fytat fungerer som hovedlagringen av fosfor i plantefrø (Azeke, Egielewa, Eigbogbo & Ihimire, 2011). I frø fra korn er fytinsyre mest konsentrert i kli-delen eller skallet på frøet, men i belgvekster blir fytinsyre hovedsakelig lagret i frøbladene. Det er derfor lettere å fjerne den fytinsyre-rike delen fra korn enn fra belgvekster.



Figur 1. Struktur til fytinsyre (t.v) og struktur av fytinsyre med mulige interaksjoner med metall-kationer (mineraler) og proteinforbindelser. Hentet fra Coulibaly, Kouakou og Chen (2011) *Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality*. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1, 1-22.

Figur 1 viser strukturen til fytinsyre og dens mulige interaksjoner med mineraler og proteiner. Fytinsyremolekylet er en ester av alkoholforbindingen inositol med seks dihydrogenfosfat-grupper. Fytinsyre blir også kalt inositol heksafosfat, forkortet IP6. I frø blir fytinsyre lagret i ionisert form som saltet fytat (Popova & Mihaylova, 2019).

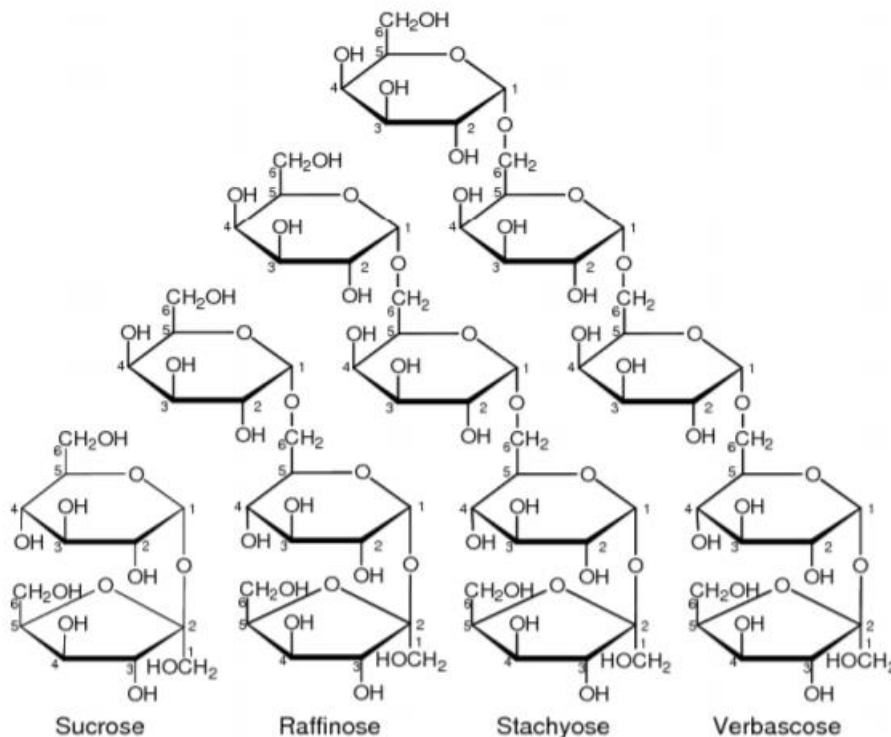
Fosfat lagret som fytinsyre i planter blir frigjort under plantens spiring ved hjelp av enzymet fytase. Dyr og mennesker mangler dette enzymet, og dette gjør at fosfatet fra fytinsyre ikke er tilgjengelig under fordøyelsen. I tillegg har fytinsyre et bredt pH-spekter som et negativt ladet ion, og har høy affinitet for mineraler som Zn²⁺, Fe^{2+/3+}, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺. Dette begrenser biotilgjengeligheten for disse mineralene hos mennesker og dyr. I tillegg fører dette til økt fosfor-forurensning gjennom avføring fra dyr som får mye fytinsyre i kosten (Azeke et al., 2011). Det har også blitt oppdaget positive effekter ved fytinsyre. Det har blitt forbundet med reduksjon av kreftrisiko, regulering av blodsukker og reduksjon av kolesterol i blodet (Shahidi, 1997; Silva & Bracarense, 2016). På grunn av dets sterke negative ladning virker også fytinsyre som en naturlig antioksidant (Gemedé & Ratta, 2014). Du, Dou og Wu (2012) rapporterte at tilsetning av 0,1 mM fytinsyre inhiberte polyfenol oksidase i eplejuice med

99,2%. Fordi fytinsyre danner kompleks med jern, inhiberer det oksidative reaksjoner katalysert av jern (Graf & Eaton, 1990).

Til tross for dette er det et stort søkelys på fytinsyres negative egenskaper, og reduksjon av fytinsyre i planteråvarer har lenge vært et tema for forskning. Blant annet har det blitt analysert hvorvidt prosessering av råvarer kan redusere innholdet av antinæringsstoffer. Det har blitt rapportert at fytinsyre følger proteinfraksjonen ved proteinisolering av belgvekster (Coulibaly et al., 2011), og det vil derfor være ønskelig å redusere fytinsyreinnholdet for å kunne utnytte planteproteiner uten de negative effektene assosiert med fytinsyre. Under spiring vil nativt fytase i frøene aktiveres, og fytinsyre brytes ned slik at fosfor kan benyttes av planten (Azeke et al., 2011). Det har også blitt påvist at bløtlegging og koking av frø kan redusere innholdet av fytinsyre (Kalpanadevi & Mohan, 2013).

2.2.2 Galaktosyl-sukrose oligosakkarider

Oligosakkarider er karbohydrater bestående av tre til ti monosakkarider bundet sammen ved hjelp av glykosidbindinger. Belgvekster inneholder galaktosyl-sukrose oligosakkarider (GOS) som er α -galaktosyl-derivater av sukrose (Obendorf & Kosina, 2011). Raffinose er et mono-galaktosyl derivat, stakiose di-galaktosyl derivat og verbaskose er et tri-galaktosyl derivat av sukrose. I belgvekster er det blitt funnet at oligosakkarider i raffinose-familien hovedsakelig finnes i frøbladene (Cheung & Chau, 1999).



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

Mennesker mangler enzymet α -galaktosidase, og har derfor ingen mulighet til å bryte ned GOS i tarmen (Gemedé & Ratta, 2014). Dette fører til gastrointestinalt ubehag som følge av fermentering av anaerobe bakterier, som produserer CO_2 , H_2 og metangass. Dette fører til ubehag i form av tarmgass, kramper, diaré og kvalme (Oboh & Burbano, 2000). Tilstedeværelse av GOS kan medføre redusert metabolisme og dermed lavere energiinntak fra mat, og begrense utnyttelse av proteiner og fordøyelsen av aminosyrer. Grunnen til dette er at GOS øker viskositeten til massen i fordøyelsessystemet (Slominski, 2011).

Det har blitt oppdaget positive effekter av GOS, blant annet at det kan fungere som prebiotika ved å fremme vekst av *Bifidobacterium* og *Lactobacillus* som inhiberer vekst av patogene mikroorganismer (Popova & Mihaylova, 2019).

Tidligere forskning har vist at spiring kan redusere innholdet av raffinose i belgvekster (Oboh & Burbano, 2000). Mens planten spirer vil iboende α -galaktosidase-enzym splitte galaktose fra sukrose-delen av raffinose, staktyose og verbaskose. Sukrose og galaktose kan deretter bli nedbrutt for å tilføre energi til planteembryoet. Bløtlegging og koking har også vist seg å ha en reduserende effekt. GOS løses i vann og forsvinner ved bløtlegging, og koking vil øke denne effekten grunnet varmeindusert hydrolyse til disakkarider og monosakkarider (Ibrahim et al., 2002; Oboh & Burbano, 2000).

3. Materialer og metoder

3.1 Produkter benyttet i oppgaven

I denne oppgaven har det blitt benyttet hele erter og fababønner. Det ble benyttet to sorter av gule erter (*Pisum sativum*), Ingrid og Astronaut, og to sorter av fababønner (*Vicia faba*), Vertigo og Sampo. Alle prøvene benyttet i oppgaven er dyrket ved Vollebekk forsøksgård i Ås 2018, som en del av et feltforsøk i regi av NIBIO. I 2017 ble det utført et sortsforsøk ved Vollebekk forsøksgård hvor proteininnholdet i de ulike sortene ble målt (Abrahamsen, Waalen & Uhlen, 2017b). Proteininnhold i sortene brukt i denne oppgaven er gitt i Tabell 2.

Tabell 2. Proteininnhold i de ulike sortene benyttet i oppgaven, verdier hentet fra Abrahamsen et al. (2017b). Sortsforsøk i erter og åkerbønne, NIBIO Korn og frøvekster, Apelsvoll, NMBU Inst. for plantevitenskap.

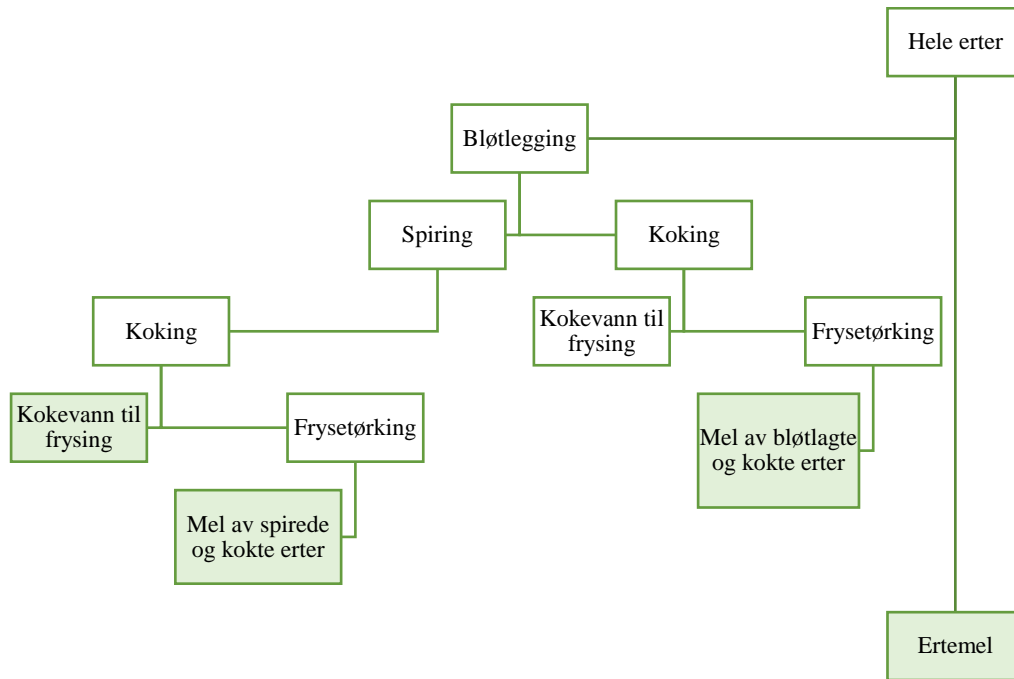
Sort	Proteininnhold
<i>Vertigo</i>	28,2%
<i>Sampo</i>	26,1%
<i>Ingrid</i>	19,3%
<i>Astronaut</i>	22,1%

I denne oppgaven ble det benyttet hele, uprosesserte erter og fababønner som kontroll. Disse ble rensset for støv og planterester før de ble malt på mølle (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch, Germany) til mel med 0,5 mm partikkelstørrelse. Hele erter og fababønner ble også bløtlagt i 16 timer og kokt i 1 time uten spiring. Det ble benyttet tre ulike spiretider, henholdsvis 24, 48 og 72 timer for resten av prøvene, og det ble gjort én parallell av hver prøve i oppgaven.

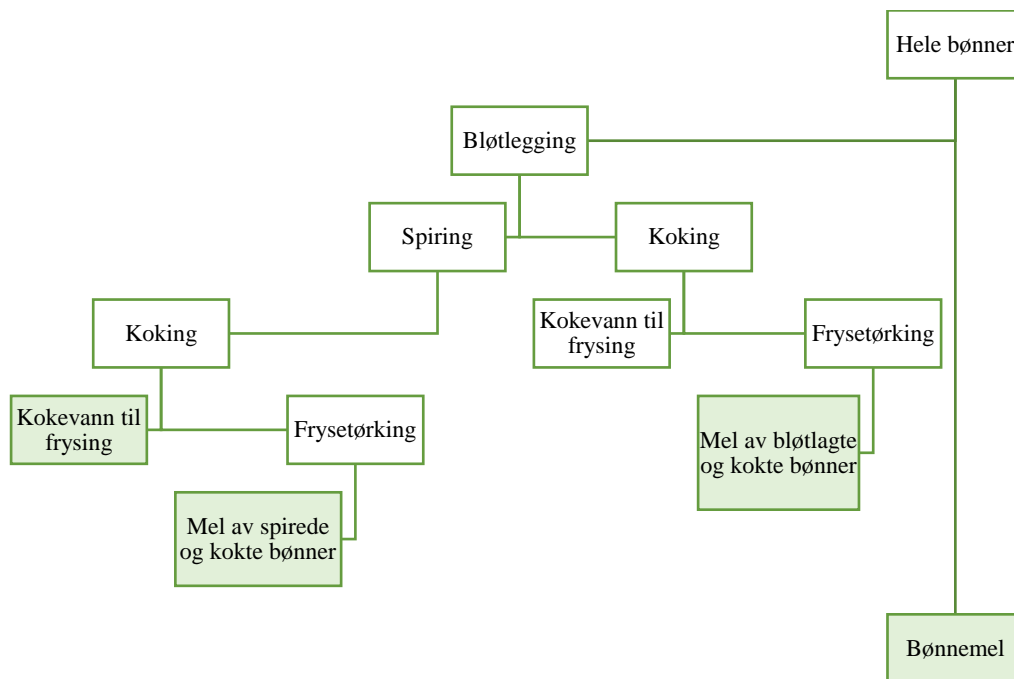
Tabell 3 viser en oversikt over de ulike prøvene benyttet i oppgaven. Figur 3 og figur 4 viser flytskjema over de ulike prosesseringene som ble gjennomført på erter og fababønner.

Tabell 3. Oversikt over de ulike prøvene benyttet i oppgaven.

Prøve	Forklaring
V-0	Hele fababønner av sorten Vertigo, malt
V-1	Fababønner av sorten Vertigo, bløtlagt i 16 timer og kokt
V-2	Fababønner av sorten Vertigo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 24 timer og kokt
V-3	Fababønner av sorten Vertigo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 48 timer og kokt
V-4	Fababønner av sorten Vertigo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 72 timer og kokt
S-0	Hele fababønner av sorten Sampo, malt
S-1	Fababønner av sorten Sampo, bløtlagt i 16 timer og kokt
S-2	Fababønner av sorten Sampo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 24 timer og kokt
S-3	Fababønner av sorten Sampo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 48 timer og kokt
S-4	Fababønner av sorten Sampo, bløtlagt i 16 timer, spirt i 72 timer og kokt
I-0	Hele erter av sorten Ingrid, malt
I-1	Erter av sorten Ingrid, bløtlagt i 16 timer og kokt
I-2	Erter av sorten Ingrid, bløtlagt i 16 timer, spirt i 24 timer og kokt
I-3	Erter av sorten Ingrid, bløtlagt i 16 timer, spirt i 48 timer og kokt
I-4	Erter av sorten Ingrid, bløtlagt i 16 timer, spirt i 72 timer og kokt
A-0	Hele erter av sorten Astronaut, malt
A-1	Erter av sorten Astronaut, bløtlagt i 16 timer og kokt
A-2	Erter av sorten Astronaut, bløtlagt i 16 timer, spirt i 24 timer og kokt
A-3	Erter av sorten Astronaut, bløtlagt i 16 timer, spirt i 48 timer og kokt
A-4	Erter av sorten Astronaut, bløtlagt i 16 timer, spirt i 72 timer og kokt



Figur 3. Flytskjema for de ulike prosesseringene av erter.



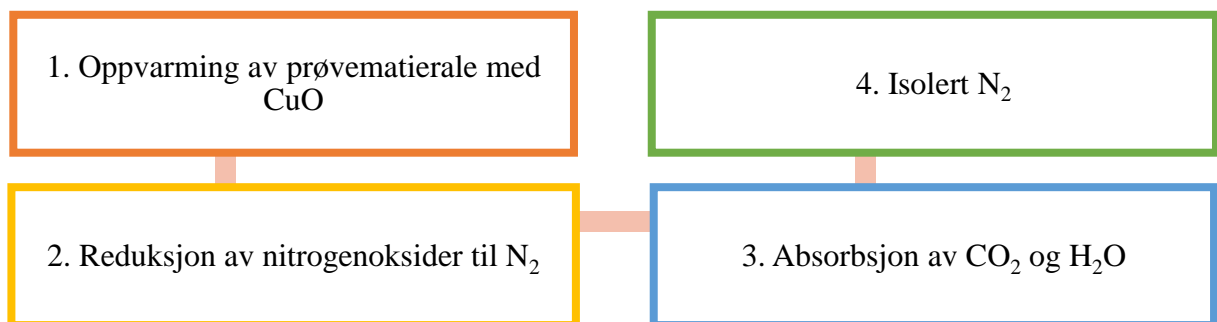
Figur 4. Flytskjema for de ulike prosesseringene av fababønner.

3.2 Beregning av proteininnhold

Proteininnholdet i de ulike prøvene ble målt på LAB-Tek på BIOVIT ved Dumas metode som beregner organisk nitrogen, samt nitrogen i form av nitrogenoksider og andre forbindelser. En prøve med kjent masse blir tilsatt kobber(II)oksid (CuO) og varmet opp til høy temperatur (800-1800°C). Organisk nitrogen i prøven vil omdannes til nitrogenoksider, som deretter reduseres til nitrogengass (N₂) av kobber. I denne prosessen blir det også dannet CO₂ og H₂O. For å isolere nitrogengassen blir produktene fra oppvarmingsreaksjonen ført gjennom en kolonne med kaliumhydroksid (KOH) som absorberer CO₂ og H₂O. Den totale mengden nitrogen i prøven kan deretter beregnes ut fra volumet av nitrogengass som samles i toppen av kolonnen. (Daintith, 2008; Simonne, H., Eitenmiller, Mills & Presman III, 1999). Reaksjonene i metoden er gjengitt under.



Dumas metode er illustrert som flytskjema i figur 5.



Figur 5. Flytskjema for Dumas metode.

For å beregne totalt nitrogen i prøven må en regne fra volumet av nitrogengass produsert i reaksjonen. Ved standard trykk og temperatur er 1 mol 22,4 L. 1 mol N₂ veier 28,02 g, hvilket gir at 1 L N₂ produsert gir 1,25 g (Chang & Goldsby, 2013).

Det blir antatt at proteiner inneholder 16% nitrogen. Det totale innholdet av protein kan dermed beregnes ved å multiplisere totalt nitrogen med 6,2 (Rhee, 2001).

3.3 Prosessering av erter og fababønner

Det ble utført et for-forsøk for å undersøke hvor fort prøvene spirte og for å kunne anslå spireprosenten før selve spireforsøket. Rundt 50 frø fra hver sort av erter og fababønner ble lagt i bløt i 1 dl springvann over natten ved romtemperatur, før hver prøve ble lagt ut mellom to lag fuktig papir. Etter 48 timers spiring ble antall spirede frø talt opp, og rotlengde på 10 tilfeldig utvalgte prøver ble målt. Spirede erter og fababønner fra for-forsøket er vist i figur 6.



Figur 6. Erter av sorten Ingrid (t.v.) og fababønner av sorten Sampo etter 48 timers spiring. Foto: Emilie Gullberg Jørgensen (10.01.20)

Erter og fababønner med malt på mølle (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch, Germany) på Nofima i Ås. Spiringen av prøvene ble gjort ved pilotanlegget ved KBM. For spiring av erter og fababønner ble det benyttet et spiresystem beregnet på spiring av byggmalt (Micromalting Steep and Germinator, Curio Group Milton Keynes, United Kingdom), illustrert i figur 7. Til spiringen av erter ble det benyttet 500g per prøve, og til spiringen av fababønner ble det benyttet 300g. Prøvene ble skylt med springvann på 8°C i 30 sekunder før bløtlegging for å fjerne eventuelt støv og planterester. Prøvene var bløtlagt i springvann på 20°C i 16 timer, med to perioder med 1 times lufting for å sørge for tilførsel av oksygen, henholdsvis etter 4 og 9 timer. I spiresystemet ble hvert spirekammer fylt opp med nok vann til å holde spirebeholderne under vann. Spiretiden regnes som startet etter bløtleggingen. Det ble gjort en parallell av hver prøve, som ble tilfeldig plassert over de forskjellige spirekamrene.

Tabell 4 illustrerer hvordan prøvene var fordelt i spiresystemet.

Tabell 4. Fordeling av prøvene i spiresystemet, samt timeoversikt over bløtleggingsprosessen.

Spirekammer 1			Spirekammer 2			Spirekammer 3										
Beholder	Sort	Tid	Beholder	Sort	Tid	Beholder	Sort	Tid								
1	Ingrid	24	5	Ingrid	48	9	Ingrid	24								
2	Ingrid	72	6	Ingrid	72	10	Ingrid	48								
3	Astronaut	48	7	Astronaut	24	11	Astronaut	72								
4	Astronaut	72	8	Astronaut	48	12	Astronaut	24								
Spirekammer 1			Spirekammer 2			Spirekammer 3										
Beholder	Sort	Tid	Beholder	Sort	Tid	Beholder	Sort	Tid								
1	Vertigo	24	5	Vertigo	48	9	Vertigo	24								
2	Vertigo	72	6	Vertigo	72	10	Vertigo	48								
3	Sampo	48	7	Sampo	24	11	Sampo	72								
4	Sampo	72	8	Sampo	48	12	Sampo	24								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>Bløtlegging</i>				<i>Lufting</i>	<i>Bløtlegging</i>				<i>Lufting</i>	<i>Bløtlegging</i>						

Etter respektive spiretider på 24, 48 eller 72 timer ble prøvene fjernet fra spiresystemet og rotlengden ble målt på 10 tilfeldig uvalgte frø. Deretter ble prøvene kokt i 1 time, forholdet mellom mengden prøve og vann under koking var 1:6 med 500 g erter og fababønner til 3000 g vann. For prøvene som ikke gjennomgikk spiring, ble hele erter og fababønner bløtlagt i 8°C springvann med samme forhold på 1:6 erter og fababønner til vann i 16 timer ved romtemperatur. Deretter ble de også kokt i 1 time i vannet de lå bløtlagt i. Etter koking ble kokevannet helt av og fryst ned til videre analyser. Prøvene ble så skylt med springvann på 8°C i 30 sekunder for å skylle vekk rester av kokevannet. Deretter ble det tilført vann ved 8°C i forhold 1:1, før prøvene ble most ved hjelp av stavmikser (MSM6B100, Bosch, Germany). Deretter ble prøvene overført til 50 mL Falconrør, der hvert rør ble fylt med 20 ml prøve. Prøvene ble så fryst på -20°C, før de ble overført til -80°C over natten før de ble plassert i en frysetørker (Heto PowerDry LL1500®, ThermoFisher Scientific, USA) for å fjerne alt vann til stede. Prøvene ble frysetørket i 48 timer, før de ble malt ytterligere i en morter for å oppnå et finmalt mel.



Figur 7. Spiresystemet benyttet (t.v.) og et av de tre spirekamrene (t.h.). Foto: Emilie Gullberg Jørgensen (13.01.20).

3.4 Analyse av fytinsyre

Innholdet av fytinsyre ble bestemt ved bruk av Phytic acid (Total Phosphorous) Assay Kit fra Megazyme (Megazyme, Ireland). Phytic acid (Total Phosphorous) Assay Kit er en metode som måler totalt innhold av tilgjengelig fosfor i næringsmidler og fôr. Ut fra det totale innholdet av fosfor kan en regne tilbake til innholdet av fytinsyre, forutsatt at mengden fosfor i prøven kommer utelukkende fra fytinsyre og at innholdet fosfor i fytinsyre er 28,2%. For fullstendig beskrivelse av metoden henvises det til protokollen (Megazyme, 2017). Metoden baserer seg på syreekstraksjon av fytinsyre og lavere former for myo-inositol fosfater fra prøvematerialet. Etter ekstrahering tilsettes fytase som defosforylerer fytinsyre til myo-inositol fosfater og frigir uorganisk fosfat. Videre tilsettes alkalisk fosfatase som fortsetter frigivningen av uorganisk fosfat. Deretter tilsettes en fargereagens som inneholder ammoniummolybdat, som danner komplekset 12-molybdofosforsyre når det reagerer med fosfat. Under sure betingelser vil 12-molybdofosforsyre reduseres til molybdenblått, og mengden molybdenblått som dannes kan måles spektrofotometrisk som økning i absorbans ved 655 nm. Mengden molybdenblått som blir dannet er proporsjonal med mengden uorganisk fosfat, som kan kvantifiseres til fosfor ved å bruke en kalibreringskurve laget ved hjelp av standarder med kjent innhold av fosfor.

Fargereagensen benyttet ble tillaget av to reagensløsninger. Reagensløsningene bestod av 10% askorbinsyre (VWR Chemicals, USA) løst i destillert vann og 95-97% svovelsyre, og 5% ammoniummolybdat løst i destillert vann. Fargereagensen ble tillaget samme dag som den skulle anvendes ved å blande 1 del ammoniummolybdatløsning til 5 deler askorbinsyreløsning.

For å lage kalibreringskurven ble det laget fem standardløsninger med kjente fosforkonsentrasjoner, henholdsvis 0, 0,5, 2,5, 5,0 og 7,5 µg/mL i 15 mL Falconrør (15 ml CELLSTAR® Polypropylene Tube, Greiner Bio-One International BmbH, Germany).

Til syreekstraheringen ble det benyttet halvparten av mengden prøvemateriale og syre som ble oppgitt i protokollen. Det ble tilsatt 10 ml 0,66 M HCl til 1,25 g prøvemateriale som så ble rørt med magnetrører (RET basic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Germany) over natten ved romtemperatur, ekstraheringen ble utført med to replikater. 1 ml av ekstraktet ble overført til 1,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-200-C, Axygen®, Mexico) og sentrifugert ved 13 000 RPM i 10 minutter i sentrifuge (Micromax, IEC, USA). Etter sentrifugering ble 0,5 ml av supernatanten pipettert over til et nytt 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 0,5 ml 0,75 M NaOH. Prøveekstraktet ble benyttet videre i den enzymatiske defosforyleringsreaksjonen, der det ble benyttet to replikater fra hver av syreekstraheringene

slik at det til sammen ble analysert fire replikater av hver prøve. Etter tilsetning av reagensene ble prøvene blandet med (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA) før de ble inkubert i 40°C vannbad d (LCB0726-12-0012, Lauda DR. R. Wobser GMBH & Co. KG, Germany). Det ble det benyttet 300 µl 50% trikloreddiksyre (Merck KGaA, Germany) i tillegg til reagensene som fulgte med kitet for å stoppe den enzymatiske reaksjonen. Etter terminering av reaksjonen med trikloreddiksyre ble prøvene sentrifugert ved 13 000 RPM i 10 minutter. Supernatanten ble så benyttet videre i den kolorimetrisk bestemmelsen av fritt og totalt fosfor i hver prøve. 1 ml supernatant ble tilsatt 0,5 ml fargereagens med ammoniummolybdat før de ble blandet med vortexmikser og deretter inkubert i vannbad ved 40°C i én time. 1 ml av standardløsningene med fosfor ble også tilsatt 0,5 ml fargereagens, blandet og inkubert på lik linje med prøvene. Etter inkubering ble prøver og standarder igjen blandet med vortexmikser, før 1ml ble overført til 1,5 ml plastkyvetter (Semi-micro cuvette, PS, 1,5 ml, Brand GMBH + Co KG, Germany). De ble så målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved 655 nm innen tre timer.

Det ble laget en standardkurve ut fra absorbansmålingene fra standardløsningene som viste sammenheng mellom absorbans og konsentrasjon av fosfor. ΔA_{fosfor} ble beregnet ved at absorbansen i standardløsningen uten fosfor ble trukket fra absorbansen fra resten av standardløsningene. M-verdien for de ulike standardløsningene ble beregnet ved å dividere mengden fosfor i standarden med ΔA_{fosfor} -verdien. Gjennomsnittet av disse M-verdiene ble benyttet til utregningen av fosforinnhold i prøvene av erter og fababønner. ΔA_{fosfor} i prøvene ble beregnet ved å trekke absorbansen av fritt fosfor fra absorbansen av totalt fosfor. For å regne ut konsentrasjonen av fosfor i prøvene ble formelen nedenfor benyttet.

$$\text{Konsentrasjon av fosfor} = \frac{\text{Mgjennomsnitt} \cdot 20 \cdot F}{10\,000 \cdot 1.0 \cdot v} * \Delta A_{\text{fosfor}} \text{ [g/100g]}$$

For å beregne fytinsyreinnholdet ut fra innholdet av fosfor ble det antatt at fosfor utgjør 28,2% av fytinsyre, og at all fosfor som ble frigitt i prøvene kommer fra fytinsyre. For å regne ut fytinsyreinnhold i prøvene ble formelen nedenfor benyttet.

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

Det ble beregnet gjennomsnitt og standardavvik for hver av prøvene. Prøver som lå mer enn to standardavvik fra gjennomsnittsverdien ble fjernet fra datasettet.

3.5 Analyse av galaktosyl-sukrose oligosakkarider

Innholdet av galaktosyl-sukrose oligosakkarider (GOS) ble bestemt ved bruk av Raffinose/D-galactose Assay Kit fra Megazyme (Megazyme, Ireland). Metoden baserer seg på ekstrahering av GOS ved hjelp av vann eller alkoholblanding. Prøvematerialet blir tilsatt α -galaktosidase som hydrolyserer raffinose, stakiose og verbaskose i prøven til D-galaktose og sukrose. Det blir deretter tilsatt galaktose mutarotase som katalyserer mutarotasjon av D-galaktose fra α -form til β -form. Ved pH 8,6 vil NAD^+ oksidere β -D-Galaktose til D-galakturonsyre ved tilsetning av β -galaktose dehydrogenase. I denne reaksjonen blir NAD^+ redusert til NADH, og NADH produsert i reaksjonen måles spektrofotometrisk ved økning i absorbans ved 340 nm. Mengden NADH er støkiometrisk med mengden D-galaktose, som benyttes videre til å beregne totalt innhold av GOS (Megazyme, 2014).

Prøveopparbeidelsen ble utført i henhold til protokollen under alternativ ekstraheringsmetode for proteinholdige, oppmalte frø. Til denne ekstraheringen ble det tillaget Carrez I og Carrez II-løsninger, som bidrar til aggregering av proteiner slik at disse kan filtreres ut av prøvematerialet (Culhaoglu, Zheng, Méchin & Baumberger, 2011). Carrez I ble tillaget ved å løse opp 3,6 g kalium heksacyanoferrat (VWR Chemicals, USA) i 100 ml destillert vann. Carrez II ble tillaget ved å løse opp 4,49 g sinksulfat monohydrat (Honeywell Fluka, Germany) i 100 ml destillert vann. Grunnet begrenset mengde prøvemateriale ble det benyttet halvparten av mengdene beskrevet i protokollen. Det ble ikke brukt noen replikater under prøveopparbeidelsen. Ekstraheringen ble utført ved at 0,5 g prøve ble veid ut i en 25 ml målekolbe, som så ble tilsatt 3 ml etanol (96%). Det ble lagt parafilm over korkene på målekolbene for å sikre at etanolen ikke fordampet ut. Målekolbene ble satt i vannbad på 86°C i 20 minutter, før de ble kjølt ned til romtemperatur og tilsatt 15 ml destillert vann og blandet. Deretter ble det tilsatt henholdsvis 1,5 ml Carrez I løsning, 1,5 ml Carrez II løsning og 3 ml 100 mM NaOH, kolbene ble vendt mellom hver tilsetning. Det ble så tilsatt destillert vann til et volum på 25 ml, før prøvene ble filtrert ved bruk av filterpapir (Whatman® quantitative filter paper, ashless, Grade 42, United Kingdom). Filtratet ble benyttet videre i analysen som prøvemateriale.

I analysen av innhold av GOS i prøvene ble innholdet av raffinose + fritt D-galaktose og fritt D-galaktose i prøvene analysert separat. Det ble benyttet blanke prøver for både raffinose + fritt D-galaktose og fritt D-galaktose under analysen, og det ble gjort en replikat per prøve for prøvematerialet og blanke prøver. I analysen av raffinose i prøvene ble det benyttet α -galaktosidase for å hydrolysere GOS til D-Galaktose, og i analysene av fritt D-Galaktose ble α -galaktosidase utelatt. Den enzymatiske reaksjonen tok sted i 2,5 ml plastkyvetter (Semi-micro

cuvette, PS, 2,5 ml, Brand GMBH + Co KG, Germany), og absorbansen ved 340 nm ble målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) før og etter reaksjonen. Prøvematerialet ble pipettert og blandet med destillert vann i kyvettene, prøvene som ble analysert for raffinose ble også tilsatt α -galaktosidase før inkubering ved romtemperatur i 20 minutter. Reagensene i kitet ble tilsatt ved bestemte volum, før absorbansen ble målt. Deretter ble den endelige reaksjonen påbegynt ved tilsettelse av D-galaktose dehydrogenase + galaktose mutarotase suspensjon før inkubering i varmeblokk (Thermolyne Type 17600 Dri-Bath, Barnstead/Thermolyne, USA) ved 40°C i 20 minutter. Etter inkubering ble prøvene målt med jevne mellomrom til absorbansen stabiliserte seg, da reaksjonen ble antatt terminert. For å gi mest mulig representative resultater burde mengden raffinose ligge mellom 0,2 og 1,25 g/L i prøveekstraktet (Megazyme, 2014).

For beregning av innhold av raffinose og fritt D-Galaktose i prøvene ble først absorbansdifferansen mellom første og andre absorbansmåling beregnet. Deretter ble absorbansdifferansen for de blanke prøvene subtrahert fra absorbansdifferansen i de tilhørende prøvene. Denne utregningen er illustrert med formelen under.

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

For å finne $\Delta A_{\text{raffinose}}$ ble Δ fritt D-galaktose subtrahert fra $\Delta A_{\text{raffinose}} +$ fritt D-galaktose.

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

For å regne ut konsentrasjonen av raffinose og D-galaktose i prøvene ble formelen under benyttet.

$$C = \frac{V * MW}{\epsilon * d * v} * \Delta A \text{ [g/L]}$$

Hvor:

V = sluttvolum = 2,62 ml.

MW = molekylvekt til substansen som ble analysert (Raffinose = 504,5 g/mol, D-Galaktose = 180,16 g/mol).

ϵ = ekstinksjonskoeffisient til NADH ved 340 nm = 6300 (x mol⁻¹ x cm⁻¹).

d = lysvei = 1 cm.

V = prøvevolum = 0,2 ml

For å beregne ut innhold av raffinose og D-galaktose i g/100g i prøvene ble formelen under benyttet.

$$\text{Innhold} = \frac{c \text{ [g/L]}}{\text{Vektprøve [g/L]}} * 100 \text{ [g/100g]}$$

Med metoden blir det analysert for innhold av raffinose, men innholdet av dette vil bli overestimert ettersom andre α -galaktosider i prøven som staktyose og verbaskose også hydrolyseres av α -galaktosidase til D-galaktose. Metoden baserer seg på utregning av raffinoseinnholdet på bakgrunn av molekylvekten til raffinose som er et trisakkarid (504,5 g/mol). Staktyose og verbaskose består av fire og fem monosakkarider, og har vesentlig høyere molekylvekt enn raffinose på henholdsvis 666,6 g/mol og 828,7 g/mol. Resultatene vil derfor ikke gi et nøyaktig innhold av GOS i prøvene, men blir i denne oppgaven benyttet for å gi et estimat.

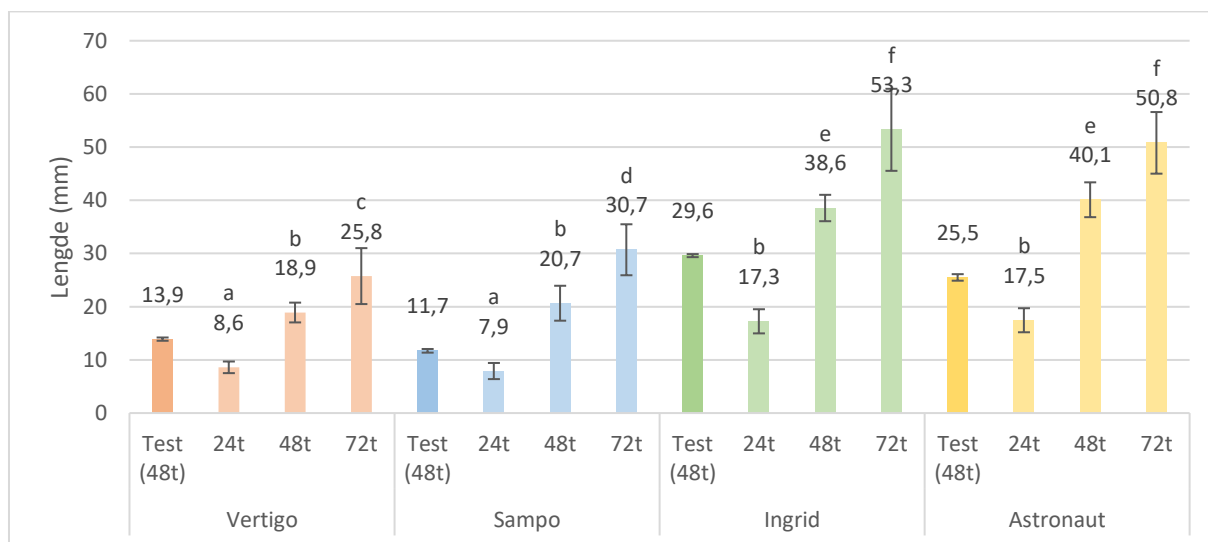
3.6 Resultatbehandling og statistisk analyse

Microsoft Office Excel (2016) ble benyttet til databehandling av rådata og fremstilling av figurer. Statistisk analyse ble utført i R-commander, og for alle analysene ble det benyttet et signifikansnivå på $p < 0,05$. Det ble benyttet enveis variansanalyse (ANOVA) for å analysere signifikans mellom prøvene grunnet én variabel. Toveis ANOVA ble benyttet for å avdekke eventuelle interaksjonseffekter mellom flere variabler. Det ble også benyttet Tukey test for å analysere signifikans mellom prøvene for de ulike responsene. Output fra R-commander er vist i vedlegg.

4. Resultater

4.1 Spiring av erter og fababønner

Forforsøket for spiring ga en spiringsprosent på 100% i alle sortene som ble benyttet. Etter spiringen av erter og fababønner i ble rotlengden på 10 tilfeldig utvalgte frø per gjentak målt. Resultatene vises i figur 8.



Figur 8. Gjennomsnittlig rotlengde i mm etter spiring i de ulike sortene av erter og fababønner, samt rotlengde målt i forforsøket for hver test. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller. Standardavvik for hver prøve er illustrert i feilfelt.

Figur 8 viser at prøvene av erter (Ingrid og Astronaut) har hyppigere vekst i løpet av en 72 timers periode enn prøvene av fababønner (Vertigo og Sampo). Gjennomsnittlig rotlengde målt i frøene ved forforsøket etter 48 timer er noe lavere enn gjennomsnittlig rotlengde etter 48 timer i hovedforsøket. I sortene av fababønner økte rotlengden fra 8,6 og 7,9 mm etter 24 timer, til henholdsvis 18,9 og 20,7 mm etter 48 timers spiring, til 25,8 og 30,7 mm etter 72 timer. I sortene av erter var rotlengden 17,3 og 17,6 mm etter 24 timer, og økte til henholdsvis 38,6 og 40,1 mm etter 48 timers spiring og 53,3 og 50,8 mm etter 72 timer. Enveis ANOVA variansanalyse i R-commander bekreftet at det var en signifikant forskjell i vekstrate mellom sorter (p -verdi $< 0,001$), se vedlegg 1. Det var ingen signifikant forskjell mellom de to ertesortene eller de to fababønnesortene.

4.2 Proteininnhold i erter og fababønner

Proteininnholdet i prøvene ble analysert ved bruk av Dumas metode ved LAB-Tek på BIOVIT.

Innholdet av protein i prøvene er vist i tabell 5.

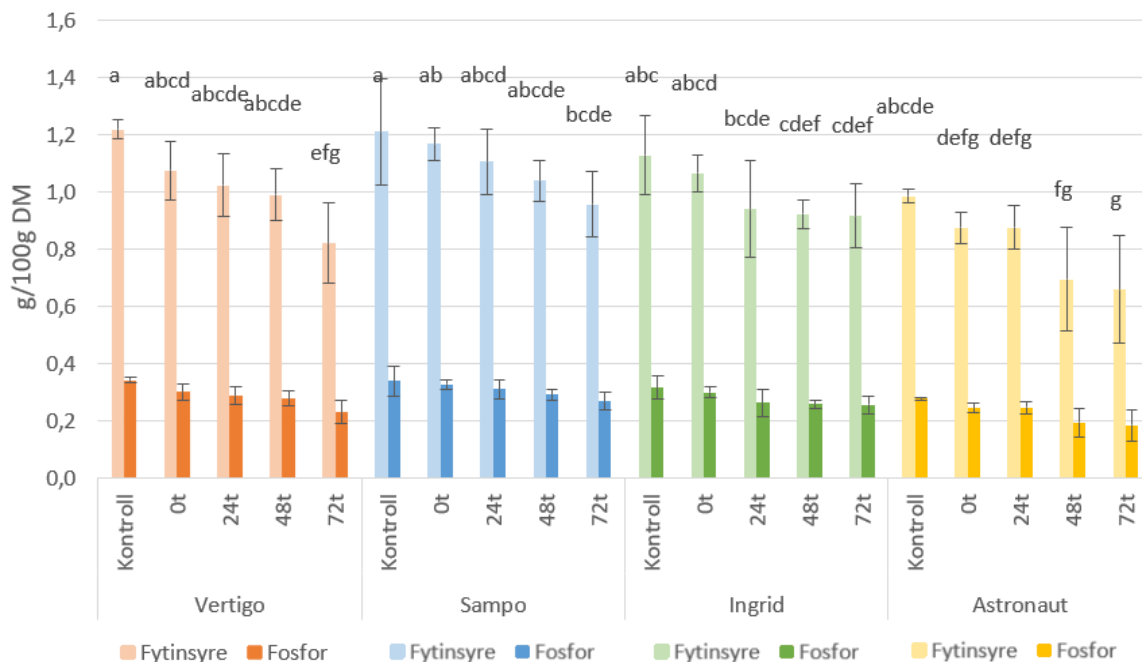
Tabell 5. Proteininnhold i prosent i prøver fra ulike sorter av erter og fababønner med forskjellige spiretider. Ulike bokstaver til venstre for prøvene indikerer signifikante forskjeller.

Vertigo		Protein %	Sampo		Protein %	Ingrid		Protein %	Astronaut		Protein %
de	V-0	30,88	ab	S-0	36,75	efgh	I-0	27,75	fgh	A-0	26,44
bc	V-1	34,31	ab	S-1	36,84	ef	I-1	29,72	fgh	A-1	26,75
cd	V-2	33,34	a	S-2	39,03	efg	I-2	28,44	fgh	A-2	27,34
bcd	V-3	33,97	a	S-3	38,63	fgh	I-3	27,28	gh	A-3	25,84
bc	V-4	34,44	a	S-4	38,50	fgh	I-4	27,38	h	A-4	24,91
Gj. snitt		33,67			38,10			28,15			26,24

Sampo var sorten med høyest detektert proteininnhold, der S-3 hadde et innhold på 38,63%. Astronaut var sorten med lavest proteininnhold, der A-3 hadde et proteininnhold på 25,84%. Sortene av fababønner hadde et høyere innhold av protein enn sortene av erter. Vertigo og Sampo hadde et gjennomsnittlig proteininnhold over alle spiretider på henholdsvis 33,67% og 38,10%, mens Ingrid og Astronaut hadde et gjennomsnittlig proteininnhold på 28,15% og 26,24%. Ved enveis ANOVA ble det funnet at det ikke var en signifikant effekt av spiretid (p-verdi > 0,05), se vedlegg 2. Det var kun V-0 som hadde signifikant lavere proteininnhold enn V-1 og V-4. Det ble derimot observert en signifikant effekt av sort (p-verdi < 0,001), der proteininnholdet i alle sortene hadde signifikante forskjeller. Ved toveis ANOVA ble det avdekket en interaksjonseffekt mellom sort og spiretid (p-verdi < 0,05), se vedlegg 3.

4.3 Innhold av fytinsyre

De frysetørkede prøvene av erter og fababønner ble målt for fritt og total fosfor ved kolorimetrisk bestemmelse. Resultatene fra de spektrofotometriske målingene ble brukt til å beregne innholdet fosfor i prøvene, som deretter ble regnet om til fytinsyre. Forholdet mellom fosfor og fytinsyre er derfor likt mellom alle prøvene. For gjennomsnittlig innhold av fosfor og fytinsyre i samtlige prøver, se vedlegg 8. Figur 9 viser innholdet av totalt fosfor og fytinsyre oppgitt i g/100g DM.



Figur 9. Innhold av fytinsyre og fosfor (g/100 DM) i prøver av bløtlagte og kokte erter og fababønner med ulik spiretid, samt kontroll med uprosessert erte- og bønnemel. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller. Standardavvik for hver prøve er illustrert i feilfelt.

Figur 9 viser at innholdet av fytinsyre i de spirede prøvene minker noe fra kontrollen, som er uprosesserte, malte frø av erter og fababønner. Ved sammenlikning mellom prøver av fababønner og erter med samme spiretid, kan det ses at prøvene av fababønner generelt hadde et noe høyere innhold av fytinsyre enn erteprøvene. Særlig ga prøvene av ertesorten Astronaut lave fytinsyreverdier. Sortene av fababønner, Vertigo og Sampo, hadde et fytinsyreinnhold på henholdsvis 1,219 g/100g DM og 1,211 g/100g DM i uprosesserte prøver, som ble redusert til 0,821 g/100g DM og 0,957 g/100g DM etter 72 timers spiring. Ertesortene Ingrid og Astronaut inneholdt henholdsvis 1,127 g/100g DM og 0,986 g/100g DM før prosessering, og fytinsyreinnholdet ble redusert til 0,916 g/100g DM og 0,659 g/100g DM etter spiring i 72

timer. Prosentvis nedgang i fytinsyre er beskrevet i tabell 6. Det ble utført enveis ANOVA og Tukey test i R-commander for å bestemme om det hadde vært en signifikant effekt av sort og spiretid på innholdet av fytinsyre. I samtlige av sortene hadde det vært en signifikant nedgang i fytinsyreinnholdet etter 72 timers spiring (p-verdi < 0,001), se vedlegg 4. Det var også en effekt av sort (p-verdi < 0,001), da Astronaut hadde et signifikant lavere innhold av fytinsyre enn de andre sortene. For å avdekke interaksjonseffekter ble det utført toveis ANOVA, men det ble ikke detektert en interaksjonseffekt mellom sort og spiretid (p-verdi > 0,05), se vedlegg 5. Innholdet av fytinsyre i sorten Astronaut var signifikant lavere enn fytinsyreinnholdet i alle de andre sortene ved kun bløtlegging og koking (A-1) og spiring i 48 timer. Ved sammenlikning av begge sortene av fababønner mot begge sortene av erter, har erter et signifikant lavere innhold av fytinsyre enn fababønner ved alle prosesseringene bortsett fra ved 72 timers spiring.

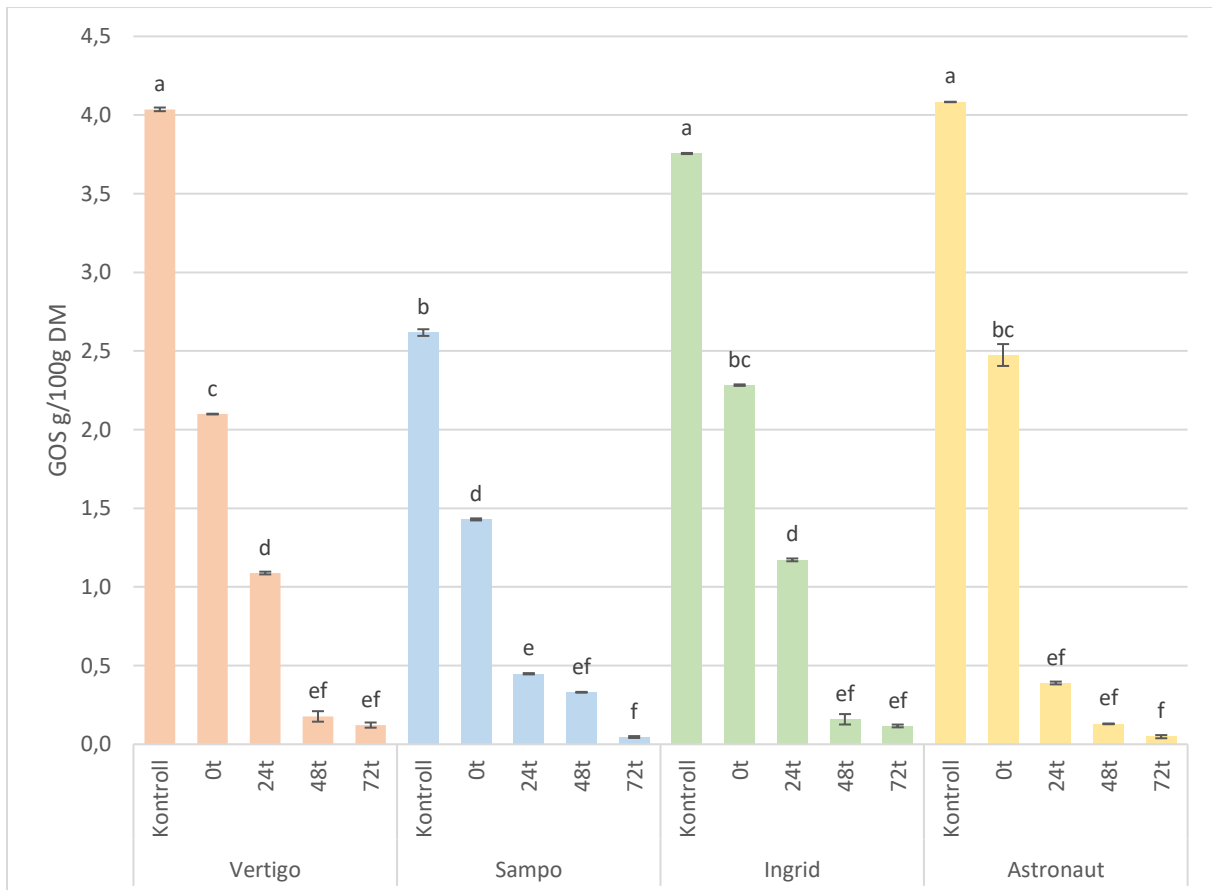
Tabell 6. Nedgang i fytinsyre etter 72 timers spiring i prosent i de ulike sortene av erter og fababønner.

Sort	Nedgang i fytinsyre
Vertigo	32,65%
Sampo	20,97%
Ingrid	18,72%
Astronaut	33,14%

Tabell 6 viser at ertesorten Astronaut hadde størst nedgang i fytinsyreinnhold av alle sortene etter 72 timers spiring med 33,14%. Ertesorten Ingrid hadde en nedgang på 18,72%. Vertigo var fababønnesorten med størst nedgang med 32,65%, mens Sampo hadde en reduksjon på 20,97%.

4.4 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider

For å beregne innholdet av GOS i prøvene ble det benyttet Raffinose/D-galactose Assay Kit fra Megazyme. Ved bruk av denne metoden blir innholdet av raffinose og D-galaktose beregnet. For gjennomsnittlig innhold av raffinose og D-galaktose i samtlige prøver, se vedlegg 9. Innholdet av GOS i prøvene er illustrert i figur 10.



Figur 10. Innhold av raffinose (g/100g DM) i prøver av bløtlagte og kokte erter og fababønner med ulik spiretid, samt kontroll med uprosessert erte – og bønnemel. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller. Standardavvik for hver prøve er illustrert i feilfelt.

Figur 10 viser at innholdet av GOS i prøvene varierer fra 4,083 g/100g DM på det høyeste (A-0) til 0,046 g/100g DM på det laveste (S-4). Det var nedgang i GOS i samtlige av sortene etter 72 timers spiring. Sortene av fababønner, Vertigo og Sampo, hadde et innhold av GOS på henholdsvis 4,036 g/100g DM og 2,617 g/100g DM i uprosesserte prøver, som ble redusert til 0,122 g/100g DM og 0,046 g/100g DM etter 72 timers spiring. Ertesortene Ingrid og Astronaut inneholdt henholdsvis 3,756 g/100g DM og 4,083 g/100g DM før prosessering, og etter 72 timers spiring ble GOS ble redusert til 0,117 g/100g DM og 0,048 g/100g DM. Prosentvis nedgang i GOS er beskrevet i tabell 7.

Tabell 7. Nedgang i raffinose etter 72 timers spiring i prosent i de ulike sortene av erter og fababønner.

Sort	Nedgang i raffinose
Vertigo	96,98%
Sampo	98,24%
Ingrid	96,90%
Astronaut	98,82%

Tabell 7 viser at raffinoseinnholdet i samtlige av sortene har blitt redusert med over 95% etter 72 timers spiring.

Resultatene viste at prøvene inneholdt svært lite D-galaktose. I S-2, V-1, V-3, V-4 og A-0 ble det ikke detektert D-galaktose. Det laveste detekterte innholdet av D-galaktose var 1 mg/100g DM i V-0, V-3 og S-3. Det høyeste detekterte innholdet av D-galaktose var 57 mg/100g DM i A-1. Figur 7 viser at innholdet av raffinose i prøvene minket i takt med spiretiden. Det ble utført enveis ANOVA i R-commander for å undersøke signifikante forskjeller mellom prøvene. Enveis ANOVA viste at spiring hadde hatt en signifikant innvirkning på innholdet av raffinose (p -verdi $< 0,001$), se vedlegg 6. Det var ingen signifikant effekt av sort på innholdet av GOS (p -verdi $> 0,05$). Det ble derimot avdekket interaksjonseffekt mellom sort og spiretid ved toveis ANOVA (p -verdi $< 0,001$), se vedlegg 7. Også prøvene som kun hadde blitt bløtlagt og kokt hadde et signifikant lavere innhold av raffinose enn kontrollene for hver sort. S-0 og S-1 hadde et signifikant lavere nivå av raffinose enn de andre sortene ved samme prosessering. Det var ingen signifikante forskjeller mellom sortene etter 48 og 72 timers spiring, innholdet av raffinose var svært lav i alle disse prøvene.

5. Diskusjon

I denne oppgaven ble innhold av antinæringsstoffer i ulike sorter av erter og fababønner med ulik grad av spiring undersøkt. Hensikten var å undersøke effekt av spiring, bløtlegging og koking som ulike typer prosessering på innholdet av antinæringsstoffer i hele erter og fababønner. Det ble undersøkt effekt av prosessering på to ulike antinæringsstoffer, fytinsyre og galaktosyl-sukrose oligosakkarider. Oppgaven hadde i utgangspunktet også som hensikt å undersøke effekt av prosessering på ytterligere et antinæringsstoff, trypsininhibitorer. Grunnet CoViD-19 situasjonen som utspilte seg våren 2020 var NMBU stengt for studenter fra 12.03 til 27.04. Dette medførte begrenset tilgang til lokaler for analyse, og undersøkelse av effekten av prosessering på innholdet av trypsininhibitorer ble dermed utelatt fra oppgaven. Kokevannet fra prosesseringen ble tatt vare på med tanke på å analysere innholdet av næringsstoffer og antinæringsstoffer samt med tanke på massebalanse, men dette ble ikke gjennomført i denne oppgaven. Vann fra bløtlegging og koking har vist seg å ha interessante funksjonelle egenskaper som skumdanner og emulgator (Serventi, 2020). Det kan derfor være interessant å analysere innholdet av antinæringsstoffer i disse biproduktene. På grunn av de kjente negative helseeffektene antinæringsstoffer kan ha i kroppen, er det ønsket å oppnå et lavt innhold i næringsmiddelprodukter. Belgvekster er et vanlig tilskudd i plantebaserte kosthold, men har også et høyt innhold av antinæringsstoffer. Plantebaserte kosthold er derfor også assosiert med høyt inntak av antinæringsstoffer, som kan føre til redusert inntak av næringsstoffer og fordøyelsesubehag. Ved produksjon av mer plantebaserte proteinkilder er det derfor ønskelig å redusere innholdet av antinæringsstoffer, noe som kan oppnås ved prosessering av planteråvarene. Det er viktig å oppnå kunnskap om optimale prosesseringsmetoder for planteprodukter, slik at en kan utvikle mat basert på planteprotein med mer gunstig sammensetning av næringsstoffer. Analysene gjort i oppgaven ble utført ved hjelp av kits som er basert på enzymatiske reaksjoner. Denne oppgaven er skrevet som en del av prosjektet FoodProFuture, som har som mål å utvikle en kunnskapsplattform for best mulig produksjon og utnyttelse av norske planteressurser til sunne og attraktive produkter med høyt innhold av plantebasert protein. FoodProFuture ønsker en endring mot et mer plantebasert kosthold, og vil sette søkelys på hvordan en kan optimalisere dyrkning av proteinrike vekster i Norge og hvordan disse kan benyttes.

5.1 Spiring av erter og fababønner

Oppsettet som ble benyttet for å spire erter og fababønner hadde tidligere kun blitt benyttet til spiring av byggmalt, og det var derfor noe usikkerhet rundt om spireanlegget ville virke til dette formålet. Ertene i forsøket ble spiret først, og det ble oppdaget at mengden frø i spirebeholderne var noe høy, noe som kan ha ført til redusert lufttilførsel mellom frøene. Dermed ble mengden frø redusert til spiring av fababønner. Gjennomsnittlig rotlengde etter 48 timer er likevel noe høyere enn det som ble målt i forforsøket, noe som kan tyde på at vekstforholdene har vært bedre i spireanlegget. I spireanlegget ble temperaturen under spiringen kontrollert, men grunnet overfylling av spirebeholderne ble det funnet at temperaturen var noe høyere enn ønsket underveis i spiringen. Det har altså vært noe inkonsekvens under spireprosessen, som kan ha påvirket videre analyser. Erter og fababønner ble spiret hver for seg, og selv om spireanlegget hadde samme innstillinger for hver spiring kan dette ha hatt en innvirkning på analysene. Vekstraten avtok mellom 48 og 72 timer, noe som kan skyldes begrenset plass til vekst i spirebeholderne. I sortene av fababønner økte rotlengden fra 8,6 og 7,9 mm etter 24 timer, til henholdsvis 18,9 og 20,7 mm etter 48 timers spiring, til 25,8 og 30,7 mm etter 72 timer. I sortene av erter var rotlengden 17,3 og 17,6 mm etter 24 timer, og økte til henholdsvis 38,6 og 40,1 mm etter 48 timers spiring og 53,3 og 50,8 mm etter 72 timer. Dette samsvarer med rotlengder funnet av Setia, Dai, Nickerson, Sopiwnyk, Malcolmson et al. (2019) ved tilsvarende tidspunkt under spiring av gule erter og fababønner. Spiringsprosenten ble målt til 100% for hver sort i forforsøket, noe som tyder på at frøene brukt i oppgaven har god levedyktighet.

5.2 Proteininnhold

Ved analyse av proteininnhold ble det funnet at det varierte noe mellom prøver av samme sort med ulik grad av spiring, men det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom dem bortsett fra V-0, som hadde et signifikant lavere proteininnhold enn de andre prøvene av samme sort. Dette er konsekvent med resultater funnet av Setia et al. (2019), som fant at proteininnholdet har en tendens til å øke under spiring, men ikke med signifikante mengder. Det var derimot en signifikant forskjell i proteininnhold mellom sortene. Vertigo hadde et gjennomsnittlig proteininnhold på 33,67%, Sampo på 38,10%, Ingrid 28,15% og Astronaut på 26,24%. Generelt hadde prøvene et svært høyt proteininnhold mot det som er rapportert tidligere. Setia et al. (2019) fant at proteininnholdet i gule ertre varierte mellom 22,7% og 24,1% fra rå ert til 72 timers spiring, og 27,5% i rå fababønne til 28% i fababønne etter 72 timers spiring. Dette kan skyldes at prøvene ble frysetørket før måling av proteininnhold, noe som har ført til tilnærmet fullstendig fjerning av vann i prøvene og en oppkonsentrering av protein. Tørre ertre har et vanninnhold på ca. 12,5% (Dahl et al., 2012; Tulbek et al., 2016), og i tørre fababønner er det rapportert et vanninnhold på rundt 11% (Alghamdi, 2009; Crépon, Marget, Carrouée, Arese & Duc, 2009; Etemadi et al., 2019). Det burde tas høyde for at verdiene oppgitt her er høyere enn det faktiske proteininnholdet i ertene og fababønnene benyttet i forsøket. Sortene benyttet i oppgaven ble dyrket i 2018. Abrahamsen et al. (2017b) gjorde sortsforsøk på samme sorter i 2017, og fant et lavere proteininnhold i samtlige av sortene benyttet enn de som ble dyrket i 2018. Dette kan skyldes endringer i temperatur, jordsmonn eller vanntilførsel i løpet av vekstsesongen i 2018 som har gitt ertene og fababønnene høyere proteininnhold enn det som er forventet. Vertigo hadde et rapportert proteininnhold i uprosesserte fababønner på 28,2% i 2017, mot 30,88% i 2018. Sampo hadde en økning fra 26,1% til 36,75%. Ingrid og Astronaut har hatt en økning i protein fra henholdsvis 19,3% og 22,1% i 2017, til 27,75% og 26,44% i 2018. Det var rapportert lave temperaturer i 2017, mot høye temperaturer og lite regn i 2018 (Abrahamsen et al., 2017b; FoodProFuture, 2017). Høyere proteininnhold kan dermed skyldes mer gunstige vekstforhold. Det kommer ikke fram av rapporten til Abrahamsen et al. (2017b) om proteininnholdet er registrert per tørrstoff, men det blir nevnt av Abrahamsen, Uhlen, Waalen og Stabbetorp (2017a) i en annen rapport at gjennomsnittlig proteininnhold per tørrstoff i ertre er 22%, og gjennomsnittlig proteininnhold i fababønner per tørrstoff er 30%. Proteininnholdet i ertre og fababønner benyttet i denne oppgaven er dermed noe høyere enn det som er rapportert tidligere.

5.3 Innhold av fytinsyre

Fytinsyre kan danne komplekser med enkelte mineraler og proteiner, noe som reduserer biotilgjengeligheten av disse næringsstoffene for mennesker og dyr som ikke produserer fytase i fordøyelsessystemet. Belgvekster som erter og fababønner inneholder mye fytinsyre, og et kosthold med stort inntak av belgvekster kan derfor føre til redusert opptak og mulig mangel av viktige mineraler og proteiner (Gemedé & Ratta, 2014). Det finnes også positive egenskaper ved fytinsyre som antioksidantaktivitet, og reduksjon av risiko for kreft. Bestemmelse av fytinsyreinnhold i et prøvemateriale kan gjøres ved hjelp av flere ulike metoder, der jernkloridtitrering, høypresisjonsvæskrokromatografi (HPLC), ionebyttekromatografi og NMR 46 spektroskopi er blant de mest tradisjonelle metodene. Disse er svært avanserte og ressurskrevende metoder, og er derfor ikke egnet for et stort kvantum av prøver (McKie & McCleary, 2016). I denne oppgaven har det blitt benyttet kit fra Megazyme, som er en enklere metode å analysere fosfor og fytinsyre på.

Sortene av fababønner, Vertigo og Sampo, hadde et fytinsyreinnhold på henholdsvis 1,219 g/100g DM og 1,211 g/100g DM i uprosesserte prøver. Dette samsvarer med verdiene funnet av Elhardallou og Walker (1994), som fant at fytinsyreinnholdet varierte mellom 0,86 – 1,5%. I en studie av Mattila, Pihlava, Hellström, Nurmi, Eurola et al. (2018) ble det funnet noe høyere innhold av fytinsyre på 1,6 g/100g DM i hele fababønner. Schlemmer, Frølich, Prieto og Grases (2009) fant at fababønner hadde et fytinsyreinnhold på 0,51-1,77 g/100g DM avhengig av sort.

Sortene av erter, Ingrid og Astronaut, inneholdt henholdsvis 1,127 g/100g DM og 0,986 g/100g DM fytinsyre før prosessering. Dette er noe høyere verdier enn det som ble funnet av Khattab og Arntfield (2009), der det ble oppdaget et fytinsyreinnhold på 0,815 g/100g DM og 0,890 g/100g DM i henholdsvis kanadiske og egyptiske erter. Det har også blitt rapportert at hele erter har et fytinsyreinnhold på 0,54% (Tulbek et al., 2016), som også er noe lavere enn det som er målt her. Schlemmer et al. (2009) fant at erter hadde et fytinsyreinnhold som varierte fra 0,22-1,22 g/100g DM avhengig av sort.

Fytinsyreinnhold i fababønner og erter kan variere som følge av klima, jordsmonn og lokasjon (Gdala & Buraczewska, 1997). Det er derfor forventet en naturlig variasjon av fytinsyreinnhold i fababønner og erter, samtidig som det i andre studier har blitt brukt andre analysemetoder enn det som er brukt i denne oppgaven.

Spiring og koking ble observert å ha en effekt på fytinsyreinnholdet i fababønner. Det har vært en gradvis nedgang i fytinsyre mellom hvert døgn i spiringsprosessen, og det har også vært en nedgang i fytinsyre fra de uprosesserte bønnene til de som bare er bløtlagt og kokt. Etter 72 timers spiring hadde fytinsyreinnholdet blitt redusert til 0,821 g/100g DM i Vertigo og 0,957 g/100g DM i Sampo. Dette tilsvarte prosentvis nedgang på henholdsvis 32,65% og 20,97%. Kalpanadevi og Mohan (2013) fant at bløtlegging av svartøyde bønner i 12 timer reduserte fytinsyreinnholdet med 31%. Spiring i 24, 48 og 72 timer reduserte fytinsyreinnholdet med henholdsvis 38%, 79% og 86%. Bløtlegging og spiring etterfulgt av autoklavering viste seg å ha en enda større effekt på fytinsyreinnholdet, med reduksjoner på henholdsvis 71%, 96%, 98% og 100%. Sistnevnte prosessering kan sammenliknes med den gjort i denne oppgaven, der frøene ble kokt etter bløtlegging og spiring. Resultatene oppnådd i denne oppgaven er dermed betydelig lavere enn de dokumentert i litteraturen. Schlemmer et al. (2009) har rapportert at bløtlegging og spiring er en effektiv metode for å redusere fytinsyre, men at effekten varierer mellom sorter. Vidal-Valverde, Frias, Sotomayor, Diaz-Pollan, Fernandez et al. (1998) fant at bløtlegging ikke hadde en signifikant effekt på fytinsyreinnholdet i fababønner, mens bløtlegging i sitronsyre og koking resulterte i en reduksjon i fytinsyre på 35%, og spiring i seks dager reduserte fytinsyreinnholdet med 45%. I en annen undersøkelse gjort av Luo, Xie og Luo (2012) ble det oppdaget en 88% reduksjon i fytinsyre i fababønner etter spiring i fem dager. Det er med andre ord oppdaget stor variasjon mellom effekten av spiring på innholdet av fytinsyre, og det er flere faktorer som kan ha virket inn på dette. Blant disse kan forhold ved spiringen som temperatur, tilgang på vann og tilgang på oksygen ha innvirkning på spiringen. Kalpanadevi og Mohan (2013) steriliserte frøene før spiring ble iverksatt for å fjerne uønskede mikroorganismer som kan virke inn på spiringen. Dette kan forklare hvorfor de observerte en høy reduksjon i fytinsyre som følge av spiring i forhold til Vidal-Valverde et al. (1998) som ikke steriliserte frøene før spiring. I denne oppgaven ble heller ikke frøene sterilisert før spiring, som kan forklare en lavere reduksjon i fytinsyre enn det som er rapportert i litteraturen. Under spiring ble det også oppdaget at frøene utvidet seg mye underveis, noe som førte til at frøene lå tett inntil hverandre og dermed reduserte luftsirkulasjonen mellom dem. Det har vært større prosentvis nedgang i fytinsyre hos Vertigo enn hos Sampo, til tross for at Sampo har hatt større grad av vekst under spiring. Dette kan skyldes differanser mellom sortene og hvordan fytinsyre brytes ned under spiring for frigjørelse av fosfor. Sorten Vertigo er regnet som mellomstore til store frø, og de er noe større enn frøene fra Sampo, men vanligvis spirer store frø fra fababønner raskere enn små frø (Alghamdi, 2009). Dette har vist seg å ikke være tilfelle i denne oppgaven, og illustrerer hvor store forskjeller det kan være mellom ulike sorter innenfor samme art.

Fytinsyreinnholdet i erter ble redusert til 0,916 g/ 100g DM i Ingrid og 0,659 g/100g DM i Astronaut etter spiring i 72 timer, som tilsvarer prosentvis nedgang på 18,72% og 33,14%. Dette er igjen lavere enn det som er rapportert i litteraturen om svartøyde bønner (Kalpanadevi & Mohan, 2013). Det har blitt rapportert en reduksjon i fytinsyreinnhold på 63,8-70,2% i erter som følge av spiring (Preedy, 2015). Under spiringen av erter ble det benyttet en større mengde frø per spirebeholder enn ved spiringen av fababønner, og det var her det ble oppdaget utfordringer med mengden av frø under spiring. Frøene utvidet seg mye inne i beholderen, og dette kan ha forårsaket stagnering i vekst grunnet begrenset plass og lufttilførsel. Dette resulterte også til en temperaturøkning i beholderne og temperaturen var derfor ikke kontrollert under hele spiringen, noe som også kan ha hatt en innvirkning på nedbrytningen av fytinsyre. Ved bruk av færre frø per spirebeholder og mulig lenger spiretid kunne det mulig vært observert en større effekt av spiretid på fytinsyreinnhold. Det later til at kombinasjonen av prosesseringsmetodene bløtlegging, koking og spiring ikke har hatt større effekt på fytinsyreinnholdet enn det som er rapportert fra forsøk med kun spiring eller kun varmebehandling. Grunnet utfordringer under spireprosessen er det midlertidig vanskelig å fastslå at det ikke har vært en kombinasjonseffekt, og flere undersøkelser der frø som kun er spiret og frø som er spiret og kokt sammenliknes er nødvendig. Det er også forskjell på prosentvis nedgang i fytinsyre mellom de to sortene av erter Ingrid og Astronaut, der Astronaut har hatt en betydelig større nedgang. Dette kan som i de ulike sortene av fababønner skyldes forskjeller mellom sortene og hvordan molekyler brytes ned under spiringen.

Ved statistisk analyse ble det observert at fababønner hadde et signifikant høyere innhold av fytinsyre enn erter, noe som stemmer overens med funn i litteraturen. I fababønner lagres fytinsyre hovedsakelig i kimbladene, mens det lagres både i kimbladet og skallet hos erter (Tulbek et al., 2016). For å oppnå større reduksjon i fytinsyreinnhold kan derfor skallet fjernes hos erter. Generelt sett har fababønner et høyere innhold av fytinsyre enn erter. Ertene har hatt høyere grad av spiring, men det ble ikke observert signifikant forskjell i fytinsyreinnhold etter 72 timers spiring mellom fababønnesorten Vertigo og ertesorten Astronaut. Dette illustrerer at alle sortene har hatt forskjellig nedbrytning av fytinsyre selv om de er innenfor samme art. Røstad (2019) analyserte effekt av ekstrudering på innholdet av fytinsyre i planteprodukter, og fant ingen signifikant reduksjon. Det ble derimot funnet at ekstruderingsbetingelsene hadde en signifikant effekt på fytinsyreinnholdet. Det har også blitt funnet en signifikant effekt av ekstrudering på fytinsyreinnhold tidligere (El-Hady & Habiba, 2003; Kaur, Sharma, Singh & Dar, 2013). For å benytte prosessering for å redusere innhold av fytinsyre trengs det derfor

kunnskap om hvilke prosesser som er mest optimale, og hvilke betingelser som kreves for at prosessen skal ha en effekt.

Metoden som er benyttet har også noen svakheter som kan føre til feilestimering av fytinsyreinnhold. Kitet fra Megazyme skiller ikke mellom fosfat frigitt fra fytinsyre (IP6) og fosfat frigitt fra andre former myo-inositol fosfater som IP5, IP4, IP3, IP2 og IP1 (McKie & McCleary, 2016). Inositol heksafosfat (fytingsyre) kan under prosessering hydrolyseres til penta- og tetrafosfater (Zdravkovic, Nikolić, Ilic-Stojanovic, Stanojević & Savic, 2012). IP6 og IP5 har større negativ helseeffekt enn lavere former for myo-inositol fosfater fordi de har større evne til å danne komplekser med kationer og proteiner. Fordi metoden fra Megazyme baserer seg på at alt fosfat i prøven kommer fra fytinsyre, vil mengden dette overestimeres dersom noe av fytinsyren har blitt brutt ned til lavere myo-inositol fosfater. Det er derfor mulig at innholdet av fytinsyre har blitt mer redusert enn det som er observert her. 5-10 mg fytinsyre i det daglige kostholdet kan redusere jernopptak med 50% (Ma, Li, Jin, Zhai, Kok et al., 2007). Prøven med minst detektert fytinsyre er A-4, som inneholder 0,6 g/100 g DM, eller 600 mg per 100g DM. For å forhindre de skadelige effektene av fytinsyre trengs det derfor prosesser som kan redusere innholdet ytterligere. Et plantebasert kosthold med høyt inntak av belgvekster og andre matvarer med høyt innhold av fytinsyre som nøtter, frø og korn kan derfor føre til redusert opptak av jern (Coulibaly et al., 2011).

5.4 Innhold av galaktosyl-sukrose oligosakkarider

Galaktosyl-sukrose oligosakkarider er en gruppe oligosakkarider som er det finnes høye forekomster av i belgvekster (Singh et al., 2017). Dyr og mennesker mangler enzymer for å bryte ned disse i fordøyelsessystemet. Mikroorganismer i tarmen bryter ned disse ved fermentering, noe som fører til produksjon av gasser som CO₂ og metangass. Dette kan føre til oppblåsthet og mageubehag. GOS har også positive helseeffekter ved at det kan virke som et prebiotika og gi samme helsebringende effekter som kostfiber (Gemedede & Ratta, 2014). Ved bruk av høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC) kan en detektere innhold av raffinose, staktyose og verbaskose (Mattila et al., 2018). Dette er en metode som krever mye ressurser, og er mindre praktisk ved analyse av mange prøver. I denne oppgaven er det benyttet kit fra Megazyme, som er en enklere metode for å estimere innhold av GOS på.

Sortene av fababønner, Vertigo og Sampo, hadde et innhold av GOS på henholdsvis 4,036 g/100g DM og 2,617 g/100g DM i uprosesserte prøver. Sampo hadde et betydelig lavere innhold av GOS enn Vertigo. Innholdet av GOS i Vertigo stemmer godt overens med det som er rapportert i litteraturen. Gdala og Buraczewska (1997) fant at totalt innhold av GOS i ulike sorter av fababønner rangerte fra 3,79 g/100g DM til 4,66 g/100g DM. Oboh og Burbano (2000) fant at innholdet av GOS i ulike bønnevarianter rangerte fra 2,830 mg/100mg DM til 3,844 mg/100mg DM. Det ble også rapportert av Vidal-Valverde et al. (1998) at uprosesserte fababønner inneholder 3,67 g/100g DM GOS. Vertigo har et innhold av GOS som er mer likt andre sorter av fababønner, mens Sampo har et lavere innhold av GOS og likner mer andre bønnesorter.

Ertesortene Ingrid og Astronaut inneholdt henholdsvis 3,756 g/100g DM og 4,083 g/100g DM GOS før prosessering. Kalpanadevi og Mohan (2013) fant at svartøyde bønner inneholdt 3,86 g/100g DM GOS. I gule erter er det rapportert et noe høyere innhold av GOS, blant annet fant Gdala og Buraczewska (1997) at erter hadde et gjennomsnittlig innhold av GOS på 8,42 g/100g DM. Han og Baik (2006) fant at gule erter inneholdt 7,07 g/100g DM. Tulbek et al. (2016) fant at hele erter inneholdt noe mindre GOS, med et detektert innhold på 6,16%. Ingrid og Astronaut inneholder mindre GOS enn det som er rapportert i litteraturen.

Det er forventet noe variasjon i innhold av GOS i fababønner og erter som følge av sort, klima og vekstforhold. I dette tilfellet var innholdet lavere enn det som er rapportert i litteraturen. Dette kan skyldes at kitet fra Megazyme som ble benyttet kun måler innhold av raffinose i prøvene. Andre α -galaktosider i prøven som staktyose og verbaskose hydrolyseres også av α -

galaktosidase, men blir ikke regnet med i metoden. Totalt innhold av GOS vil dermed bli noe underestimert, og mest sannsynlig er det totale innholdet av GOS målt i denne oppgaven lavere enn det reelle innholdet i prøvene. I litteraturen er det benyttet andre metoder for å detektere GOS, og her er det også rapportert varierende innhold av de tre oligosakkaridene raffinose, staktyose og verbaskose. Staktyose og verbaskose har høyere molekylvekt enn raffinose, så med dette i beregningen er det detekterte innholdet av GOS i denne oppgaven underestimert. Vidal-Valverde et al. (1998) fant at fababønner kun inneholdt 0,28 g/100g DM raffinose, og henholdsvis 1,10 g/100g DM og 2,29 g/100g DM staktyose og verbaskose. Tulbek et al. (2016) observerte at erter inneholdt 0,82% raffinose, og henholdsvis 1,62% og 3,72% staktyose og verbaskose. Khattab og Arntfield (2009) fant at kanadiske og egyptiske erter inneholdt i gjennomsnitt 1,38 g/100g DM verbaskose, 1,87 g/100g DM raffinose og 2,44 g/100g DM staktyose. Forholdet mellom de tre oligosakkaridene varierer mellom sort, og for å best mulig kunne si noe om totalt innhold av GOS trengs det mer nøyaktige metoder som HPLC for å måle innholdet av alle oligosakkarider til stede i prøvematerialet.

Spiring og koking har hatt stor innvirkning på innholdet av GOS i prøvene. Samtlige av sortene både av fababønner og erter viser over 96% nedgang i GOS etter 72 timers spiring. Sortene av fababønner Vertigo og Sampo hadde et innhold av GOS på henholdsvis 0,122 g/100g DM og 0,046 g/100g DM etter 72 timers spiring. Sortene av erter, Ingrid og Astronaut har etter 72 timers spiring oppnådd reduksjon av GOS til henholdsvis 0,117 g/100g DM og 0,048 g/100g DM. Etter kun bløtlegging og koking har innholdet av GOS nesten halvert i samtlige sorter, noe som også ble funnet i andre belgvekster (Han & Baik, 2006; Khattab & Arntfield, 2009). Dette kan skyldes at GOS løses i vannet og blir skylt ut av frøene (Ibrahim et al., 2002). Kalpanadevi og Mohan (2013) har rapportert at staktyose og verbaskose ble 100% redusert etter 72 timers spiring og autoklaving, mens raffinose kun hadde en reduksjon på 88% i svartøyde bønner.. Vidal-Valverde et al. (1998) fant liknende resultater i fababønner, der staktyose og verbaskose hadde blitt redusert 100%, mens raffinose hadde hatt en reduksjon på kun 12%. Ibrahim et al. (2002) fant at både raffinose og staktyose hadde en reduksjon på 100% etter kun 48 timers spiring i svartøyde bønner. Dette kan tyde på at staktyose og verbaskose hydrolyseres av α -galaktosidase videre til raffinose, og at det er mer raffinose enn staktyose og verbaskose i prøvene som har spirt lengst. Det kan antas at Megazyme-metoden vil gi mer nøyaktige estimater av GOS i prøvene som har spirt lenger, ettersom det muligens er en høyere andel av raffinose enn staktyose og verbaskose i disse prøvene, og denne metoden baserer seg på beregning av raffinose-innholdet. Det er derimot en feilkilde at verdiene målt i prøvene spirt i

72 timer er svært lave, og ligger på nedre grense mellom 12-250 μg raffinose som burde inngå i reaksjonen for å gi nøyaktige resultater (Megazyme, 2014). For å bedre kunne sammenlikne og analysere effekten av spiring og koking trengs mer nøyaktige metoder for å måle GOS, men ved sammenlikning av resultater oppnådd i litteraturen viser likevel resultatene god overensstemmelse.

Ved statistisk analyse ble det observert at fababønnesorten Sampo hadde et signifikant lavere innhold av GOS enn fababønnesorten Vertigo og ertesortene Ingrid og Astronaut. Spiringen hadde samme effekt på alle sortene, og etter 48 timers spiring hadde alle sortene hatt en reduksjon av GOS til under 0,350 g/100g DM. Dette kan tyde på at spiring og koking er en effektiv måte å redusere innholdet av GOS i belgvekster på, og den har vist seg effektiv på flere ulike sorter av både fababønner og erter. Røstad (2019) undersøkte også effekt av ekstrudering på innhold av GOS i planteprodukter, og fant at ekstrudering ikke var effektivt for å redusere GOS. Det har blitt rapportert at varmebehandling kan redusere innholdet av GOS, men at direkte varmebehandling er mindre effektivt enn koking (Moussou, Corzo-Martínez, Sanz, Zaidi, Montilla et al., 2017). Dette tyder på at tilstedeværelsen av vann er nødvendig for å løse opp og fjerne GOS fra prøvematerialet.

Det er svakheter ved metoden til Megazyme, og en av dem kan være at ettersom NAD^+ oksiderer $\beta\text{-D-Galaktose}$ fra raffinose, staktyose og verbaskose, kan det ta noe tid før reaksjonen stabiliserer seg. Hvis omdanningen av D-galaktose ikke er fullført etter 20 minutter ved 40°C kan det bety at interferens har funnet sted (Megazyme, 2017). Det vil si at det er større mengder staktyose og verbaskose til stede som gjør at reaksjonen bruker lenger tid på å stabilisere seg. Her ble det ikke observert økning i absorbans etter 20 minutter, noe som kan tyde på at reaksjonen har stabilisert seg raskt og at det hovedsakelig er raffinose til stede i reaksjonen. Dette kan derimot ikke konstateres uten nærmere undersøkelser av innholdet av staktyose og verbaskose i prøvene.

5.5 Oppsummering

I denne oppgaven ble det analysert for innhold av fytinsyre og galaktosyl-sukrose oligosakkarider i ulike sorter av erter og fababønner med ulik grad av prosessering i form av bløtlegging, koking og spiring. Sortene av fababønner som ble benyttet var Vertigo og Sampo, sortene av erter var Ingrid og Astronaut. Under spiringen viste det seg at ertene spirte raskere enn fababønnene. Spiring og koking hadde ingen signifikant innvirkning på proteininnhold i noen av prøvene. På generell basis var proteininnholdet høyere enn det som tidligere er blitt rapportert for fababønner og erter.

Undersøkelse av fytinsyre viste at spiring i 72 timer har en signifikant effekt i samtlige sorter, men at effekten av spiring og koking varierte mellom hver sort. Erter inneholdt betydelig mindre fytinsyre (1,13% og 0,99% DM) enn fababønner (1,22 og 1,21% DM). Kitet fra Megazyme for analyse av totalt fosfor og beregning av fytinsyre viste seg å gi sammenliknbare resultater mot mer avanserte metoder for å analysere fytinsyre. I fababønner ble det ikke observert noen signifikant forskjell i fytinsyreinnhold før etter 72 timer, mens i erter var det signifikant forskjell etter 24 timers spiring (Ingrid) og etter kun bløtlegging og koking (Astronaut). Én sort av fababønne og én sort av ert hadde større prosentvis nedgang enn de andre sortene, Vertigo (32,65%) og Astronaut (33,14%). Sampo og Ingrid hadde hatt lavere prosentvis nedgang (20,97% og 18,72%)

Ved analyse av GOS ble det vist at Sampo hadde et signifikant lavere innhold (2,62%) enn de andre sortene (Vertigo 4,04%, Ingrid 3,78%, og Astronaut 4,10%). Etter 72 timers spiring hadde innholdet av GOS minket med over 96% for samtlige av sortene. Det var også en signifikant nedgang i GOS etter kun bløtlegging og koking i alle sortene.

Basert på resultatene i denne oppgaven kan det konkluderes med at innholdet av fytinsyre og GOS i erter og fababønner kan reduseres ved spiring og koking, og dette samsvarer med funn gjort i litteraturen.

6. Til ettertanke og videre forskning

Oppsettet som ble benyttet for å spire erter og fababønner hadde tidligere kun blitt benyttet til spiring av byggmalt, og det var derfor noe usikkerhet rundt om spireanlegget ville virke til dette formålet. Ertene i forsøket ble spiret først, og det ble oppdaget at mengden frø i spirebeholderne var for høy. Dermed ble mengden frø redusert til spiring av fababønner, men også dette var en for høy mengde for spiringsanlegget. Det ble gjort et gjentak av hver spiring, og resultatene viste god korrelasjon mellom gjentakene. Det var signifikante forskjeller i rotlengde mellom hver spiringstid, men rotlengde hadde tilsynelatende ikke noen signifikant effekt på nedbrytning av fytinsyre og GOS i prøvene. Spiretiden hadde derimot en signifikant effekt for alle prøvene, og det kan sees en tydelig korrelasjon mellom spiretid og reduksjon i både fytinsyre og GOS.

Kokevannet fra prosesseringen ble tatt vare på, men ikke analysert i denne oppgaven. Det kan være interessant å undersøke den kjemiske sammensetningen av dette kokevannet, for å få et mer sammenhengende bilde av hvilke næringsstoffer og antinæringsstoffer som blir fjernet med vannet i prosessen av bløtlegging, spiring og koking.

Metoden som ble benyttet for analyse av fytinsyre er ikke best egnet for prosesserte produkter. Fytinsyre blir brutt ned til lavere former for myo-inositol fosfater, men metoden fra Megazyme skiller ikke mellom fosfat fra disse og fosfat fra fytinsyre. Det er en mulighet for at det finnes noen av disse myo-inositol fosfatene i prøvene, ettersom de har gjennomgått prosessering. Fytinsyreinnholdet i prøvene kan derfor være noe overestimert, og her burde det benyttes andre metoder som HPLC eller ionebyttekromatografi for å gi et mer nøyaktig anslag av fytinsyreinnhold og mulig innhold av lavere myo-inositol fosfater etter bløtlegging, spiring og koking.

Metoden som ble benyttet for analyse av galaktosyl-sukrose oligosakkarider i prøvene beregner kun innholdet av raffinose i prøvene, så resultatene kan ikke overføres fullstendig for innhold av GOS. Andre oligosakkarider som staktyose og verbaskose har høyere molekylvekt enn raffinose, og ved å overføre innhold av raffinose til innhold av GOS vil dette være noe underestimert. Her burde det benyttes andre metoder som for eksempel HPLC for å undersøke i detalj mengden av de spesifikke oligosakkaridene. Det kunne vært interessant å se hvordan innholdet av hvert oligosakkarid ble påvirket underveis i spiringsprosessen.

Til videre forskning hadde det vært ønskelig å undersøke hvordan spiring og koking kan påvirke innholdet av andre antinæringsstoffer som proteaseinhibitorer, lektiner, tanniner, saponiner og

alkaloider i belgvekster. Det vil være en fordel å kartlegge innhold av flere antinæringsstoffer for å få en bedre forståelse av hvordan spiring, bløtlegging og koking påvirker antinæringsstoffer i belgvekster, og om dette er en gunstig prosesseringsmetode. Spiring kan redusere innholdet av antinæringsstoffer, og det kan også være interessant å undersøke hvordan denne prosesseringen vil virke inn på funksjonelle egenskaper som skumdannelse, geldanning, vannbinding og proteinløselighet for å nevne noen. Hensikten med denne oppgaven er å kartlegge hvordan antinæringsstoffinnholdet i belgvekster kan reduseres for å benytte mer plantebasert protein i fremtiden. Til slike formål er de fysiske og kjemiske egenskapene til belgvekstene viktig å tilegne seg kunnskap om, samt hvordan de kan sammenliknes med funksjonelle egenskaper i uprosesserte belgvekster. Det vil også være hensiktsmessig å undersøke om bløtlegging, spiring og koking har en innvirkning på fordøyelsen av erter og fababønner. Ved analyse av fordøyelse av disse prøvene kan det observeres om innholdet av forskjellige antinæringsstoffer påvirker fordøyelsen. Prøvene benyttet er mel fremstilt av hele erter og fababønner, og kunne blitt benyttet i in vitro fordøyelse i form av et ferdig produkt ment for konsum. På denne måten kunne det blitt observert om fytinsyreinnholdet har en effekt på opptak av mineraler i fordøyelsen. Fermentering av produktene kunne også avdekket om redusert innhold av GOS vil gi lavere produksjon av gasser og dermed potensielt redusert ubehag ved høyt inntak av belgvekster.

7. Litteratur

- Abrahamsen, U., Uhlen, A. K., Waalen, W. M. & Stabbetorp, H. (2017a). Muligheter for økt proteinproduksjon på kornarealene. *NIBIO BOK*, 5 (1).
- Abrahamsen, U., Waalen, W. M. & Uhlen, A. K. (2017b). Sortsforsøk i erter og åkerbønne. *NIBIO BOK*, 4 (1).
- Alghamdi, S. S. (2009). *Chemical Composition of Faba Bean (Vicia faba L.) Genotypes under Various Water Regimes*. Pakistan Journal of Nutrition. Department of Plant Production, College of Food and Agricultural Sciences, King Saud University, P.O. Box 2460, Riyadh, Saudi Arabia.
- Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C. & Saldívar, S. O. (2017). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83 (1). doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13985>.
- Azeke, M. A., Egielewa, S. J., Eigbogbo, M. U. & Ihimire, I. G. (2011). Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Science and Technology*, 48 (6): 724-729.
- Cassidy, E. S., West, P. C., Gerber, J. S., Foley, J. A. . (2013). Redefining agricultural yields: from tonnes to people nourished per hectare. *Environmental Research Letters*, 8.
- Chang, R. & Goldsby, K. A. (2013). *General Chemistry: The Essential Concepts*: McGraw-Hill Education.
- Cheung, P. C. K. & Chau, C.-F. (1999). The Carbohydrate Composition of Cotyledons and Hulls of Three Chinese Indegenous Legume Seeds. I: Whitaker, J. R. (red.) *Food for Health in the Pacific Rim*. Connecticut, USA: Food & Nutrition Press Inc. .
- Coulibaly, A., Kouakou, B. & Chen, J. (2011). Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1: 1-22.
- Crépon, K., Marget, P. P., C., Carrouée, B., Arese, P. & Duc, G. (2009). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba L.*) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115 (3): 329-339.
- Culhaoglu, T., Zheng, D., Méchin, V. & Baumberger, S. (2011). Adaptation of the Carrez procedure for the purification of ferulic and p-coumaric acids released from lignocellulosic biomass prior to LC/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, 879.

- Dahl, W. J., Foster, L. M. & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* (2012), 108.
- Daintith, J. (2008). *A Dictionary of Chemistry*: OUP Oxford.
- Dhaliwal, M. S. (2017). Legume Vegetables. I: *Handbook of Vegetable Crops*: Kalyani Publishers.
- Du, Y., Dou, S. & Wu, S. (2012). Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice. *Food Chemistry*, 135 (2). doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.131>.
- El-Hady, E. S. A. A. & Habiba, R. A. (2003). Effect of soaking and extrusion condition on anti-nutrients and protein digestibility of legume seed. *LWT - Food Science and Technology*, 36 (3): 285-293. doi: 10.1016/S0023-6438(02)00217-7.
- Elhardallou, S. B. & Walker, A. F. (1994). Phytic acid content of three legumes in the raw, cooked and fibre forms. *Phytochemical Analysis*, 5 (5): 243-246.
- Etemadi, F., Hashemi, M., Barker, A. V., Zandvakili, O. R. & Liu, X. (2019). Agronomy, Nutritional Value, and Medicinal Application of Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Horticultural Plant Journal*, 5.
- FoodProFuture. (2017). *FoodProFuture Newsletter: Innovative and sustainable exploitation of plant proteins in future foods*. Ås, Norway.
- Fredrikson, M., Biot, P., Alminger, M. L. & Carlsson, N. S., A. (2001). Production Process for High-Quality Pea-Protein Isolate with Low Content of Oligosaccharides and Phytate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49.
- Frøseth, R. B. (2009). *Erter og åkerbønner*. Tilgjengelig fra: <https://www.agropub.no/fagartikler/erter-og-akerbonner> (lest 03.07.2020).
- Gdala, J. & Buraczewska, L. (1997). Chemical composition and carbohydrate content of several varieties of faba bean and pea seeds. *Journal of Animal Feed Sciences*.
- Gemedé, H. F. & Ratta, N. (2014). Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3 (4): 284-289.
- Graf, E. & Eaton, J. W. (1990). Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 8 (1): 61-69. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90146-A](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90146-A).
- Günther, M. (2019). *Kan Norge produsere mer planteprotein til mat?* Tilgjengelig fra: <https://www.nibio.no/nyheter/kan-norge-produsere-mer-planteprotein-til-mat> (lest 03.07.2020).

- Han, I. H. & Baik, B. (2006). Oligosaccharide Content and Composition of Legumes and Their Reduction by Soaking, Cooking, Ultrasound, and High Hydrostatic Pressure. *Cereal Chemistry*, 83.
- Heller, M. C. & Keoleian, G. A. (2014). Greenhouse Gas Emission Estimates of U.S. Dietary Choices and Food Loss. *Journal of Industrial Ecology*, 19 (3). doi: 10.1111/jiec.12174.
- Helsedirektoratet. (2018). *Utviklingen i norsk kosthold*. Oslo, Norge: Helsedirektoratet.
- Ibrahim, S. S., A., H. R., Shatta, A. A. & Embaby, H. E. (2002). Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. *Food / Nahrung*, 46 (2). doi: 10.1002/1521-3803(20020301).
- Kalpanadevi, V. & Mohan, V. R. (2013). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *unguiculata*. *LWT - Food Science and Technology*, 51.
- Karaca, C. A., Low, N. & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*.
- Kaur, S., Sharma, S., Singh, B. & Dar, B. N. (2013). Effect of extrusion variables (temperature, moisture) on the antinutrient components of cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (3). doi: 10.1007/s13197-013-1118-4.
- Khattab, R. Y. & Arntfield, S. D. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (6): 1113-1118. doi: 10.1016/j.lwt.2009.02.004.
- Khazaei, H., Purves, R. W., Hughes, J., Link, W., O'Sullivan, D. M., Schulman, A. H., Björnsdotter, E., Geu-Flores, F., Nadzieja, M., Andersen, S. U., et al. (2019). Eliminating vicine and convicine, the main anti-nutritional factors restricting faba bean usage. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 549-556. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.051>.
- Kumar, A., Prasad, N. N. & Sinha, S. K. (2014). Nutritional and antinutritional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) germplasms growing in Bihar, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21 (1): 159-162.
- Lack, A. & Evans, D. (2005). *Plant Biology*. 2nd utg. Abingdon, United Kingdom: Taylor & Francis Group.
- Luo, Y., Xie, W. & Luo, F. (2012). Effect of Several Germination Treatments on Phosphatases Activities and Degradation of Phytate in Faba Bean (*Vicia faba* L. and

- Azuki Bean (*Vigna angularis* L.). *Journal of Food Science*, 77 (10). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02733.x>.
- Ma, G., Li, Y., Jin, Y., Zhai, F., Kok, F. J. & Yang, X. (2007). Phytate intake and molar ratios of phytate to zinc, iron and calcium in the diets of people in China. *Eur J Clin Nutr*, 61 (3): 368-74. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602513.
- Mattila, P. H., Pihlava, J., Hellström, J., Nurmi, M., Eurola, M., Mäkinen, S., Jalava, T. & Pihlanto, A. (2018). Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products. *Food Quality and Safety*, 2: 213-219. doi: 10.1093/fqsafe/fyy021.
- McKie, V. & McCleary, B. V. (2016). A Novel and Rapid Colorimetric Method for Measuring Total Phosphorus and Phytic Acid in Foods and Animal Feeds. *Journal of AOAC International* 99 (3): 738-743. doi: 10.5740/jaoacint.16-0029.
- Megazyme. (2014). *RAFFINOSE/D-GALACTOSE* Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29, IRELAND.: Megazyme.
- Megazyme. (2017). *PHYTIC ACID (PHYTATE)/TOTAL PHOSPHORUS*. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29, IRELAND.: Megazyme.
- Micek, P., Kowalski, Z. M., Kulig, B. & Kański, J. (2014). Effect of variety and plant protection method on chemical composition and in vitro digestibility of faba bean (*Vicia faba*) seeds. *Annals of Animal Science*, 15: 143-154. doi: 10.2478/aoas-2014-0080.
- Moussou, N., Corzo-Martínez, M., Sanz, M. L., Zaidi, F., Montilla, A. & Villamiel, M. (2017). Assessment of Maillard reaction evolution, prebiotic carbohydrates, antioxidant activity and α -amylase inhibition in pulse flours. *J Food Sci Technol*, 54 (4): 890-900. doi: 10.1007/s13197-016-2298-5.
- Obendorf, R. L. & Kosina, S. M. (2011). Soluble Carbohydrates in Soybean. I: *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*, s. 201-228. Rijeka, Croatia: InTech.
- Oboh, H. & Burbano, C. (2000). Effect of soaking, cooking and germination on the oligosaccharide content of selected Nigerian legume seeds. *Plants Foods for Human Nutrition*, 55.
- Poore, J. & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360 (6392): 987-992. doi: 10.1126/science.aaq0216.
- Popova, A. & Mihaylova, D. (2019). Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. *The Open Biotechnology Journal*, 13: 68-76.

- Preedy, V. R. (2015). *Processing and Impact on Active Components in Food* 1st utg. San Diego, USA: Academic Press.
- Rhee, K. C. (2001). Determination of Total Nitrogen. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 0 (1).
- Røstad, I. (2019). *Antinæringsstoffer i planteprodukter – effekt av prosess*. Masteroppgave. Ås, Norge: Norges Miljø - og Biovitenskapelige Universitet.
- Sáa, A. G. A., Morenob, Y. M. F. & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97.
- Sandberg, A.-S. (2000). Developing functional ingredients. I: Gibson, G. R., Williams, C. M. (red.) *Functional Foods: Concept to Product*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Savelkoul, F. H. M. G., Van der Poel, A. F. B. & Tamminga, S. (1992). The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review *Plant Foods for Human Nutrition*, 42.
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M. & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53.
- Serikstad, G. L., Hansen, S. & de Boer, A. (2013). Biologisk nitrogenbinding – belgvekster som kilde til nitrogen. *Bioforsk Fokus* 8(3).
- Serventi, L. (2020). *Upcycling Legume Water: from wastewater to food ingredients*. Christchurch, New Zealand: Springer Nature Switzerland. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42468-8>.
- Setia, R., Dai, Z., Nickerson, M. T., Sopiwnyk, E., Malcolmson, L. & Ai, Y. (2019). Impacts of short-term germination on the chemical compositions, technological characteristics and nutritional quality of yellow pea and faba bean flours. *Food Research International*, 122.
- Shahidi, F. (1997). Beneficial Health Effects and Drawbacks of Antinutrients and Phytochemicals in Foods. I: *Antinutrients and Phytochemicals in Food*: American Chemical Society.
- Shen, S., Hou, H. & Ding, C. (2016). Protein content correlates with starch morphology, composition and physiochemical properties in field peas. *Canadian Journal of Plant Science*, 96 (3).

- Shi, L., Arntfield, S. D. & Nickerson, M. T. (2018). Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses. *Food Research International*, 107: 660-668. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.056>.
- Silva, E. O. & Bracarense, A. P. F. R. L. (2016). Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. *Journal of Food Science*, 81 (6). doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13320>.
- Simonne, A. H., H., S. E., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A. & Presman III, C. P. (1999). Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73 (1): 39-45.
- Singh, R. K., Chang, H., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., et al. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*.
- Slominski, B. A. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*, 90. doi: 10.3382/ps.2011-01372
- Stephen, A. M., Philips, G. O. & Williams, P. A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. 2nd Edition utg. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Tharanathan, R. N. & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes - A boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14 (12).
- Totland, T. H., Melnæs, B. K., Lundberg-Hallén, N., Hellend-Kigen, K. M., Lund-Blix, N. A., Myhre, J. B., Johansen, A. M. W., Løken, E. B. & Andersen, L. F. (2012). *Norkost 3 En landsomfattende kostholdsundersøkelse blant menn og kvinner i Norge i alderen 18-70 år, 2010-11*. Oslo, Norge.
- Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Wang, Y. C., Asavajaru, P. & Lam, A. (2016). Pea: A Sustainable Vegetable Protein Crop. I: Nadathur, S. R., Wanasundara, Janitha P. D., Scanlin, Laurie (red.) *Sustainable Protein Sources*. London, United Kingdom: Academic Press.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sotomayor, C., Diaz-Pollan, C., Fernandez, M. & Urbano, G. (1998). Nutrients and antinutritional factors in faba bean as affected by processing. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 207: 140-145. doi: <https://doi.org/10.1007/s002170050308>.

- Wang, N., Hatcher, D. W. & Gawalko, E. J. (2008). Effect of variety and processing on nutrients and certain anti-nutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Food Chemistry*, 111 (1): 132-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.047>.
- Zdravkovic, A. S., Nikolić, V., Ilic-Stojanovic, S. S., Stanojević, L. & Savic, I. M. (2012). THE EXTRACTION KINETICS AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SESAME SEEDS (*Sesames indicum* L.) AQUEOUS EXTRACTS. *Advanced technologies*, 2 (1): 48-57.

Vedlegg

Oversikt over vedlegg

Vedlegg 1: Enveis ANOVA: rotlengde ~ spiretid

Vedlegg 2: Enveis ANOVA: protein ~ spiretid og protein ~ sort

Vedlegg 3: Toveis ANOVA: protein ~ sort:spiretid

Vedlegg 4: Enveis ANOVA: fytinsyre ~ spiretid og fytinsyre ~ sort

Vedlegg 5: Toveis ANOVA: fytinsyre ~ sort:spiretid.

Vedlegg 6: Enveis ANOVA: GOS ~ spiretid og GOS ~ sort

Vedlegg 7: Toveis ANOVA: GOS ~ sort:spiretid.

Vedlegg 8: Innhold av fosfor og fytinsyre.

Vedlegg 9: Innhold av raffinose og D-galaktose.

Vedlegg 1: Enveis ANOVA: rotlengde ~ spiretid.

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Sort    11  51369    4670   297.3 <2e-16 ***
Residuals 228   3581     16
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tukey's HSD
Alpha: 0.05

```
      Mean G1 G2 G3 G4 G5 G6
Ingrid 72t  53.25 A
Astronaut 72t 50.80 A
Astronaut 48t 40.10  B
Ingrid 48t   38.55  B
Sampo 72t   30.70   C
Vertigo 72t  25.75   D
Sampo 48t   20.65   E
Vertigo 48t  18.90   E
Astronaut 24t 17.45   E
Ingrid 24t   17.25   E
Vertigo 24t   8.60   F
Sampo 24t    7.90   F
```

Figur A. Output fra enveis ANOVA i R Commander, rotlengde ~ spiretid, samt fra påfølgende Tukey test.

Vedlegg 2: Enveis ANOVA: protein ~ spiretid og protein ~ sort.

```

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Spiretid       4      8.3   2.086    0.079  0.988
Residuals     31    815.1  26.292

---
                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
SORT           3    782.5  260.83    204 <2e-16 ***
Residuals     32     40.9    1.28

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

Linear Hypotheses:
              Lower Center Upper Std.Err t value  P(>t)
ASTRONAUT-INGRID -2.8856 -1.9144 -0.9433  0.3395  -5.64 0.000196 ***
ASTRONAUT-SAMPO -12.8179 -11.8467 -10.8755  0.3395 -34.90 2.32e-14 ***
ASTRONAUT-VERTIGO -8.4001 -7.4289 -6.4577  0.3395 -21.89 1.67e-12 ***
INGRID-SAMPO     -10.9034 -9.9322 -8.9610  0.3395 -29.26 3.03e-14 ***
INGRID-VERTIGO   -6.4856 -5.5144 -4.5433  0.3395 -16.25 1.24e-10 ***
SAMPO-VERTIGO     3.4466  4.4178  5.3890  0.3395  13.01 3.55e-09 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

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

              Mean G1 G2 G3 G4
SAMPO        38.08556 A
VERTIGO      33.66778  B
INGRID       28.15333  C
ASTRONAUT    26.23889  D

```

Figur B. Output fra enveis ANOVA i R Commander, protein ~ spiretid, samt enveis ANOVA og påfølgende Tukey test for protein ~ sort.

Vedlegg 3: Toveis ANOVA: protein ~ sort:spiretid.

Anova Table (Type II tests)

Response: PROTEIN.

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
SORT	782.49	3	503.0058	4.878e-16	***
Spiretid	8.34	4	4.0222	0.019146	*
SORT:Spiretid	24.27	12	3.9006	0.006394	**
Residuals	8.30	16			

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

	Mean	G1	G2	G3	G4	G5	G6
SAMPO:2	39.035	A					
SAMPO:3	38.630	A					
SAMPO:4	38.500	A					
SAMPO:1	36.845	A	B				
SAMPO:0	36.750	A	B				
VERTIGO:4	34.435		B	C			
VERTIGO:1	34.315		B	C			
VERTIGO:3	33.970		B	C			
VERTIGO:2	33.345			C			
INGRID:1	29.720				D		
INGRID:2	28.440				D	E	
INGRID:0	27.750				D	E	F
INGRID:4	27.375				D	E	F
ASTRONAUT:2	27.345				D	E	F
INGRID:3	27.280				D	E	F
ASTRONAUT:1	26.755				D	E	F
ASTRONAUT:0	26.440					E	F
ASTRONAUT:3	25.845					E	F
ASTRONAUT:4	24.910						F

Figur C. Output fra enveis ANOVA i R Commander, protein ~ sort:spiretid, samt fra påfølgende Tukey test.

Vedlegg 4: Enveis ANOVA: fytinsyre ~ sort og fytinsyre ~ spiretid.

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Sort      3   1.418   0.4726   22.53 1.33e-11 ***
Residuals 118   2.475   0.0210
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
Astronaut 0.7972667 0.1734462    30
Ingrid    0.9801935 0.1333538    31
Sampo     1.0910000 0.1188874    30
Vertigo   1.0211613 0.1482449    31

      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Spiretid   4   1.169   0.29225   12.55 0.0000000157 ***
Residuals 117   2.724   0.02328
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

      mean      sd data:n
0 1.1357500 0.1182869    16
1 1.0446667 0.1312151    30
2 0.9868261 0.1466798    23
3 0.9147000 0.1658410    30
4 0.8278261 0.1838620    23

      Lower      Center      Upper      Std.Err t value      P(>t)
0-1 -0.033219  0.091083  0.215386  0.044862  2.030  0.25816
0-2  0.024622  0.148924  0.273226  0.044862  3.320  0.01037 *
0-3  0.096748  0.221050  0.345352  0.044862  4.927 0.0000270542 ***
0-4  0.183622  0.307924  0.432226  0.044862  6.864 0.0000000034 ***
1-2 -0.066462  0.057841  0.182143  0.044862  1.289  0.69830
1-3  0.005664  0.129967  0.254269  0.044862  2.897  0.03569 *
1-4  0.092538  0.216841  0.341143  0.044862  4.834 0.0000400525 ***
2-3 -0.052176  0.072126  0.196428  0.044862  1.608  0.49550
2-4  0.034698  0.159000  0.283302  0.044862  3.544  0.00505 **
3-4 -0.037428  0.086874  0.211176  0.044862  1.936  0.30407
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Tukey's HSD
Alpha: 0.05
      Mean G1 G2 G3 G4
0 1.1357500  A
1 1.0446667  A  B
2 0.9868261   B  C
3 0.9147000   C  D
4 0.8278261   D

```

Figur D. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ sort, samt enveis ANOVA og påfølgende Tukey test for fytinsyre ~ spiretid

Vedlegg 5: Toveis ANOVA: Fytinsyre ~ sort:spiretid.

Anova Table (Type II tests)

Response: Fytinsyre.g.100g

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Sort	1.35831	3	37.2276	2.470e-16	***
Spiretid	1.10960	4	22.8083	1.769e-13	***
Sort:Spiretid	0.12497	12	0.8562	0.5931	
Residuals	1.24055	102			

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

	Mean	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Vertigo:0	1.2192500	A						
Sampo:0	1.2107500	A						
Sampo:1	1.1677500	A	B					
Ingrid:0	1.1275000	A	B	C				
Sampo:2	1.1058000	A	B	C	D			
Vertigo:1	1.0751250	A	B	C	D			
Ingrid:1	1.0665000	A	B	C	D			
Sampo:3	1.0392857	A	B	C	D	E		
Vertigo:2	1.0241667	A	B	C	D	E		
Vertigo:3	0.9910000	A	B	C	D	E		
Astronaut:0	0.9855000	A	B	C	D	E		
Sampo:4	0.9568333		B	C	D	E		
Ingrid:2	0.9398750		B	C	D	E		
Ingrid:3	0.9221250			C	D	E	F	
Ingrid:4	0.9162000			C	D	E	F	
Astronaut:2	0.8760000				D	E	F	G
Astronaut:1	0.8747500				D	E	F	G
Vertigo:4	0.8210000					E	F	G
Astronaut:3	0.6944286						F	G
Astronaut:4	0.6590000							G

Figur E. Output fra enveis ANOVA i R Commander, fytinsyre ~ sort:spiretid, samt fra påfølgende Tukey test.

Vedlegg 6: Enveis ANOVA: GOS ~ sort og GOS spiretid.

```

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Sort            3    2.38   0.7949   0.524  0.668
Residuals      68 103.23   1.5181

                mean      sd data:n
Astronaut     1.1296667 1.4510786    18
Ingrid        1.2462778 1.2635923    18
Sampo         0.7917222 0.8369314    18
Vertigo       1.2232222 1.2920925    18

                Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Spiretid       4   97.25  24.311  194.7 <2e-16 ***
Residuals     67    8.37   0.125

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

                mean      sd data:n
0 3.6228750 0.64691608     8
1 2.0715000 0.44063379    16
2 0.7746250 0.38883602    16
3 0.1990000 0.11986214    16
4 0.0831875 0.05323435    16

-----
      Lower Center  Upper Std.Err t value      P(>t)
0-1  1.1677  1.5514  1.9351  0.1369  11.335  < 2e-16 ***
0-2  2.4645  2.8483  3.2320  0.1369  20.810  < 2e-16 ***
0-3  3.0402  3.4239  3.8076  0.1369  25.015  < 2e-16 ***
0-4  3.1560  3.5397  3.9234  0.1369  25.861  < 2e-16 ***
1-2  0.9132  1.2969  1.6806  0.1369   9.475  < 2e-16 ***
1-3  1.4888  1.8725  2.2562  0.1369  13.681  < 2e-16 ***
1-4  1.6046  1.9883  2.3720  0.1369  14.527  < 2e-16 ***
2-3  0.1919  0.5756  0.9593  0.1369   4.206  0.000733 ***
2-4  0.3077  0.6914  1.0752  0.1369   5.052  0.0000348 ***
3-4 -0.2679  0.1158  0.4995  0.1369   0.846  0.915075

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Tukey's HSD
Alpha: 0.05
      Mean G1 G2 G3 G4
0 3.6228750 A
1 2.0715000  B
2 0.7746250   C
3 0.1990000   D
4 0.0831875   D

```

Figur F. Output fra enveis ANOVA i R Commander, GOS ~ sort, samt enveis ANOVA og påfølgende Tukey test for GOS ~ spiretid

Vedlegg 7: Toveis ANOVA: GOS ~ sort:spiretid.

Anova Table (Type II tests)

Response: Raffinose.g.100g

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Sort	2.385	3	45.899	1.219e-14	***
Spiretid	97.245	4	1403.849	< 2.2e-16	***
Sort:Spiretid	5.083	12	24.458	< 2.2e-16	***
Residuals	0.901	52			

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

	Mean	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Astronaut:0	4.08300	A					
Vertigo:0	4.03600	A					
Ingrid:0	3.75550	A					
Sampo:0	2.61700		B				
Astronaut:1	2.47450		B	C			
Ingrid:1	2.28300		B	C			
Vertigo:1	2.09900			C			
Sampo:1	1.42950				D		
Ingrid:2	1.17225				D		
Vertigo:2	1.08850				D		
Sampo:2	0.44825					E	
Astronaut:2	0.38950					E	F
Sampo:3	0.33050					E	F
Vertigo:3	0.17700					E	F
Ingrid:3	0.15875					E	F
Astronaut:3	0.12975					E	F
Vertigo:4	0.12200					E	F
Ingrid:4	0.11650					E	F
Astronaut:4	0.04825						F
Sampo:4	0.04600						F

Figur G. Output fra enveis ANOVA i R Commander, $GOS \sim \text{sort:spiretid}$, samt fra påfølgende Tukey test.

Vedlegg 8: Innhold av fosfor og fytinsyre

Tabell A. Gjennomsnittlig innhold av fosfor (g/100g DM) og fytinsyre (g/100g DM) i prøver av bløtlagte og kokte erter og fababønner med ulik spiretid, samt kontroll med uprosessert erte – og bønnemel.

Sort	Spiretid	Fosfor g/100g DM	Fytinsyre g/100g DM
Vertigo	<i>Kontroll</i>	0,344 ± 0,009	1,219 ± 0,033
	<i>0t</i>	0,303 ± 0,029	1,075 ± 0,101
	<i>24t</i>	0,289 ± 0,031	1,024 ± 0,110
	<i>48t</i>	0,279 ± 0,025	0,991 ± 0,090
	<i>72t</i>	0,232 ± 0,040	0,821 ± 0,141
Sampo	<i>Kontroll</i>	0,341 ± 0,053	1,211 ± 0,187
	<i>0t</i>	0,329 ± 0,016	1,168 ± 0,058
	<i>24t</i>	0,312 ± 0,032	1,106 ± 0,114
	<i>48t</i>	0,293 ± 0,020	1,039 ± 0,072
	<i>72t</i>	0,270 ± 0,032	0,957 ± 0,113
Ingrid	<i>Kontroll</i>	0,318 ± 0,039	1,127 ± 0,137
	<i>0t</i>	0,301 ± 0,018	1,066 ± 0,064
	<i>24t</i>	0,265 ± 0,047	0,940 ± 0,168
	<i>48t</i>	0,260 ± 0,014	0,922 ± 0,051
	<i>72t</i>	0,258 ± 0,031	0,916 ± 0,110
Astronaut	<i>Kontroll</i>	0,278 ± 0,007	0,986 ± 0,025
	<i>0t</i>	0,247 ± 0,016	0,875 ± 0,055
	<i>24t</i>	0,247 ± 0,022	0,876 ± 0,077
	<i>48t</i>	0,196 ± 0,051	0,695 ± 0,181
	<i>72t</i>	0,186 ± 0,053	0,659 ± 0,188

Vedlegg 9: Innhold av raffinose og D-galaktose

Tabell B. Gjennomsnittlig innhold av raffinose (g/100g DM) og D-galaktose (g/100g DM) i prøver av bløtlagte og kokte erter og fababønner med ulik spiretid, samt kontroll med uprosessert erte – og bønnemel.

Sort	Spiretid	Raffinose g/100g DM	D-Galaktose/100g DM
Vertigo	<i>Kontroll</i>	4,036 ± 0,012	0,001 ± 0,048
	<i>0t</i>	2,099 ± 0,002	0,022 ± 1,328
	<i>24t</i>	1,089 ± 0,009	0,024 ± 0,033
	<i>48t</i>	0,177 ± 0,033	0,001 ± 0,030
	<i>72t</i>	0,122 ± 0,016	0,005 ± 0,104
Sampo	<i>Kontroll</i>	2,617 ± 0,021	0,039 ± 0,678
	<i>0t</i>	1,430 ± 0,006	0,016 ± 0,185
	<i>24t</i>	0,448 ± 0,004	-0,003 ± 0,256
	<i>48t</i>	0,331 ± 0,003	0,001 ± 0,215
	<i>72t</i>	0,046 ± 0,006	0,002 ± 0,605
Ingrid	<i>Kontroll</i>	3,756 ± 0,004	0,007 ± 0,185
	<i>0t</i>	2,283 ± 0,005	-0,002 ± 0,018
	<i>24t</i>	1,172 ± 0,009	0,026 ± 0,115
	<i>48t</i>	0,159 ± 0,033	-0,009 ± 0,004
	<i>72t</i>	0,117 ± 0,009	-0,004 ± 0,086
Astronaut	<i>Kontroll</i>	4,083 ± 0,001	-0,018 ± 0,015
	<i>0t</i>	2,475 ± 0,070	0,057 ± 0,008
	<i>24t</i>	0,390 ± 0,009	0,026 ± 1,814
	<i>48t</i>	0,130 ± 0,002	0,009 ± 0,030
	<i>72t</i>	0,048 ± 0,010	0,027 ± 0,752



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway