



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2022 30 stp

Fakultet for kjemi, biologi og matvitenskap

Tove G. Devold

Fermentering av belgvekster med exopolysakkaridproduserende bakterier – effekt på tekstur

Fermentation of legumes with exopolysaccharide
producing bacteria – effect on texture

Frida Øyehaug

Matvitenskap – Produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne oppgaven ble skrevet som del av toårig masterutdannelse innen Matvitenskap – retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Laboratoriearbeid i forbindelse med oppgaven ble gjennomført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap våren 2022.

Takk til hovedveileder Tove G. Devold for gode råd og samtaler underveis, samt konstruktive tilbakemeldinger. Takk til medveileder Hilde Marit Østlie som har bidratt med kunnskap og praktisk hjelp med det mikrobiologiske, i tillegg til god oppfølging, planlegging underveis, og konstruktive tilbakemeldinger. Takk til medveileder Reidar B. Schüller som har bidratt med opplæring og tolkning av reologiske analyser. Takk til medveiledere Judith Narvhus for gode råd og tilbakemeldinger. Takk til medveileder Davide Porcellato som gav idéen til oppgaven under et møte i mai 2021.

Jeg vil også rette takk til Kari Olsen for hjelp med praktisk gjennomføring av kromatografiske analyser. I tillegg vil jeg takke May Aalberg for hjelp på laboratoriet.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte gjennom årene med studier, for oppmuntring og motivasjon gjennom denne våren, og for gode minner både på og utenfor campus.

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

Ås, juni 2022

Frida Øyehaug

Sammendrag

Det plantebaserte markedet er i stor vekst, og mange plantebaserte produkter består av ekstrudert planteprotein og teksturgivende tilsetningsstoffer. Derfor er det av interesse å undersøke alternative og mer skånsomme metoder som kan redusere behovet for slike tilsetningsstoffer. En måte å oppnå dette på kan være fermentering med exopolysakkarid (EPS)-produserede melkesyrebakterier (MSB). Hensikten med oppgaven var å undersøke om *in situ* produsert EPS fra fermentering med selekterte MSB kan påvirke tekstur til en plantebasert burger basert på erter og linser, og dermed være et alternativ til bruk av teksturgivende tilsetningsstoffer. Innledningsvis ble 45 MSB isolert fra plantemateriale screenet for EPS-produksjon. Det ble valgt ut 9 EPS+ stammer til pH og teksturanalyser i erte- og linsemos med og uten tilsatt sukrose. Videre ble et metabolismeforsøk med 3 EPS+ og 1 EPS- MSB i ertemos med og uten sukrose utført hvor pH, cellevekst, innhold av karbohydrater og organiske syrer, samt reologiske målinger ble gjort. Reologiske analyser ble utført for å undersøke tendenser i elastisitet, viskositet, og trådtrekkende egenskaper i fermentert ertemos med og uten tilsatt sukrose. Til slutt ble et burgerforsøk utført for å undersøke hvordan ulikt innhold av fermentert og ikke-fermentert ertemos ble påvirket av oppvarming, med hensyn til vanntap og tekstur.

Resultatene fra metabolismeforsøket viste at celletall økte etter 24t fermentering i ertemos fra $6 \cdot 10^5$ til $6 \cdot 8 \cdot 10^8$ kde/g. Det ble produsert mer melkesyre i prøver med sukrose som resulterte i pH-reduksjon i ertemos fra ca. 6,1 til 4,64-4,95 og 5,01-5,23 for henholdsvis prøver med og uten sukrose. Det ble antatt at EPS ble produsert i ertemos med sukrose basert på redusert innhold av glukose og sukrose, økt fruktoseinnhold etter fermentering, samt høyere viskositet enn i prøver uten sukrose. Resultatene fra burgerforsøket viste at EPS alene ikke var nok for å oppnå ønsket tekstur under steking, dermed ble det tilsatt potetmel i burgermiksen. Med tilsatt potetmel ble det vist at et økt innhold av fermentert ertemos i forhold til ikke-fermentert ertemos, reduserte vanntap under steking. Burgermiks med 50/50 og 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos, og burgermiks med bare ikke-fermentert ertemos, hadde vanntap på henholdsvis $20,0 \pm 2,2\%$, $26,3 \pm 6,1\%$ og $32,9 \pm 3,0\%$. Reologiske analyser etter oppvarming viste tendenser til at potetmel jevnet ut forskjellene i elastisitet, tøyning og styrke. Ved tilsetning av potetmel, hadde prøvene med fermentert ertemos høyere elastisitet og styrke enn kontrollprøven uten fermentert ertemos. Burgerforsøket viste tendenser til at *in situ* produsert EPS i et burgerlignende produkt basert på ertemos tilsatt potetmel, kan redusere vanntap under steking, samt økte elastisitet og styrke etter oppvarming.

Abstract

The plant-based market is growing, and many plant-based products consists of extruded plant protein and texturizing additives. That is why it is of interest to research alternative and more gentler processing methods, so that the need for such additives can be reduced. One way of achieving this could be to use fermentation with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria (LAB). The aim of this thesis was to investigate if *in situ* produced EPS from fermentation with selected LAB could affect the texture of a plant-based burger and be an alternative to texturizing additives. To start, 45 LAB isolated from plant material was screened for EPS production. 9 EPS+ strains were selected for pH- and texture analysis in pea and lentil pastes with and without added sucrose. Then 3 EPS+ and 1 EPS- LAB were chosen for a metabolism experiment in pea paste with and without sucrose where pH, cell growth, carbohydrate and organic acid content and rheological analysis were done. Rheological analysis was done to investigate tendencies in elasticity, viscosity and ropy properties in fermented legume paste with or without added sucrose. Finally, the burger experiment was carried out to investigate how different amounts of pea paste fermented with EPS-producing LAB and non-fermented pea paste was affected by heating, regarding water loss and texture.

The results showed that the cell count grew after 24h fermentation in pea paste from $6 \cdot 10^5$ to $6 \cdot 8 \cdot 10^8$ cfu/g. Lactate production was higher in samples with sucrose which resulted in a pH reduction from ca. 6,1 to 4,64-4,95 and 5,01-5,23 in pea paste with and without sucrose, respectively. It was assumed that EPS was produced in pea paste with added sucrose based on the reduced glucose and sucrose content, increased fructose after fermentation, and the viscosity was higher for samples with sucrose than without. From the burger experiment it was shown that EPS alone was not able to achieve the wanted texture of a burger during cooking. Therefore, potato starch was added into the burger mixtures. With potato starch, an increased amount of fermented pea paste relative to non-fermented, showed reduced water loss during cooking. The burger mixes with 50/50 and 25/75 fermented and non-fermented pea pastes, and the control with only non-fermented pea paste, had water losses at $20,0 \pm 2,2\%$, $26,3 \pm 6,1\%$ and $32,9 \pm 3,0\%$ respectively. Rheological analyzes after heating showed tendencies that the potato starch evened out the differences in elasticity, strain and shear stress. However, with added potato starch, the samples with fermented pea paste had a slightly higher elasticity and strength than the control. The burger experiment showed tendencies that *in situ* produced EPS in a burger product based on fermented pea paste with added potato starch, can reduce water loss when cooking, and increase elasticity and strength after heating.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	III
Abstract.....	IV
1. Innledning.....	1
1.1 Inspirasjon til oppgaven.....	1
1.2 Hensikt med oppgaven.....	2
2. Teori.....	3
2.1 Belgvekster.....	3
2.1.1 Erter.....	4
2.1.2 Linser.....	6
2.1.3 Oppsummering av erter og linser.....	7
2.2 Fermentering.....	8
2.2.1 Metabolisme ved fermentering.....	8
2.2.2 Exopolysakkarider.....	9
2.3 Reologi.....	11
2.3.1 Reologiske målemetoder for fluider.....	12
3. Materialer og metoder.....	13
3.1 Forsøksoppsett.....	13
3.2 Preparering av prøvemateriale.....	14
3.3 Vekstmedium.....	15
3.4 Innledende forsøk.....	16
3.4.1 Screening for EPS-produksjon.....	16
3.4.2 Test av EPS-produksjon i erter med utvalgte MSB.....	18
3.4.3 Test av EPS-produksjon i erter og linser.....	18
3.5 Metabolismeforsøk.....	19
3.5.1 Frysestock-løsning.....	19
3.5.2 Analyse av mikrobiell vekst.....	20
3.5.3 Analyse av pH.....	20
3.5.4 Analyse av organiske syrer og karbohydrater.....	20
3.6 Burgerforsøk.....	21
3.6.1 Prøveopparbeidelse - Burgermiks.....	21
3.6.2 Vanntap.....	22
3.7 Teksturanalyser.....	23
3.7.1 Fermentert erte- og linsemos.....	23

3.7.2	Burgermiks	23
3.8	Databehandling og statistiske analyser.....	24
3.9	Oversikt over prøvekoder	24
4.	Resultat.....	26
4.1	Innledende forsøk	26
4.1.1	Screening av MSB	26
4.1.2	Test av EPS-produksjon i erter med utvalgte MSB.....	28
4.1.3	Test av EPS-produksjon i erter og linser	28
4.1.4	Teksturanalyser på fermentert erte- og linsemos.....	31
4.2	Metabolismeforsøk	38
4.2.1	Mikrobiell vekst.....	38
4.2.2	pH.....	39
4.2.3	Organiske syrer og karbohydrater	40
4.2.4	Teksturanalyser av fermentert ertemos med utvalgte stammer til metabolismeforsøk	43
4.3	Burjerforsøk	48
4.3.1	Vanntap	48
4.3.2	Teksturanalyser for burjerforsøk	49
5.	Diskusjon.....	50
5.1	Innledende forsøk	50
5.2	Metabolisme og teksturanalyser.....	52
5.2.1	Celletall og pH	52
5.2.2	Organiske syrer og karbohydrater	53
5.2.3	Tekstur	55
5.3	Burjerforsøk	56
5.4	Oppsummering og konklusjon	58
6.	Til ettertanke og videre forskning	59
	Referanser	61
	Vedlegg	I

1. Innledning

1.1 Inspirasjon til oppgaven

FNs 17 bærekraftsmål, som er «verdens felles arbeidsplan for å utrydde fattigdom, bekjempe ulikhet og stoppe klimaendringene innen 2030» (FN-Sambandet, 2022), har flere mål som kan relateres til matproduksjon. En, av mange, endringer som må gjøres for å oppnå disse målene er å endre verdens spisevaner. For å utrydde sult i en stadig økende verdensbefolkning, må kjøttforbruket reduseres og bruk av planteprotein til menneskelig konsum må økes. Dette av mange grunner. Blant annet står kjøttproduksjon og dyrehold for store klimagassutslipp, samtidig som husdyrene trenger fôr og beitemark (Poore and Nemecek, 2018). Ca. 36% av kaloriene fra verdens avlinger går til dyrefôr, hvor bare 12% av disse kan benyttes til menneskelig konsum i form av kjøtt, egg og meieriprodukter (Cassidy et al., 2013).

Fra dette kan det antas at ved å endre spisevaner og bytte helt eller delvis ut animalsk protein med planteprotein, vil etterspørselen etter kjøtt- og meieriprodukter gå ned. Redusert etterspørsel vil føre til redusert husdyrhold, som videre vil føre til at klimagassene fra husdyrhold reduseres. I tillegg vil planteproteinet som produseres kunne gå direkte til menneskelig konsum istedenfor til fôr, dermed vil flere kunne få dekket sitt daglige proteininntak.

Det plantebaserte markedet er i stor vekst med aktører i inn- og utland. Mange av dagens plantebaserte alternativer til kjøttprodukter består av ekstrudert planteprotein og teksturgivende tilsetningsstoffer. I et marked i økning kan det også være rom for produkter med alternative prosesseringsmetoder. Derfor hadde det vært interessant å undersøke en mer skånsom produksjon av slike produkter. Det har allerede blitt vist at *in situ* produserte exopolysakkarider fra fermentering med utvalgte melkesyrebakterier kan påvirke tekstur og dermed redusere behovet for teksturgivende tilsetningsstoffer i produkter som gulrotpuré, deig av fababønnemel og glutenfritt brød (Juvonen et al., 2015, Xu et al., 2019, Rühmkorf et al., 2012). Det vil derfor være av interesse å undersøke effekt av *in situ* produsert exopolysakkarid som teksturforbedrer i plantebaserte burgere.

1.2 Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å undersøke om *in situ* produsert exopolysakkarid fra fermentering med melkesyrebakterier kan påvirke tekstur til en plantebasert burger, og dermed være et alternativ til bruk av dagens teksturgivende tilsetningsstoffer. For å undersøke hvordan fermenteringen påvirket råstoffet, samt om det ble produsert exopolysakkarider, ble det gjennomført et metabolismeforsøk for å se på pH-senking, cellevekst og endringer i innhold av karbohydrater og organiske syrer. Det ble også gjennomført reologiske analyser for å undersøke om fermentering med EPS-produserende melkesyrebakterier ville bidra til teksturforandringer. Reologiske analyser ble utført for å undersøke tendenser i fermentert erte- og linsemos med og uten sukrose, samt for ertemos før og etter fermentering. Reologiske målinger på burgermikser med ulikt innhold av fermentert og ikke-fermentert ertemos ble gjennomført for å undersøke tendenser i teksturforandring ved ulike nivå av fermentert ertemos i burgermiksen. Teksturanalyse for burgermikse ble gjennomført etter oppvarming i reometer for å simulere steking. I tillegg ble burgermiksene med ulike innhold av fermentert og ikke-fermentert ertemos undersøkt for vanntap under steking.

2. Teori

2.1 Belgvekster

Belgvekster har lenge vært en viktig kilde til næring, både for mennesker og dyr verden over. De er gode kilder til protein og komplekse karbohydrater, samt at de har et naturlig lavt fettinnhold (Shevkani et al., 2019). Proteininnhold i belgvekster ligger rundt 18-25%, noe som gjør dem til en billig proteinkilde (Tharanathan and Mahadevamma, 2003). I tillegg er belgvekster, i symbiose med bakterier fra *Rhizobium*-slekta, N-fikserende (Zahran, 1999). Ribozia, som er native bakterier i jordsmonnet, danner rotknoller på belgveksten. I rotknollene fikserer bakteriene N_2 fra luften, og omgjør den til NH_4^+ . NH_4^+ tas opp som næring av planten. Dette er en svært gunstig prosess hvor rotknollene tilfører næring til jorda, og i områder med vekselbruk vil dette kunne minske behovet for kunstgjødsel.

En utfordring med belgvekster er deres innhold av antinæringsstoffer (ANS). Noen ANS tilhører plantens forsvarssystem. Planten produserer disse kjemiske forbindelsene for å forsvare seg mot angrep fra insekter, dyr, og andre farer som kan ødelegge for vekst. Andre ANS er nativt til stede som minerallager og karbohydrater. Blant ANS i belgvekster finnes tanniner, fytinsyre, trypsin inhibitorer og raffinosefamilien av oligosakkarider (RFO) (Khokhar and Apenten, 2003). Tanniner inhiberer fordøyelsesenzymer og reduserer opptak av næringsstoffer som proteiner og karbohydrater (Reddy et al., 1985). Fytinsyre i planter kan danne komplekser med ulike toverdige mineraler som sink, jern og kalsium, og gjøre disse utilgjengelige for opptak under fordøyelsen (Persson et al., 1998). En av flere funksjoner til trypsin inhibitorer er at de hemmer trypsin, som er et fordøyelsesenzym som spalter proteiner, og reduserer dermed mengden protein som blir tatt opp under fordøyelsen (Liener and Kakade, 1980). RFO består av raffinose, stachyose, verbascose og ajugose, disse er α -galaketosyl enheter bundet α -(1 \rightarrow 4) til glukose-delen av et sukrosemolekyl (Saini, 1989). Ettersom pattedyr ikke har α -galaketosidaseaktivitet i fordøyelsessystemet, vil bakterier i den nedre tarmkanalen metabolisere disse karbohydratene og produserer gass, dette fenomenet omtales som flatulens (Rackis, 1975).

Heldigvis kan innholdet av ANS reduseres eller fjernes gjennom prosesser som blansjering, germinering, bløtlegging eller fermentering (Khokhar and Apenten, 2003). De ulike prosessene vil ha ulik effekt på forskjellige ANS avhengig av størrelse, stabilitet og reaktivitet av molekylene.

2.1.1 Erter

Erter (*Pisum sativum* L.) har i århundrer vært en viktig kilde til både mat og fôr (Cousin, 1997). Erter består av 23-33% protein, 1,5-2% fett og 60-65% karbohydrater, hvorav ca. 40% er stivelse og 1,8-4,7% er sukrose (Lam et al., 2018, Cousin, 1997). I tillegg inneholder erter rundt 14-26% fiber (Tosh and Yada, 2010). Sammensetningen varierer etter type ert, jordsmonn og øvrige vekstforhold.

Stivelse bidrar til viktig næring og kalorier, og i tillegg har stivelse viktige funksjonelle egenskaper som for eksempel gelling og fortykning (Damodaran and Parkin, 2017). Stivelse opptrer som stivelseskorner og er sammensatt av amylose og/eller amylopektin. Amylose har få forgreninger og består av (1→4)- α -D-glukopyranolsyner. Amylopektin er derimot et stort molekyl med mange forgreninger. En viktig funksjonell egenskap hos stivelse er dens evne til å gelatinisere. Det vil si at stivelseskorner, i overflod av vann og ved tilføring av varme, mister strukturen sin og sveller. Hydrogenbindingene som holder dobbelheliksene i amylopektin destabiliserer slik at vann danner hydrogenbindinger med amylopektinet og ødelegger den krystallinske strukturen. Dette er en irreversibel prosess hvor amylose vil lekke ut av korna. Ved kontinuerlig tilføring av varme og med en tilført skjærkraft, som røring, vil strukturen til stivelseskorna bli totalt forstyrret og det vil dannes en viskøs pasta. Under nedkjøling av en slik pasta dannes en viskoelastisk gel over tid. Denne prosessen kalles retrogradering, hvor stivelsesmolekylet danner knutepunkter, slik som i en gel, for å presse ut vann og rekrystallisere strukturen (Damodaran and Parkin, 2017). Ratnayake et al. (2001) undersøkte blant annet amyloseinnhold og gelatiniseringstemperatur for stivelse fra fire kultivarer av erter. Amyloseinnholdet var ca. 49%, og gelatinisering av ertestivelsen startet rundt 61°C, nådde topp/midtpunkt ved ca. 67°C og sluttet rundt 75-76°C. Gelatiniseringsentalpien lå på 11,2-11,5 J/g.

Det er særlig proteininnholdet som gjør erter til en ettertraktet næringskilde. Erteprotein deles i to hovedklasser – globuliner og albuminer. Globuliner er lagerproteiner, hvor disse er saltløselige og er den største proteinbestanddelen på 70-80% (Roy et al., 2010). Globuliner deles videre inn i subenhetene legumin og vicilin, henholdsvis 11S og 7S proteiner (Duranti and Gius, 1997). Både legumin og vicilin er oligomere proteiner. Legumin er en heksamere og har en kompakt struktur. Leguminmonomerer består av en sur og en basisk subenhet på henholdsvis 25-50 kDa og ca. 20 kDa. Disse er kovalent bundet via disulfidbroer. Vicilin er en trimer og monomerene har en størrelse på 40-75 kDa (Duranti and Gius, 1997). Tre monomerer bindes sammen via hydrofobe interaksjoner (Lam et al., 2018). Dette gjør

stabiliteten til vicilin mer utsatt for endringer i pH og ionestyrke enn legumin, som mer stabil og som bare er utsatt for dissosiasjon ved veldig lav pH eller ionestyrke (Duranti and Gius, 1997). I tillegg til legumin og vicilin har erteprotein små mengder med convicilin. Convicilin inneholder svovelholdige aminosyrer (Lam et al., 2018). Til tross for convicilin, er det lite svovelholdige aminosyrer i lagerproteinene. Det er derimot et høyt innhold av de essensielle aminosyrene lysin og tryptofan (Duranti, 2006).

De funksjonelle egenskapene til erteproteinene bestemmes av forholdet mellom legumin og vicilin (Lg/Vn) (Shevkani et al., 2019). Dette forholdet endres underveis i vekstprosessen hvor vicilin dannes tidlig og legumin sent. Lg/Vn forholdet varierer mellom 0,4-2,0 i erter (Lam et al., 2018). Ettersom vicilin er mindre og bundet med intramolekylære hydrofobe interaksjoner i forhold til legumin, som er større og har flere disulfidbroer som gjør molekylet mer rigid, vil vicilin-isolater ha bedre løselighet og emulgeringsevne enn legumin-isolater. Disse egenskapene varierer også med pH hvor løselighet og emulgeringsevne er lavest ved erteproteinets isoelektriske punkt (pI). Erteprotein i sin helhet har pI rundt pH 4-6, hvor vicilin og legumin har pI ved henholdsvis pH 5,5 og pH 4,8 (Lam et al., 2018). Albuminer står for 10-20% av proteininnholdet i erter (Roy et al., 2010). Disse vannløselige proteinene er hovedsakelig ulike enzymer som bidrar til metabolisme i cotyledonceller (Duranti and Gius, 1997).

I tillegg til løselighet og evne til å stabilisere emulgeringer er også gelling, vannabsorpsjonskapasitet (VAK) og fettabsorpsjonskapasitet (FAK) viktige egenskaper for proteiner (Shevkani et al., 2015). Erteprotein danner varmeinduserte geler, dette skjer etter denaturering av proteinene (Shevkani et al., 2019). Denatureringstemperatur (T_d) for erteprotein ligger rundt 82-85°C og gellingstemperatur ligger rundt 84-93°C (Shevkani et al., 2015). Det er også blitt vist sammenheng mellom T_d og legumininnhold i erteprotein, hvor T_d øker ved økt legumininnhold (Mession et al., 2015). Ladjal-Ettoumi et al. (2016) fant ut at erteprotein hadde to endotermiske topper ved oppvarming av proteinet, dette viste til T_d for både vicilin og legumin som lå på henholdsvis 83,3°C og 104,6°C.

VAK er en viktig egenskap for proteinet til å ta opp vann uten at proteinene oppløses. Dette gjelder kritisk viskøse væsker og semi-faste materialer med høyt vanninnhold (Sreerama et al., 2012). FAK er viktig for tekstur og munnfølelse, samt smak ettersom mange smakskomponenter sitter i fett, og særlig siden erter inneholder lite fett (Shevkani et al., 2019). Fernández-Quintela et al. (1997) undersøkte spansk erteproteinisolat som viste VAK og FAK på henholdsvis 1,7 og 1,2 g/g. Shevkani et al. (2015) undersøkte et indisk åkerertproteinisolat

som viste VAK og FAK på henholdsvis 3,9-4,8 g/g og 5,5-7,2 g/g. Forskjellene i disse egenskapene kommer av at i de ulike forsøkene ble det benyttet ulik isoleringsmetode for proteinene. Dette ble vist av Boye et al. (2010b) som sammenlignet de funksjonelle egenskapene til erte-, linse- og kikertproteinkonsentrater som ble prosessert enten ved ultrafiltrering (UF) eller isoelektrisk utfelling (IEU). Proteininnholdet varierte mellom 63-88,6%, og var høyere i prøver som var UF prosessert. FAK var også høyere for prøver prosessert gjennom UF, derimot var VAK var generelt høyere for prøvene som var IEU prosessert.

I tillegg til å være en god proteinkilde, særlig rik på tryptofan og lysin som er essensielle aminosyrer, er erter en god kilde for B vitaminer, folat, kalsium, jern og kalium (Roy et al., 2010).

2.1.2 Linser

Linser (*Lens culinaris*) inneholder rundt 26-31% protein, 1,16-1,25% fett og 56-64% karbohydrater (Boye et al., 2010a). Stivelse utgjør 35-53% av karbohydratinnholdet, hvorav 20,7-45,5% er amylose (Reddy et al., 1984). Linser har også et fiberinnhold på 18-20% (Tosh and Yada, 2010). Dette gjør linser til en god næringskilde i likhet med erter.

Joshi et al. (2013) har rapportert amyloseinnhold i linsestivelse på ca. 32,5% og geleringsstemperatur ved start på ca. 61,6°C og topp/midtpunkt-temperatur på 69,3°C, samt geleringsentalpi på 11,8 J/g.

Linseprotein har et albumin:globulin forhold på 1:3, samt et legumin:vicilin forhold på 10,5:1 (Boye et al., 2010a). Innholdet av albumin og globulin er relativt lik til erter, men linser har betydelig større forskjell mellom legumin og vicilin enn erter (Boye et al., 2010a). En større andel legumin gir da linseprotein flere svovelholdige aminosyrer som er ønskelig i en god proteinkilde. Men dette gjør også linseprotein mer rigid og påvirker løselighet og emulgeringsevne negativt grunnet størrelsen på legumin og subenhetens disulfidbroer. Det høye innholdet av legumin påvirker også T_d til linseprotein. Ladjal-Ettoumi et al. (2016) undersøkte blant annet T_d til erteprotein og linseprotein. Linseprotein hadde høyest T_d på 106,5°C.

Vicilin fra linser skiller seg fra erter. I linser er vicilin glykosylert og inneholder rundt 2,8% karbohydrater (Boye et al., 2010a). Glykosylering av protein kan føre til forbedring av ulike funksjonelle egenskaper som løselighet, emulgeringsevne og termisk stabilitet (Nacka et al., 1998)

Uavhengig av hvordan linseprotein blir ekstrahert, ligger pI rundt pH 4-6 (Jarpa-Parra, 2018). Løselighet og emulgeringsevne til linseprotein vil dermed være lavest ved denne pH-en og bli bedre ved høyere eller lavere pH. I sammenligningen til Boye et al. (2010b) om UF og IEU prosessering av blant annet erte- og linseprotein var det ingen signifikant forskjell i VAK for erter og linser (både grønne og røde), heller ikke i prosesseringsmetode. For FAK var det ingen signifikant forskjell mellom erte- og linseprotein prosessert ved UF, men FAK var signifikant høyere for rød linseprotein prosessert ved IEU enn for erteprotein.

Linser har et høyt innhold av de essensielle aminosyrene lysin, leucin og arginin (Boye et al., 2010a). I tillegg har linseprotein høy fordøyelighet rundt 83%. Begrensede aminosyrer for linseprotein er de svovelholdige aminosyrene methionin og cystein, samt den essensielle aminosyren tryptofan.

2.1.3 Oppsummering av erter og linser

Erter og linser har mange lignende egenskaper. De har begge lavt fettinnhold, og høyt innhold av protein og stivelse. Tabell 1 viser en oppsummering av næringsinnhold og informasjon om isoelektrisk punkt, og temperatur for denaturering og gelatiniseringstemperatur, samt gelatiniseringsentalpi for erter og linser.

Tabell 1. Næringsinnhold og funksjonelle egenskaper som isoelektrisk punkt, denatureringstemperatur og gelatiniseringsegenskaper hos erter og linser.

		Erter	Linser	Referanser
Næringsinnhold	Protein (%)	23-33	26-31	(Lam et al., 2018,
	- Albumin:Globulin	1:4*	1:3	Cousin, 1997, Reddy
	- Legumin:Vicilin	0,4-2,0	10,5:1	et al., 1984, Boye et
	- Convicilin	Ja	Nei	al., 2010a, Tosh and
	Karbohydrater (%)	60-65	56-64	Yada, 2010)
	Hvorav:			
	- Stivelse (%)	40	35-53	
	- Fiber (%)	14-26	18-20	
Fett (%)	1,5-2	1,16-1,25		
Egenskaper	Isoelektrisk punkt	pH 4-6	pH 4-6	(Jarpa-Parra, 2018,
	Denatureringstemperatur (°C)	82-85	106,5	Lam et al., 2018)
	Gelatinisering (°C)			(Shevkani et al.,
	- Start-temperatur (°C)	61	61,6	2015, Ladjal-
	- Topp-temperatur (°C)	67	69,3	Ettoumi et al., 2016)
- Entalpi (J/g)	11,2-11,5	11,8	(Ratnayake et al.,	
			2001, Joshi et al.,	
			2013)	

2.2 Fermentering

Fermentering har i lang tid vært en viktig conserveringsmetode for mat og drikke (Paul Ross et al., 2002). Tradisjonelt foregår prosessen gjennom naturlig tilstedeværende mikroorganismer i matvaren, men i nyere tid benyttes gjerne utvalgte starterkulturer med definerte egenskaper for å sikre god kvalitet i sluttproduktet. I tillegg til økt holdbarhet, kan fermentering bidra til å bedre næringsverdien, endre tekstur, samt påvirke de organoleptiske egenskapene til mat og drikke (Zannini et al., 2016). Mikroorganismene som gjennomfører fermenteringen er hovedsakelig melkesyrebakterier (MSB) og gjærsopp. I dagligvarehandelen finnes svært mange fermenterte produkter, blant annet gjærede varer som brød og øl, og MSB-fermenterte varer som ost og yoghurt.

2.2.1 Metabolisme ved fermentering

Metabolisme er summen av alle kjemiske reaksjoner i et biologisk system ved et gitt tidspunkt (Sadava, 2014). Det er to hovedtyper av metabolske reaksjoner, dette er anabolske og katabolske reaksjoner. Anabolske reaksjoner krever energi (ATP), og disse reaksjonene fører til syntese av komplekse molekyler fra enkle og mindre komplekse molekyler. Energien som kreves blir lagret i form av ATP. Katabolske reaksjoner gjør det motsatte, altså bryter katabolske reaksjoner ned store komplekse molekyler til mindre og enklere molekyler. Denne nedbrytningen fører til dannelse av ATP. Katabolske og anabolske reaksjoner opererer ofte sammen, hvor ATP som dannes gjennom katabolske reaksjoner, brukes i anabolske reaksjoner (Sadava, 2014).

Fermentering er en anaerob prosess (Sadava, 2014). Det er to hovedveier fermentering kan foregå ved ettersom hvilke mikroorganismer som er til stede. Alkoholfermentering foregår hovedsakelig av gjær, hvor glukose gjennom flere trinn omdannes til etanol og CO₂ (Sadava, 2014).

Ved melkesyrefermentering kan MSB omdanne karbohydrater til melkesyre (Kandler, 1983). Det finnes en rekke ulike MSB, både staver og kokker, som enten er homofermentative eller heterofermentative. Homofermentativ omsetning av karbohydrater vil si at det absolutte sluttproduktet i fermenteringen er melkesyre. Heterofermentative bakterier derimot produserer melkesyre i tillegg til andre komponenter som etanol, CO₂, og eddiksyre (Kandler, 1983).

Sitratmetabolisme er også viktig under fermentering med MSB (Hugenholtz, 1993). Sitrat er naturlig til stede i mange matvarer som melk, frukt og grønnsaker. Enkelte MSB kan gjøre om sitrat til diacetyl, acetoin, butandiol og acetaldehyd under fermentering. Blant annet er

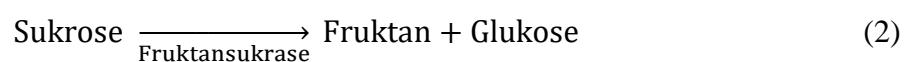
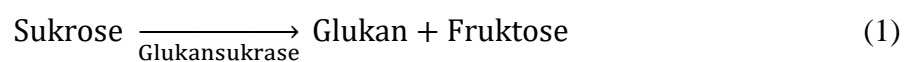
diacetyl en aromakomponent som er ønsket i ulike meieriprodukter, men i produkter som øl og vin er disse komponentene sett på som kvalitetsødeleggende. MSB som kan gjennomføre sitratmetabolisme er blant annet *Leuconostoc* og en underart av *Lactococcus*, i tillegg kan stammer fra *Lactobacillus* slekten omgjøre sitrat til succinat (Hugenholtz, 1993).

2.2.2 Exopolysakkarider

I tillegg til å genererer energi og biomasse gjennom sukkerkatabolisme, kan mange bakterier også produsere polysakkarider (Boels et al., 2001). Slike polysakkarider kan være deler av celleveggen kalt lipopolysakkarider, de kan være på overflaten til celleveggen som kapsulære polysakkarider, eller så kan polysakkaridene skilles ut til det ekstracellulære området. Sistnevnte kalles exopolysakkarider (EPS).

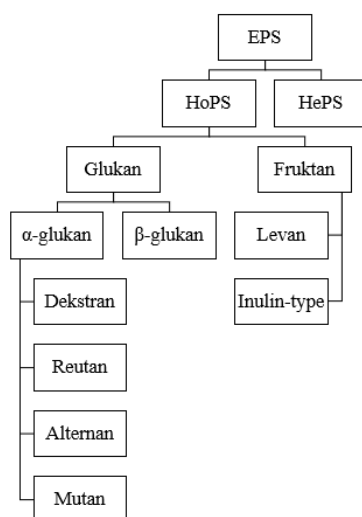
EPS produsert *in situ* i en matvare gjennom MSB-fermentering, kan brukes for å endre de reologiske egenskapene til matvaren (Boels et al., 2001). Disse biopolymerene kan øke viskositet og geldanningsevne, samt kan de fungerer som stabilisatorer og emulgatorer (De Vuyst and Degeest, 1999). I matindustrien er dette en interessant metode med hensyn til å kunne redusere mengden tilsetningsstoffer som mange forbrukere er skeptiske til. Det har blant annet blitt vist at *in situ* produsert EPS kan bedre struktur og kvalitet på glutenfritt brød (Galle et al., 2012, Rühmkorf et al., 2012), samt bedre vannbindingsevne i lavfett mozzarella (Low et al., 1998).

Det er to hovedgrupper av EPS, hvor disse er homopolysakkarider (HoPS) og heteropolysakkarider (HePS) (De Vuyst and Degeest, 1999). HoPS består av én type monosakkarider, enten fruktose eller glukose som danner henholdsvis fruktaner og glukaner (Monsan et al., 2001). For å syntetisere HoPS benyttes sukrose som glykosyldonor, ettersom sukrose er et disakkarid bestående av glukose og fruktose. Ekstracellulære glykansukraser, som er en type transglykosylase, katalyserer overføringen av en glykosylenhet fra sukrosemolekylet til polysakkaridet, enten glukane eller fruktan som vist i ligning 1 og 2 (Monsan et al., 2001). HoPS syntetiseres utenfor cellen i det ekstracellulære området (Cerning, 1990).



Blant HoPS finnes det ulike typer avhengig av type binding mellom monosakkaridene og hvilke hydroksylgrupper som er med i bindingen. Fruktaner deles inn i to typer: levan β -2 \rightarrow 6 og inulin-type β -2 \rightarrow 1 (Monsan et al., 2001). Glukaner er enten α - eller β -linket. α -glukaner består av blant annet dextrans α -1 \rightarrow 6, mutan α -1 \rightarrow 3, alteran α -1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 og reuteran α -1 \rightarrow 4, i tillegg finnes β -glukan β -1 \rightarrow 3 (Zannini et al., 2016). Både glukanene og fruktanene er også forgrenet i ulik grad som påvirker egenskapene til polysakkaridet. Ulike stammer av MSB vil kunne produsere ulike HoPS. Hovedsakelig er det stammer fra *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., og *Leuconostoc* spp. som produserer HoPS (Zannini et al., 2016).

Som HoPS, finnes det ulike HePS avhengig av hvilke monosakkarider som er bundet sammen, om de er α - eller β -linket, og forgreningsgrad av kjedene. HePS består typisk av 3-8 ulike monomerer sammensatt i lange kjeder (De Vuyst and Degeest, 1999, Zannini et al., 2016). Det er monomerene D-galaktose, D-glukose, og L-rhamnose som oftest går igjen hos ulike HePS, men i forskjellige ratioer. Oversikt over klassifisering av EPS fra MSB vises i figur 1.



Figur 1. Oversikt over klassifisering av exopolysakkarider (EPS) fra melkesyrebakterier (Korcz and Varga, 2021). HoPS: homopolysakkarider, HePS: heteropolysakkarider. Laget i Power Point.

HePS syntetiseres av mesofile og termofile MSB som for eksempel *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus* og *S. thermophilus* (De Vuyst and Degeest, 1999). Selve syntesen av HePS foregår ved den cytoplasmiske membranen og forløperne til de repeterende enhetene produseres intracellulært (Cerning, 1990). Enhetene translokteres så over membranen og blir polymerisert i det ekstracellulære området. Dette er en energikrevende prosess, og siden MSB genererer relativt lite energi i forhold til aerobe bakterier vil mengden og sammensetningen av EPS som produseres avhenge av celleveksten og andre fermenteringsforhold (De Vuyst and Degeest, 1999).

Xu et al. (2017) viste at fermentering med EPS produserende MSB hadde en signifikant effekt på teksturen til deig laget av fababønnemel. Seks ulike stammer fra *Leuconostoc* spp. og *Weisella* spp. ble benyttet til fermentering av deiger laget av fababønnemel og vann, med og uten tilsatt sukrose. Prøver med tilsatt sukrose hadde en høyere andel dekstran enn prøvene uten sukrose, dette gjorde flere av prøvene mer viskøse og gav dem større elastisitet.

2.3 Reologi

Reologi er læren om deformasjon og væskeflyt (Steffe, 1996). Kunnskap om matvarers reologiske egenskaper er viktig i mange situasjoner - i alt fra de funksjonelle egenskapene til ingrediensene, til prosessering av maten, og sensorikk. I et produksjonsanlegg er slik kunnskap også nyttig for best mulig prosessflyt, og reologi benyttes i beregninger for hvordan ulikt utstyr som pumper, ekstrudere, miksere og varmevekslere, opererer mest mulig effektivt (Steffe, 1996).

En matvare kan være flytende, fast, eller semi-fast (Steffe, 1996). Konsistensen avgjør hvordan matvaren vil oppføre seg i ulike situasjoner som i en fyllemaskin i produksjonsanlegget, når matvaren helles fra kartong, eller når den tygges. Med ulike reologiske målemetoder kan oppførselen kvantifiseres ved mekanisk eller gravitasjonelt arbeid.

For fluider og semi-faste matvarer er det ofte interessant å undersøke dens viskositet og/eller elastisitet. Viskositet er definer som et fluids evne til å motstå bevegelse (Helseth, 2021) og elastisitet er evnen til å gjenoppnå original form og størrelse etter deformasjon (Ormestad, 2021). I reologi er det ofte interessant å undersøke en væskes viskoelastiske egenskaper, altså hvordan deformasjon og flyt henger sammen. Slike målinger viser endringer i et stoffs skjæringsmodul (G') og skjærtapsmodul (G'') under ulike forhold, som for eksempel økt tøyning eller økt skjærhastighet. Dersom G' er større enn G'' har stoffet en mer elastisk karakter, og dersom G'' er større enn G' er stoffet mer viskøs karakter (Pal, 1997).

I reologien kategoriseres fluider som newtonske eller ikke-newtonske. Et newtonsk fluid har et proporsjonalt forhold mellom skjærspenning og skjærhastighet, og for et ikke-newtonsk fluid er dette forholdet ikke-proporsjonalt (Helseth, 2018, Helseth, 2020). Ikke-newtonske fluider kan være skjærtynnende og skjærtykkende. Skjærtynnende vil si at ved økt skjærspenning, blir fluidet mer flytende. Et skjærtykkende fluid som utsettes for økt skjærspenning blir tykkere.

2.3.1 Reologiske målemetoder for fluider

Reologiske måleinstrumenter kalles reometere. For fluider finnes det to hovedtyper av reometer: rotasjon og sylinder (Steffe, 1996). Rotasjonsinstrumenter brukes generelt til å undersøke tidsavhengig oppførsel til et fluid. I sylinderinstrumenter, derimot, går prøvemateriale gjennom sylinderet bare én gang. For eksempel kan et vertikalt sylindersystem brukes til å undersøke viskositet til yoghurt ved å måle tiden det tar før yoghurtprøven renner gjennom sylindren ved hjelp av tyngdekraften. En tynn yoghurt vil renne raskt gjennom sylindren, og en tykk yoghurt vil bruke lang tid. Et rotasjonssystem kan opereres med konstant tøyning eller konstant skjærkraft, det kan også opereres med kontrollert tøyning eller skjærkraft. Slike kontrollerte og dynamiske metoder brukes for å bestemme de viskoelastiske egenskapene til et fluid (Steffe, 1996).

Et utvalg dynamiske tester for å bestemme viskoelastiske egenskaper til fluider er "amplitude sweep" (AS), "step rate test" (SRT) og rotasjonstest. AS gjøres ved kontrollert økende tøyning og konstant angulær frekvens. For AS vises "output" G' og G'' som funksjon av skjærspenningen. Fra dette resultatet kan den øvre grensen for det viskoelastiske området (LVER) bestemmes. LVER er området hvor G' , eventuelt G'' , er en bestemt prosent lavere enn platåverdi (Steffe, 1996, Jørgensen et al., 2015). SRT kan brukes for å undersøke om fluidet har trådtrekkende egenskaper. En slik test kjøres med konstant skjærhastighet på et fluid som har stått i ro. Dersom fluidet har ikke har trådtrekkende egenskaper vil den brå overgangen føre til en "overshoot" i skjærspenningen ved deformasjon av fluidet. Derimot, dersom fluidet er trådtrekkende vil det ikke føre til "overshoot", og skjærspenningen vil etter hvert stabiliseres (Narvhus et al., 2019). Fluidets oppførsel under en slik test kan modelleres ved hjelp av Bird-Leider ligningen (Steffe, 1996). Rotasjonstest kan gjøres med kontrollert økende skjærhastighet. I denne testen måles skjærspenningen som utføres på fluidet ved økende skjærhastighet. Rotasjonstest brukes for å undersøke fluidets viskositet, det vil si om fluidet har newtonsk eller ikke-newtonsk oppførsel (Steffe, 1996).

3. Materialer og metoder

3.1 Forsøksoppsett



Figur 2. Flytskjema for arbeidsprosessen gjennom oppgaven. Laget i Power Point.

Oppgaven gikk ut på å undersøke om EPS produsert *in situ* i prøvemateriale basert på moste erter og linser hadde effekt på tekstur og vanntap under steking. Figur 2 viser flytskjema for prosessen. Først ble selekterte MSB undersøkt for EPS produksjon, fra disse ble 9 EPS positive (EPS+) og 1 EPS negativ (EPS-) stammer utvalgt til videre forsøk. For å undersøke om bakteriene kunne vokse i ertemos, med og uten tilsatt sukrose, ble det gjennomført fermenteringsforsøk med tre av de EPS+ stammene. Videre ble de 10 utvalgte stammene testet i både erte- og linsemos med og uten sukrose for å undersøke endringer i pH og tekstur. Fra dette ble det bestemt å fortsette med erter som basis og tre EPS+ stammer med ulike reologiske egenskaper ble tatt videre og en ny EPS- stamme, på grunn av dårlig vekst i den første utvalgte EPS- stammen. Metabolismeforsøk ble gjennomført over 3 uker på ertemos med og uten erter med de fire stammene, samt reologi. Fra dette ble én utvalgt EPS+ stamme benyttet til burgerforsøk. Under burgerforsøket ble ulike forhold mellom fermentert og ikke-fermentert ertemos testet med hensyn til vanntap under steking og viskoelastisitet med reologisk analyse. Under prøvesteking holdt ikke burgermiksene formen, så hver miks ble tilsatt potetmel for at miksene skulle holde bedre på form og vann.

3.2 Preparering av prøvemateriale

Råstoff som ble benyttet var hermetiserte erter i saltlake (Coop, 410 g hvorav 250 g erter, opprinnelse/produsert i Norge). Sammensetning av erter som vist på forpakning: fett (0,4%), karbohydrat (7,7%, hvorav sukkerarter 3,6%), protein (4,4%), og salt (0,50%).

I tillegg ble hermetiserte økologiske røde linser i saltlake (Änglamark, 380 g hvorav 230 g linser, opprinnelse/produsert i Italia). Sammensetning av linser som vist på forpakningen: fett (0,5%), karbohydrat (12,3%, hvorav sukkerarter 0,7%), fiber (4,2%), protein (5%), og salt (0,47%).

Ertemos ble preparert ved å først helle av laken [ca. 120 mL] fra de hermetiske ertene. Ertene [ca. 250 g] ble så skylt med sterilt vann [60 mL] i boksen, videre ble ertene overført til en steril Omni-mixer beholder (OMNI-MIXER HOMOGENIZER modell 17106, OMNI International, Waterbury, CT. USA) sammen med sterilt vann [120 mL] og ble homogenisert [styrke 4, 2 minutter]. Ertemos til fermentering bestod av 95% ertemos og 5% sukrose eller 5% sterilt vann. Ertemos ble fordelt på sterile osteglass [93,25 g per 100 g fermentert prøve]. Sukroseprøver ble tilsatt 80%-sukroseløsning (S80%) [6,75 mL per 100 g prøve], og prøver uten sukrose ble tilsatt sterilt vann [6,75 mL per 100 g prøve].

Til linsemos ble laken [ca. 80 g] helt av fra hermetiske linser. Linser [ca. 230 g] ble skylt med sterilt vann [60 mL], så homogenisert med sterilt vann [80 mL] i en steril Omni-mixer beholder [styrke 4, 2 minutter]. Linsemos til fermentering bestod av 95% linsemos og 5% sukrose eller 5% sterilt vann. Linsemos ble fordelt på sterile osteglass [93,25 g per 100 g fermentert prøve]. Sukroseprøver ble tilsatt 80%-sukroseløsning (S80%) [6,75 mL per 100 g prøve], og prøver uten sukrose ble tilsatt sterilt vann [6,75 mL per 100 g prøve].

S80% ble laget ved å løse opp sukrose (VWR International; Leuven, Belgia) [80 g] i destillert vann til et totalvolum på ca. 100 mL. S80% ble homogenisert ved hjelp av magnetrører og varme, så overført til 50 mL pyrexflasker [20-25 mL i hver] og autoklavert [121°C, 15 min.].

3.3 Vekstmedium

MRS-buljong (Merck; Dortmund, Tyskland) ble benyttet som næringsmedium til vekst av MSB. 52,2 g MRS-buljong ble brukt per liter destillert vann. Løsningen ble blandet ved hjelp av magnetrører og satt i kokevannbad [30 min.], så fordelt på 10 mL rør [5 mL i hver]. Rørene ble autoklavert [121°C, 15 min.] og satt på kjølerom frem til bruk.

Til screening for EPS produksjon ble stammene strøket ut på sukrose-agar. Sukrose-agar bestod av 1% tryptone (Oxoid LTD; Basingstoke, Hampshire, England), 0,5% gjærekstrakt (Merck; Darmstadt, Tyskland), 0,5% K_2HPO_4 (Merck), 1,75% Agar (VWR International; Leuven, Belgia (laget i Italia)), 5% sukrose (VWR International), og 0,5% Di- NH_4 -H-sitrat løst i 1 liter destillert vann. Sukroseagaren ble løst opp ved hjelp av magnetrører, og satt i kokevannbad [30 min.]. Så ble agaren fordelt på 250 mL pyrexflasker [200 mL i hver] og autoklavert. Lagret på kjølerom frem til bruk. Før bruk ble agaren smeltet i kokevannbad [30 min.] og satt i vannbad [47°C] frem til bruk.

MRS+Sukrose næringsmedium til dyrking av bakterier bestod av 1% pepton (Oxoid Ltd.), 0,8% "Lab-Lemco" pulver (Oxoid Ltd.), 0,4% gjærekstrakt (Merck), 2% sukrose (VWR International) 1 mL Tween 80, 0,2% K_2HPO_4 (Merck), 0,5% Na-acetat $3H_2O$ (Merck), 0,2% Tri-ammoniumsitratt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Tyskland), 0,02% Magnesiumsulfat $7H_2O$ (VWR International), 0,002% mangansulfat $4H_2O$ per liter destillert vann. pH ble justert til $6,2 \pm 0,2$ med HCl. Løsningen ble blandet ved hjelp av magnetrører og varmebehandlet i kokevannbad [30 min.]. Så ble halvparten av buljongen ble fordelt på flasker [200 mL i hver] og halvparten fordelt i 10 mL rør [5 mL i hver]. Flasker og rør ble autoklavert og satt på kjølerom frem til bruk.

MRS-agar bestod av 52,2 g MRS (Merck) og 15 g Agar (VWR International) per liter destillert vann. Løsningen ble blandet ved hjelp av magnetrører. Videre ble den varmebehandlet i kokevannbad [30 min.] og fordelt på flasker [200 mL i hver], så autoklavert. Lagret på kjølerom frem til bruk. Før bruk ble agaren smeltet i kokevannbad [30 min.] og satt i vannbad [48°C] frem til bruk.

3.4 Innledende forsøk

3.4.1 Screening for EPS-produksjon

Til EPS-screening ble 44 stammer av melkesyrebakterier selektert, samt én referansestamme som vist i tabell 2. De utvalgte stammene var isolert fra plantemateriale og hentet fra utvalgt litteratur (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015, Østlie et al., 2021, Paulsen, 2021). Stammene ble tint og podet 1% i MRS-buljong. Podede rør ble inkubert over natt ved 30°C. Etter inkubering ble hver stamme, ved hjelp av steril podenål, strøket ut på sukroseagar-skåler (to stammer per skål). Skålene ble inkubert ved 30°C i 2-3 døgn. Etter 2-3 døgn ble skålene undersøkt for vekst, og indikasjon på EPS produksjon ble ansett som «store bløte kolonier», «slimlag», eller «trådtrekkende». «Trådtrekkende» ble testet ved å føre en steril podenål til en koloni og forsøke å dra denne opp, dersom tråden ble minst 5 mm lang ble stammen ansett som trådtrekkende. 9 EPS+ og 1 EPS- stammer ble valgt ut til videre forsøk.

For å holde dem vedlike ble de utvalgte stammene podet [1%] i ny MRS-buljong én gang i uken og inkubert over natt ved 30°C og så satt på kjøll.

Tabell 2. Selekterte stammer til EPS screening. Viser stamme, kilde og om den er heterofermentativ (HeF) eller homofermentativ (HoF). Stamme nr. 1-17 fra Ng'ong'ola-Manani et al. (2015), nr. 18-28 fra Østlie et al. (2021), og nr. 29-44 fra Paulsen (2021). Nr. 45 var en referansestamme.

Nr	Stamme	Kilde	Egenskap
1	<i>Weisella confusa</i> TM 67	Soya	HeF
2	<i>W. confusa</i> TM 76	Soya	HeF
3	<i>W. confusa</i> TM 107	Soya	HeF
4	<i>W. confusa</i> TM 218	Soya	HeF
5	<i>W. cibaria</i> TM 53S	Soya	HeF
6	<i>W. cibaria</i> TM 172	Soya	HeF
7	<i>W. cibaria</i> TM 184	Soya	HeF
8	<i>W. cibaria</i> TM 187	Soya	HeF
9	<i>W. cibaria</i> TM 188B	Soya	HeF
10	<i>W. cibaria</i> TM 221a	Soya	HeF
11	<i>W. cibaria</i> TM 369	Soya	HeF
12	<i>Lactobacillus brevis</i> TM 152	Soya	HeF

13	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TM 120	Soya	HoF
14	<i>Lb. fermentum</i> TM 297	Soya	HeF
15	<i>Lb. fermentum</i> TM 314	Soya	HeF
16	<i>Lb. fermentum</i> TM 317	Soya	HeF
17	<i>Lb. fermentum</i> TM 336	Soya	HeF
18	<i>Leueuconostoc citreum/holzapfelii</i> GK 1	Bygg	HeF
19	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	Bygg	HeF
20	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 2	Bygg	HeF
21	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 45	Bygg	HeF
22	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	Bygg	HeF
23	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 74	Bygg	HeF
24	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> GK 97	Bygg	HeF
25	<i>C. maltaromaticum</i> GK 101	Bygg	HeF
26	<i>Leu. mesenteroides/pseudomesenteroides</i> GK 107	Bygg	HeF
27	<i>Lactococcus lactis</i> GK 103	Bygg	HoF
28	<i>L. lactis</i> GK 162	Bygg	HoF
29	<i>F. rossiae</i> JP 2	Hvete	HeF
30	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i> JP 8	Hvete	HeF
31	<i>F. rossiae</i> JP 9	Hvete	HeF
32	<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i> JP 11	Hvete	HoF
33	<i>P. pentosaceus</i> JP 12	Hvete	HoF
34	<i>F. rossiae</i> JP 24	Spelt	HeF
35	<i>F. rossiae</i> JP 25	Spelt	HeF
36	<i>F. rossiae</i> JP 29	Spelt	HeF
37	<i>F. rossiae</i> JP 30	Spelt	HeF
38	<i>F. rossiae</i> JP 33	Spelt	HeF
39	<i>F. rossiae</i> JP 43	Enkorn	HeF
40	<i>P. pentosaceus</i> JP 45	Enkorn	HoF
41	<i>P. pentosaceus</i> JP 50	Enkorn	HoF
42	<i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	Enkorn	HoF
43	<i>P. pentosaceus</i> JP 62	Emmer	HoF
44	<i>F. rossiae</i> JP 66	Emmer	HeF
45	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> DSM 20484		

3.4.2 Test av EPS-produksjon i erter med utvalgte MSB

For å undersøke om de utvalgte stammene kunne vokse i ertemos, med og uten tilsatt S80%, ble tre EPS+ stammer med ulik indikasjon på EPS produksjon valgt ut; nr. 2, 32 og 38, henholdsvis *Weisella confusa* TM 76, *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* JP 11, og *Furfurilactobacillus rossiae* JP 33. De utvalgte stammene ble først podet 1% i MRS-buljong og inkubert over natt ved 30°C. Neste dag ble de podet 1% i MRS+sukrose og inkubert over natt ved samme betingelser.

Ertemos ble fremstilt som beskrevet i avsnitt 3.2. Prøver med sukrose (S) bestod av ertemos [93,25 g] og S80% [6,75 mL]. Prøver uten sukrose (U) bestod av ertemos [93,25 g] og sterilt vann [6,75 mL]. En S- og en U-prøve ble parvis podet [1 mL, tilsvarende 1%] med stamme nr. 2, 32, og 38, henholdsvis *W. confusa* TM 76, *Lp. plantarum/pentosus* JP 11, og *F. rossiae* JP 33. I tillegg ble det laget en kontrollprøve (EKU) bestående av bare ertemos [93,25 g] og sterilt vann [6,75 mL]. De 7 prøvene ble satt til inkubering ved 22°C i ca. 24 timer. pH ble målt før og etter fermentering, og teksturendringer ble observert.

3.4.3 Test av EPS-produksjon i erter og linser

Da det ble observert pH reduksjon i 5 av prøvene samt teksturendringer i 2 av prøvene fra testen beskrevet i 3.4.2, ble de 9 utvalgte EPS+ og 1 EPS- stammene fra 3.4.1 testet i både erte- og linseprøvemateriale.

Erte- og linsemos ble fremstilt som beskrevet i avsnitt 3.2. Prøver med 5% sukrose (S) bestod av erte- eller linsemos [ca. 93,25 g], S80% [6,75 mL], og podet [1 mL, tilsvarende 1%]. Prøver uten sukrose (U) bestod av erte-/linsemos [ca. 46,63 g], sterilt vann [3,7 mL], og podet [0,5 mL, tilsvarende 1%]. Samt en kontrollprøve for hvert av råstoffene bestående av erte- eller linsemos [ca. 46,3 g] og sterilt vann [3,7 mL].

Prøvene ble inkubert ved 22°C i ca. 24 timer. pH ble målt før og etter fermentering, samt teksturanalyse etter fermentering som beskrevet i avsnitt 3.7.1.

3.5 Metabolismeforsøk

Under metabolismeforsøket ble det gjennomført analyse av mikrobiell vekst, pH og analyse av organiske syrer og karbohydrater i ertemos før og etter fermentering med og uten tilsatt S80%. Erter ble valgt fremfor linser ettersom ertemos ble mer homogen enn linsemos. Forsøket gikk over 3 uker, hvor de samme testene ble gjennomført på samme vis hver uke. Prøvematerialet ble preparert på lik måte hver uke, hvor ertemos ble fremstilt som beskrevet i avsnitt 3.2. Til 8 sterile osteglass ble det overført ertemos [187,5 g]. Fire av prøvene ble tilsatt S80% [12,5 mL] og de resterende fire ble tilsatt sterilt vann [12,5 mL], merket henholdsvis «S» og «U».

De fire frysestock-stammene, beskrevet i avsnitt 3.5.1, ble benyttet til poding. En S- og en U-prøve ble podet med et volum som tilsvarte 10^6 kde/g ved start. Podevolum ble beregnet ut ifra celletall i de fire frysestockene, se beregning i vedlegg 1. For stamme 2, 13, 17 og 21, var podevolumene på henholdsvis 19 μ L, 27 μ L, 29 μ L og 20 μ L. Poding ble gjennomført med ca. 20 min. mellomrom. Etter poding ble prøven mikset godt med en steril skje. Halvparten av prøven overført til et nytt sterilt osteglass, denne ble satt rett i inkuberingsskap på 22°C i 24 timer.

3.5.1 Frysestock-løsning

Til metabolismeforsøk ble det laget frysestocksuspensjoner av tre EPS+ (stamme 2, 13 og 17) og én EPS- (stamme 21). Det ble valgt ut ny EPS- stamme ettersom stamme nr. 15 hadde lite pH reduksjon ved fermentering. Stammer fra kjølfrys ble først podet 1% i MRS-buljong og inkubert ved 30°C over natt. Videre ble de podet 1% i 100 mL MRS-buljong og inkubert ved 30°C over natt. Etter inkubering ble prøvene overført til hvert sitt sentrifugerør, satt i en Beckman J2-MC sentrifuge (Dan Mezansky A.S, Oslo, Norge) og sentrifugert [10 000 rpm, 4°C, 10 min.]. Supernatanten ble helt av og pellet ble løst opp i Ringers løsning [ca. 50 mL] og sentrifugert. Denne vaskingen med Ringers ble gjort to ganger. Pellet ble så resuspendert i 10 mL Ringers tilsatt 15% glyserol. Løsningen ble så pipettert [0,5 mL] i sterile fryserør og oppbevart ved -80°C.

Fra frysestock ble det preparert en fortynningsrekke ved å overføre 100 μ L frysestock i 9,9 mL Ringers, opp til 10^{-8} fortynning for hver av de fire stammene. Innstøping av 10^{-6} , 10^{-7} og 10^{-8} med MRS-agar ble gjort med to paralleller for hver stamme. Skålene ble inkubert oppned ved 30°C i 2 døgn. Celletall i hver frysestock ble beregnet ut ifra vekst på skåler, se vedlegg 1.

3.5.2 Analyse av mikrobiell vekst

Fra 0-prøven (T0) ble 10 g veid ut i Stomacherpose, og tilsatt Ringersløsning [90 mL] til posen. Prøven ble homogenisert i en Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward Medical, England) [120 s; High]. Løsning i posen tilsvarte 10^{-1} fortynning. Det ble laget en fortynningsrekke ved å overføre 100 μL fra 10^{-1} fortynning til 9,9 mL Ringersrør – tilsvarte 10^{-3} fortynning. For T0 ble det laget fortynningsrekke opp til 10^{-5} fortynning. For utplating med MRS-agar for T0 ble fortynning 10^{-3} , 10^{-4} , og 10^{-5} benyttet. Utplating ble gjort med 2 paralleller og inkuberingsforhold 30°C i 2-4 døgn.

Etter 24 timers (T24) fermentering ble det laget fortynningsrekke opp til 10^{-7} fortynning for T24. For utplating med MRS-agar ble 10^{-5} , 10^{-6} , og 10^{-7} benyttet for T24. Utplating ble gjort med 2 paralleller og inkuberingsforhold 30°C i 2-4 døgn.

Denne mikrobielle analysen ble gjennomført en gang for hvert av de 3 fermenteringsforsøkene.

3.5.3 Analyse av pH

Fra samme prøvene det ble utført mikrobielle analyser ble det også målt pH med ca. 20 min. mellomrom. pH ble målt for både T0 og T24, en gang for hvert av de 3 fermenteringsforsøkene.

3.5.4 Analyse av organiske syrer og karbohydrater

Det ble gjennomført High Performance Liquid Chromotography (HPLC) for bestemmelse av innhold av organiske syrer og karbohydrater i de fermenterte ertemosene før og etter fermentering, T0 og T24. Metoden er beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen endringer. Analysen ble gjennomført en gang for hvert av de 3 fermenteringsforsøkene.

Til HPLC ble 1,00 g av hver prøve veid inn i hvert sitt 10 mL rør. Røret ble så tilsatt ionebyttet vann [2,5 mL], 0,5 M H_2SO_4 [200 μL] (Merck, Tyskland), og acetonitril [8 mL] (Merck). Prøvene ble først ristet for hånd, så satt i MultiRS-60-BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) [30 min.]. Videre ble prøvene sentrifugert ved romtemperatur i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan) [15 min; 1470 x g; 3400 rpm].

Etter sentrifugering ble supernatant filtret med 0,2 μm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i HPLC-rør. Til analysen ble HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), med pumpe,

autosamplere, kolonneovn, DAD-UV-detektor, og RI-detektor (Agilent Technologies). Injisert prøve [25 µL] ble kjørt gjennom forkolonne Cation-H refill (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), så separert med Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var 32°C. Mobilfase var H₂SO₄ (Merck) [5 mM; 4 mL/min].

Prøvenes komponenter ble identifisert etter retensjonstid sammenlignet med standardløsninger. Standardløsningene ble preparert og analysert på samme måte som prøvene. Som standarder ble karbohydratene maltose, fruktose, og glukose (Merck) og de organiske syrene sitronsyre, eddiksyre og melkesyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet. RI-detektor ble brukt for å detektere karbohydrater og eddiksyre, og DAD-UV for detektering av organiske syrer.

3.6 Burgerforsøk

3.6.1 Prøveopparbeidelse - Burgermikser

Burgermikser ble fremstilt ved å lage ertemos som beskrevet i kapittel 3.2. Totalt ble tre burgermikser laget – A, B og C. A bestod av 50/50 fermentert ertemos og ikke-fermentert ertemos, B bestod av 25/75 fermentert ertemos og ikke-fermentert ertemos, og C var 100% ikke-fermentert ertemos (kontrollprøve). Ertemosen ble fordelt på sterile osteglass, ikke-fermentert ertemos ble satt på kjølerom [4°C] over natt. Som vist i tabell 3 ble det til A og B tatt av ertemos [henholdsvis 163,4 g og 81,7 g] i hver sine osteglass som videre ble tilsatt S80% [henholdsvis 8,6 mL og 4,3 mL] og podet med stamme nr. 17 – *Lb. fermentum* TM 336 [1%, tilsvarende henholdsvis 25 µL og 12 µL] og satt til inkubering [22°C; 24 timer]. Stamme 17 ble valgt på grunnlag av resultat fra metabolisme forsøk, samt reologiske analyser beskrevet i avsnitt 3.6.1. pH til de fermenterte miksene A og B ble målt før og etter fermentering.

Tabell 3. Sammensetning av fermentert ertemos til mikser A og B. Viser mengde ertemos, S80%, og podematerial for å oppnå 10⁶ g kde/mL ved start. Begge miksene ble podet med stamme nr. 17 – *Lb. fermentum* TM 336.

	A	B
Ertemos	163,4 g	81,7 g
S80%	8,6 mL	4,3 mL
Poding*	25 µL	12 µL

*stamme nr. 17 – *Lb. fermentum* TM 336 (mengden tilsvarte 10⁶ ved start).

Burgermiksene bestod av 86% ertemos, 13% rapsolje, og 1% salt. For hver miks ble det laget et totalvolum på ca. 400 g. I en bakebolle ble rapsolje, [52 g], ertemos [ca. 344 g] og salt [4 g] mikset for hånd med slikkepott til homogen blanding. A inneholdt 50/50 fermentert og ikke-fermentert ertemos [172g/172g], B inneholdt 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos [ca. 86 g/258 g], og C inneholdt ikke-fermentert ertemos [ca. 344 g] som vist i tabell 4.

Til reologimålinger ble det tatt ut prøvemateriell [ca. 20 g], resterende burgerblanding ble overført til sterile osteglass og satt på kjølerom [4°C] over natten.

Tabell 4. Mengde av fermentert og ikke-fermentert ertemos, rapsolje og salt i hver av burgermiksene A, B og C, samt totalvolum i miksene.

	Mengde (g)		
	A	B	C
Ertemos fermentert	172	86	0
Ertemos ikke-fermentert	172	258	344
Rapsolje	52	52	52
Salt	4	4	4
Totalt	400	400	400

3.6.2 Vanntap

For å undersøke vanntap under steking ble burgerne stekt i stekepanne på middelsvarme i 3-4 min per side. Hver burgermiks [ca. 300 g] ble tilsatt potetmel [ca. 15 g], ettersom de første testprøvene ikke holdt formen sin.

For hver miks, A, B og C, ble det stekt 3 prøver på 85 g. Burgerne ble veid ut på bakepapir og overført til stekepanne. Vekt før og etter steking ble observert, samt vekt av burgermiks som ble igjen på bakepapiret og dermed ikke stekt.

3.7 Teksturanalyser

3.7.1 Fermentert erte- og linsemos

Følgende analyser ble gjennomført på fermentert erte- og linsemos med og uten sukrose og 9 EPS+ og 1 EPS- stamme, samt kontroller. Totalt 21 prøver for hver av erte- og linsemos. En parallell per prøve. I tillegg ble analysene gjennomført på de 8 prøvene benyttet til metabolismeforsøket, her to paralleller per prøve.

For måling av tekstur og viskositetsendringer ble det gjennomført målinger med reometer modell Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Graz, Østerrike). Til reologimålinger ble det benyttet kopp (CC27/Ti) og bob (CC27/Ti), og data ble analysert i Rheoplus (RHEOPLUS/32 V3.40). For hver prøve ble ca. 15 mL prøvemateriale overført til kopp. Måletemperatur var 20°C, og bob ble sakte senket til måleposisjon [1 mm]. Det ble gjennomført tre påfølgende tester; 1) "amplitude sweep" (AS) med kontrollert tøyning (γ) [0,01-100%] og angulær frekvens (ω) [10 rad/s] med 13-19 målepunkter; 2) "step rate test" med konstant skjærhastighet [0,1 s⁻¹] og 120 målinger i økende intervall fra 0,01-15 s; og 3) rotasjon med kontrollert skjærhastighet [50-500 s⁻¹] med 20 målepunkter. Rheoplus ble benyttet for å bestemme den øvre grensen for det viskoelastiske området (LVER) til intervall 1. LVER viste punktet hvor G' var 3% lavere en platåverdi av G'.

3.7.2 Burgermiks

Reometer modell Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH) utstyrt med plate-plate geometri (PP50/P2). Romtempererte prøver [ca. 20 g; diameter 40 mm og høyde 5mm] fra burgermiks A, B og C ble i tur påført den tempererte platen [20°C]. Probeplaten ble forsiktig senket til måleposisjon [4 mm]. Måling for temperaturbehandling bestod av to påfølgende intervaller; 1) varmebehandling med oscillasjon [$\gamma = 1\%$ og $\omega = 1$ rad/s] bestående av tre trinn: i) konstant kraft [5 N] og konstant temperatur [20°C] med 5 målepunkter/10 sek, ii) oppvarming [til 160°C] med 60 målepunkter/15 sek, og iii) nedkjøling [til 20°C] med 60 målepunkter/15 sek.; og 2) AS med kontrollert tøyning [0,01-100%] og angulær frekvens [10 rad/s] ved konstant temperatur [20°C]. Rheoplus ble benyttet for å bestemme LVER, hvor G' var 3% lavere en platåverdi av G'.

Testen ble gjennomført på burgermiks A, B og C, med og uten tilsatt potetmel.

3.8 Databehandling og statistiske analyser

Microsoft Excel og RStudio (Versjon 1.3.1093) ble brukt til behandling av data og statistiske analyser. Enveis og toveis variansanalyser (ANOVA), TukeyHSD, og Compact Letter Display (CLD) ble benyttet for å finne signifikante forskjeller i pH, cellevekst, karbohydrater og organiske syrer, samt elastisitet og viskositet i sammenheng med metabolismeforsøket. ANOVA, TukeyHSD og CLD ble gjennomført ved hjelp av RStudio, med signifikansnivå $p < 0,05$. Output fra RStudio er vist i vedlegg.

3.9 Oversikt over prøvekode

Tabell 5 viser oversikt over prøvekode som ble benyttet under forsøk og som blir brukt i resultatdelen av oppgaven. Oversikten forklarer hvilket råstoff prøvene bestod av, hvilken bakteriestamme prøven ble inokulert med og om prøven ble tilsatt sukrose eller ikke (dersom ikke ble prøven tilsatt tilsvarende volum med sterilt vann).

Tabell 5. Forklaring på prøvekode. Viser hvilket råstoff prøven bestod av, hvilken bakteriestamme prøven ble fermentert med og om prøven var tilsatt sukrose eller ikke.

Prøvekode	Råstoff	Bakteriestamme: Nr. og navn	Tilsatt sukrose
E02S	Erter	Nr. 2 - <i>W. confusa</i> TM 76	Ja
E06S	Erter	Nr. 6 - <i>W. cibaria</i> TM 172	Ja
E13S	Erter	Nr. 13 - <i>P. pentosaceus</i> TM 120	Ja
E17S	Erter	Nr. 17 - <i>Lb. fermentum</i> TM 336	Ja
E19S	Erter	Nr. 19 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	Ja
E21S	Erter	Nr. 21 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 45	Ja
E22S	Erter	Nr. 22 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	Ja
E32S	Erter	Nr. 32 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP 11	Ja
E38S	Erter	Nr. 38 - <i>F. rossiae</i> JP 33	Ja
E42S	Erter	Nr. 42 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	Ja
E15S	Erter	Nr. 15 - <i>Lb. fermentum</i> TM 314	Ja
E02U	Erter	Nr. 2 - <i>W. confusa</i> TM 76	Nei
E06U	Erter	Nr. 6 - <i>W. cibaria</i> TM 172	Nei
E13U	Erter	Nr. 13 - <i>P. pentosaceus</i> TM 120	Nei
E17U	Erter	Nr. 17 - <i>Lb. fermentum</i> TM 336	Nei
E19U	Erter	Nr. 19 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	Nei
E21U	Erter	Nr. 21 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 45	Nei
E22U	Erter	Nr. 22 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	Nei
E32U	Erter	Nr. 32 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP 11	Nei
E38U	Erter	Nr. 38 - <i>F. rossiae</i> JP 33	Nei
E42U	Erter	Nr. 42 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	Nei
E15U	Erter	Nr. 15 - <i>Lb. fermentum</i> TM 314	Nei
EKU	Erter	Ingen - Til kontroll	Nei
L02S	Linser	Nr. 2 - <i>W. confusa</i> TM 76	Ja
L06S	Linser	Nr. 6 - <i>W. cibaria</i> TM 172	Ja
L13S	Linser	Nr. 13 - <i>P. pentosaceus</i> TM 120	Ja
L17S	Linser	Nr. 17 - <i>Lb. fermentum</i> TM 336	Ja
L19S	Linser	Nr. 19 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	Ja
L22S	Linser	Nr. 22 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	Ja
L32S	Linser	Nr. 32 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP 11	Ja
L38S	Linser	Nr. 38 - <i>F. rossiae</i> JP 33	Ja
L42S	Linser	Nr. 42 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	Ja
L15S	Linser	Nr. 15 - <i>Lb. fermentum</i> TM 314	Ja
L02U	Linser	Nr. 2 - <i>W. confusa</i> TM 76	Nei
L06U	Linser	Nr. 6 - <i>W. cibaria</i> TM 172	Nei
L13U	Linser	Nr. 13 - <i>P. pentosaceus</i> TM 120	Nei
L17U	Linser	Nr. 17 - <i>Lb. fermentum</i> TM 336	Nei
L19U	Linser	Nr. 19 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	Nei
L22U	Linser	Nr. 22 - <i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	Nei
L32U	Linser	Nr. 32 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP 11	Nei
L38U	Linser	Nr. 38 - <i>F. rossiae</i> JP 33	Nei
L42U	Linser	Nr. 42 - <i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	Nei
L15U	Linser	Nr. 15 - <i>Lb. fermentum</i> TM 314	Nei
LKU	Linser	Ingen - Til kontroll	Nei

4. Resultat

4.1 Innledende forsøk

4.1.1 Screening av MSB

Det ble totalt screenet 45 bakteriestammer for EPS-produksjon, hvorav en referansestamme var inkludert.. Tabell 6 viser om stammene som ble screenet for EPS-produksjon var EPS positive (+) eller negative (-), samt hvordan koloniene til de EPS+ stammene så ut. Totalt var 18 stammer EPS+, inkludert kontrollstammen. 15 av de 45 stammene var EPS+ og hadde dannet store bløte kolonier på skålen slik som kontrollstammen *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* DSM 20484 (nr. 45). *W. confusa* TM 76, *W. cibaria* TM 172, og *P. pentosaceus* TM 120 (stamme nr. 2, 6 og 13) er stammer som dannet slike kolonier. To av de EPS+ dannet et tynnflytende slimlag på skålen, dette var *F. rossiae* JP 33 og *Lp. plantarum/pentosus* JP52 (stamme nr. 38 og 42). Én av stammene som hadde lite vekst, hadde trådtrekkende egenskaper, dette var *Lp. plantarum/pentosus* JP 11 (stamme nr. 32). Stammene kategorisert som EPS- viste ingen/svært lite vekst, og ingen tegn til trådtrekkende egenskaper. Til videre forsøk ble en-to stammer fra hver bakterieart som produserte «store bløte kolonier» av henholdsvis *Weisella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* og *Leuconostoc* (stamme nr. 2, 6, 13, 17, 19, og 22) valgt. I tillegg ble *Lp. plantarum/pentosus* (stamme nr. 32) som viste trådtrekkende egenskaper valgt, samt stamme nr. 38 og 42 som produserte tynnflytende slim, henholdsvis *F. rossiae* og *Lp. plantarum/pentosus*. Som EPS- kontrollstamme ble *Lb. fermentum* TM 314 (stamme nr. 15). Disse ti stammene, hvorav 9 var EPS+ og 1 var EPS-, er merket med fet skrift i tabell 6.

Tabell 6. EPS-screening av utvalgte bakteriestammer på sukroseagar, hvor EPS-positive (+) eller negative (-) er angitt, og hvis positiv vises observasjon av koloniene. Stammer merket med fet skrift ble valgt ut til videre forsøk på råmateriale.

Nr	Stammer	EPS +/-	Observasjon
1	<i>W. confusa</i> TM 67	+	Store bløte kolonier
2	<i>W. confusa</i> TM 76	+	Store bløte kolonier
3	<i>W. confusa</i> TM 107	+	Store bløte kolonier
4	<i>W. confusa</i> TM 218	+	Store bløte kolonier
5	<i>W. cibaria</i> TM 53S	-	
6	<i>W. cibaria</i> TM 172	+	Store bløte kolonier
7	<i>W. cibaria</i> TM 184	+	Store bløte kolonier
8	<i>W. cibaria</i> TM 187	-	
9	<i>W. cibaria</i> TM 188B	-	
10	<i>W. cibaria</i> TM 221a	-	

11	<i>W. cibaria</i> TM 369	+	Store bløte kolonier
12	<i>Lb. brevis</i> TM 152	-	
13	<i>P. pentosaceus</i> TM 120	+	Store bløte kolonier
14	<i>Lb. fermentum</i> TM 297	-	
15	<i>Lb. fermentum</i> TM 314	-	
16	<i>Lb. fermentum</i> TM 317	-	
17	<i>Lb. fermentum</i> TM 336	+	Store bløte kolonier
18	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 1	+	Store bløte kolonier
19	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 12	+	Store bløte kolonier
20	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 2	+	Store bløte kolonier
21	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 45	-	
22	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	+	Store bløte kolonier
23	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 74	+	Store bløte kolonier
24	<i>C. maltaromaticum</i> GK 97	-	
25	<i>C. maltaromaticum</i> GK 101	-	
26	<i>Leu. mesenteroides/pseudomesenteroides</i> GK 107	-	
27	<i>L. lactis</i> GK 103	-	
28	<i>L. lactis</i> GK 162	-	
29	<i>F. rossiae</i> JP 2	-	
30	<i>F. rossiae</i> JP 8	-	
31	<i>F. rossiae</i> JP 9	-	
32	<i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP 11	+	Trådtrekkende
33	<i>P. pentosaceus</i> JP 12	-	
34	<i>F. rossiae</i> JP 24	-	
35	<i>F. rossiae</i> JP 25	-	
36	<i>F. rossiae</i> JP 29	-	
37	<i>F. rossiae</i> JP 30	-	
38	<i>F. rossiae</i> JP 33	+	Slimlag på skål, tynnflytende
39	<i>F. rossiae</i> JP 43	-	
40	<i>P. pentosaceus</i> JP 45	-	
41	<i>P. pentosaceus</i> JP 50	-	
42	<i>Lp. plantarum/pentosus</i> JP52	+	Slimlag på skål, tynnflytende
43	<i>P. pentosaceus</i> JP 62	-	
44	<i>F. rossiae</i> JP 66	-	
45	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> DSM 20484	+	Store bløte kolonier

4.1.2 Test av EPS-produksjon i erter med utvalgte MSB

For å undersøke om EPS+ stammer vokste i ertemos med og uten tilsatt sukrose, ble tre stammer, nr. 2, 32 og 38, inokulert i ertemos med og uten tilsatt sukrose. Tabell 7 viser pH før og etter inkubering ved 22°C i 25,5 timer, samt observerte teksturforandringer etter fermenteringen av ertemos med 3 utvalgte MSB. E02S hadde en pH reduksjon fra 6,02 til 4,68, og for E02U ble pH redusert fra 6,08 til 5,19. E02S hadde fått en fast struktur etter fermentering, mens teksturen til E02U var uforandret etter fermenteringen (svært viskøs). For E32S ble pH redusert fra 5,96 til 4,30 etter fermentering, og teksturen viste skjærtynnende egenskaper etter fermentering ved røring med skje. For E32U ble pH redusert fra 6,03 til 4,43 etter fermentering og teksturen var uforandret. Teksturen var uforandret og det var tilnærmet ingen pH reduksjon for E38S, E32U, eller EKV (kontrollprøve).

Tabell 7. pH før (T0) og etter fermentering i 25,5 timer (T25,5) i ertemos (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U), og teksturendring etter fermentering. Det ble benyttet tre ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76, 32 - *Lp. plantarum/pentosus* JP, og 38 - *F. rossiae* JP33. EKV = kontrollprøve (ertemos + sterilt vann).

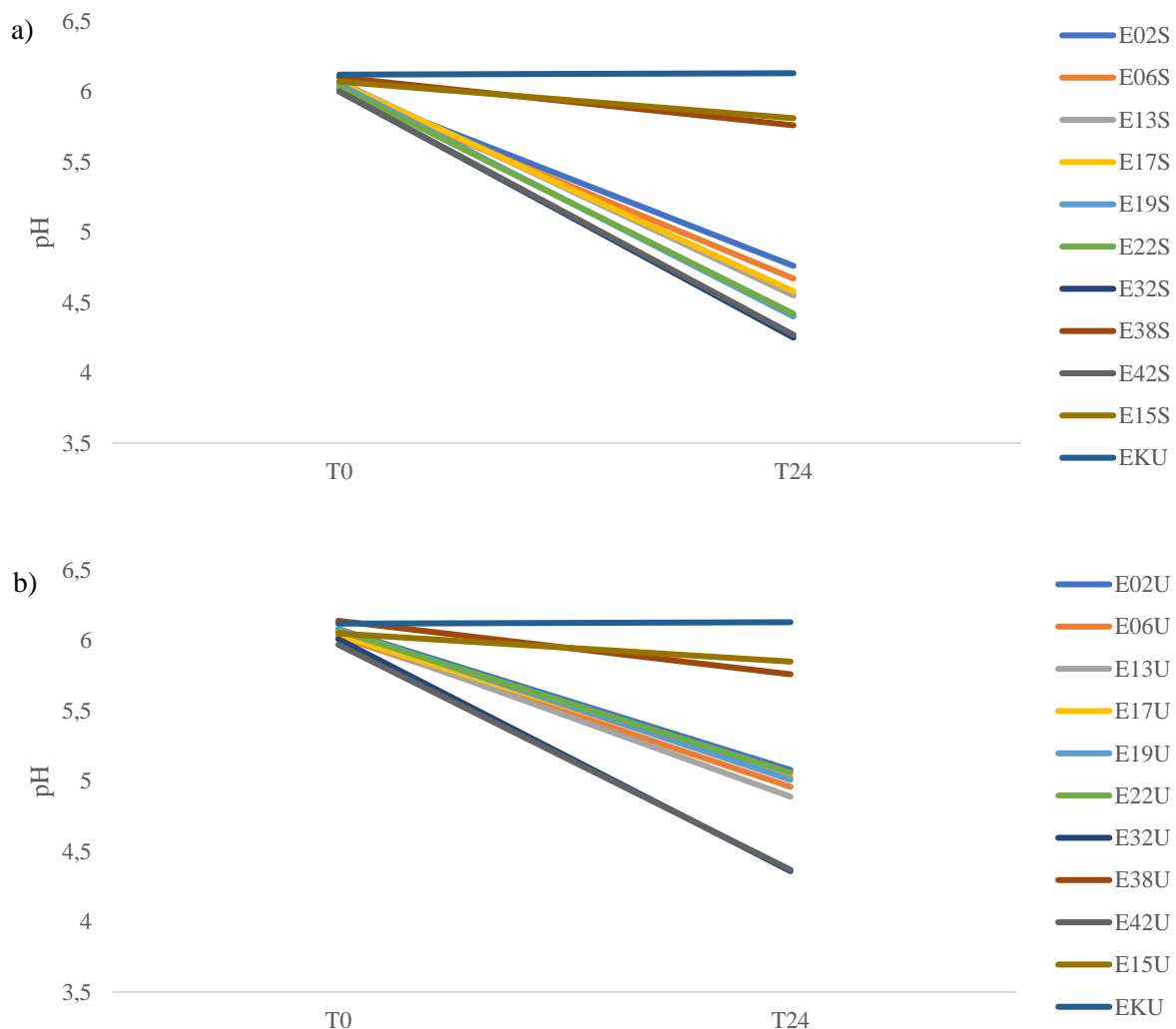
Prøve	pH		Teksturforandring etter inkubering
	T0	T25,5	
E02S	6,02	4,68	Fastnet
E32S	5,96	4,30	Blitt skjærtynnende
E38S	6,08	5,96	Uendret
E02U	6,08	5,19	Uendret
E32U	6,03	4,34	Uendret
E38U	6,10	6,04	Uendret
EKV	6,13	6,11	Uendret

4.1.3 Test av EPS-produksjon i erter og linser

Endring i pH før og etter fermentering med de ti utvalgte stammene ble undersøkt i erte- og linsemos med og uten tilsatt sukrose. Figur 3 viser pH før (T0) og etter fermentering (T24) for ertemos med sukrose (S) og uten sukrose (U). Ved T0 lå pH i prøvene på 5,97-6,14. Etter fermentering var pH i S- og U-prøver redusert med henholdsvis 0,26-1,75 og 0,2-1,65 pH-enheter. Gjennomsnittlig reduksjon i pH for ertemos med sukrose og ertemos uten sukrose var henholdsvis $1,29 \pm 0,52$ og $1,02 \pm 0,43$. Prøver fermentert med stamme nr. 32 og 42 (henholdsvis *Lp. plantarum/pentosus* JP11 og *Lp. plantarum/pentosus* JP52) hadde størst pH-reduksjon både for S- og U-prøver. Prøvene E32S og E42S hadde pH-reduksjon på

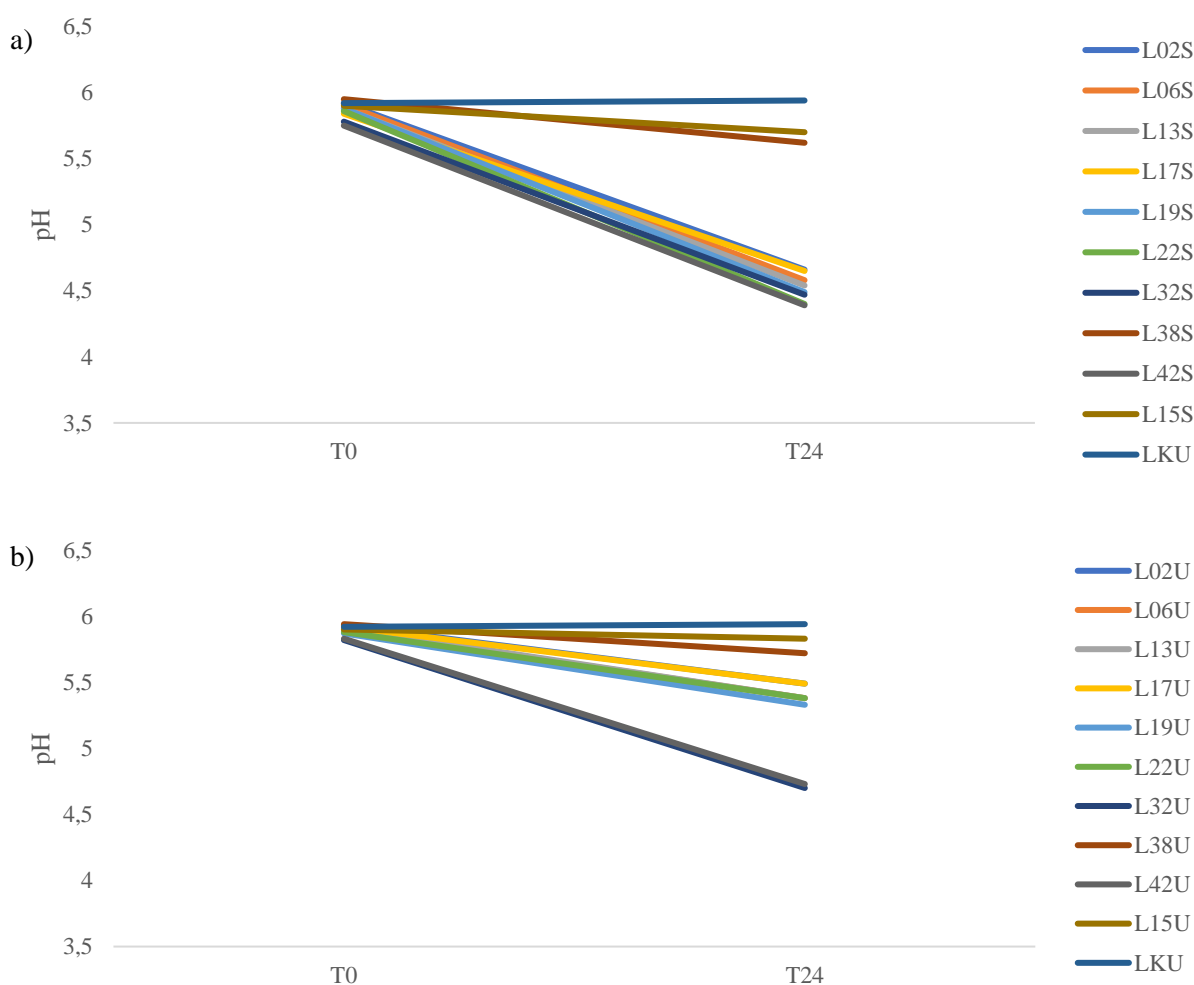
henholdsvis 1,75 og 1,73 pH-enheter. Prøvene E32U og E42U hadde en noe lavere pH-reduksjon enn S-prøver med de samme stammene på henholdsvis 1,65 og 1,60 pH-enheter. Minst reduksjon i pH ble observert i prøver fermentert med stamme 15 og 38 (henholdsvis *Lb. fermentum* TM314 og *F. rossiae* JP33). I prøvene E15S og E32S ble pH redusert med henholdsvis 0,26 og 0,34 pH-enheter, og for E15U og E32U ble pH redusert med henholdsvis med 0,20 og 0,38 pH-enheter. Kontrollprøven (EKU) var tilnærmet lik for T0 og T24.

pH-reduksjon, fra størst til lavest, for ertemos tilsatt sukrose var som følger: E32S > E42S > E19S > E22S > E13S > E17S > E06S > E02S >> E38S > E15S. For ertemos uten sukrose var trenden tilsvarende ertemos med sukrose og pH-reduksjon, fra størst til lavest, var slik: E32U > E42U > E13U > E06U = E19U > E17U = E22U > E02U >> E38U > E15U > EKU.



Figur 3. Endring i pH før (T0) og etter fermentering (T24) i ertemos (a) med sukrose, og (b) uten tilsatt sukrose. De utvalgte stammene var: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzappelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzappelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314.

Figur 4 viser pH ved T0 og T24 for linsemos (L) med sukrose (S) og uten sukrose (U). Ved T0 lå pH på 5,75-5,95. Etter fermentering var pH i S- og U-prøver redusert med henholdsvis 0,2-1,46 og 0,07-1,12 pH-enheter. Gjennomsnittlig reduksjon i pH for linsemos med og uten sukrose var henholdsvis $1,12 \pm 0,43$ og $0,55 \pm 0,32$. Prøvene L22S, L19S hadde størst pH-reduksjon med 1,46 pH-enheter. Blant linsemos uten sukrose hadde prøvene som var fermentert med stamme nr. 32 og 42 sterkest reduksjon med henholdsvis 1,12 og 1,10 pH-enheter. Minst reduksjon i pH ble observert i prøver fermentert med stamme nr. 15 og 38 i prøver både med og uten sukrose. L15S og L38S hadde pH-reduksjon på henholdsvis 0,20 og 0,33 pH-enheter. For L15U og L38U ble pH redusert med henholdsvis 0,07 og 0,22 pH-enheter. For L15U og L38U ble pH redusert med henholdsvis 0,07 og 0,22 pH-enheter. Kontrollprøven (LKU) var uendret. pH-reduksjon, fra størst til lavest, for linsemos tilsatt sukrose var følgende: L22S > L19S > L42S > L13S > L06S > L32S > L02S > L17S >> L38S > L15S. For linsemos uten sukrose ble pH-reduksjon, fra størst til lavest, slik: L32U > L42U > L19U > L13U > L06U > L22U > L17U >> L38U > L15U > LKU.

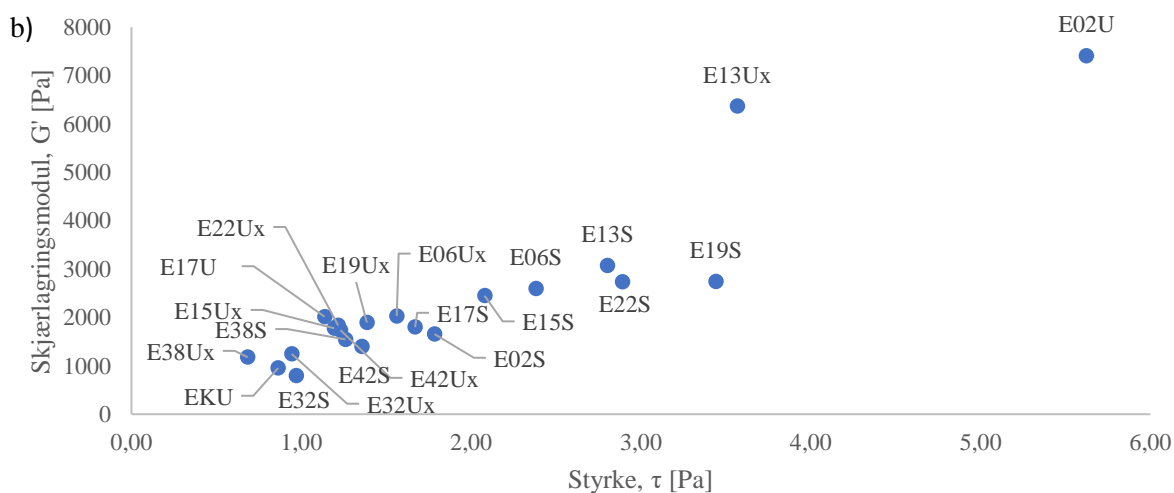
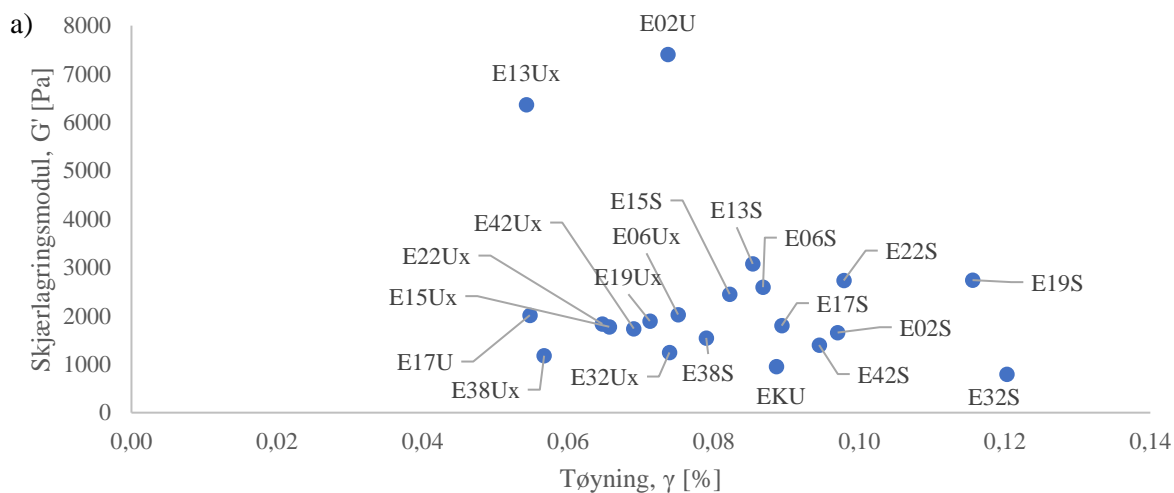


Figur 4. Endring i pH før (T0) og etter fermentering (T24) i linsemos (a) med sukrose, og (b) uten tilsatt sukrose. De utvalgte stammene var: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzappelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzappelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314.

pH-reduksjon for ertemos med og uten sukrose, samt linsemos uten sukrose, hadde de samme tendensene med hensyn til hvilke stammer som hadde stor og liten pH-reduksjon. For linsemos med sukrose var det andre stammer som hadde høy pH-reduksjon, men de samme stammene, nr. 38 og 15, produserte her også minst syre.

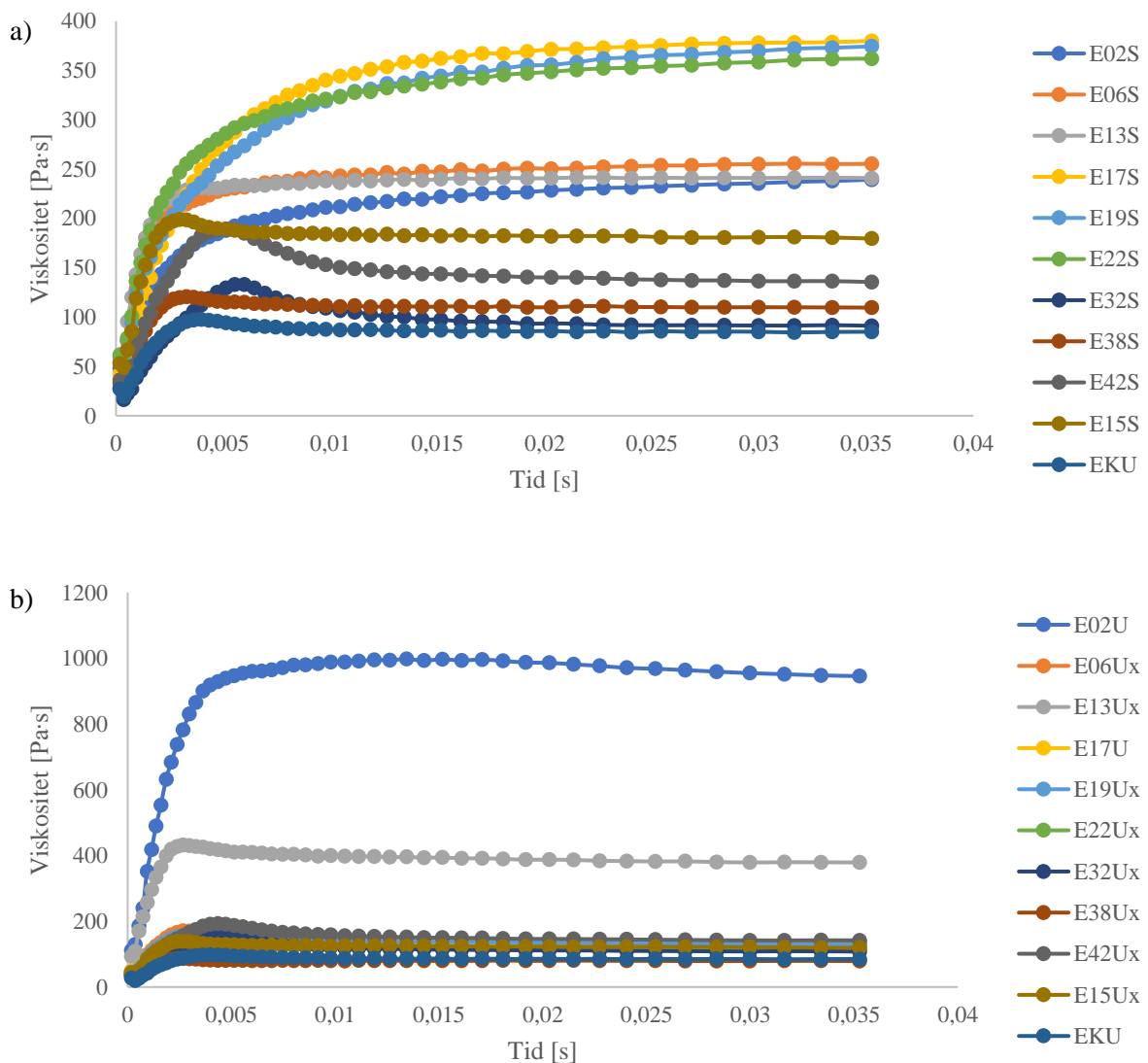
4.1.4 Teksturanalyser på fermentert erte- og linsemos

Reologiske analyser ble gjennomført for å undersøke forskjeller i tekstur mellom prøver tilsatt sukrose og uten tilsatt sukrose etter fermentering med de ti utvalgte stammene i erte- og linsemos. LVER (den øvre grensen for det viskoelastiske området) viser hvor mye tøyning/styrke et fluid, eventuelt et semi-fast stoff, tåler før den mister sine viskoelastiske egenskaper. Skjærlagringsmodulen (G') viser til elastisiteten av prøven. Figur 5 viser LVER til fermentert ertemos med og uten sukrose (henholdsvis figur 5a og 5a). Prøver merket med «x» ble analysert etter en natt på kjølerom. Høyest skjærlagringsmodul (G') og styrke hadde E02U og E13Ux på henholdsvis ca. 7400 og 6300 Pa med styrke på 5,62 og 3,57 Pa, og tøyning på 0,07% og 0,05%. Prøver med tilsatt sukrose nådde LVER ved høyere tøyning og styrke enn prøver uten tilsatt sukrose som vist på figur 5a og 5b, unntatt E32S, E38S og E42S som hadde G' og tøyning på nivå med prøver uten tilsatt sukrose. E32S tålte derimot høyest tøyning av alle prøvene. For prøver tilsatt sukrose gav ble G' i synkende rekkefølge for prøver med ulike stammer: E13S > E19S > E22S > E06S > E15S > E17S > E02S > E38S > E42S > E32S > E KU.



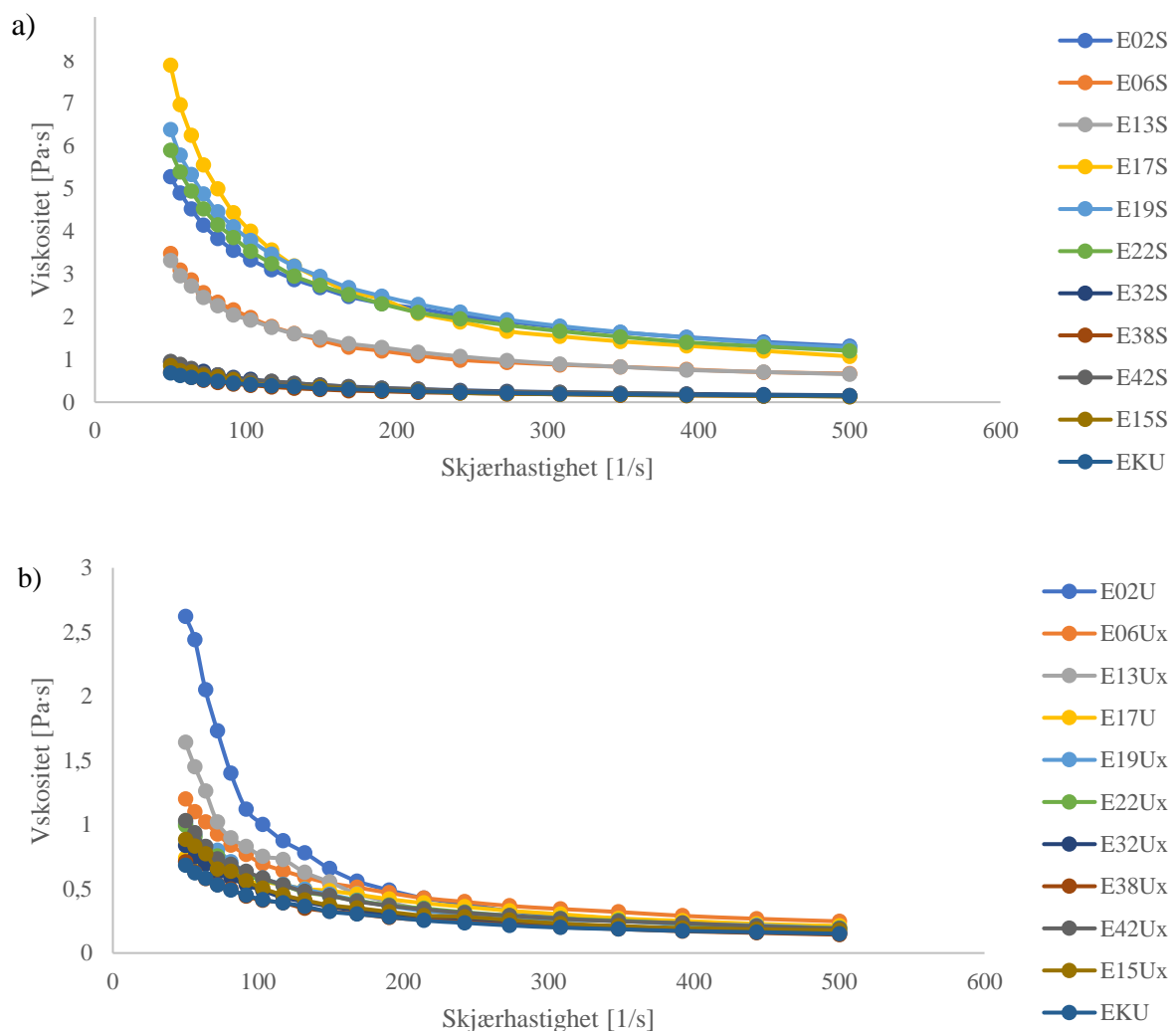
Figur 5. LVER for ertemos (E) etter fermentering med (S) og uten sukrose (U), samt kontrollprøve (EKU). Det ble benyttet ti stammer til fermentering: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzappelii* GK12; 22 - *Leu. citreum/holzappelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314. Prøver markert med «x» ble analysert etter en natt på kjølelager. (a) Skjærlagringsmodul som funksjon av tøyning, og (b) skjærlagringsmodul som funksjon av styrke.

"Step rate test" (SRT) ble gjennomført for å undersøke om de fermenterte prøvene viste tendenser til trådtrekkende egenskaper eller ikke, samt viskositet til prøven. Figur 6 viser resultat fra SRT utført på fermentert ertemos tilsatt sukrose (figur 6a) og uten sukrose (figur 6b). Prøver merket med «x» ble analysert etter en natt på kjølerom. E02S, E06S, E13S, E17S, E19S, og E22S fikk ikke "overshoot". Blant disse hadde E17S, E19S og E22S høyest viskositet (ca. 340-380 Pa·s), fulgt av E06S, E13S og E02S (ca. 200-250 Pa·s). E32S, E38S, E42S og E15S, samt kontrollprøven (EKU) fikk "overshoot". Blant prøvene uten tilsatt sukrose hadde alle "overshoot" ved viskositet >200 Pa·s, med unntak av E02U som hadde en svært høy viskositet rundt 1000 Pa·s og E13U som fikk "overshoot" med viskositet rundt 400 Pa·s som vist på figur 6b.



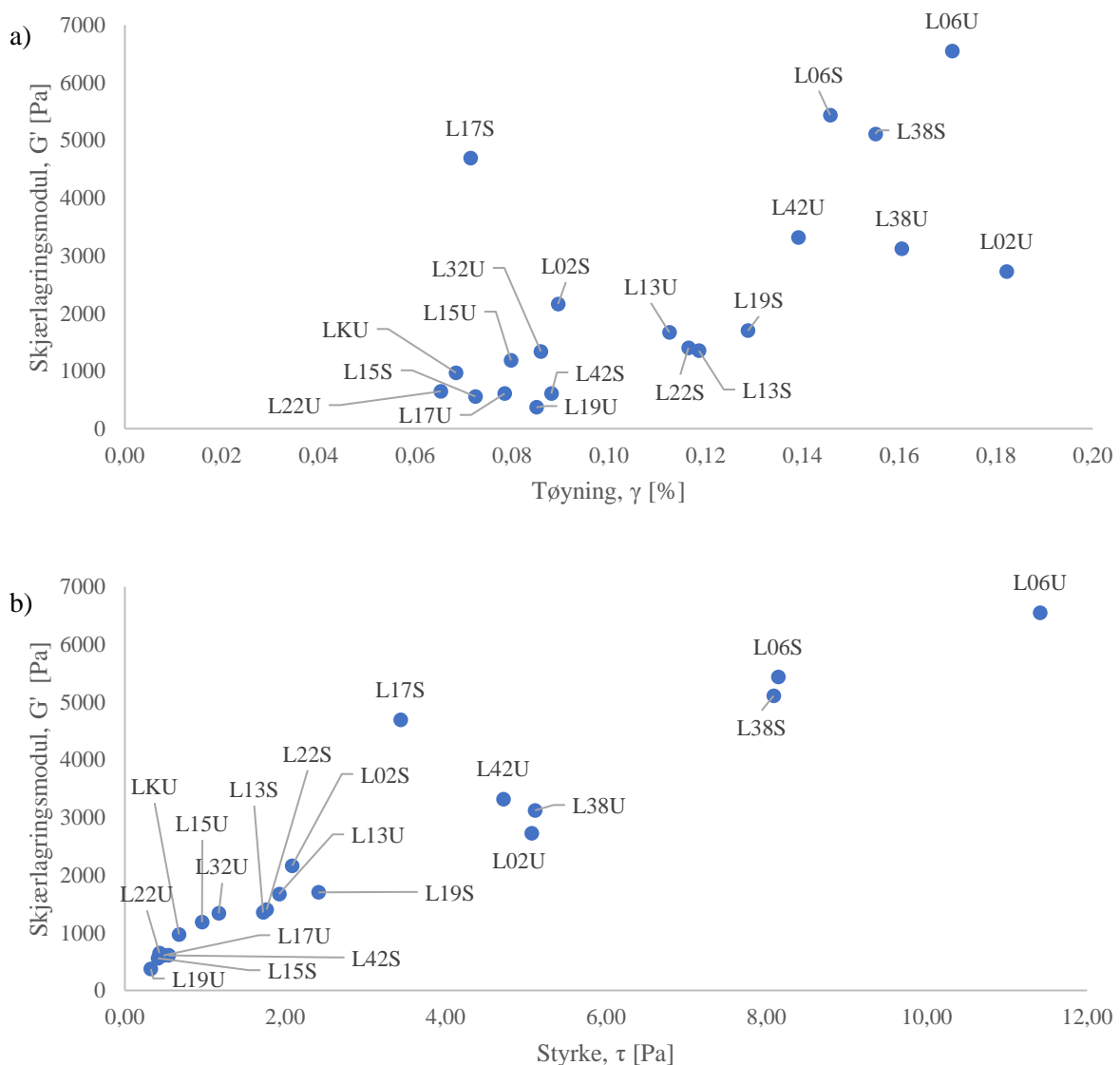
Figur 6. SRT kurve for ertre (a) med sukrose og (b) uten tilsatt sukrose. Det ble benyttet ti stammer til fermentering: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314. Prøver markert med «x» ble analysert etter en natt på kjølerom. Merk endring på y-akse med (a) sukrose og (b) uten sukrose.

Rotasjonstest ble benyttet for å undersøke viskositet, samt om de fermenterte prøvene hadde newtonsk eller ikke-newtonsk oppførsel. Figur 7 viser resultat fra rotasjonstest for fermentert ertemos med og uten tilsatt sukrose (henholdsvis figur 7a og 7b). Prøver merket med «x» ble analysert etter en natt på kjølerom. Alle prøvene viste ikke-newtonsk og skjærtynnende oppførsel. Høyest viskositet ved skjærhastighet på 50 s^{-1} hadde E17S (7,88 Pa·s), fulgt av E19S, E22S og E02S (henholdsvis 6,37, 5,89 og 5,27 Pa·s). Ved skjærhastighet på 500 s^{-1} lå viskositeten til disse fire prøvene på rundt 1-1,3 Pa·s. E06S og E13S hadde viskositet ved start rundt 3,3 Pa·s og ved slutt rundt 0,6 Pa·s. Prøvene E32S, E38S, E42S og E15S hadde viskositet ved skjærhastighet på 50 s^{-1} på $<1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ og ved skjærhastighet på 500 s^{-1} på rundt 0,15 Pa·s. For prøver uten tilsatt sukrose hadde alle en viskositet ved skjærhastighet på 500 s^{-1} på $<1,2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, med unntak av E02U og E13Ux med henholdsvis 2,6 og 1,6 Pa·s.



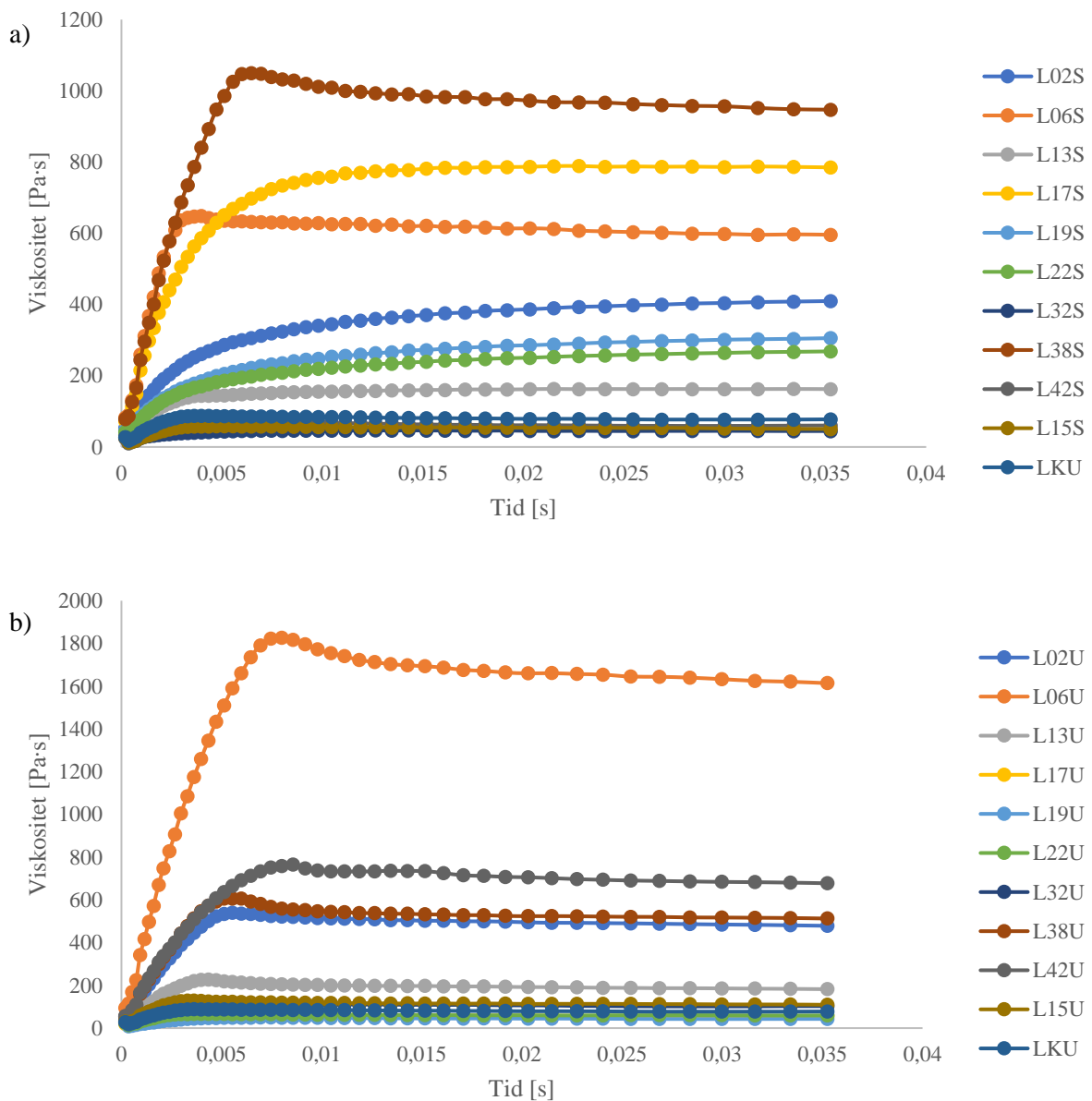
Figur 7. Viskositet som funksjon av skjærhastigheten fra rotasjonstest. Resultat for ertemos (a) med sukrose og (b) uten tilsatt sukrose, fermentert med ti ulike stammer. De utvalgte stammene var: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314. Prøver markert med «x» ble analysert etter en natt på kjølerom. Merk endring på y-akse (a) med sukrose og (b) uten sukrose.

Figur 8 viser LVER til fermentert linsemos med og uten sukrose. Høyest G' og styrke hadde L06U med G' på 6550 Pa med styrke på 11,4 Pa som vist på figur 8b. Prøven L06U hadde nest høyest tøyning på 0,18% som vist på figur 8a. Andre prøver som skilte seg ut med tanke på G' var L06S, L38S og L17S (rundt 4600-5400 Pa). L06S og L38S hadde relativt lik tøyning og styrke på henholdsvis ca. 0,15% og 8,1 Pa. L17S hadde derimot tøyning på 0,07% og styrke på 3,4 Pa. LKU (kontrollprøve) hadde G' på 970 Pa, og flere prøver hadde G' lavere enn LKU som for eksempel L15S, L22U, og L17U. Disse prøvene hadde relativt lik tøyning og styrke som LKU.



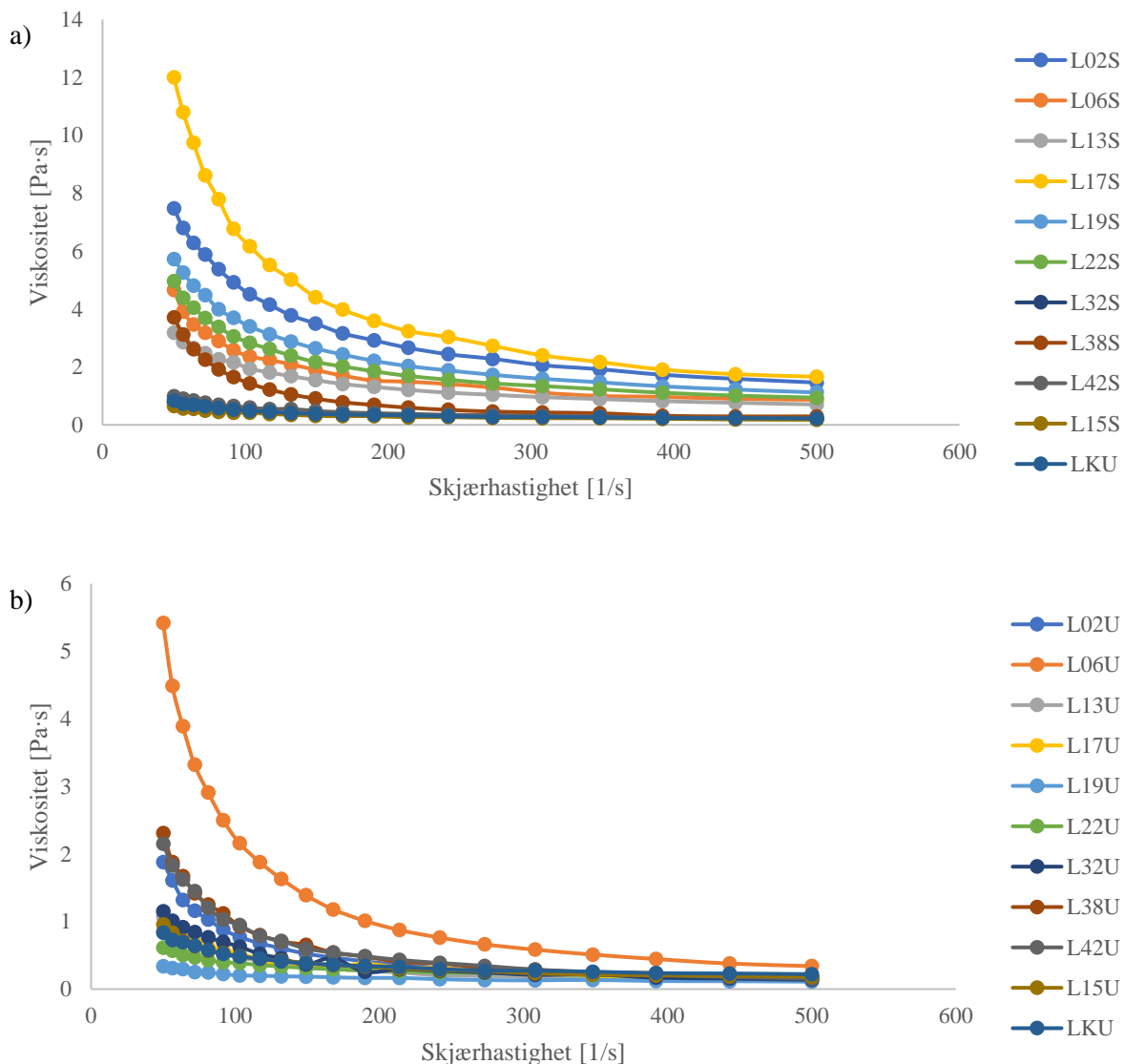
Figur 8. LVER for linsemos (L) etter fermentering med (S) og uten sukrose (U), samt en kontrollprøve (LKU). Det ble benyttet ti stammer til fermentering: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314. (a) Skjærlagringsmodul som funksjon av tøyning, og (b) skjærlagringsmodul som funksjon av styrke.

Figur 9 viser resultat fra SRT utført på fermentert ertemos tilsatt sukrose (figur 9a) og uten sukrose (figur 9b). L02S, L06S, L13S, L17S, L19S, og L22S fikk ikke "overshoot". Blant disse hadde L17S og L06S høyest viskositet (ca. 780 og 620 Pa·s), fulgt av L02S, L19S, L22S og L13S (ca. 400, 300, 260 og 160 Pa·s). L32S, L38S, L42S og L15S, samt EKV fikk "overshoot". L38S hadde høy viskositet rundt 1000 Pa·s, og de resterende med sukrose hadde viskositet <100 Pa·s. Blant prøvene uten tilsatt sukrose hadde alle "overshoot" ved varierende viskositet som vist på figur 9b.



Figur 9. SRT kurve for linsemos (a) med sukrose og (b) uten tilsatt sukrose. Det ble benyttet ti stammer til fermentering: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314.

Figur 10 viser resultat fra rotasjonstest for fermentert linsemos med og uten tilsatt sukrose (henholdsvis figur 10a og 10b). Alle prøvene viste ikke-newtonsk og skjærtynnende oppførsel. Høyest viskositet ved start (skjærhastighet på 50 s^{-1}) hadde L17S (12,0 Pa·s), fulgt av L02S, E19S, L22S, L06S, L38S og L13S (henholdsvis 7,48, 5,72, 4,97, 4,66, 3,71 og 3,18 Pa·s). Ved slutt (skjærhastighet på 500 s^{-1}) lå disse på 0,7-1,6 Pa·s (unntatt L38S med 0,2 Pa·s). L32S, L42S, L15S og LKU hadde viskositet ved start $> 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, og viskositet ved slutt rundt 0,2 Pa·s. For prøver uten tilsatt sukrose (figur 10b) hadde L06U høyest viskositet ved start på 5,42 Pa·s, de resterende hadde viskositet $< 2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Ved slutt lå viskositeten til disse på 0,2 Pa·s.



Figur 10. Viskositet som funksjon av skjærhastigheten fra rotasjonstest. Resultat for linsemos (a) med sukrose og (b) uten tilsatt sukrose, fermentert med ti ulike stammer. De utvalgte stammene var: 2 – *W. confusa* TM76; 6 – *W. cibaria* TM172; 13 – *P. pentosaceus* TM120; 17 – *Lb. fermentum* TM336; 19 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK12; 22 – *Leu. citreum/holzapfelii* GK50; 32 – *Lp. plantarum/pentosus* JP11; 38 – *F. rossiae* JP33; 42 – *Lp. plantarum/pentosus* JP52; 15 – *Lb. fermentum* TM314. Merk endring på y-akse (a) med sukrose og (b) uten sukrose.

4.2 Metabolismeforsøk

Ut ifra innledende forsøk (pH og reologi) på erte- og linsemos med ti bakteriestammer ble det valgt å gå videre med ertemos og fire bakteriestammer: nr. 2, 13, 17 og 21. Nr. 21 ble valgt som ny EPS- da stamme nr. 15 viste lite pH-reduksjon etter fermentering.

Det ble gjennomført analyser på mikrobiell vekst, pH, kromatografisk analyse for organiske syrer og karbohydrater, samt reologiske analyser for å undersøke elastisitet, fasthet, tøyning og styrke, samt om prøvene hadde trådtrekkende egenskaper og viskositetsmålinger. Analysene ble gjennomført ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering ved 22°C.

4.2.1 Mikrobiell vekst

Prøvene ble plattet ut ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. For E02S og E02U økte celletall med 3,00 log kde/g etter fermentering. E13S og E13U hadde celletalløkning på 2,8 log kde/g etter fermentering. E17S og E17U hadde økning i celletall på 3,00 og 3,11 log kde/g etter fermentering. Og E21S og E21U hadde celletalløkning på 2,77 og 2,93 log kde/g etter fermentering. Det var ingen signifikant forskjell i celletall før fermentering for prøver med og uten tilsatt sukrose som var inkubert med samme stamme, det var heller ingen signifikant forskjell i celletall etter fermentering for S- og U-prøver inokulert med de samme stammene som vist med signifikansnivå ($p < 0,05$) i tabell 8. Det var derimot signifikant forskjell i celletall før og etter fermentering. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 3.

Tabell 8. Gjennomsnittlig celletall (log kde/g) av mikrobiell vekst på MRS-agar før (T0) og etter fermentering (T24) i ertemos (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) ved 30°C. Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76, 13 - *P. pentosaceus* TM152, 17 - *Lb. fermentum* TM336, og 21 - *Leu. citreum/holzapfelii* GK45. Celletall oppgitt her er gjennomsnittsverdier av 3 gjentak, se vedlegg 2, og er oppgitt med standardavvik. Bokstaver i superskrift viser signifikante forskjeller ved signifikansnivå ($p < 0,05$).

Prøve	Celletall (log kde/g)	
	T0	T24
E02S	5,89±0,01 ^{cd}	8,89±0,07 ^a
E02U	5,88±0,03 ^{cd}	8,85±0,04 ^a
E13S	6,00±0,01 ^c	8,77±0,06 ^{ab}
E13U	5,98±0,04 ^c	8,81±0,08 ^a
E17S	5,78±0,02 ^d	8,78±0,02 ^{ab}
E17U	5,79±0,03 ^d	8,90±0,05 ^a
E21S	5,86±0,09 ^{cd}	8,63±0,00 ^b
E21U	5,85±0,08 ^{cd}	8,78±0,06 ^{ab}

4.2.2 pH

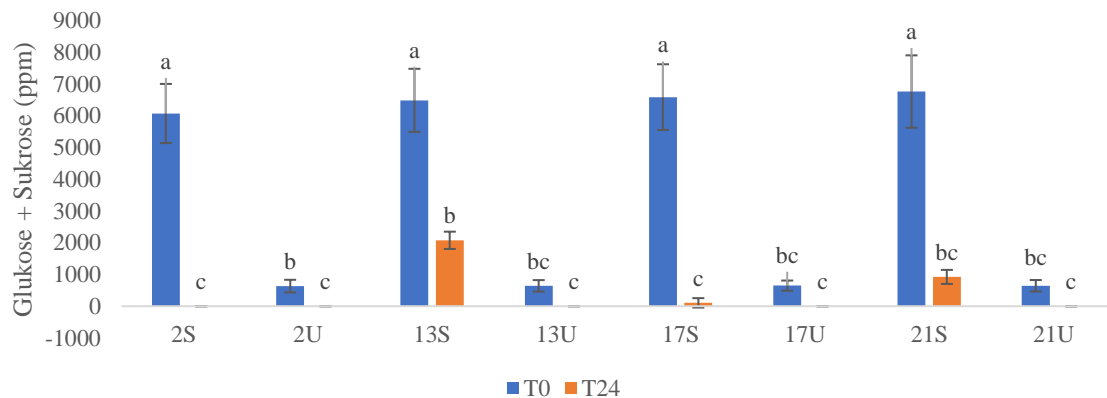
pH ble målt i prøvene ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. For alle stammene var reduksjon i pH sterkere i prøver med sukrose, enn i prøver uten sukrose, som vist i tabell 9. Gjennomsnittlig pH-reduksjon i prøver tilsatt sukrose og uten sukrose var henholdsvis 1,29 og 0,97 pH-enheter. Det var signifikant forskjell i pH etter fermentering mellom S- og U-prøver fermentert med samme stamme. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 4. Signifikant størst pH-reduksjon viste prøven E21S med pH-reduksjon på 1,44 pH-enheter, fulgt av E13S og E02S med pH-reduksjon på henholdsvis 1,32 og 1,28 pH-enheter. Minst pH-reduksjon ble observert i prøve E17U, E21U og E02U med henholdsvis 0,89, 0,93 og 0,95 pH-enheter. Blant S-prøver hadde E17S minst reduksjon på 1,13 pH-enheter, og blant U-prøver hadde E13U størst reduksjon på 1,11 pH-enheter.

Tabell 9. Gjennomsnittlig endring under fermentering vist ved pH før (T0) og etter fermentering (T24) i erter (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U). Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76, 13 - *P. pentosaceus* TM152, 17 - *Lb. fermentum* TM336, og 21 - *Leu. citreum/holzapfelii* GK45. Gjennomsnittlig pH fra 3 gjentak, se vedlegg 2, og oppgitt med standardavvik. Bokstaver i superskrift signifikante forskjeller ved signifikansnivå ($p < 0,05$).

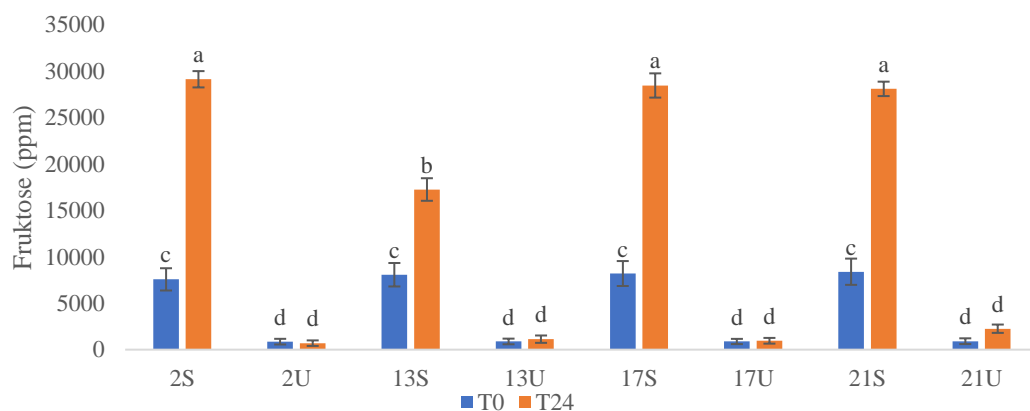
Prøve	pH	
	T0	T24
E02S	6,13 ± 0,02 ^a	4,85 ± 0,02 ^{de}
E02U	6,12 ± 0,03 ^a	5,17 ± 0,12 ^{bc}
E13S	6,13 ± 0,04 ^a	4,81 ± 0,03 ^e
E13U	6,12 ± 0,04 ^a	5,01 ± 0,06 ^{cd}
E17S	6,08 ± 0,04 ^a	4,95 ± 0,06 ^{de}
E17U	6,13 ± 0,02 ^a	5,23 ± 0,05 ^b
E21S	6,08 ± 0,04 ^a	4,64 ± 0,00 ^f
E21U	6,11 ± 0,03 ^a	5,17 ± 0,03 ^{bc}

4.2.3 Organiske syrer og karbohydrater

Sukrose som var tilsatt i prøvene omdannes til glukose ved analysen som ble benyttet, innholdet rapporteres derfor samlet som GluSuk. GluSuk-innhold ble målt ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Som vist på figur 11 var GluSuk-innhold høyest i prøver tilsatt sukrose, rundt 6066-6752 ppm ved T0. GluSuk-nivået på prøver uten tilsatt sukrose lå på 633-647 ppm ved T0. Ved T24 var GluSuk-innholdet i alle U-prøver ikke-detekterbart, det gjaldt også E02S. Etter fermentering hadde E13S et GluSuk-innhold på 2074 ppm, E21S hadde GluSuk-innhold på 922 ppm, og E17S innhold på ca. 100 ppm. Det var signifikant forskjell i GluSuk-innhold ved T0 mellom prøver med og uten sukrose. Det var signifikant forskjell på GluSuk-innhold ved T24 for E13S og E17S, men ingen signifikant forskjell mellom 13S:21S eller 17S:21S ved T24. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 5.

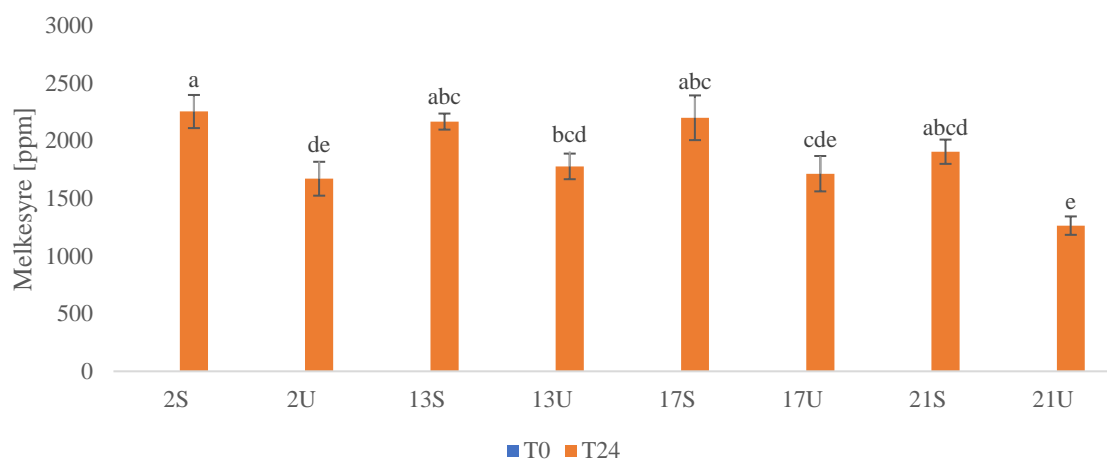


Figur 11. Samlet glukose- og sukroseinnhold i prøvene før (T0) og etter fermentering (T24) i erter (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) for fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Bokstaver a-c viser hvilke prøver som er/ikke er signifikant forskjellig fra hverandre ved signifikansnivå $p < 0,05$.



Figur 12. Fruktoseinnhold i prøvene før (T0) og etter fermentering (T24) i erter (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) for fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Bokstaver a-d viser hvilke prøver som er/ikke er signifikant forskjellig fra hverandre ved signifikansnivå $p < 0,05$.

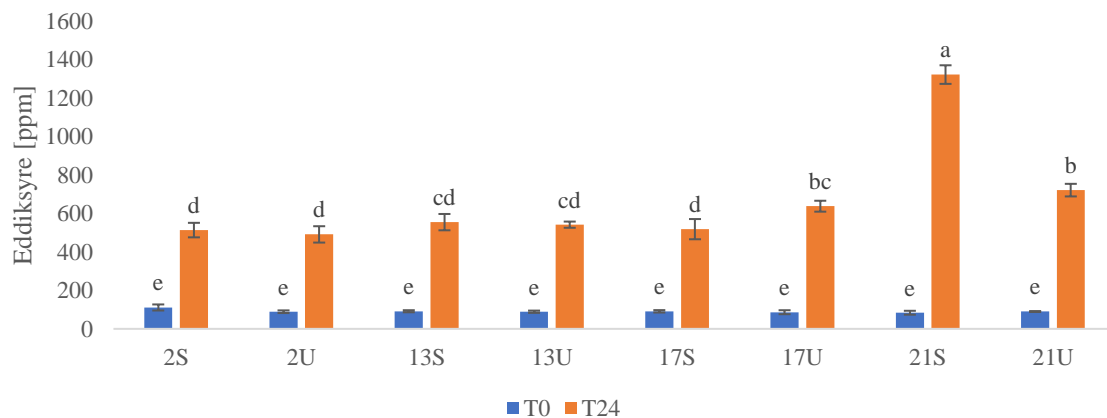
Fruktoseinnhold ble målt ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. I alle prøvene, med unntak av E02U, var fruktoseinnholdet høyere ved T24 enn ved T0 som vist på figur 12. Fruktoseinnholdet til U-prøvene ved T0 var rundt 880-900 ppm, og for S-prøvene var innholdet ved T0 rundt 8000 ppm. Ved T24 var det høyest fruktoseinnhold i E02S, E17S og E21S på henholdsvis 28113 ± 877 , 28445 ± 1306 , og 28080 ± 778 ppm. Det var ikke signifikant forskjell mellom disse tre prøvene, men ved T24 hadde 13S signifikant lavere fruktoseinnhold enn de andre S-prøvene med 17244 ± 1215 ppm. For U-prøvene var det ingen signifikant forskjell i fruktoseinnhold ved T0 og T24, eller for de ulike stammene. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 6.



Figur 13. Melkesyreinnhold i prøvene før (T0) og etter fermentering (T24) i ertre (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) for fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Bokstaver a-e viser hvilke prøver som er/ikke er signifikant forskjellig fra hverandre ved signifikansnivå $p < 0,05$.

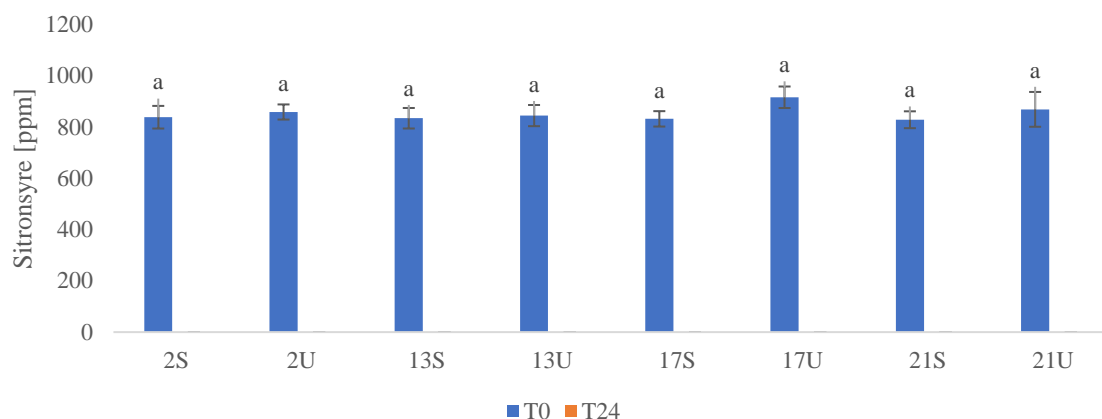
Melkesyreinnhold ble analysert ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Innhold av melkesyre ved T0 var ikke detekterbart som vist på figur 13. Ved T24 var det høyest melkesyreinnhold i E02S, E17S, E13S og E21S, med henholdsvis $2254 \pm 143,73$, $2200,35 \pm 194,02$, $2167,28 \pm 69,77$ og $1905,64 \pm 105,39$ ppm. Det var ingen signifikant forskjell mellom S-prøvene. Melkesyreinnholdet i U-prøvene var noe lavere enn i S-prøvene som vist på figur 13. Lavest melkesyreinnhold var det i E22U med $1264,33 \pm 79,79$ ppm. Det var ingen signifikant forskjell mellom E02U, E13U og E17U, hvor disse hadde et melkesyreinnhold på henholdsvis $1671,33 \pm 146,98$, $1778,22 \pm 111,14$ og $1715,13 \pm 153,5$ ppm. Ved fermentering med stamme 2 og 21 var det signifikant forskjell mellom S- og U-prøver, men ikke for prøver fermentert med stamme 13 og 17 som vist på figur 13. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 7.

Eddiksyreinnhold ble analysert ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Ved T0 var eddiksyreinnholdet i prøvene mellom $83,75 \pm 10,12$ og $111,18 \pm 15,73$ ppm, og lavest innhold ble analysert i E21S og høyest i E02S som vist på figur 14. Det var ingen signifikant forskjell ($p < 0,05$) i eddiksyreinnhold i de 8 prøvene ved T0. Ved T24 var det en økning i eddiksyreinnhold i alle prøvene. Høyest eddiksyreinnhold ved T24 hadde E22S fulgt av E22U med henholdsvis $1321,87 \pm 48,31$ og $721,24 \pm 32,74$ ppm. Det var ingen signifikant forskjell mellom E02S, E02U, E13S, E13U og E17S ved T24, der disse hadde de laveste eddiksyreinnholdene ved T24 og varierte mellom $491,1 \pm 42,5$ og $554,79 \pm 42,46$ ppm. Prøve 17U ved T24 inneholdt $637,58 \pm 28,37$ ppm eddiksyre, og dette var ikke signifikant fra E21U, E13S eller E13U. Det var derimot signifikant forskjell mellom 21U og 13S/13U som vist på figur 14. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 8.



Figur 14. Eddiksyreinnhold i prøvene før (T0) og etter fermentering (T24) i ertre (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) for fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Bokstaver a-d viser hvilke prøver som er/ikke er signifikant forskjellig fra hverandre ved signifikansnivå $p < 0,05$.

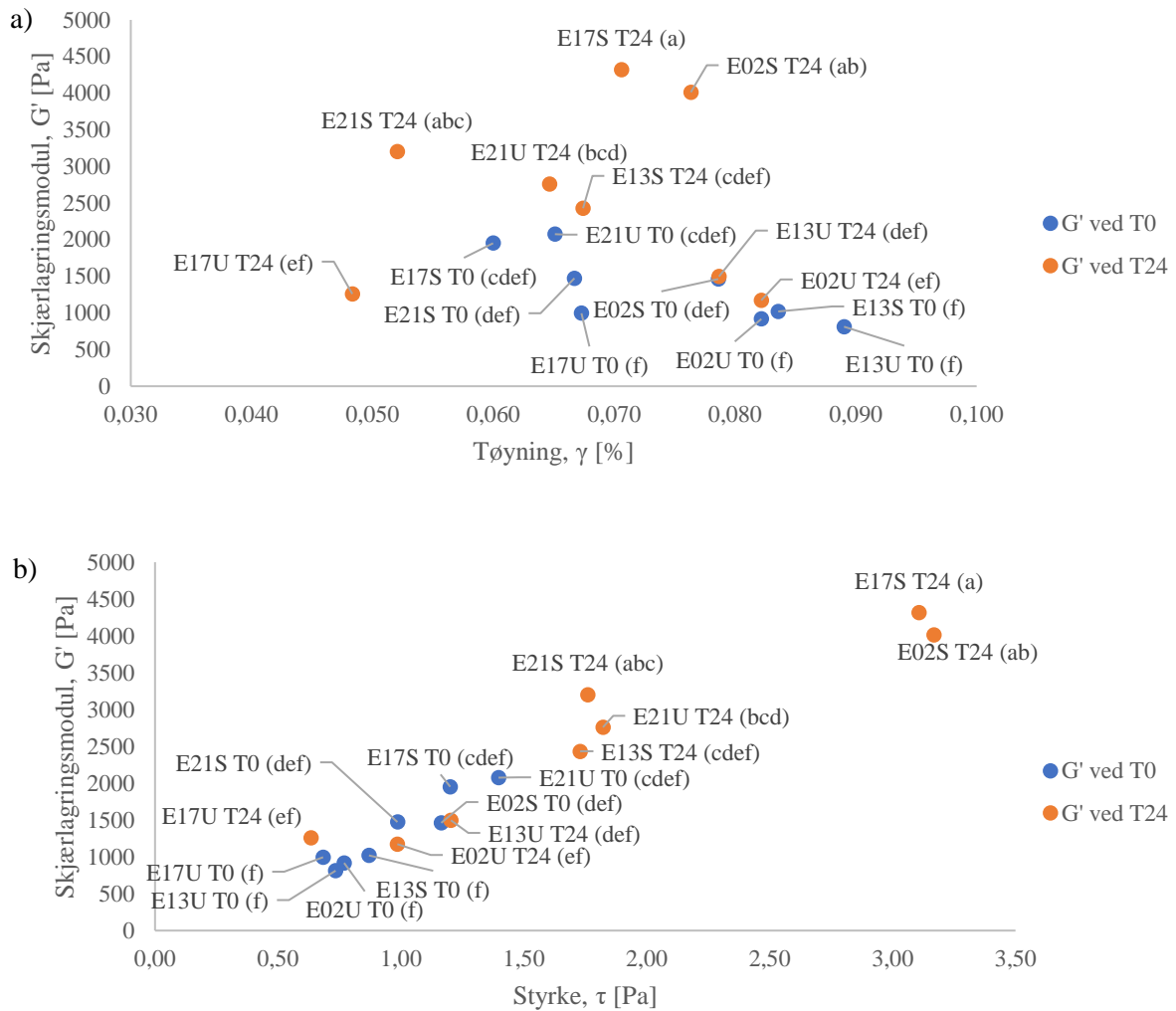
Innhold av sitronsyre ble målt ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Sitronsyreinnhold ved T0 lå mellom $828,06 \pm 32,83$ og $915,73 \pm 41,96$ ppm. Det var ingen signifikant forskjell på sitronsyreinnholdet mellom de 8 prøvene som vist på figur 15. For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 9. Det ble ikke detektert sitronsyre i prøvene etter fermentering.



Figur 15. Sitronsyreinnhold i prøvene før (T0) og etter fermentering (T24) i erters (E) med sukrose (S) og uten sukrose (U) for fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Bokstaver viser til signifikansnivå, her var det ingen signifikant forskjell i sitronsyreinnholdet mellom prøvene ved signifikansnivå ($p < 0,05$).

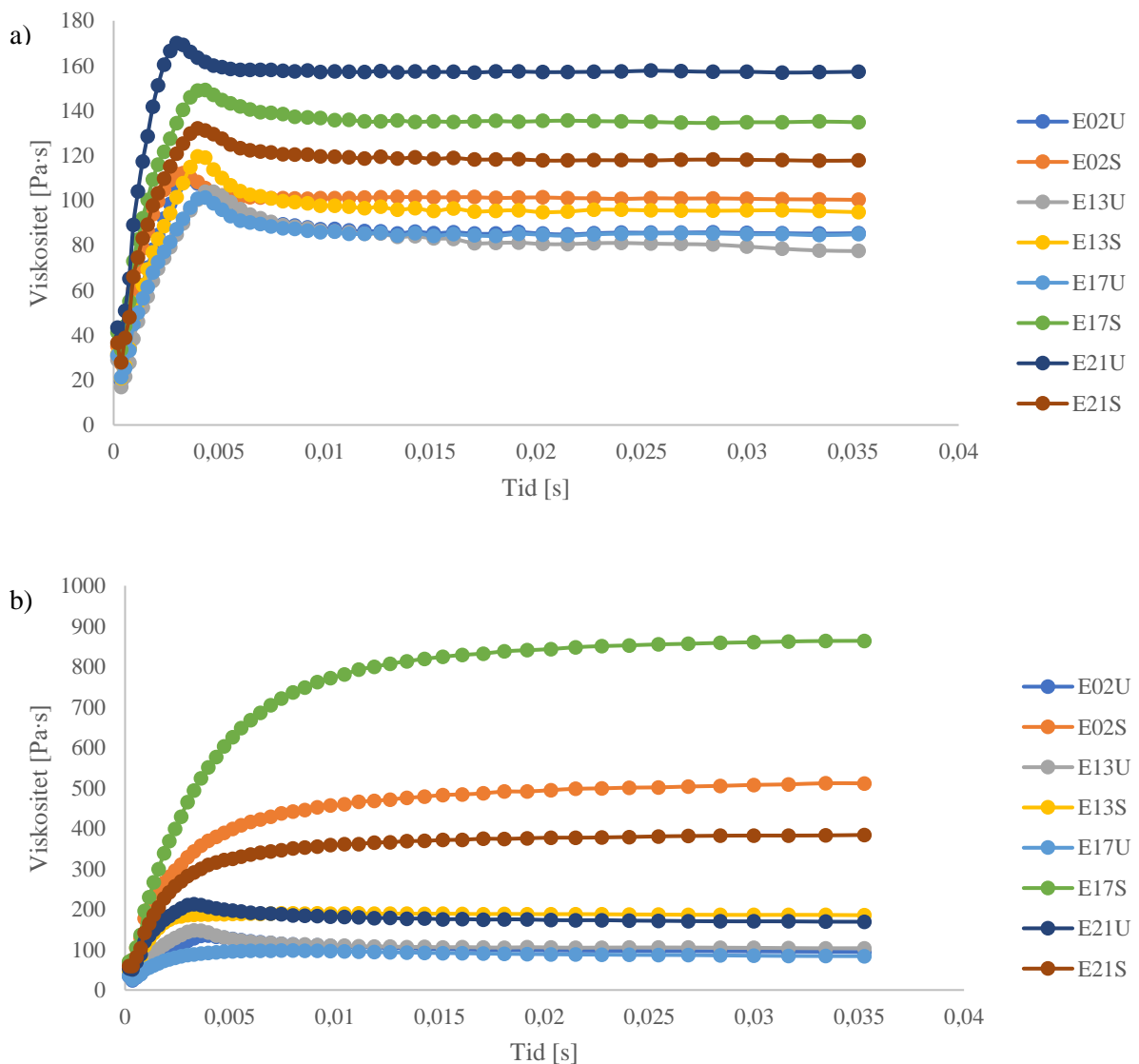
4.2.4 Teksturanalyser av fermentert ertemos med utvalgte stammer til metabolismeforsøk

LVER ble analysert for ertemos med og uten sukrose ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Figur 16 viser gjennomsnittlig LVER for ertemos ved T0 og T24, og med og uten sukrose. Høyest G' hadde E17S, E02S og E21S etter fermentering på henholdsvis 4317, 4013 og 3201 Pa, det var ingen signifikant forskjell på disse tre. E17S og E02S ved T24 hadde høyest styrke rundt 3,1 Pa som vist på figur 16b. Det var signifikant forskjell på G' for alle prøvene som var tilsatt sukrose før og etter fermentering, med unntak av E13S. Det var ingen signifikant forskjell på G' for prøver uten sukrose før og etter fermentering (signifikansnivå f). Det var økning i styrke etter fermentering for alle prøver med unntak av E17U, økningen var størst for prøver som var tilsatt sukrose. Tøyning var uforandret for E02U og E21U etter fermentering (0,082% og 0,065%), for E17S økte tøyning etter fermentering (fra 0,060 til 0,071%), for de resterende prøvene ble tøyning redusert etter fermentering som vist på figur 16a. For inndeling av signifikante forskjeller for G' på signifikansnivå ($p < 0,05$), se vedlegg 10.



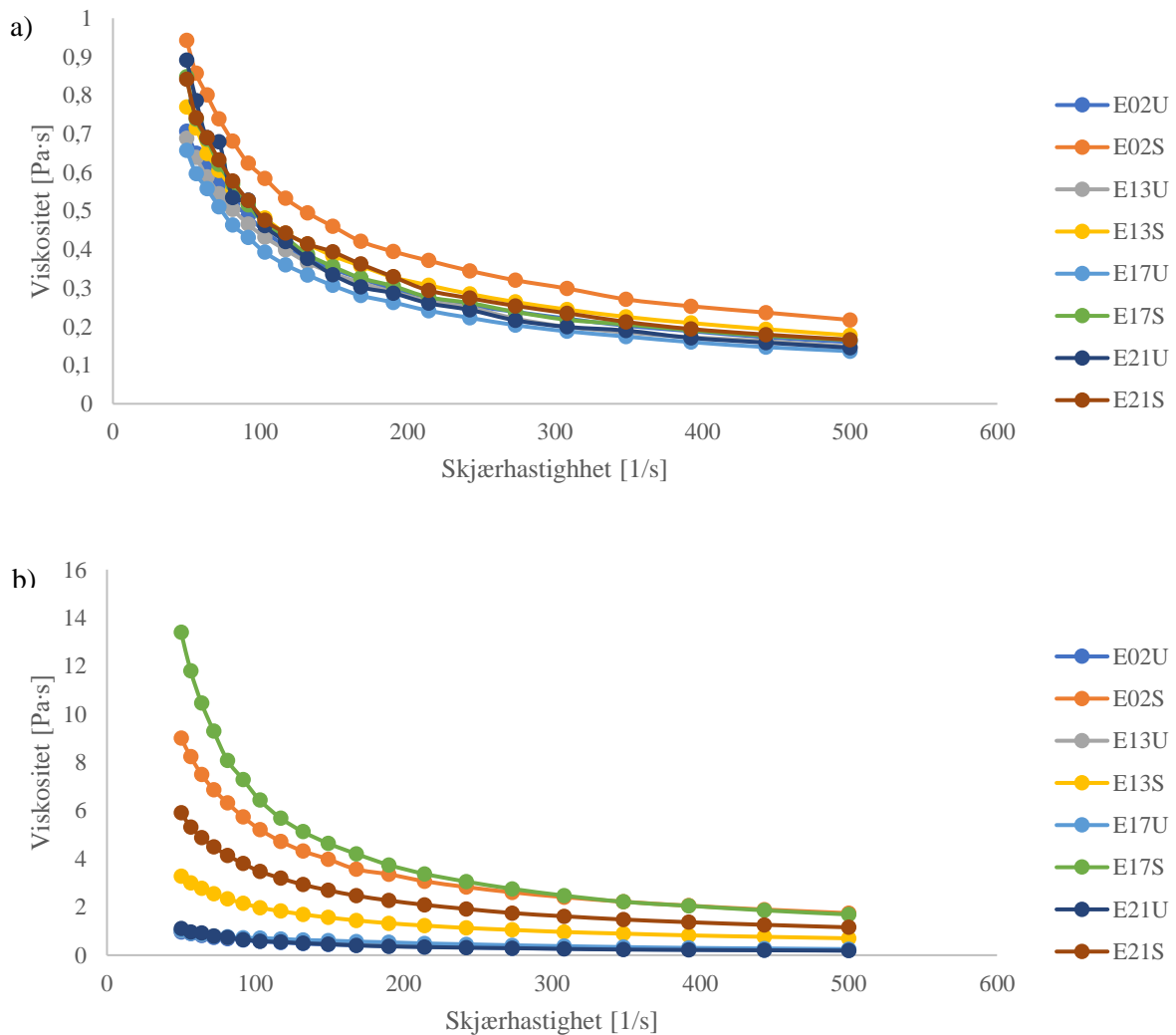
Figur 16. Gjennomsnittlig LVER med skjærlagringsmodul (G') som funksjon av (a) tøyning og som funksjon av (b) styrke for ertemos før (T0) og etter fermentering (T24). Prøvene var enten tilsatt sukrose (S) eller var uten sukrose (U). Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzapfelii* GK45. Blå= G' ved T0, oransje= G' ved T24. Etikett ved punkter viser til prøven og bokstav i parentes viser til signifikante forskjeller for G' ved signifikansnivå $p < 0,05$.

SRT ble gjennomført for ertemosprøver ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Figur 17 viser resultat for SRT ved T0 (figur 17a) og ved T24 (figur 17b). Ved T0 fikk samtlige prøver "overshoot". Ved T24 fikk prøver uten tilsatt sukrose "overshoot". Derimot hadde prøvene som var tilsatt sukrose ikke "overshoot". Ved T24 hadde E17S høyest viskositet rundt 800 Pa·s, fulgt av E02S, E21S og E13S med henholdsvis ca. 450, 350, og 170 Pa·s. Prøver uten tilsatt sukrose hadde tilnærmet lik viskositet ved T0 og T24 (rundt 80-170 Pa·s). Ved T0 hadde alle prøver viskositet <180 Pa·s.



Figur 17. SRT kurve for ertemos med og uten sukrose (a) før og (b) etter fermentering. Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzapfelii* GK45. Merk endring på y-akse (a) før og (b) etter fermentering.

Rotasjonsmlinger ble gjennomført ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering. Figur 18 viser resultat fra rotasjonstest ved T0 (figur 18a) og ved T24 (figur 18b). Ved T24 hadde E17S høyest viskositet ved start (skjærhastighet på 50 s^{-1}) på $13,4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, fulgt av E02S, E21S og E13S med henholdsvis $9,0$, $5,91$, og $3,29 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Det var signifikant forskjell i disse ved start som vist i tabell 10. Ved T0 hadde alle prøver viskositet $>1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Prøver uten tilsatt sukrose hadde lik viskositet ved T24 som ved T0. Det var ingen signifikant forskjell i viskositet ved skjærhastighet= 50 s^{-1} for prøver uten tilsatt sukrose ved T24 i forhold til T0 som vist i tabell 10. Viskositet ved skjærhastighet= 500 s^{-1} var signifikant høyest for E02S og E17S på $1,75$ og $1,69 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, fulgt av E21S og E13S på $1,16$ og $0,70 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Det var ingen signifikant forskjell på viskositet ved skjærhastighet= 500 s^{-1} for prøver uten tilsatt sukrose i forhold til før fermentering ($0,15$ - $0,25 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). For inndeling av signifikante forskjeller på signifikansnivå ($p<0,05$), se vedlegg 11 og 12.



Figur 18. Viskositet (a) før fermentering (T0) og (b) etter fermentering (T24) for ertemos med sukrose (S) og uten sukrose (U). Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45. Merk endring på y-akse (a) før og (b) etter fermentering.

Tabell 10. Viskositet ved skjærhastighet 50 s^{-1} og 500 s^{-1} før (T0) og etter fermentering (T24) for ertemos med og uten tilsatt sukrose. Det ble benyttet fire ulike stammer: 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceous* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzapfelii* GK45. Bokstaver i superskript viser signifikante forskjeller ved signifikansnivå $p < 0,05$.

Prøve	Viskositet ved skjærhastighet = 50 1/s [Pa·s]		Viskositet ved skjærhastighet = 500 1/s [Pa·s]	
	T0	T24	T0	T24
E02S	0,94 ^e	9,00 ^b	0,22 ^d	1,75 ^a
E02U	0,71 ^e	0,96 ^e	0,16 ^d	0,19 ^d
E13S	0,77 ^e	3,29 ^d	0,18 ^d	0,70 ^c
E13U	0,69 ^e	1,02 ^e	0,15 ^d	0,21 ^d
E17S	0,85 ^e	13,4 ^a	0,17 ^d	1,69 ^a
E17U	0,66 ^e	1,04 ^e	0,14 ^d	0,25 ^d
E21S	0,84 ^e	5,91 ^c	0,17 ^d	1,16 ^b
E21U	0,89 ^e	1,12 ^e	0,15 ^d	0,19 ^d

4.3 Burgerforsøk

For å undersøke hvordan *in situ* produsert EPS påvirket vanntap og tekstur til fermentert ertemos under varmebehandling ble det gjennomført analyse av vanntap ved steking i stekepanne og analyse av LVER etter varmebehandling i reometer. Det ble benyttet to burgermikser med ulikt innhold av fermentert og ikke-fermentert ertemos, samt en kontrollprøve uten fermentert ertemos, henholdsvis burgermikser A, B og C. Burgermikser A bestod av 50/50 fermentert og ikke-fermentert ertemos, B bestod av 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos, og C bestod av bare ikke-fermentert ertemos (til kontroll). Fermentert ertemos var tilsatt sukrose [5%] og inokulert med stamme nr. 17 - *Lb. fermentum* TM336.

4.3.1 Vanntap

For å undersøke bakterievekst i de fermenterte delene av burgermikser A og B (henholdsvis 50/50 og 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos) ble pH målt før og etter fermentering. Som vist i tabell 11 ble pH redusert ca. 1 pH-enhet for både ertemos A og B. Både A og B var tilsatt sukrose [5%] og inokulert med bakteriestamme nr. 17 - *Lb. fermentum* TM336.

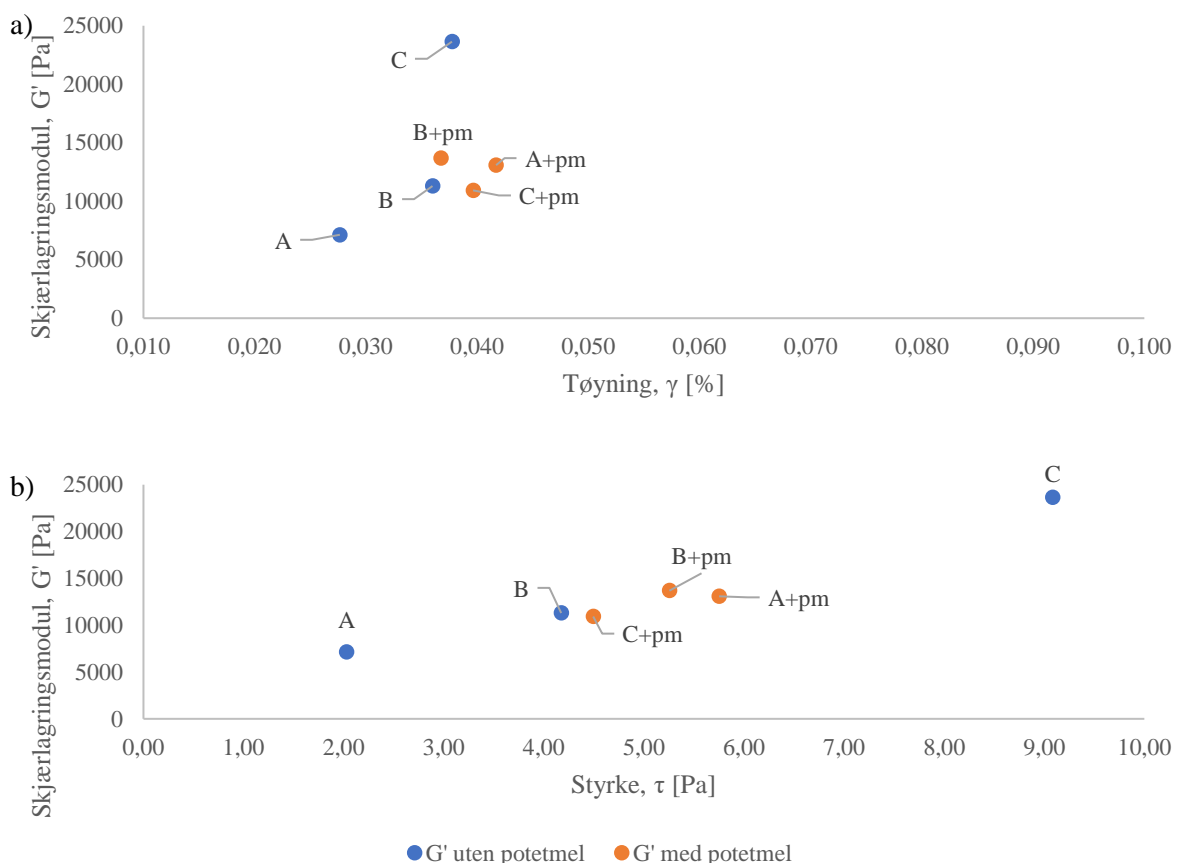
Tabell 11. pH før (T0) og etter fermentering (T24) for fermentert ertemos A og B. Både A og B bestod av ertemos tilsatt sukrose [5%] og inokulert med stamme nr. 17 - *Lb. fermentum* TM336.

	T0	T24
A	6,02	5,00
B	6,04	5,00

For å undersøke vanntap under steking ble det stekt 3 burgere av hver burgermikser i stekepanne. Under prøvesteking hold ikke prøvene formen og fløt utover pannen. Dermed ble det tilsatt potetmel for å binde mer vann [ca. 15 g potetmel per 300 g av hver burgermikser]. For hver av burgermikserne, A, B og C, ble det stekt 3 prøver på ca. 85 g. Gjennomsnittlig vanntap for burgermikserne A, B og C med tilsatt potetmel var henholdsvis $20,0 \pm 2,2\%$, $26,3 \pm 6,1\%$ og $32,9 \pm 3,0\%$. For vekt før og etter steking, samt beregning av vanntap, se vedlegg 13.

4.3.2 Teksturanalyser for burgerforsøk

Burgermiksen A, B og C ble varmebehandlet opp til 160°C i reometeret så nedkjølt til 20°C, direkte etter varmebehandling ble det gjennomført "amplitude sweep" analyse på prøvene for å undersøke LVER til burgermiksen. Figur 19 viser LVER for varmebehandlet burgermiksen A, B og C med og uten potetmel (henholdsvis oransje og blå markeringer). Burgermiksen A bestod av 50/50 fermentert og ikke-fermentert ertemos, B bestod av 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos, og C bestod av bare ikke-fermentert ertemos (til kontroll). For burgermiksen uten potetmel hadde C høyest G' fulgt av B og A (23 kPa, 11 kPa og 7 kPa). Med hensyn til tøyning, som vist på figur 19a, hadde C høyest, fulgt av B og A (0,038%, 0,036% og 0,028%). Med hensyn til styrke, som vist på figur 19b, hadde C høyest, fulgt av B og A (9,08 Pa, 4,17 Pa og 2,03 Pa). For burgermiksen med potetmel (+pm) hadde B høyest G' , fulgt av A og C (13,6 kPa, 13,0 kPa og 10,9 kPa). Med hensyn til tøyning hadde A+pm høyest, fulgt av C+pm og B+pm (0,41%, 0,40% og 0,37%). Med hensyn til styrke hadde A+pm høyest, fulgt av B+pm og C+pm (5,75 Pa, 5,25 Pa og 4,49 Pa).



Figur 19. LVER med skjærlagringsmodul (G') som funksjon av (a) tøyning og som funksjon av (b) styrke for varmebehandlede burgermikser A, B og C med og uten potetmel. A bestod av 50/50 fermentert og ikke fermentert ertemos, B bestod av 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos, og C bestod av bare ikke-fermentert ertemos. Den fermenterte ertemosen var tilsatt sukrose [5%] og inokulert med stamme nr. 17 - *Lb. fermentum* TM336. Blå=uten potetmel, oransje=med potetmel (+pm).

5. Diskusjon

I denne oppgaven ble det undersøkt hvordan fermentering med exopolysakkarid (EPS)-produserende melkesyrebakterier (MSB) kan påvirke tekstur, samt pH og metabolitter i et burgerlignende produkt produsert av ertemos. Hensikten var å se om *in situ* produsert EPS kan påvirke teksturen til en platebasert burger, og om dette kan være et alternativ til bruk av teksturgivende tilsetningsstoffer og en mer skånsom prosesseringsmetode i forhold til plantebaserte burgere som er laget av ekstrudert planteprotein og tilsatt stabilisatorer.

Det ble gjort mikrobiologiske analyser for å screene en rekke MSB for EPS-produksjon, samt undersøke vekst og metabolisme i erte- og linsemos laget av henholdsvis hermetiske ertes og hermetiske linser. Fra EPS-screeningen ble ti stammer valgt ut til videre forsøk. Det ble undersøkt hvordan tilsetning av sukrose påvirket vekst, ved å se på endringer i pH-reduksjon og tekstur, i erte- og linsemosene. Reologiske analyser ble gjennomført for å undersøke tendenser i teksturforskjeller (viskositet, styrke, tøyning, og trådrekkende egenskaper) til erte- og linsemos fermentert med og uten sukrose med de ti utvalgte stammene.

Videre ble fire MSB benyttet i et metabolismeforsøk med fermentert ertemos, med sukrose og uten sukrose. I tillegg til metabolismeforsøket ble det gjennomført reologiske analyser. Metabolismeforsøk og reologiske analysene ble gjennomført for å undersøke endringer i cellevekst, pH og organiske syrer og karbohydrater, samt endringer i tekstur før og etter 24 timers fermentering med sukrose og uten tilsatt sukrose.

Fra dette ble én EPS+ stamme benyttet til et burgerforsøk. Denne stammen viste god vekst i ertemos med tilsatt sukrose, samt viste den tegn til å ha trådtrekkende egenskaper, og en tekstur med høy viskositet og styrke. Til burgerforsøk ble ulike mengder fermentert ertemos benyttet i tre burgermikser, inkludert en kontrollprøve uten fermentert ertemos. Disse ble undersøkt for vanntap under steking, samt ble de undersøkt for elastisitet, styrke og tøyning etter varmebehandling i reometer.

5.1 Innledende forsøk

Screening av EPS produksjon blant de 45 selekterte MSB resulterte i 17 EPS+ stammer i tillegg til referansestammen, og 27 EPS- stammer. For å bli karakterisert som EPS+ måtte stammene produsere slim eller slimaktige bløte kolonier (Manini et al., 2016). Eventuelt måtte koloniene danne tråder på ≥ 5 mm når kolonien ble rørt med en podenål (Ruas-Madiedo and de los Reyes-Gavilán, 2005). Blant de EPS+ prøvene dannet 15 stammer store bløte kolonier

slik som referansestammen, 2 stammer dannet et tyunnflytende slimlag, og 1 stamme dannet små trådtrekkende kolonier.

Fra disse 17 EPS+ stammene ble ni stammer valgt ut til videre forsøk, samt 1 EPS-. Dette ble gjort for å se hvordan de ulike stammene tilhørende ulike arter og slekter ville påvirke en belgvekstmos, her fra hermetiske erter og hermetiske linser, med hensyn til pH og tekstur.

pH-reduksjon var noe høyere i ertemos enn i linsemos, hvor ertemos med og uten tilsatt sukrose hadde en gjennomsnittlig pH-reduksjon på henholdsvis $1,29 \pm 0,52$ og $1,02 \pm 0,43$ pH-enheter og linsemos med og uten sukrose hadde pH-reduksjon på henholdsvis $1,12 \pm 0,43$ og $0,55 \pm 0,32$ pH-enheter. Forskjellen i pH-reduksjon var mindre mellom prøver med og uten tilsatt sukrose for ertemos enn for linser. Dette er trolig grunnet erters naturlige innhold av sukker. Som vist på varedeklarasjonene inneholdt erter 3,6% sukkerarter. Linser, derimot, inneholdt bare 0,7% sukkerarter.

De reologiske analysene, særlig LVER, viste varierende resultater for fermentert erte- og linsemos. Det var forventet høyere viskositet, skjærlagringsmodul (G') og styrke i prøver med tilsatt sukrose enn i prøver uten sukrose (Xu et al., 2019, Katina et al., 2009, Juvonen et al., 2015). For ertemos viste flere av prøvene tegn til dette, hvor E19S, E22S, E06S og E13S hadde høyere styrke og G' enn de andre ertemosprøvene, med unntak av E02U og E13Ux som hadde høy G' . Det er trolig at de to sistnevnte prøvene ikke var homogene og at hele erter ble med i prøvemateriale som ble analysert, noe som kan forklare de høye verdiene på disse to prøvene i alle de tre reologiske analysene. Prøver uten tilsatt sukrose viste ingen tegn til trådtrekkende egenskaper ettersom alle fikk "overshoot" under "step rate" testen, som forklart av Narvhus et al. (2019). Derimot viste for eksempel E17S, E02S og E13S tegn til trådtrekkende egenskaper ettersom disse ikke fikk "overshoot" (Narvhus et al., 2019). Det ble også observert høyere viskositet i prøver som var tilsatt sukrose enn i prøver uten tilsatt sukrose. Disse teksturendringene var som forventet basert på resultater fra lignende forsøk med EPS-produserende MSB i gulrotpuré og deig av fababønnemel med og uten tilsatt sukrose (Juvonen et al., 2015, Xu et al., 2019).

Ved tillaging av linsemos ble det beregnet 80 mL vann per 230 g linser, som skulle tilsvare forholdet mellom erter og vann i ertemos. Under beregning ble det benyttet feil mengde erter, så faktisk mengde vann som skulle vært brukt i linsemos var 110 mL. Dermed ble det tilsatt ca. 28% mindre vann i linsemos enn i ertemos. I tillegg har linser mindre volum og større overflate enn erter, samt hadde de hermetiske linsene høyere tørrstoffinnhold enn de

hermetiske ertene, henholdsvis 20,8g/100g og 12,5 g/100 g (beregnet ut ifra næringsinnhold på varedeklarasjon til produktene). Det høye tørrstoffinnholdet, samt redusert vannmengde i linsemos førte til en lite homogen mos med mange hele linser. Dette påvirket trolig ikke pH- endring ved fermentering, men det fikk store konsekvenser under de reologiske analysene. For en av prøvene, L06U, måtte måleposisjon under de reologiske analysene settes til 2 mm istedenfor 1 mm på grunn av hele linser i prøven. Innholdet av hele linser i flere prøver, spesielt L06U, førte til feil i reologianalysene. For eksempel hadde LVER til L06U høyest G' og styrke av linseprøvene, og L06U fikk også høyest viskositet på SRT av alle linseprøvene og høyere viskositet på rotasjonstest enn de andre linsemosprøvene uten tilsatt sukrose. Dette stemte ikke overens med forventningene eller resultatene for ertemos, og det var ingen tydelig sammenheng i LVER og innhold av sukrose for fermentert linsemos slik som det var for ertemos.

5.2 Metabolisme og teksturanalyser

Stamme nr. 2 *W. confusa*, nr. 13. *P. pentosaceus*, nr. 17. *Lb. fermentum* og nr. 21 *Leu. citreum/holzapfelii* ble valgt ut til metabolismeforsøk. Nr. 2, 13 og 17 som EPS+ på bakgrunn av deres pH-reduksjon samt ulike teksturelle egenskaper. Alle tre viste trådtrekkende egenskaper på SRT med tre nivå av viskositet, hvor nr. 17 hadde høyest viskositet, fulgt av nr. 13 og 2. Nr. 21 ble valgt ut som en EPS- stamme ettersom stamme nr. 15 som var EPS- i innledende forsøk på erte- og linsemos, viste dårlig pH-reduksjon etter fermentering.

Det ble tidlig vist at nr. 21 var EPS+ da pH ble kraftig redusert og prøven som var tilsatt sukrose fastnet i tekstur etter fermentering. Denne stammen ble under EPS screeningen kategorisert som EPS-. Under screeningen ble to og to stammer strøket ut på samme MRS+sukroseagar skål (delt i to). Under dette forsøket så det ut som om stamme nr. 22 som var på samme skål «tok over» skålen, noe som gjorde stamme 21 sin vekst lite tydelig. Derfor ble nr. 21 kategorisert som EPS-. Dette viste i ettertid seg å ikke stemme, og var ikke overraskende da nr. 21 var én av seks *Leu. citreum/holzapfelii* isolert fra bygg, hvor de fem andre var EPS+. Det burde blitt utført gjentak eller paralleller under screening for EPS-produksjon for å sikre at stammene ble korrekt kategorisert.

5.2.1 Celletall og pH

For å undersøke bakterievekst i ertemos med og uten sukrose ble det utført analyse av celletall og pH før og etter fermentering. Det var ingen signifikant forskjell i cellevekst blant prøver som var fermentert med samme stamme med eller uten sukrose. Dette var som forventet da

selve celleveksten ikke er avhengig av den ekstra sukrosen ettersom det allerede er karbohydrater og sukkerarter nativt til stede i ertene som bidrar til vekst og metabolisme hos bakteriene. Det samme har tidligere blitt vist i fermenteringsforsøk med EPS-produserende bakterier i deig laget av fababønnemel med og uten tilsatt sukrose, hvor det heller ikke var signifikant forskjell i cellevekst (Xu et al., 2019, Xu et al., 2017).

Det var derimot en tydelig økt syreproduksjon i prøvene med tilsatt sukrose. Det var signifikant forskjell i pH etter fermenteringen blant prøver med samme stamme, hvor den ene var tilsatt sukrose og den andre ikke. Dette ble også vist av Xu et al. (2019) hvor deig av fababønnemel som var tilsatt sukrose [5%] hadde en sterkere pH-reduksjon enn prøver uten tilsatt sukrose.

Stamme nr. 21 (*Leu. citreum/holzapfelii* GK 45), som viste seg å være EPS+, hadde signifikant sterkest reduksjon i pH. Dette kommer av den høye eddiksyreproduksjonen til stamme nr. 21, som antageligvis kommer av at dette var den eneste av de fire utvalgte MSB i metabolismeforsøket som tilhørte *Leuconostoc* slekten. Dette ettersom *Leuconostoc* er kjent for å produsere mer eddiksyre enn *Weisella* og *Lactobacillus* (Kandler, 1983).

5.2.2 Organiske syrer og karbohydrater

For å undersøke endringer i metabolitter under fermentering ble det utført High Performance Liquid Chromatography (HPLC) på ertemos før og etter fermentering. Ved HPLC var det ikke mulig å skille glukose og sukrose (GluSuk) innhold i prøvene, derfor ble det samlede innholdet av disse karbohydratene registrert i prøvene før og etter fermenteringen. Det var signifikant høyere innhold av GluSuk i prøvene som var tilsatt sukrose enn prøvene uten sukrose, med rundt 6066-6752 ppm, og det var rundt 633-647 ppm glukose i prøver uten tilsatt sukrose. Dette var som forventet ettersom prøvene med tilsatt sukrose hadde høyere innhold enn prøvene uten tilsatt sukrose.

Det samme ble observert med hensyn til fruktoseinnholdet i prøvene før fermenteringen hvor prøver uten tilsatt sukrose hadde et fruktoseinnhold rundt 880-900 ppm og prøver med tilsatt sukrose lå på rundt 8000 ppm. Med tanke på at sukrose er et disakkarid bestående av monomerene glukose og fruktose, er det grunn til å anta at tilsatsen av sukrose har hatt betydning for fruktoseinnholdet i prøvene ved T0. I begge tilfellene var innholdet i S-prøver ca. 10 ganger høyere enn for prøver uten tilsatt sukrose.

Etter fermentering var GluSuk-innholdet ikke detekterbart for prøver uten tilsatt sukrose eller E02S. Det var noe GluSuk igjen i E13S, E17S og E21S, som her gir grunn til å tro at *W. confusa* har vært mer effektiv i metaboliseringen av GluSuk enn de tre andre.

Etter fermentering økte fruktoseinnholdet i prøvene som var tilsatt sukrose. En økning i fruktose sammen med en reduksjon i GluSuk tyder på EPS-produksjon i form av glukkan som er et HoPS (Monsan et al., 2001). Prøvene E02S, E17S og E21S hadde høyest innhold av fruktose etter fermentering, og det var disse tre prøvene som også hadde høyest viskositet. Prøvene som ikke var tilsatt sukrose hadde svært lite fruktoseinnhold, både før og etter fermentering, noe som var forventet da de ikke var tilsatt sukrose og heller ikke endret konsistens etter fermentering. Juvonen et al. (2015), som undersøkte fermentering i gulrotpuré med EPS-produserende MSB, fikk den samme reduksjonen i sukrose og økningen i fruktose etter fermentering i sukroseanrikt gulrotpuré med dekstranproduserende MSB. De benyttet blant annet *W. confusa* og *Leu. citreum* til fermentering. Både *W. confusa* og *Leu. citreum* produserte dekstran i gulrotpuréen (Juvonen et al., 2015). Også Katina et al. (2009) rapporterte reduksjon i glukose og sukrose, samt økning i fruktose i surdeig fermentert med EPS-produserende *W. confusa* tilsatt sukrose, i kontroll uten tilsatt sukrose og med ikke EPS-produserende bakteriestamme var det observert lite eller ingen fruktose etter fermentering. I tillegg ble det funnet mer dekstran i surdeig fermentert med *W. confusa* med tilsatt sukrose i forhold til prøven uten tilsatt sukrose som var fermentert med samme stamme (Katina et al., 2009).

Melkesyreproduksjon var høyere for prøver tilsatt sukrose enn uten sukrose, dette ble også observert av Xu et al. (2019), men i denne oppgaven ble det ikke observert noen signifikant forskjell i melkesyre produsert av de ulike bakteriestammene slik som Xu et al. (2019) observert.

Alle prøvene hadde økt eddiksyreinnhold etter fermentering, hvor prøve E21S hadde signifikant høyere enn de andre. Dette var som forventet da stamme nr. 21 tilhører *Leuconostoc* slekten, og *Leuconostoc* spp. generelt produserer melkesyre og eddiksyre i ca. 1:1 forhold (Kandler, 1983). Stamme nr. 2, 13 og 17 hadde lik eddiksyreproduksjon. Dette var forventet fra stamme nr. 2 og 17 ettersom de er heterofermentative, men det var uventet fra nr. 13 som er homofermentativ. Men det har blitt vist at enkelte stammer av *P. pentosaceus* kan omgjøre sukker med fem karboner til eddiksyre, samt at enkelte *Pediococcus* spp. kan gjøre om sitrat til eddiksyre og oxaloacetat ved hjelp av sitratlyase (Wade et al., 2019). Det er mulig stamme nr. 13 er en slik stamme, men det krever videre forskning for å kunne bekreftes.

5.2.3 Tekstur

Det var ønsket å undersøke teksturforandring ved fermentering med sukrose og uten sukrose for de fire stammene benyttet i metabolismeforsøket. Skjærlagringsmodulen (G'), som er et mål for elastisitet, var relativt lik for alle prøvene før fermentering (T0). Etter fermentering (T24) var prøvene uten tilsatt sukrose relativt uforandret med hensyn til G' , men prøvene tilsatt sukrose hadde høyere G' enn ved T0. Prøvene E17S og E02S hadde høyest G' fulgt av E21S og E13S. Med hensyn til forholdet mellom GluSuk-innhold før og etter fermentering, fruktoseinnhold etter fermentering for disse fire prøvene, samt G' kan det antas at stamme nr. 17, 2 og 21 har produsert mer EPS enn stamme nr. 13. En høyere G' for fermenterte prøver tilsatt sukrose kan komme av interaksjoner mellom polysakkarider og proteiner i matrisen, altså av interaksjoner mellom EPS og proteiner i ertemosen (De Vuyst and Degeest, 1999, Spotti et al., 2013). Prøvene E02S og E17S hadde høyere styrke enn E13S og E21S. Dette kan komme av type og mengde EPS som ble produsert av de ulike stammene, men dette ble ikke undersøkt i denne oppgaven. Alle fire stammene kan produsere HoPS i form av dekstran, men *Leu. citreum* kan i tillegg produsere alternan og inulin (Korcz and Varga, 2021).

Prøver med tilsatt sukrose fikk også betydelig høyere viskositet etter fermentering, mens prøver uten tilsatt sukrose hadde ingen signifikant forskjell i viskositet før og etter fermentering. De samme tendensene i viskositet med og uten tilsatt sukrose har også blitt vist i andre medium som deig laget av fababønnemel og surdeig (Xu et al., 2019, Katina et al., 2009). I tillegg viste prøvene med tilsatt sukrose tegn til trådtrekkende egenskaper ettersom de ikke fikk "overshoot" på "step rate" testen (Narvhus et al., 2019). Trådtrekkende egenskaper etter fermentering med MSB kan være tegn på *in situ* produsert EPS (Narvhus et al., 2019).

Rotasjonstestene, både før og etter fermentering, viste skjærtynnende tendenser på samtlige prøver, samt en økt viskositet for prøver tilsatt sukrose etter fermentering. Ettersom ertemosen var en miks av hermetiske erter og vann, var det ikke overraskende at den påførte skjærkraften gav skjærtynnende tendenser. Det er trolig at den påførte kraften kan ha brutt opp en gel dannet av erteprotein, samt gelatinisert stivelse og dermed redusert viskositeten. Viskositeten økte for prøver med sukrose etter fermentering. Dette var som forventet da disse hadde produsert EPS. Men om den økte viskositeten var grunnet EPS sine vannbindingsevner eller grunnet interaksjoner mellom EPS og erteprotein er det ikke her nok informasjon for å kunne fastslå. Det er for eksempel ikke enighet om økt viskositet i yoghurt produsert med EPS-produserende egenskaper kommer av EPS sine vannbindingsevner eller ikke (Mende et al., 2016).

5.3 Burgerforsøk

For å undersøke om *in situ* produsert EPS kunne ha positiv innvirkning på tekstur av en burger basert på hermetiske erter ble det utført en vanntapsanalyse under steking og en teksturanalyse etter varmebehandling på to burgermikser med ulikt innhold av fermentert ertemos, og en burgermikser uten fermentert ertemos som kontrollprøve.

Til burgerforsøk ble stamme nr. 17 – *Lb. fermentum* TM152 valgt ut. Denne stammen viste cellevekst på lik linje med de tre andre stammene, men hadde den svakeste pH-reduksjonen blant S-prøvene, fra ca. pH 6,08 til 4,95. Denne svakere reduksjonen i pH er gunstig ettersom det ikke er ønskelig å ha et svært syrlig produkt. I tillegg viste *Lb. fermentum* TM152 god EPS-produksjon under fermentering med tilsatt av sukrose, og gode reologiske evner. Ertemos tilsatt sukrose og inokulert med denne stammen hadde høyest viskositet, trådtrekkende egenskaper, samt høyest G' av de fermenterte ertemosprøvene. I tillegg viste den høy styrke. Tøyning var på lik linje med de tre andre sukroseprøvene ved T24. Høy G' viste at dette var den mest elastiske og faste av prøvene, dette sammen med høy styrke er ønskelig med tanke på å holde form i et burgerprodukt.

For å sikre vekst og EPS-produksjon i ertemos til burgermiksene ble pH målt før og etter fermentering. Som under metabolismeforsøket ble pH redusert fra ca. 6 til 5, i tillegg ble de fermenterte ertemosene synlig tykkere som tydet på ønsket EPS-produksjon under fermenteringen.

Burgerforsøket bestod av tre burgermikser: A, B og C, hvor A bestod av 50/50 fermentert og ikke-fermentert ertemos, B bestod av 25/75 fermentert og ikke-fermentert ertemos, og C bestod av bare ikke-fermentert ertemos som kontroll. Både under første oppvarmingstest i reometer og under prøvesteking i stekepanne av burgermikser A og B var det tydelig at miksene ikke holdt formen ved tilføring av varme. Vannet fordampet og «burgeren» fløt utover, både på platen i reometeret og i stekepannen. Dermed ble 300 g av hver mikser tilsatt ca. 15 g potetmel for å binde mer vann. Potetmelet førte til synlig bedre sammenhengende mikser, og burgerne holdt bedre på formen under steking. Potetmel består hovedsakelig av stivelse. Stivelse kan binde vann, og ved tilføring av varme sveller stivelseskornene slik at stivelsen tykner (Damodaran and Parkin, 2017). Potetmelet førte til at burgermiksene holdt bedre formen under steking og under oppvarming i reometeret.

"Amplitude sweep" (AS) med reometer ble gjennomført på burgermiks A, B og C både uten potetmel og med potetmel. Testen ble gjennomført etter oppvarming til 160°C i reometeret for å simulere steking. Prøven ble så kjølt ned til 20°C og analysert. LVER for de tre prøvene uten potetmel gav varierende styrke og elastisitet. C hadde høyest G' og styrke, fulgt av B og A. Burgermiks C hadde et naturlig innhold av sukker fra ertene som ble brent under oppvarmingen og som ved nedkjøling ble svært hardt som førte til høye verdier for denne prøven. Det samme skjedde også med B og A, men i mindre grad trolig grunnet lavere sukroseinnhold i de fermenterte ertemosene og mulig bedre vannbindingsevne grunnet EPS (Mende et al., 2016).

LVER for burgermiks med potetmel viste at A og B hadde svært lik G' (henholdsvis 13,6 og 13,0 kPa), og C noe lavere (10,9 kPa). Det var forventet at A med høyest innhold av fermentert ertemos skulle være mer elastisk enn B som hadde et mindre innhold av fermentert materiale, men dette var ikke tilfelle. Denne elastisiteten kan skyldes tilførselen av potetmel og svelling av stivelse ettersom C, som ikke inneholdt fermentert ertemos, ikke lå langt unna med tanke på G'. Tøyning var relativt lik for de tre prøvene, men A hadde høyest styrke, fulgt av B og C. Forskjellen i styrke var som forventet da det tidligere i oppgaven ble vist høyere styrke for prøver med tilsatt sukrose, altså med EPS-produksjon, i forhold til prøver uten tilsatt sukrose og dermed uten EPS-produksjon. Det har tidligere blitt vist at *in situ* produsert EPS kan føre til mer stabile geler ettersom EPS kan interagere med proteiner og gelstrukturer (De Vuyst and Degeest, 1999).

Gjennomsnittlig vanntap under steking var lavest for burgermiks A med høyest andel fermentert ertemos (20,0±2,2%), fulgt av burgermiks B (26,3±6,1%) og burgermiks C (32,9±3,0%). Vanntapet ble redusert ved økt mengde fermentert ertemos i burgermiksen. Ettersom mengden potetmel var lik i de tre burgermiksenes, er det grunn til å tro at mengden fermentert ertemos, og dermed innhold av EPS, i burgermiksen har påvirket vanntapet. Dette var som forventet da EPS har blitt vist å ha evne til å holde på vann (Low et al., 1998, Mende et al., 2016).

5.4 Oppsummering og konklusjon

I denne oppgaven ble det undersøkt om *in situ* produsert EPS påvirket teksturen til et burgerprodukt basert på ertemos. En rekke MSB ble screenet for EPS-produksjon og videre testet i prøvematerialet, hovedsakelig ertemos laget av hermetiske erter, men også linsemos av hermetiske linser ble testet. Det ble undersøkt hvordan tilsetning av sukrose påvirket EPS produksjonen, samt pH, cellevekst, og innhold av organiske syrer og karbohydrater. I tillegg ble det gjennomført reologiske analyser for å undersøke elastiske egenskaper, samt viskositet og trådtrekkende egenskaper. Til slutt ble det undersøkt hvordan et burgerlignende produkt bestående av fermentert og ikke-fermentert ertemos ble påvirket av oppvarming, med hensyn til vanntap og tekstur.

Prøver med tilsatt sukrose hadde en sterkere pH-reduksjon, samt høyere viskositet og elastisitet enn prøver uten tilsatt sukrose. I tillegg viste flere av stammene, i prøver tilsatt sukrose, økt viskositet etter fermentering og tegn til trådtrekkende egenskaper som tyder på EPS-produksjon. Ved analyse av karbohydrater i prøver før og etter fermentering viste disse resultatene også tegn på EPS-produksjon i prøver tilsatt sukrose ettersom glukose og sukroseinnholdet ble redusert etter fermentering, mens fruktoseinnholdet økte etter fermentering.

Ved test av varmebehandling av et burgerlignende produkt bestående av fermentert og ikke-fermentert ertemos, ble det vist at mengden EPS og fermentert ertemos som ble benyttet her ikke var nok til å stabilisere burgermiksen ved varmebehandling. Men med tilsatt potetmel i burgermiksen ble det vist at mer fermentert ertemos i burgermiksen, resulterte i mindre vanntap under steking og en sterkere burger/gel.

Basert på resultatene i denne oppgaven kan det se ut som om EPS produsert *in situ* med melkesyrebakterier bedrer teksturen i en burgerlignende miks basert på ertemos. Men det kreves mer forskning på området for å kunne si om denne type fermentering kan være en alternativ og mer skånsom prosesseringsmetode for å produsere plantebaserte burgerprodukter i forhold til ekstruderte planteburgere med teksturgivende tilsetningsstoffer.

6. Til ettertanke og videre forskning

Til gjentak og eventuell videre forskning er det flere forbedringspotensialer og retninger forskningen kan ta. Ideelt burde råstoffet som ble benyttet gjennom forsøkene ha vært fra samme batch, noe det ikke var her. Dette kan ha ført til små forskjeller i sukkerinnhold i ertene gjennom prosessen som kan ha påvirket blant annet utfallet av metabolismeforsøket.

Mengden stammer burde også vært redusert i de innledende forsøkene, særlig med tanke på reologimålingene. Med et antall på 42 prøver til sammen for erte- og linsemos ble det ikke mulig å gjennomføre forsøket med paralleller på grunn av mangel på tid. Det samme ble gjeldende for teksturanalyser i forbindelse med metabolismeforsøket. For et mer statistisk korrekt bilde av resultatene burde minst tre paralleller blitt gjennomført.

Det var også flere faktorer som ikke fungerte som forventet gjennom prosessen som kan utforskes videre. Til det innledende fermenteringsforsøket i ertes og linser ble stamme nr. 15 benyttet som EPS-. Her var det ønsket en stamme som hadde pH-reduksjon på nivå med de EPS+ stammene, men nr. 15 hadde svært liten pH-reduksjon og ble dermed sett på som en dårlig kontrollstamme. Derfor ble det benyttet en annen "EPS-" stamme til metabolismeforsøket, men denne viste seg å være EPS+. Til et eventuelt fremtidig arbeid er det ønskelig å benytte en EPS- stamme som vokser under de samme forholdene som de EPS+ stammene, slik at forsøket har en kontrollstamme i tillegg til prøvene uten sukrose slik at eventuelle endringer i tekstur som kan komme av sukrosetilsetningen ikke påvirker på andre måter enn EPS-produksjon. Det burde også blitt undersøkt hvordan forsuring av ertemosen potensielt påvirket teksturen ved tilsetning av for eksempel melkesyre til en pH på nivå med de EPS+ stammene fra metabolisme forsøket. Dette for å bekrefte, eventuelt avkrefte, om det er pH-reduksjon eller EPS-produksjon som påvirker teksturen i den fermenterte ertemosen.

Til videre forskning er det mange interessante faktorer som kan undersøkes i ulike trinn av prosessen. For eksempel eksperimentering med sukkernivå og hvordan dette påvirker mengden EPS som blir produsert. Også vanninnhold i mosen kunne det vært eksperimentert med.

I en mikrobiologisk retning hadde det vært spennende å undersøke nivå av antinæringsstoff før og etter fermentering med de EPS+ stammene som ble benyttet her. Xu et al. (2017) og (2019) viste reduksjon i raffinose, stachyose og verbascose ved fermentering med EPS+ *Leuconostoc* spp. og *Weissella* spp. I tillegg hadde det vært av interesse å analysere hvilke typer EPS som ble produsert i de fermenterte ertemosene. Her er det antatt at det ble produsert

HoPS i form av glukaner på grunn av det økte innholdet av fruktose etter fermenteringen i sammenheng med at innhold av glukose og sukrose ble redusert.

For videre produktutvikling kunne det vært interessant å undersøke om andre belgvekster vil påvirkes på samme måte som erter, og gi linser et nytt forsøk. Her ble det gjort en feil ved beregning av mengde vann til linsemos som kan være grunnen til en klumpete linsemos, som videre gav problemer under teksturmålingene. I tillegg til andre råstoff for fermentering, kunne det blitt eksperimentert med mengde fermentert materiale i burgermiksene siden dette ble vist å påvirke vanntap under steking, elastisitet og styrke av burgeren hvor en høyere andel fermentert materiale reduserte vanntapet og økte styrken. Videre produktutvikling med tilsetning av flere ingredienser for å fokusere på smaksopplevelsen på produktet hadde også vært interessant. For å forbedre næringsinnholdet kan det også eksperimenteres med tilsetning av proteinisolater. I tillegg til å bedre proteininnholdet i burgeren, kan proteinisolater bedre vannabsorpsjon og emulgeringsevne til produktet. Her kan det eksperimenteres med tilsetning av ulike mengder legumin- og vicilinisolater ettersom disse proteinenhetene har ulike funksjonelle egenskaper.

Det er mange retninger denne forskningen kan ta som er spennende, både retning mikrobiologi og produktutvikling. Ettersom det fokuseres mer og mer på å øke inntak av planteprotein kan dette være en alternativ retning å gå i forhold til plantebaserte burgere av ekstrudert planteprotein og teksturgivende tilsetningsstoffer.

Referanser

- BOELS, I. C., KRANENBURG, R. V., HUGENHOLTZ, J., KLEEREBEZEM, M. & DE VOS, W. M. 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 723-732.
- BOYE, J., ZARE, F. & PLETCH, A. 2010a. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414-431.
- BOYE, J. I., AKSAY, S., ROUFIK, S., RIBÉREAU, S., MONDOR, M., FARNWORTH, E. & RAJAMOHAMED, S. H. 2010b. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43, 537-546.
- 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, 034015.
- CERNING, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7, 113-130.
- COUSIN, R. 1997. Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 53, 111-130.
- DAMODARAN, S. & PARKIN, K. L. 2017. *Fennema's Food Chemistry*, Taylor & Francis Group, LLC.
- DE VUYST, L. & DEGEEST, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177.
- DURANTI, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- DURANTI, M. & GIUS, C. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53, 31-45.
- FERNÁNDEZ-QUINTELA, A., MACARULLA, M. T., DEL BARRIO, A. S. & MARTÍNEZ, J. A. 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 331-341.
- FN-SAMBANDET. 2022. *FNs bærekraftsmål* [Online]. Available: <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal> [Accessed 16. april 2022].
- GALLE, S., SCHWAB, C., DAL BELLO, F., COFFEY, A., GÄNZLE, M. G. & ARENDT, E. K. 2012. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 105-112.
- GRØNNEVIK, H., FALSTAD, M. & NARVHUS, J. A. 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21, 601-606.
- HELSETH, L. E. 2018. *newtonsk væske* [Online]. Store norske leksikon på snl.no: Store norske leksikon. Available: https://snl.no/newtonsk_v%C3%A6ske [Accessed 15. mai 2022].
- HELSETH, L. E. 2020. *ikke-newtonsk væske* [Online]. Store norske leksikon på snl.no: Store norske leksikon. Available: https://snl.no/ikke-newtonsk_v%C3%A6ske [Accessed 15. mai 2022].
- HELSETH, L. E. 2021. *viskositet* [Online]. Store norske leksikon på snl.no: Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/viskositet> [Accessed 15. mai 2022].
- HUGENHOLTZ, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 165-178.

- JARPA-PARRA, M. 2018. Lentil protein: A review of functional properties and food application. An overview of lentil protein functionality. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 892-903.
- JOSHI, M., ALDRED, P., MCKNIGHT, S., PANOZZO, J. F., KASAPIS, S., ADHIKARI, R. & ADHIKARI, B. 2013. Physicochemical and functional characteristics of lentil starch. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1484-1496.
- JUVONEN, R., HONKAPÄÄ, K., MAINA, N. H., SHI, Q., VILJANEN, K., MAAHEIMO, H., VIRKKI, L., TENKANEN, M. & LANTTO, R. 2015. The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 207, 109-118.
- JØRGENSEN, C. E., ABRAHAMSEN, R. K., RUKKE, E.-O., JOHANSEN, A.-G., SCHÜLLER, R. B. & SKEIE, S. B. 2015. Improving the structure and rheology of high protein, low fat yoghurt with undenatured whey proteins. *International Dairy Journal*, 47, 6-18.
- KANDLER, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.
- KATINA, K., MAINA, N. H., JUVONEN, R., FLANDER, L., JOHANSSON, L., VIRKKI, L., TENKANEN, M. & LAITILA, A. 2009. In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26, 734-743.
- KHOKHAR, S. & APENTEN, R. K. O. 2003. Antinutritional factors in food legumes and effects of processing. *The role of food, agriculture, forestry and fisheries in human nutrition*, 4, 82-116.
- KORCZ, E. & VARGA, L. 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375-384.
- LADJAL-ETTOUMI, Y., BOUDRIES, H., CHIBANE, M. & ROMERO, A. 2016. Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophysics*, 11, 43-51.
- LAM, A. C. Y., CAN KARACA, A., TYLER, R. T. & NICKERSON, M. T. 2018. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34, 126-147.
- LIENER, I. E. & KAKADE, M. L. 1980. Protease inhibitors. *Toxic constituents of plant foodstuffs*, 2, 7-71.
- LOW, D., AHLGREN, J. A., HORNE, D., MCMAHON, D. J., OBERG, C. J. & BROADBENT, J. R. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2147-2151.
- MANINI, F., CASIRAGHI, M. C., POUTANEN, K., BRASCA, M., ERBA, D. & PLUMED-FERRER, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 275-283.
- MENDE, S., ROHM, H. & JAROS, D. 2016. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- MESSIEN, J.-L., CHIHI, M. L., SOK, N. & SAUREL, R. 2015. Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, 46, 233-243.
- MONSAN, P., BOZONNET, S., ALBENNE, C., JOUCLA, G., WILLEMOT, R.-M. & REMAUD-SIMÉON, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 675-685.

- NACKA, F., CHOBERT, J.-M., BUROVA, T., LÉONIL, J. & HAERTLÉ, T. 1998. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 17, 495-503.
- NARVHUS, J. A., RUKKE, E.-O. & SCHÜLLER, R. B. 2019. Rheological analysis of ropy fermented milk. *Annual Transactions of the Nordic Rheology Society*, 27.
- NG'ONG'OLA-MANANI, T. A., WICKLUND, T., MWANGWELA, A. M. & ØSTLIE, H. M. 2015. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Involved in Natural and Lactic Acid Bacterial Fermentations of Pastes of Soybeans and Soybean-Maize Blends Using Culture-Dependent Techniques and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Food Biotechnology*, 29, 20-50.
- ORMESTAD, H. 2021. *elastisitet - fysikk* [Online]. Store norske leksikon på snl.no: Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/elastisitet - fysikk> [Accessed 15. mai 2022].
- PAL, R. 1997. Viscosity and storage/loss moduli for mixtures of fine and coarse emulsions. *Chemical Engineering Journal*, 67, 37-44.
- PAUL ROSS, R., MORGAN, S. & HILL, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- PAULSEN, J. 2021. *Mikrobiota analyser av spontant fermenterte surdeiger av moderne hvete og urkorn*. Master, NMBU.
- PERSSON, H., TÜRK, M., NYMAN, M. & SANDBERG, A.-S. 1998. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3194-3200.
- POORE, J. & NEMECEK, T. 2018. Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360, 987-992.
- RACKIS, J. J. 1975. Oligosaccharides of food legumes: Alpha-galactosidase activity and the flatus problem. *Physiological effects of food carbohydrates*, 15, 207-222.
- RATNAYAKE, W. S., HOOVER, R., SHAHIDI, F., PERERA, C. & JANE, J. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 74, 189-202.
- REDDY, N. R., PIERSON, M. D., SATHE, S. K. & SALUNKHE, D. K. 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates—A review. *Food Chemistry*, 13, 25-68.
- REDDY, N. R., PIERSON, M. D., SATHE, S. K. & SALUNKHE, D. K. 1985. Dry bean tannins: A review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, 541-549.
- ROY, F., BOYE, J. I. & SIMPSON, B. K. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43, 432-442.
- RUAS-MADIEDO, P. & DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88, 843-856.
- RÜHMKORF, C., JUNGKUNZ, S., WAGNER, M. & VOGEL, R. F. 2012. Optimization of homoexopolysaccharide formation by lactobacilli in gluten-free sourdoughs. *Food Microbiology*, 32, 286-294.
- SADAVA, D. H., DAVID M.; HELLER, H. CRAIG; BERENBAUM, MAY R. 2014. *LIFE The Science of biology*, Sinauer Associates, Inc.
- SAINI, H. 1989. Legume seed oligosaccharides. *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- SHEVKANI, K., SINGH, N., CHEN, Y., KAUR, A. & YU, L. 2019. Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2787-2798.

- SHEVKANI, K., SINGH, N., KAUR, A. & RANA, J. C. 2015. Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
- SPOTTI, M. J., PERDUCA, M. J., PIAGENTINI, A., SANTIAGO, L. G., RUBIOLO, A. C. & CARRARA, C. R. 2013. Gel mechanical properties of milk whey protein–dextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 31, 26-32.
- SREERAMA, Y. N., SASHIKALA, V. B., PRATAPE, V. M. & SINGH, V. 2012. Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, 131, 462-468.
- STEFFE, J. F. 1996. *Rheological methods in food process engineering*, USA, Freeman Press.
- THARANATHAN, R. N. & MAHADEVAMMA, S. 2003. Grain legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 507-518.
- TOSH, S. M. & YADA, S. 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*, 43, 450-460.
- WADE, M., STRICKLAND, M. T., OSBORNE, J. P. & EDWARDS, C. G. 2019. Role of *Pediococcus* in winemaking. *Australian journal of grape and wine research*, 25, 7-24.
- XU, Y., CODA, R., HOLOPAINEN-MANTILA, U., LAITILA, A., KATINA, K. & TENKANEN, M. 2019. Impact of in situ produced exopolysaccharides on rheology and texture of fava bean protein concentrate. *Food Research International*, 115, 191-199.
- XU, Y., WANG, Y., CODA, R., SÄDE, E., TUOMAINEN, P., TENKANEN, M. & KATINA, K. 2017. In situ synthesis of exopolysaccharides by *Leuconostoc* spp. and *Weissella* spp. and their rheological impacts in fava bean flour. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 63-71.
- ZAHRAN, H. H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 968-989.
- ZANNINI, E., WATERS, D. M., COFFEY, A. & ARENDT, E. K. 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121-1135.
- ØSTLIE, H. M., PORCELLATO, D., KVAM, G. & WICKLUND, T. 2021. Investigation of the microbiota associated with ungerminated and germinated Norwegian barley cultivars with focus on lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 341, 109059.

Vedlegg

Oversikt over vedlegg

Vedlegg 1: Cellevekst i frysestock

Vedlegg 2: Metabolisme – cellevekst og pH

Vedlegg 3: Compact Letter Display (CLD) og toveis ANOVA: celletall ~ prøve * tid

Vedlegg 4: CLD og toveis ANOVA: pH ~ prøve * tid

Vedlegg 5: CLD og toveis ANOVA: glusuk ~ prøve * tid, glusuk = glukose+sukrose

Vedlegg 6: CLD og toveis ANOVA: fruktose ~ prøve * tid

Vedlegg 7: CLD og enveis ANOVA: melkesyre ~ prøve

Vedlegg 8: CLD og toveis ANOVA: eddiksyre ~ prøve * tid

Vedlegg 9: CLD og enveis ANOVA: sitronsyre ~ prøve

Vedlegg 10: CLD og toveis ANOVA: G ~ prøve * tid, G = skjærlagringsmodul

Vedlegg 11: CLD og toveis ANOVA: visk50 ~ prøve * tid, visk50 = viskositet ved skjærhastighet 50 s^{-1}

Vedlegg 12: CLD og toveis ANOVA: viks500 ~ prøve * tid, visk500 = viskositet ved skjærhastighet 500 s^{-1}

Vedlegg 13: Beregning av vanntap

Vedlegg 1: Cellevekst i frysestock

Tabell A. Vekst av frysestockl for stamme nr 2 - *W. confusa* TM76; 13 - *P. pentosaceus* TM152; 17 - *Lb. fermentum* TM336; 21 - *Leu. citreum/holzappelii* GK45, samt gjennomsnittlig cellevekst.

Stamme\Fortynning	Vekst (antall kolonier)			Gjennomsnittlig cellevekst (kde/g)
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
02	>300	>300	105	105,5*10 ⁸
	>300	>300	106	
13	>300	>300	71	74*10 ⁸
	>300	>300	77	
17	>300	>300	60	69*10 ⁸
	>300	>300	78	
21	>300	>300	115	100,5*10 ⁸
	>300	>300	86	

Beregning for mengde frysestock som må tilsettes for å oppnå 10⁶ kde/g ved start i totalt 200 mL prøve:

$$c_1 v_1 = c_2 v_2$$

$$\text{Stamme nr. 2: } \frac{200 \text{ mL} * 10^6 \text{ kde/g}}{105,5 * 10^8 \text{ kde/g}} = 19 \text{ uL}$$

$$\text{Stamme nr. 13: } \frac{200 \text{ mL} * 10^6 \text{ kde/g}}{74 * 10^8 \text{ kde/g}} = 27 \text{ uL}$$

$$\text{Stamme nr. 17: } \frac{200 \text{ mL} * 10^6 \text{ kde/g}}{69 * 10^8 \text{ kde/g}} = 29 \text{ uL}$$

$$\text{Stamme nr. 21: } \frac{200 \text{ mL} * 10^6 \text{ kde/g}}{100,5 * 10^8 \text{ kde/g}} = 20 \text{ uL}$$

Vedlegg 2: Metabolisme – cellevekst og pH:

Tabell B. pH før fermentering (T0) og etter fermentering (T24) for tre gjentak av metabolismeforsøket.

Prøve	UKE 1		UKE 2		UKE 3	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
E02S	6,11	4,87	6,12	4,85	6,15	4,82
E13S	6,09	4,85	6,13	4,8	6,18	4,79
E17S	6,03	4,91	6,08	4,19	6,13	5,03
E21S	6,07	4,63	6,03	4,64	6,13	4,64
E02U	6,13	5,30	6,08	5,19	6,14	5,01
E13U	6,07	5,06	6,11	5,05	6,17	4,92
E17U	6,12	5,30	6,11	5,23	6,15	5,17
E21U	6,14	5,17	6,06	5,21	6,12	5,14

Tabell C. Celletall (log kde/g) før fermentering (T0) og etter fermentering (T24) for tre gjentak av metabolismeforsøket.

Prøve	Cellevekst (log kde/g)					
	UKE 1		UKE 2		UKE 3	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
E02S	$74,5 \cdot 10^4$	$98 \cdot 10^7$	$80 \cdot 10^4$	$67,5 \cdot 10^7$	$78 \cdot 10^4$	$69 \cdot 10^7$
E13S	$95 \cdot 10^4$	$62,5 \cdot 10^7$	$102 \cdot 10^4$	$66 \cdot 10^7$	$102 \cdot 10^4$	$48,5 \cdot 10^7$
E17S	$56,5 \cdot 10^4$	$59,5 \cdot 10^7$	$61,5 \cdot 10^4$	$57 \cdot 10^7$	$61 \cdot 10^4$	$62,5 \cdot 10^7$
E21S	$78,5 \cdot 10^4$	$42 \cdot 10^7$	$85,5 \cdot 10^4$	$42,5 \cdot 10^7$	$55,5 \cdot 10^4$	$43 \cdot 10^7$
E02U	$70 \cdot 10^4$	$80 \cdot 10^7$	$79 \cdot 10^4$	$65 \cdot 10^7$	$80,5 \cdot 10^4$	$68,5 \cdot 10^7$
E13U	$86,5 \cdot 10^4$	$85,5 \cdot 10^7$	$102 \cdot 10^4$	$56 \cdot 10^7$	$96 \cdot 10^4$	$57,5 \cdot 10^7$
E17U	$68,5 \cdot 10^4$	$81,5 \cdot 10^7$	$60 \cdot 10^4$	$69,5 \cdot 10^7$	$57,5 \cdot 10^4$	$91 \cdot 10^7$
E21U	$90,5 \cdot 10^4$	$72 \cdot 10^7$	$62,5 \cdot 10^4$	$53 \cdot 10^7$	$62 \cdot 10^4$	$58,5 \cdot 10^7$

Vedlegg 3: Compact Letter Display (CLD) og toveis ANOVA: celletall ~ prøve * tid

```
> summary(celleta11.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
prøve   7  0.13    0.02    5.197 0.000496 ***
tid     1 102.58  102.58 28160.250 < 2e-16 ***
prøve:tid 7  0.16    0.02    6.105 0.000140 ***
Residuals 32  0.12    0.00
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> celleta11.cld
$prøve
  E13U  E02S  E13S  E02U  E17U  E21U  E17S  E21S
   "a"  "ab"  "ab"  "ab"  "abc" "abc"  "bc"  "c"

$tid
 24  0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E17U:24 E02S:24 E02U:24 E13U:24 E21U:24 E17S:24 E13S:24 E21S:24 E13S:0 E13U:0 E02S:0 E02U:0 E21S:0
   "a"   "a"   "a"   "a"   "ab"  "ab"  "ab"  "ab"  "b"  "c"  "c"  "cd"  "cd"  "cd"
E21U:0 E17U:0 E17S:0
   "cd"  "d"  "d"
```

Figur A. Output fra toveis ANOVA (celletall ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(celleta11.anova, celleta11.tukey) fra RStudio. Hvor celleta11.tukey <- TukeyHSD(celleta11.anova).

Vedlegg 4: CLD og toveis ANOVA: pH ~ prøve * tid

```
> summary(pH.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
prøve   7  0.491    0.070    21.28 2.31e-10 ***
tid     1 15.368  15.368 4662.87 < 2e-16 ***
prøve:tid 7  0.423    0.060    18.36 1.48e-09 ***
Residuals 32  0.105    0.003
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> pH.cld
$prøve
 E17U E02U E21U E13U E17S E02S E13S E21S
   "a" "ab" "ab" "bc"  "c"  "c"  "c"  "d"

$tid
  0 24
"a" "b"

$`prøve:tid`
 E13S:0 E02S:0 E17U:0 E13U:0 E02U:0 E21U:0 E17S:0 E21S:0 E17U:24 E21U:24 E02U:24 E13U:24 E17S:24
   "a"   "a"   "a"   "a"   "a"   "a"   "a"   "a"   "b"  "bc"  "bc"  "cd"  "de"
E02S:24 E13S:24 E21S:24
   "de"  "e"  "f"
```

Figur B. Output fra toveis ANOVA (pH ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(pH.anova, pH.tukey) fra RStudio. Hvor pH.tukey <- TukeyHSD(pH.anova).

Vedlegg 5: CLD og toveis ANOVA: glusuk ~ prøve * tid, glusuk = glukose+sukrose

```
> summary(glusuk.anova)
      Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
prøve   7 136322116 19474588  46.23 5.91e-15 ***
tid     1 120495233 120495233 286.04 < 2e-16 ***
prøve:tid 7 80302846 11471835  27.23 9.20e-12 ***
Residuals 32 13480066  421252
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> glusuk.cld
$prøve
E13S E21S E17S E02S E17U E21U E13U E02U
"a" "ab" "ab" "b" "c" "c" "c" "c"

$tid
 0 24
"a" "b"

$`prøve:tid`
E21S:0 E17S:0 E13S:0 E02S:0 E13S:24 E21S:24 E17U:0 E21U:0 E13U:0 E02U:0 E17S:24 E02S:24 E02U:24
"a" "a" "a" "a" "a" "b" "bc" "bc" "bc" "bc" "bc" "c" "c" "c"
E13U:24 E17U:24 E21U:24
"c" "c" "c"
```

Figur C. Output fra toveis ANOVA (glusuk ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(glusuk.anova, glusuk.tukey) fra RStudio. Hvor glusuk.tukey <- TukeyHSD(glusuk.anova).

Vedlegg 6: CLD og toveis ANOVA: fruktose ~ prøve * tid

```
> summary(fruktose.anova)
      Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
prøve   7 3.147e+09 449548272  390.4 <2e-16 ***
tid     1 9.760e+08 976025783  847.6 <2e-16 ***
prøve:tid 7 1.046e+09 149429354 129.8 <2e-16 ***
Residuals 32 3.685e+07 1151560
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> fruktose.cld
$prøve
E02S E17S E21S E13S E21U E13U E17U E02U
"a" "a" "a" "b" "c" "c" "c" "c"

$tid
24 0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E02S:24 E17S:24 E21S:24 E13S:24 E21S:0 E17S:0 E13S:0 E02S:0 E21U:24 E13U:24 E17U:24 E21U:0 E17U:0
"a" "a" "a" "a" "b" "c" "c" "c" "c" "d" "d" "d" "d" "d"
E13U:0 E02U:0 E02U:24
"d" "d" "d"
```

Figur D. Output fra toveis ANOVA (fruktose ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(fruktose.anova, fruktose.tukey) fra RStudio. Hvor fruktose.tukey <- TukeyHSD(fruktose.anova).

Vedlegg 7: CLD og enveis ANOVA: melkesyre ~ prøve

```
> summary(melkesyre.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
prøve   7 2356210  336601  12.99 1.56e-05 ***
Residuals 16  414480   25905
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> melkesyre.cld
$prøve
  E02S  E17S  E13S  E21S  E13U  E17U  E02U  E21U
  "a"   "ab"  "abc" "abcd" "bcd" "cde"  "de"   "e"
```

Figur E. Output fra enveis ANOVA (melkesyre ~ prøve), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(melkesyre.anova, melkesyre.tukey) fra RStudio. Hvor melkesyre.tukey <- TukeyHSD(melkesyre.anova).

Vedlegg 8: CLD og toveis ANOVA: eddiksyre ~ prøve * tid

```
> summary(eddiksyre.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
prøve   7 785096  112157  92.89 <2e-16 ***
tid      1 3911461 3911461 3239.44 <2e-16 ***
prøve:tid  7  828679  118383  98.04 <2e-16 ***
Residuals 32   38638    1207
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> eddiksyre.cld
$prøve
E21S E21U E17U E13S E13U E02S E17S E02U
"a"  "b" "bc" "cd" "cd" "cd" "cd"  "d"

$tid
  24  0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E21S:24 E21U:24 E17U:24 E13S:24 E13U:24 E17S:24 E02S:24 E02U:24 E02S:0 E13S:0 E17S:0 E21U:0 E02U:0
"a"    "b"    "bc"    "cd"    "cd"    "d"    "d"    "d"    "e"    "e"    "e"    "e"    "e"
E13U:0 E17U:0 E21S:0
"e"    "e"    "e"
```

Figur F. Output fra toveis ANOVA (eddiksyre ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(eddiksyre.anova, eddiksyre.tukey) fra RStudio. Hvor eddiksyre.tukey <- TukeyHSD(eddiksyre.anova).

Vedlegg 9: CLD og enveis ANOVA: sitronsyre ~ prøve

```
> summary(sitronsyre.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
prøve   7  17853    2550   0.94  0.504
Residuals 16  43400    2712
> sitronsyre.cld
$prøve
$prøve$Letters
E17U E21U E02U E13U E02S E13S E17S E21S
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"
```

Figur G. Output fra enveis ANOVA (sitronsyre ~ prøve), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(sitronsyre.anova, sitronsyre.tukey) fra RStudio. Hvor sitronsyre.tukey <- TukeyHSD(sitronsyre.anova).

Vedlegg 10: CLD og toveis ANOVA: G ~ prøve * tid, G=skjærлагringsmodul

```
> summary(G.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
prøve   7 17076204  2439458  22.897 6.29e-07 ***
tid      1 12307393 12307393 115.518 1.92e-08 ***
prøve:tid  7  5682518   811788   7.619 0.000523 ***
Residuals 15  1598119   106541
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
1 observation deleted due to missingness
> G.cld
$prøve
E17S E02S E21U E21S E13S E13U E17U E02U
"a"  "a"  "ab" "ab" "bc"  "c"  "c"  "c"

$tid
 24  0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E17S:24 E02S:24 E21S:24 E21U:24 E13S:24 E21U:0 E17S:0 E13U:24 E21S:0 E02S:0 E17U:24 E02U:24 E13S:0
"a"      "ab"     "abc"    "bcd"   "cde"   "cdef"  "cdef"  "def"   "def"   "def"   "ef"    "ef"    "f"
E17U:0  E02U:0  E13U:0
"f"      "f"      "f"
```

Figur H. Output fra toveis ANOVA (G ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(G.anova, G.tukey) fra RStudio. Hvor G.tukey <- TukeyHSD(G.anova).

Vedlegg 11: CLD og toveis ANOVA: visk50 ~ prøve * tid, visk50=viskositet ved skjærhastighet på 50 s⁻¹

```
> summary(visk50.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
prøve   7  155.38   22.20  159.4 1.38e-13 ***
tid      1  107.82  107.82  774.0 5.61e-15 ***
prøve:tid  7  147.11   21.02  150.9 2.11e-13 ***
Residuals 16    2.23    0.14
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> visk50.cld
$prøve
E17S E02S E21S E13S E21U E13U E17U E02U
"a"  "b"  "c"  "d"  "e"  "e"  "e"  "e"

$tid
 24  0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E17S:24 E02S:24 E21S:24 E13S:24 E21U:24 E17U:24 E13U:24 E02U:24 E02S:0 E21U:0 E17S:0 E21S:0 E13S:0
"a"      "b"     "c"     "d"     "e"     "e"     "e"     "e"     "e"     "e"     "e"     "e"     "e"
E02U:0  E13U:0  E17U:0
"e"      "e"      "e"
```

Figur I. Output fra toveis ANOVA (visk50 ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(visk50.anova, visk50.tukey) fra RStudio. Hvor glusuk.tukey <- TukeyHSD(visk50.anova).

Vedlegg 12: CLD og toveis ANOVA: visk500 ~ prøve * tid, visk500=viskositet ved skjærhastighet på 500 s⁻¹

```
> summary(visk500.anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
prøve   7  3.388   0.4840   194.4 2.87e-14 ***
tid     1  2.900   2.8998  1165.0 2.24e-16 ***
prøve:tid 7  3.029   0.4327   173.8 6.94e-14 ***
Residuals 16  0.040   0.0025
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> visk500.cld
$prøve
E02S E17S E21S E13S E17U E13U E02U E21U
"a"  "a"  "b"  "c"  "d"  "d"  "d"  "d"

$tid
 24  0
"a" "b"

$`prøve:tid`
E02S:24 E17S:24 E21S:24 E13S:24 E17U:24 E02S:0 E13U:24 E02U:24 E21U:24 E13S:0 E21S:0 E17S:0 E02U:0
"a"    "a"    "b"    "c"    "d"    "d"    "d"    "d"    "d"    "d"    "d"    "d"    "d"
E13U:0 E21U:0 E17U:0
"d"    "d"    "d"
.
```

Figur J. Output fra toveis ANOVA (visk500 ~ prøve * tid), samt Compact Letter Display (CLD) (multcompLetters4(visk500.anova, visk50.tukey) fra RStudio. Hvor glusuk.tukey <- TukeyHSD(visk50.anova).

Vedlegg 13: Beregning av vanntap

Tabell D. Vekt før og etter steking, og vekt av burgermiks som ble igjen på papir etter overføring til stekepanne. Samt beregnet vanntap for hver parallell av de tre burgermiksene A, B og C, og gjennomsnittlig vanntap for hver burgermiks med standardavvik.

	A			B			C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Vekt før (g)	85,14	85,03	85,43	85,58	85,37	85,56	85,38	85,07	85,18
Vekt igjen på papir (g)	3,13	0,83	0,49	1,5	1,02	3,2	1,31	1,88	1,44
Vekt etter (g)	68	66,95	65,99	55,05	63,98	65,87	59,67	53,04	55,8
Vanntap (%)	17,1	20,5	22,3	34,5	24,1	20,0	29,0	36,2	33,4
Gj.sn. vanntap (%)	20,0±2,2			26,2±6,1			32,9±3,0		

Beregning av vanntap (%):

$$\text{Vanntap} = \frac{(\text{Vekt før} - \text{vekt igjen på papir} - \text{vekt etter}) \text{ g}}{(\text{Vekt før} - \text{vekt igjen på papir}) \text{ g}} * 100\%$$



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway