



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for kjemi, biologi og matvitenskap

Tove G. Devold

Fermentering av kikerter med eksopolysakkaridproduserende melkesyre bakterier og deres effekt på tekstur

Fermentation of chickpeas with exopolysaccharide
producing lactic acid bacteria and their effect on
texture

Jens Martin Linløkken Rustad

Matvitenskap – Produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Denne oppgaven ble skrevet i forbindelse med en femårig masterutdannelse innen matvitenskap – retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet våren 2023. Laboratoriearbeidet i denne oppgaven ble utført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Tove G. Devold, og delveiledere Hilde Marit Østlie og Reidar B. Schüller for gode råd, planleggings hjelp, tilbakemeldinger og all hjelpen til utføringen og arbeidet rundt masteroppgaven.

Jeg vil også rette en takk til Kari Olsen for hjelp til gjennomføring av kromatografiske analyser. I tillegg vil jeg takke May Aalberg for hjelp på laboratoriet og for å være tilgjengelig til å besvare alt jeg måtte lure på.

Til slutt vil jeg takke familien min og vennene mine for god støtte gjennom studieårene, og for oppmuntring og motivasjon gjennom masterarbeidet. Og spesiell takk til Frida for inspirasjonen til oppgaven.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Ås, mai 2023

Jens Martin Linløkken Rustad

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å undersøke effekten av *in situ* eksopolysakkarid produksjon ved melkesyre fermentering på teksturen til kikertpuré. Dette ble undersøkt for å se om dette kan være en alternativ metode til bruken av tilsetningsstoffer for å produsere en plantebaserte burger. Dette ble undersøkt ved å først screene 29 melkesyrebakterier for eksopolysakkarid produksjon, alle disse var tidligere isolert fra plantemateriale på NMBU. Her ble også effekten av valget av karbonkilde undersøkt ved å bruke tre forskjellige karbohydrater: sukrose, maltose, og glukose. Av disse stammene ble det valgt ut seks eksopolysakkarid produserende stammer som ble brukt til å fermentere kikertpuré, hvor vekst ble undersøkt ved å måle pH og observere teksturendringer. Det ble også undersøkt om tilsetningen av karbohydrat og aquafaba, og valget av inkuberingstemperatur hadde en effekt på puréene under fermentering. Det var ingen eller en liten effekt på teksturen ved tilsetning av aquafaba eller bruken av 22°C eller 30°C inkuberingstemperatur, men karbohydrat tilsetning så ut til å ha en positiv effekt på både teksturen og pH nedgang.

For å videre undersøke effekten av tre utvalgte eksopolysakkarid produserende stammer og tilsetning av sukrose/maltose ble det utført et metabolisme- og reologiforsøk for å se hvordan innholdet av karbohydrater og organiske syrer, pH, celletall, viskositet, trådtrekkenhet og viskoelastisitet ble påvirket under fermentering. Disse ble fermentert ved 30°C i 24 t. Celletallet til alle prøvene økte fra ca. 6 log kde/g til ca. 9 log kde/g. Innholdet av melkesyre, eddiksyre og fruktose økte ved tilsetningen av karbohydrat for to av stammene, og sukrose tilsetning økte disse mere. Fermentering med *Limosilactobacillus fermentum* TM336 og tilsetning av 5% sukrose hadde den største økning i viskositet og elastiske egenskaper.

Til slutt ble det laget typer tre kikertburgere med forskjellige innhold av fermentert og ikke-fermentert kikertpuré for å undersøke hvordan fermentert kikertpuré påvirket vekttapet og teksturen til burgerne. Hvor kikertpuréen ble fermentert med *Lfb. fermentum* TM336, og tilsatt 5% sukrose og 17% aquafaba. Teksturen ble undersøkt ved en «texture profile analysis». Både vekttapet og teksturen ble ikke signifikant påvirket ved tilsetningen av fermentert kikertpuré under dette forsøket.

Abstract

The objective of this master thesis was to investigate the effects of in situ exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on texture of chickpea puree. This was investigated to see if this might be a good alternative to the usage of additives to produce a plant-based chickpea burger. First 29 lactic acid bacteria strains were screened for exopolysaccharide production, all these strains were earlier isolated on NMBU. The effect of carbon source was also investigated by using three different carbohydrates: glucose, sucrose, and maltose. There were picked out six exopolysaccharide producing lactic acid bacteria strains that then was used to ferment chickpea puree, where the growth was investigated by measuring pH and observing textural changes. It was also measured of the addition of carbohydrates and aquafaba, and the choice of incubation temperature influenced the chickpea puree under fermentation. There was no or a very small positive effect on texture by adding aquafaba or changing the incubation temperature between 22°C or 30°C. But the addition of carbohydrates had a positive effect on texture and pH reduction.

To further investigate the effect of three chosen exopolysaccharide producing lactic acid bacteria strains and the addition of sucrose/maltose there was performed a metabolism and rheological analysis to see how the contents of carbohydrates and organic acids, pH, cell number, viscosity, and viscoelastic properties changed under fermenting. These were fermented at 30°C for 24 h. The cell number changed from 6 log cfu/g to 9 log cfu/g for all the fermented tests. The contents of lactic acid, acetic acid and fructose increased for two of the strains, and further increased when sucrose was added. The strain *Limosilactobacillus fermentum* TM336 and usage of 5% sucrose gave the highest increase in viscosity and elastic properties.

At the end there produced three chickpea burgers with different ratios of fermented to non-fermented chickpea puree to investigate the effects of fermented puree on the weight loss and textural changes. The fermented chickpea puree was fermented with *Llb. fermentum* TM336 and 5% sucrose and 17% aquafaba. The burgers texture was measured via a texture profile analysis. There were not any significant effects of the addition of fermented chickpea puree under the work of this master thesis.

Innhold

1 Innledning.....	1
1.1 Kikerter.....	2
1.1.1 Aquafaba.....	3
1.2 Fermentering.....	4
1.3 Melkesyrebakterier.....	6
1.4 Exopolysakkarider.....	7
1.5 Reologi.....	10
1.5.1 Reologiske analyser.....	11
1.6 Hensikt.....	12
2 Materialer og metoder.....	13
2.1 Forsøksoppsett.....	13
2.2 Prøvemateriale og vekstmedier.....	14
2.2.1 Prøvemateriale.....	14
2.2.2 Vekstmedier.....	15
2.2.3 Frysestock.....	16
2.3 Undersøkelse av melkesyrebakterie stammer.....	17
2.3.1 Screening av melkesyrebakterier for EPS-produksjon.....	17
2.3.2 Test av EPS-produksjon i kikertpuré 1.....	19
2.3.3 Test av EPS-produksjon i kikertpuré 2.....	19
2.4 Metabolismeforsøk.....	20
2.4.1 Preparering av kikertpuré.....	20
2.4.2 Analyse av bakteriell vekst.....	21
2.4.3 pH analyse.....	21
2.4.4 Analyse av karbohydrater og organiske syrer.....	21
2.5 Utvikling av kikertburger.....	22
2.6 Reologiske analyser av kikertpuré og -burger.....	24

2.6.1 Kikertpuré	24
2.6.2 Kikertburger.....	25
2.7 Databehandling og statistiske analyser.....	26
2.8 Prøvekoder	26
3 Resultater	28
3.1 Screening av EPS-produksjon hos utvalgte MSB	28
3.2 Test av EPS-produksjon i kikertpuré	30
3.2.1 Undersøkelse av vekst og EPS-produksjon i kikerter	30
3.2.2 Undersøkelsen av vekst i kikertpuré for utvalgte stammer.	31
3.2.3 Teksturanalyser av kikerter fermentert med utvalgte stammer	32
3.3 Metabolismeforsøk.....	37
3.3.1 pH-analyse	37
3.3.2 Celletall.....	38
3.3.3 Organiske syrer og karbohydratinhold.....	38
3.4 Reologianalyser av prøvene brukt til metabolismeforsøk.....	40
3.5 Produksjon av burger og teksturanalyser (TPA).	47
3.5.1 Vekttap under steking.....	47
3.5.2 «Texture profile analysis» av kikertburgere	48
4 Diskusjon	51
4.1 Screening og innledende fermenteringsforsøk.....	52
4.2 Cellevekst og endring av karbohydrater og organiske syrer	54
4.3 Teksturendring i kikertpuré.....	56
4.4 Produksjonen av kikertburgere med fermentert kikertpuré.....	57
4.5 Konklusjon	60
4.5.1 Videre forskning.....	61
Referanser.....	62
Vedlegg	69

Forkortelse	Forklaring	Side
ANS	Anti-næringsstoff	3
AS	«Amplitude Sweep»	11
EPS	Eksopolysakkarid	7
G'	Lagringsmodul	10
HeF	Heterofermentative	5
HePs	Heteropolysakkarid	8
HoF	Homofermentative	5
HoPs	Homopolysakkarid	8
KP1	Kikertpuré med eller uten 5% sukrose	15
KP2	Kikertpuré med eller uten 5% sukrose/maltose, og med eller uten aquafaba	15
LVER	Øvre grense for det viskoelastiske området	11
MSB	Melkesyrebakterier	6
MRS	deMan, Rogosa, Sharpe	15
RT	Rotasjonstest	11
SRT	Shear-rate test	11
TDOT	Temperaturavhengig oscillasjons test	11
TPA	«Texture profile analysis»	12
44%M	Sterilt vann med 44% (w/v) maltose	14
44%S	Sterilt vann med 44% (w/v) sukrose	14
80%S	Sterilt vann med 80% (w/v) sukrose	14

1 Innledning

FN's 17 bærekraftighetsmål er en arbeidsplan som går ut på å bekjempe fattigdom, ulikhet og stoppe klimaendringene. Blant annet inngår målene om å stoppe sult, forbedre folkehelsen og bevare artsmangfoldet i hav og på land (FN-Sambandet, 2023). For å nå disse målene med en økende verdens befolkning må det blant annet skje endringer i matvanene til mange industrialiserte land i verden. Rundt en tredel av all menneskeskapte klimagassutslipp er assosiert med matproduksjonen, de største andelene kommer fra husdyr, kunstgjødsel, og ødeleggelse av skogareal. Ved å øke andelen av vegetabiliske produkter og redusere animalske produkters blant konsumentene vil man kunne redusere utslippene assosiert med matproduksjon betraktelig (Crippa et al., 2021; United-Nations, 2023).

I mange industrialiserte land har trender og konsumenters økende fokus på helse og miljø ført til et økt konsum av plante-baserte matprodukter (PBM). I tillegg ønsker mange konsumenter mindre prosesserte produkter, i form av «Clean label». «Clean Label» er et merke som brukes for å signalisere at produktet inneholder familiære ingredienser for den generelle befolkningen, kan også kalles «kjøkken skaps ingredienser», eller ingredienser den generelle befolkningen har enkel tilgang til (Asioli et al., 2017). Dette har ført til en økende utvikling av plantebasert kjøtterstatere og kjøtt lignende produkter (Tachie et al., 2023). Blant de mest populære er «Beyond Meat» og Naturli (Ishaq et al., 2022). Mange av disse produktene har et høyt innhold av høyt prosesserte ingredienser som protein isolater og tilsetningsstoffer for å gi de plantebaserte produktene egenskapene til produktet de skal erstatte. Mange av disse kjøtterstatere bruker ekstrudering for å danne fiberlignende strukturer av protein isolater for å danne kjøttlignende strukturer (He et al., 2020; Ishaq et al., 2022). Lange ingredienslister med ukjente tilsetningsstoffer gjør mange konsumenter skeptiske til hvordan disse produktene påvirker helsen deres. Det er derfor interessant å undersøke hvordan en kunne produsert kjøtterstatere med nye prosesserings teknikker som reduserer mengden tilsetningsstoffer nødvendig for å danne akseptable produkter (Asioli et al., 2017). Et av disse alternativene er bruken av fermentering hvor eksopolysakkarider produserende melkesyrebakterier har blitt brukt for å forbedre teksturen i glutenfritt brød, grønnsakspurer, bønner og i flere melkeprodukter (Juvonen et al., 2015; Tachie et al., 2023; Yan et al., 2017).

For å etterligne animalske produkter blir ofte planter med et høyt protein innhold brukt, oftest belgfrukter som soya, erter, sorte bønner, kikerter osv. Disse plantebaserte produktene har også et høyt innhold av fiber og et lavere innhold av mettede fettsyrer i sammenligning med kjøtt, men alene har de en ufullstendig aminosyreprofil (Tachie et al., 2023). Ved varmebehandling av mange av disse belgfruktene blir det dannet en tykt flytende væske, også kalt aquafaba. Aquafaba produsert ved hermetisering av kikerter har i nyere tid blitt brukt som en erstatnings for egg på bakgrunn av dens emulgerende og skumdannende egenskaper (He et al., 2021). Dette kan da være en mulig ingrediens i kjøtterstatte.

1.1 Kikerter

Kikerter (*Cicer arietinum L.*) er en belgvekst som tilhører Fabaceae familien som har vært dyrket av mennesker siden Neolittisk tid, og var en av de åtte domestiserte plantene på denne tiden i Midtøsten. I dag er belgveksten konsumert over hele verden og produsert i over 50 land. Den største andelen produseres i India, men kikerter blir også produsert i Pakistan, Tyrkia, Australia, USA, Mexico, Myanmar og Etiopia (Sofi et al., 2020). Asia og Midtøsten har det høyeste konsumet av kikerter hvor de også har mange tradisjonelle retter som hummus og falafel (Nersten, 2021). Her er det også et stort potensial til bruk i andre produkter. Kikerter kan deles inn i to typer Desi og Kabuli som har noen små variasjoner i næringsinnholdet, men som skiller i hovedsak ut i fra fargen på plantens blomster.(Jukanti et al., 2012).

Kikerter er en økonomisk billig kilde til proteiner, essensielle aminosyrer, kostfiber og mineraler. Tørkede kikerter inneholder rundt 19% proteiner, 60% karbohydrater; hvorav det meste i form av stivelse, og 17% kostfiber (Sofi et al., 2020). Proteinene kan deles inn i gruppene albuminer, globuliner, prolaminer, gluteniner og rest proteiner (Sofi et al., 2020). De har et lavere innhold av svovelholdige aminosyrer, men hvis de blir konsumert sammen med kornprodukter vil de ha en mer komplett aminosyreprofil. De har et noe høyere innhold av fett sammenlignet med andre belgvekster som erter, linser og røde kidneybønner på 2-6%, hvor 85% er umettede fettsyrer. En stor andel av disse fettsyrene er olje-, linol-, palmitin- og stearinsyre (Jukanti et al., 2012).

Kikerter inneholder også liten andel mono-, di- og oligosakkarider (totalt rundt 3-6%), og i likhet med mange andre belgvekster har kikerter også et relativt høyt innhold av oligosakkarider i sammenligning med andre belgvekster. Oligosakkarider er 3-10 monosakkarid kjeder som ikke blir absorbert eller nedbrutt i fordøyelses systemet hos mennesker, men blir istedenfor brutt ned av bakteriefloraen i tykktarmen som fører til gassdannelse og flatulens. Alfa-galaktosider er hovedgruppen oligosakkarider i kikerter, og kan deles inn i raffinose familie oligosakkarider (RFO) og galaktosid cyclitols (Jukanti et al., 2012).

Kikerter inneholder i likhet med andre belgvekster også anti-næringsstoffer (ANS). Dette er stoffer som reduserer fordøyelse- og absorpsjonsgraden av næringsstoff, og som derved reduserer tilgjengeligheten til næringsstoffene. De deles opp i protein og ikke-protein ANS. Protein ANS er korte polypeptider som er svært syre resistente og som kompleksbindes og reduserer effekten til intestinale peptidaser og proteaser. Ikke-protein ANS inkluderer fenylsyre, tanniner, fenoler og alkaloider, hvor disse har evnen til å binde mineraler, redusere aktiviteten til noen enzymer og gir en bitter smak (Jukanti et al., 2012). Innholdet av ANS blir redusert ved bløtlegging, koking og hermetisering av kikertene (Jukanti et al., 2012; Sofi et al., 2020).

1.1.1 Aquafaba

Ved hermetisering eller koking av kikerter i vann blir det produsert en tykt flytende væske kalt aquafaba. Denne væsken har en rekke funksjonelle egenskaper som å være emulgerende, og skum- og gel-danner. Disse egenskapene har blitt utnyttet i produksjonen av egg-fri majones, marengs, dressing, og bakst. Aquafaba inneholder en kombinasjon av karbohydrater (mono-, di- og oligosakkarider, og cellulose), proteiner, mineraler, og ANS, og har et tørrstoffinnhold på 5-10% (He et al., 2021). Det eksakte innholdet av forskjellige komponenter vil variere etter type kikerter og behandlingsmetode benyttet. En lengere koke tid kan øke mengden tørrstoff samt redusere mengden av noen typer ANS (Alsaman et al., 2020).

De funksjonelle egenskapene gjør at denne ingrediensen har et potensiale til å erstatte bruken andre noen typer tilsetningsstoffer og dermed danne produkter med et «Clean Label»-merke. I tillegg kan aquafaba brukes som en erstatning for eggeprotein for de med en vegansk diet (He et al., 2021). Aquafaba har også en noen ulemper som dets innhold av oligosakkarider og andre ANS som kan føre til mageproblemer. Aquafaba kan også endre den sensoriske kvaliteten til et produkt når den brukes som en erstatning for melk og egg på grunn av endring i smak og den totale sensoriske opplevelsen (He et al., 2021).

1.2 Fermentering

Alle levende organismer er avhengig av energi for å leve. For å kunne produsere energi brukes redoksreaksjoner for å overføre energien til en mer brukbar variant for organismen. Her vil en komponent bli oksidert (reduksjonsmiddelet) for å redusere (oksidant) et annet. For mange aerobe organismer er det oksygen som tar rollen som reduksjonsmiddel, mens anaerobe organismer kan bruke både organiske og uorganiske substrater som reduksjonsmiddel. For begge typene respirasjon blir meste parten av energien produsert ved elektron transport fosforylering for å danne ATP. Fermentering er en type anaerob redoksreaksjons mekanisme hvor energien som blir produsert kommer fra substrat nivå fosforylering, som danner en mye lavere mengde ATP i sammenligning med respirasjon. I svært mange fermenteringsprosesser blir et substrat bruk som både reduksjonsmiddel og oksidasjonsmiddel. Dette fører til at substratet blir kun delvis oksidert, noe som fører til at mye av energien blir igjen i endeproduktet. Typen endeprodukt varierer mellom arter, men kan brukes til kategorisering av fermenteringstyper (Müller, 2008).

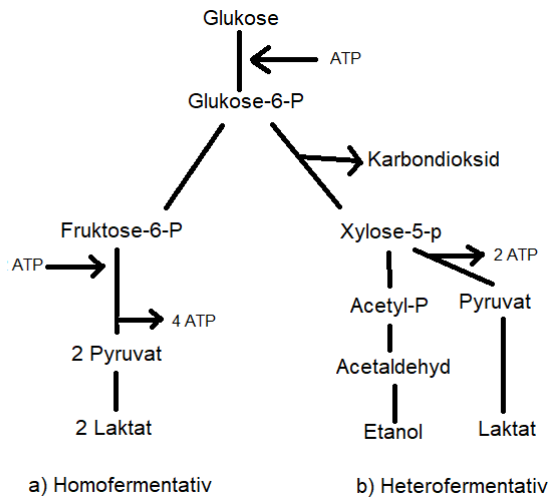
Noen av de vanligste typene endeprodukt er etanol, CO₂, melkesyre, propionsyre, butandiol, smørsyre, H₂, ravsyre, maursyre og eddiksyre. Mens de vanligste substrat er sakkarider (heksoser og pentoser), aminosyrer og andre organiske syrer (Müller, 2008).

Mikroorganismers evne til å fermentere substrater har lenge blitt utnyttet i produksjon og konservering av matvarer gjennom historien, en teknikk som fremdeles er mye brukt. Blant annet brukes fermentering til å produsere en rekke meieriprodukter som yoghurt, kulturmilk, rømme og ost, samt i kjøtt- og fiskebaserte produkter som pølser og rakfisk, og vegetabiliske produkter som øl, vin, sauerkraut og brød (Mannaa et al., 2021). Melkesyre-, eddiksyre- og etanolfermentering er noen av de mest brukte i

matvareindustrien i dag hvor bakterier og gjær blir brukt. Den vanligste etanol produsenten i matindustrien er *Saccharomyces cerevisiae*, hvor den konverterer et glukosemolekyl til 2 etanol og 2 CO₂ molekyler. Noe som brukes i øl, vin, og brød. Mens melkesyre blir i hovedsak produsert av en gruppe bakterier kalt melkesyrebakterier. Disse blir som nevnt brukt i mange meieriprodukter, rakkfisk, pølser og sauerkraut (Müller, 2008).

Ved å produsere store mengder melkesyre, etanol og/eller eddiksyre; som alle fungerer som antimikrobielle midler ved høye konsentrasjoner, blir veksthastigheten til mange typer mikroorganismer redusert noe som forlenger holdbarhetstiden på produktet (Müller, 2008). Etanol fungerer ved å interagere og ødelegge deler av cellens strukturer i plasma og cellemembranen til mikroorganismer (Liu & Qureshi, 2009). Melkesyre og mange andre svake organiske syrer vil ikke-dissosiere og vil da kunne enklere transporteres over cellemembranen til mikroorganisme og syrene det indre miljøet deres. Denne syrningen vil føre til denaturering av mange proteiner som ødelegger de eller reduserer deres effektivitet, som da fører til en redusert veksthastighet eller celledød (Peetermans et al., 2021). Syrningen kan også føre til teksturendringer i produktet på grunn av denaturering og/eller koagulering av proteiner. Dette skjer på grunn av at pH nærmer seg pKa-verdien til proteinene slik at den totale ladningen til proteinene blir nøytrale, som igjen fører til mindre frastøtningen og at proteinene kan koagulere. Dette blir utnyttet i for eksempel produksjonen av yoghurt, rømme og kulturmilk (Leroy & De Vuyst, 2004).

Melkesyrebakterier (MSB) er en av de viktigste fermenterings organismene i mat produksjon, og som nevnt brukt til å produsere yoghurt, kulturmilk, sauerkraut, pølser, surdeig og vin (Leroy & De Vuyst, 2004). Disse bakteriene kan grupperes etter om de produserer ett eller flere endeprodukter under fermentering, også kalt hhv homo- og heterofermentative. Homofermentative (HoF) MSB produserer hovedsakelig melkesyre og 2 ATP ved oksidering av glukose, mens heterofermentative (HeF) vil produsere både melkesyre, etanol/eddiksyre og/eller CO₂ og 1 ATP (Figur 1). Heterofermentative MSB har også muligheten til å bruke pentoser som substrat noe som mange Homofermentative MSB mangler (Mannaa et al., 2021; Müller, 2008)



Figur 1: Homo- og heterofermentative metaboliske reaksjonsveier (Mannaa et al., 2021; Müller, 2008). Laget i MS Paint.

1.3 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) ble først oppdaget på midten av 1800-tallet når Louis Pasteur studerte alkoholfermentering av rødbete juice, men istedenfor å få produsert alkohol ble det produsert melkesyre. Han oppdaget senere at melkesyrebakterier var ansvarlig for melkesyrefermentering av melk. I 1873 ble de første rendyrkede kulturene av melkesyrebakterier isolert av Joseph Lister. Det var først i 1919 at Orla-Jensen først systematiserte melkesyrebakteriene (Tian, 2019). Melkesyrebakterier og melkesyrefermentering har blitt brukt i over 5000 år over hele verden i preservering av mat og produksjonen av mat (König & Fröhlich, 2017). Det finnes også bevis på at fermenteringen ble brukt til å produsere syrnet melk i Sahara opptil 8000 år tilbake (Tian, 2019).

Melkesyrebakterier er en fellesnevner for en rekke Gram-positive bakterier som har melkesyre som et hovedprodukt ved fermentering av glukose. Melkesyrebakterier er en heterogen gruppe bakterier som har noen få felles trekk, men som også varierer svært mye. De er generelt ikke-sporedannende, aerotolerante anaerobe, katalase-negative, og har glukose fermentering som hoved energikilde. De varierer i morfologi (kokker, staver eller tettrader), salt og syre toleranse, EPS produksjon og optimumstemperaturer (15-45°C) (König & Fröhlich, 2017; Tian, 2019). I dag er det 41 slekter som klassifiseres som melkesyrebakterier, noen av de viktigste i mat er *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, og

Oenococcus. Mange av disse slektene og deres arter er klassifisert som generelt sett på som trygge (GRAS) til konsum (Tian, 2019).

Noen typer melkesyrebakterier har blitt vurdert til å ha positive effekter på tarm- og magehelse, blant annet har noen typer potensiale til å redusere diare og andre tarmproblemer etter operasjoner, antibiotikabruk, matinfeksjoner, etc. (Tian, 2019). Ordet probiotika blir mye brukt til å beskrive disse positive helseeffektene til melkesyrebakterier, men etter mer forskning og en økende usikkerhet angående dokumentert effekt er bruk av denne beskrivelsen omtrent opphørt. Det er i dag ett lovverk mot reklamering av probiotika i EU (Reid et al., 2019).

Melkesyrebakterier har også muligheten til å øke næringsinnholdet i mange belgfrukter som har et høyt innhold av utilgjengelige næringsstoffer på grunn av ANS. Noen av disse ANS er tanniner, fytinsyre og raffinose. Sammenlignet med animalske produktet har belgfrukter et protein innhold med lavere fordøyelighet, og mange av de kan føre til gastrointestinale problemer hos mange (Jukanti et al., 2012). MSB fermentering har blitt vist til å øke fordøyeligheten til proteiner i belgvekster ved å produsere ekstracellulære peptidaser og proteaser som gjør proteinene mer tilgjengelig for fordøyelses enzymer. Noen typer MSB har enzymer som kan metabolisere flere av ANS, blant annet *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, og *Lactiplantibacillus pentosus* (Michela et al., 2022).

1.4 Exopolysakkarider

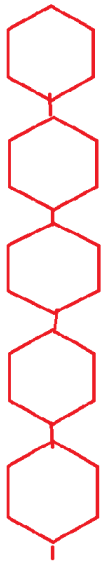
Mange bakterier produserer polysakkarider som enten er bundet til bakteriens overflate også kalt kapselpolysakkarider (KPS), hvor disse blir ofte er modifisert med peptider og lipider, eller produsert ekstracellulært som exopolysakkarider (EPS). Disse polymerne kan dannes av en variert mengde monosakkarider fra nedbrytingen av karbohydrater i et medium. EPS kan dannes i en rekke forskjellige typer med varierende lengde, sammensetning av monosakkarider og forgreningsgrad, men de deles inn i to subgrupper homosakkarider og heterosakkarider (Prete et al., 2021). Flere slekter og arter av melkesyrebakterier har forutsetningen for å produsere EPS, noen slekter som ofte produserer EPS er *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* og *Weissellale* (Patel & Prajapat, 2013). Dannelsen av EPS er en metode disse bakteriene bruker for å beskytte seg selv og redusere stresset fra omverdenen og fermenteringsprosessen (Donot et al., 2012).

Homopolysakkarider (HoPs) (Figur 2) er EPS sammensatt av kun en type monosakkarid; D-glukose, D-fruktose, eller D-galaktose. De varierer i lengden, forgrening, glykosidbinding, og hvilke hydroksylgrupper som er linket sammen. Videre inndeling er alfa eller beta-glukosider (D-glukose), inuliner (beta 2→1 bånd) og levaner (beta 6→1 bånd) (D-fruktose), og polygalaktaner (D-galaktose). Polygalaktaner er svært uvanlige. Noen av de vanligste typene alfa-glukanene er dextran (alfa 1→6 bånd), reuteran (alfa 1→3 bånd), mutans (alfa 1→4 bånd) og alternans (alfa 1→6 og alfa 1→3 bånd vekslende) (Prete et al., 2021). HoPs blir generelt sett passivt produsert extracellulært ved å bruke fritt sukker som en donor for korresponderende monosakkarid og extracellulær glykosyl hydrolase (Sanlibaba & Çakmak, 2016; Torino et al., 2015). Produksjonen av alfa-glukaner og fruktaner er mer eller mindre avhengig av sukrose som donor sakkarid. Beta-glukaner skiller seg fra disse to ved at de syntetiseres intracellulært ved hjelp av membran assosierte glykosyl transferaser og er ikke avhengig av sukrose som donor sakkarid (Prete et al., 2021; Torino et al., 2015).

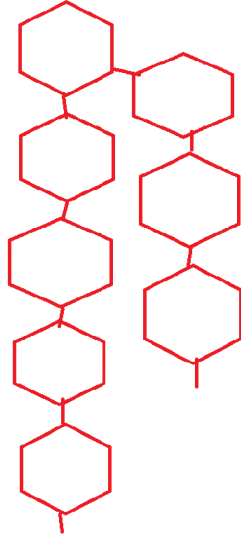
Heteropolysakkarider (HePs) (Figur 2) er polysakkarider satt sammen av to eller flere typer monosakkarider i tre til åtte repeterende sekvenser. Noen av de vanligste monosakkaridene er D-glukose, D-galaktose og L-rhamnose, hvor disse også kan bli modifisert med acetyl, pyruvat, fosfat, og glyserol. HePs blir aktivt syntetisert intracellulært, fraktet over cellemembranen og polymerisert extracellulært. I sammenligning med HoPs blir HePs generelt produsert i lavere mengder, og spiller derfor en mindre rolle med hensyn til EPS sin påvirkning på miljøet (Prete et al., 2021; Torino et al., 2015).

Homopolysakkarider

Uforgrenet

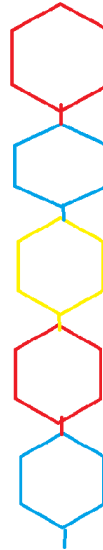


Forgrenet

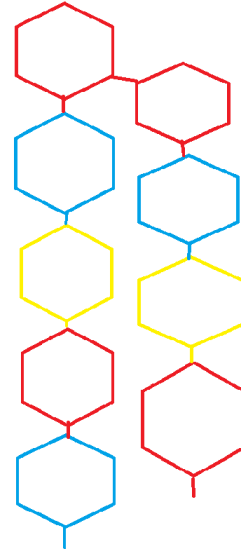


Heteropolysakkarider

Uforgrenet
Tre monomer typer



Forgrenet
Tre monomer typer



Figur 2: Illustrasjon av homo- og heteropolysakkarid, forgrenet og uten grener. Hvor de forskjellige fargede heksagonene representerer forskjellige typer monosakkarider (Prete et al., 2021; Torino et al., 2015). Laget i MS Paint.

MSB bruker EPS til å lage en fysisk barriere mellom seg selv om miljøet får å redusere stresset påført cellene fra under fermentering og trusler utenifra. I tillegg blir EPS også brukt i dannelsen av biofilm, celleaggregering og gir bakteriene evnen til å feste seg til andre overflater (Prete et al., 2021). Miljøfaktorer som pH, temperatur, osmotisk trykk, og innhold av skadelige kjemiske komponenter vil kunne redusere veksthastigheten eller drepe bakteriene. Det er derfor viktig for mange bakterier å danne denne barrieren for å få et noe mer kontrollert miljø (Nguyen et al., 2020). Endring i noen av disse variablene til suboptimale verdier kan fremme produksjonen av EPS i noen tilfeller. Hvor av reduksjonen av temperaturer til suboptimal temperatur økte produksjonen av EPS, mens endring i pH til suboptimale pH-verdier viste seg å ha varierende effekt ut ifra stammen brukt i en studie fra Prete et al. (2021).

Endringen av andre faktorer som mediets karbonkilde påvirker også EPS-produksjonen, men effektene ser ut til å være svært artsspesifikk (Elisashvili et al., 2009; Fukuda et al., 2010; Midik et al., 2020; Oleksy-Sobczak & Klewicka, 2020). Flere *Lactocaseibacillus rhamnosus* stammer fikk en økt EPS-produksjon med sukrose som substrat (Oleksy-Sobczak & Klewicka, 2020). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 og G12, *Streptococcus thermophilus* W22 og *Lactobacillus*

casei CG11 hadde den høyeste produksjonen med glukose som substrat (Elisashvili et al., 2009; Midik et al., 2020). Bruken av organisk nitrogen kilde i vekstmediet øker også det totale EPS utbyttet (Prete et al., 2021).

I dag blir EPS-produserende MSB brukt i matvareindustrien på grunn av EPS sine reologiske, stabiliserende og emulgerende egenskaper. I meieriindustrien blir de blant annet brukt i yoghurt og kulturmilk-produksjon (Prete et al., 2021). I Norge er produktet tettemelk avhengig av EPS-produserende MSB for trådtrekkende egenskapen til produktene (Netland, 2015). I tillegg gir EPS også andre fysiokjemiske egenskaper som økt viskositet, vannbindings evne og stabilitet ved å danne tre dimensjonale nettverk med seg selv og andre komponenter i miljøet sitt. Bruken av disse egenskapene har blant annet blitt demonstrert i produksjon av surdeigsbrød (Íspirli et al., 2020), og produksjonen av erte- og linseburger basert på fermenterte pureer av disse belgvekstene (Øyehaug, 2022).

1.5 Reologi

Reologi er læren om flyt og deformeringsendringene til materialer ved påføring av skjærspenning. Dette er et viktig fagfelt innenfor mange områder, blant annet innen geologi, utvikling av materialer til konstruksjon, maling og plastikk, kosmetikk og matproduksjon (Steffe, 1996). Innenfor matproduksjonsindustrien er reologi viktig for å kunne forutsi og forstå hvordan materialer beveger seg gjennom prosesseringsenheter og produktets funksjonalitet, holdbarhet, og sensorisk egenskaper (Steffe, 1996).

Oppførselen til disse materialene kan deles inn i viskositet og elastisitet, som begge kan være svært interessante for å forstå hvordan materiale oppfører seg under stress. Viskositeten kommer fra friksjonen mellom komponentene i materialet som fører til en dannelselse av varme energi som slippes løs til miljøet, og som fører til et tap av energi inne i materialet. Elastisiteten er evnen til å motstå eller returnere til den samme strukturen før deformering ved at de interne superstrukturene blir strukket uten å bli ødelagt, og energien som ble tilført bli bevart inne i materialet. Med dette som bakgrunn kan en dele disse inn i taps- (G'') og lagringsmodul (G') til å beskrive produktets henholdsvis viskøse og elastiske oppførsel. G' og G'' (gis i Pa) og deres forhold vil si om en har en viskoelastisk fast eller flyttende stoff. Hvis $G' > G''$ er det et viskoelastisk fast stoff, og hvis $G' < G''$ er det et viskoelastisk flyttende stoff. Tangens

delta ($\tan \delta$) er et dimensjonsløst tall som beskriver forholdet mellom G' og G'' ($\tan \delta = G''/G'$), hvor δ går fra 0° til 90° . (Anton-Paar, 2023b).

Produkters viskositets er ikke alltid konstant, men kan bli påvirket av flere faktorer, to av disse er temperatur og skjærhastigheten. Noen fluider har en viskositet som er uavhengig av skjærhastigheten, disse kalles newtonske (eks: vann, og aceton). Resten kalles ikke-newtonske væsker hvor skjærhastigheten vil enten øke eller redusere viskositeten. Skjærtynnende/Pseudoplastiske væsker får en reduksjon i viskositeten ved en stigende skjærhastighet (eks: polymerere og de fleste matmaterialer). Mens skjærtykkende/dilatante fluider vil ha en økende viskositet ved økende skjærhastighet (eks: stivelses løsning) (Anton-Paar, 2023b).

1.5.1 Reologiske analyser

Reometere er instrumenter brukt til å undersøke de reologiske egenskapene til ulike materialer. Det finnes flere typer undersøkelsesteknikker, men rotasjonstester er best egnet til å undersøke av matmaterialer. Rotasjonstester kan bli brukt med kontinuerlig rotasjon eller oscillerende skjærhastighet. Rotasjonstester bruker parameterne skjærspenning (Pa) og skjærhastighet (1/s). Shear-rate test (SRT) og Rotasjonstest (RT) er to typer kontrollerte skjærhastighetstester. Ved bruken av SRT ønsker en å finne viskositeten til et materiale ved å bruke en konstant skjæringshastighet over en hvis tids periode. Den vil også vise om materialet har trådtrekkendeegenskaper, det ser man ved at viskositet kurvene får en maks viskositet som så raskt reduseres. Ved bruken RT benyttes en kontrollert økende skjæringshastighet for å undersøke materialets viskositet ved en økende skjærhastighet, og dets flyteegenskaper. (Anton-Paar, 2023b). Oscillasjonstester bruker tøyning (%) og angulær frekvens (rad/S) som parametere. To typer oscillasjonstester er «amplitude sweep» (AS) og temperaturavhengig oscillasjonstest (TDOT) (Anton-Paar, 2023b). AS bruker en konstant angulær frekvens og en økende tøyning som viser G' og G'' i forhold til skjærspenningen eller tøyning. En kan bruke denne testen for å finne den øvre grense for det viskoelastiske området (LVER) ut ifra når G' har falt en bestemt prosent andel under platåverdien (Steffe, 1996). TDOT bruker konstant tøyning og angulær frekvens med en kontrollert økende og/eller synkende temperatur for å undersøke endringen av G' og G'' under temperatur endring, samt mulig geldannelse (Anton-Paar, 2023c).

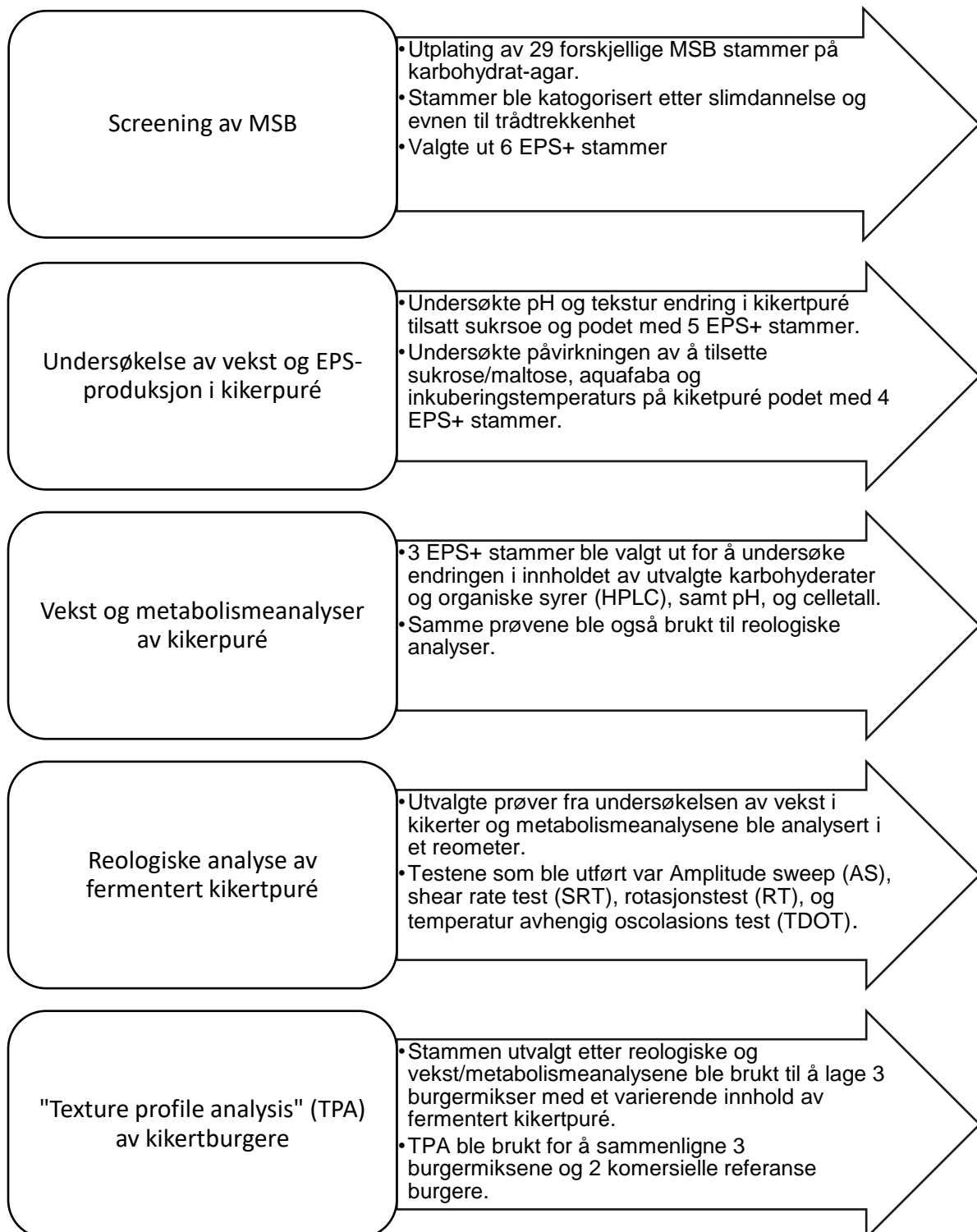
For å undersøke teksturen til faste eller semi-faste produkter kan en bruke «texture profile analysis» (TPA). Denne testen blir også kalt en «two-bite test» siden den etterligner munnens bite evne, og hvor en proben blir sendt ned i produktet to ganger. Proben vil bevege seg ned i produktet under en bestemt hastighet og en bestemt distanse eller motstand er nådd. Deretter går proben ut av prøven i en hvile periode. Forså å bli send ned i prøven igjen til det samme punktet som første gang. En kan bruke denne testen for å måle parameterne hardhet (Hardness), «cohesivness» , spents (Springiness), klebrighet (Gumminess), tykkemotstand (Chewiness) og «resilience» (Rosenthal, 2010; TTC, 2023). Disse parameterne beskrives som følger; hardhet – den høyeste motstands kraften oppnådd ved første trykket, cohesivness – hvor godt produktet motstår det andre trykket i forhold til det første, spenst – hvor godt produktet går tilbake til sin originale høyde etter det første trykket, klebrighet – er regnet ut for semi-solide produkter ved å ta hardhet * «cohesivness», tyggemotstand – er hovedsakelig regnet ut for solide produkter ved å ta klebrighet * spenst, og «resilience» – er hvor hardt produktet kjemper for å gå tilbake til sin originale høyde ved å se på motkraften til produktet etter det første trykket (TTC, 2023).

1.6 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke effekten av *in situ* produksjon av eksopolysakkarider fra melkesyrebakteriefermentering i en kikertbasert planteburger, og om EPS kan fungere som et alternativ til tilsetningsstoffer som i dag blir brukt i planteburgere. I denne masteroppgaven ble endringer ved melkesyrebakteriefermentering av kikerter undersøkt ved å måle og analysere pH, innhold av karbohydrat og organiske syrer, celletall og påvirkning på tekstur. Tekstur endringene i kikertene ble undersøkt ved bruken av et reometer, og «texture profile analysis» for kikertburgere. Det ble innledningsvis undersøkt effekten av forskjellige stammer melkesyrebakterier, tilsetting av karbohydrat, forskjellige inkuberingstemperatur og bruken av aquafaba. Det ble også laget kikertburgere med et variert innhold av fermentert og ikke-fermenterte kikerter for å undersøke effekten av fermenteringen på teksturen i en stekt kikertburger og vanntapet under steking.

2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksoppsett



Figur 3: Forsøks oppsettet til analysene utført under denne masteroppgaven vist i et flowchart. Laget i Microsoft Word.

Oppgaven gikk ut på å undersøke om *in situ* EPS-produksjon i kikertpuré kan ha en positiv effekt på teksturen til kikert-basert planteburger. Flytskjemaet for forsøksoppsettet er vist i Figur 3. Det ble valgt ut 29 MSB stammer til screeningen for EPS-produksjon, av disse stammene ble 5 EPS+ stammer valgt ut og brukt videre til å undersøke deres vekst i kikertpuré. pH-reduksjon og viskositetsøkning ble tatt som indikasjon på at bakterien vokste i kikertmediet. Deretter ble det valgt ut 4 EPS+ stammer for å undersøke effekten av å tilsette 5% sukrose/maltose, med og uten aquafaba og to inkubasjonstemperaturer på vekst i kikertpuré. Ut ifra disse testene ble det valgt ut 3 EPS+ stammer for å undersøke endring i pH, karbohydratmetabolisme og vekst av bakteriene under fermentering i kikertpuré. Karbohydratmetabolisme inkl produksjonen av organiske syrer ble analysert ved HPLC (avsnitt 2.4.4) og vekst av mikroorganismer ble registrert på karbohydrat-agar (avsnitt 2.4.2). Det ble også utført reologiske analyser på disse pureene samt utvalgte prøver fra det første fermenteringsforsøket, testene som ble benyttet var «amplitude sweep» (AS), shear-rate test (SRT), rotasjonstest (RT) og temperaturavhengig oscillasjonstest (TDOT). En av de EPS+ stammene ble så valgt ut for å bli brukt i en kikertbasert planteburger med et varierende innhold av fermenterte kikerter. For å best mulig etterligne kommersielle burgere ble kikert-burgermiksene tilsatt potetstivelse, rapsolje og salt. Det ble laget 3 burgermikser med forskjellige forhold av fermentert og ikke-fermentert kikertpuré, og tekstur etter steking ble sammenlignet med kommersielle burgere ved hjelp av «texture profile analysis» (TPA).

2.2 Prøvemateriale og vekstmedier

2.2.1 Prøvemateriale

Kikertene som ble benyttet var kikerter i lake (Rema 1000, 410 g, 250 g kikerter). Ingrediensene til kikertene i lake er forvullede og kokte kikerter (61%), vann (38%), salt (1%). Næringsinnholdet per 100 g kikerter beskrevet på pakningen er; fett (2 g), hvorav mettede fettsyrer (0,2 g), karbohydrater (16 g), hvorav sukkerarter (0,7 g), kostfiber (5,5 g), protein (6,5 g), og salt (0,88 g).

Sukroseløsning 44% (44%S) ble laget ved å veie ut sukrose (Merck, Tyskland, Darmstad) (44 g) i en målekolbe, for så etterfylle med destillert vann til et totalt volum på 100ml. Maltoseløsning 44% (44%M) ble laget ved veie ut maltose (Merck) (44 g) i en målekolbe og etterfylle med destillert vann til et totalvolum på 100 ml.

Sukrosløsning 80% (80%S) ble laget ved å veie ut sukrose (80 g) i en målekolbe, for så bli etterfylt med destillert vann til et totalvolum på 100 ml. Målekolbene ble plassert på en magnet rører hvor løsningene ble varmet opp under omrøring inntil alt karbohydratet var løst. Deretter ble de overført til 50 ml pyrexflasker som ble autoklavert (121°C i 15 min).

Den første Kikertpuré (KP1) ble preparert ved å helle av laken (aquafaba) (ca. 150 ml) fra en ny åpnet hermetisk boks. Kikertene (ca. 250 g) ble deretter skylt med sterilt vann (60 ml) i boksen før vannet ble helt av og, kikertene ble overført til en steril omni-mikser beholder (OMNI-MIXER HOMOGENIZER modell 17106, OMNI International, Waterbury, CT. USA) sammen med 100ml sterilt vann. Miksen ble så homogenisert (posisjon 4, i 3 minutter). Kikertpuréen ble overført til sterile syltetøyglass (46,8 g), sammen med 3,125 ml 80%S eller sterilt vann. KP1 til fermentering hadde en sammensetning av 71,4% kikerter og 5% sukrose eller sterilt vann.

Den andre kikertpuré (KP2) ble preparert ved å helle av laken (aquafaba) (ca. 150 ml) fra en ny åpnet hermetisk boks. Kikertene (ca. 250 g) ble deretter skylt med sterilt vann (60 ml) i boksen før vannet ble helt av og halvparten (120 – 130 g) av kikertene ble overført til hver sin sterile omni-mikser beholder sammen med en kombinasjon av enten sterilt vann/aquafaba (30 ml) og sterilt vann/44% sukkerløsning (44%S/44%M) (20 ml). Miksene ble homogenisert (posisjon 4) i ca. 3 min, men mange av prøvene måtte kjøres lengere etter som at puréene ble svært faste. Kikertpuréens sammensetning var 71,4% kikerter, 17,1% aquafaba eller sterilt vann, 5% karbohydrat + 5% sterilt vann eller 11,4% sterilt vann. Det ble overført ca. 50 g KP2 i sterile syltetøyglass.

2.2.2 Vekstmedier

Til screeningen av MSB stammer med hensyn til EPS-produksjon ble sukrose-, maltose- og glukose-agar benyttet (karbohydrat-agar). Agarene var sammensatt av 1 g Tryptone (Oxoid, Basingstoke, UK), 0,5 g gjær ekstrakt (Oxoid), 0,5 g K₂HPO₄ (EMD Millipore, Tyskland, Dramstad), 0,5 g di-NH₄-H-sitrat, agar-pulver (VWR International, Leuven, Belgia), og 5 g sukrose, maltose eller glukose (EMD Millipore) løst i 1000ml destillert vann. Karbohydrat agarene ble plassert i kokevannbad til alt var løst. Ble deretter overført til 250 ml pyrexflasker og autoklavert. Plassert i

vannbad (48°C) før bruk. Karbohydrat agarene ble så overført til petriskåler (ca. 20ml) klare til screening.

MRS-buljong ble laget til oppdyrking av MSB. MRS-buljongen hadde en sammensetning av 52,2 g MRS (EMD Millipore) per 1000 ml destillert vann. Miksen ble så satt på kokevannbad til alt var oppløst (ca. 30 min). Deretter ble 5ml MRS-buljong fordelt på 10 ml rør, eller fordelt på 250 ml pyrexflasker (100 ml). Rørene og flaskene ble autoklavert og satt på kjølelager til bruk.

MRS-agar ble laget for finne koloni dannende enheter (kde) i prøvene. Agaren hadde en sammensetning av 52 g MRS og 15 g agar pulver per 1000 ml destillert vann. Løsningen ble satt i kokevannbad til pulveret var oppløst (ca. 30 min). Deretter ble løsningen fordelt på pyrexflasker (200 ml). Pyrexflaskene ble autoklavert og satt på lager til bruk. Før bruk ble de satt i kokevannbad for å smelte agaren, deretter ble de satt i vannbad (48°C) for temperering. MRS-agaren ble overført på petriskåler (ca. 20 ml).

2.2.3 Frysestock

Til metabolismeforsøkene ble det laget frysestockløsninger av tre EPS produserende MSB stammer (stamme 3, 5 og 23). Disse ble valgt etter resultatet fra screeningen, test 1 og 2 av EPS-produksjon i kikertpuré og tidligere arbeid gjort av Øyehaug, F. (2022). De beste stammene ble tatt opp fra -80°C fryser på KBM, NMBU, og podet i MRS-buljong (5 ml) før inkubering ved 30°C i 24 t. Stammene ble så ompodet en ekstra gang under de samme betingelsene, før stammene ble 1% podet over til 100 ml MRS-buljong og inkubering ved 30°C i 24 t. Etter inkuberingen ble 100 ml av hver stamme overført til to 50 ml sterile sentrifugerør, og sentrifugert i Thermo Scientific Multifuge X3R sentrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA) ved 8 000 x G, ved 4°C, i 10 min. Pelleten ble vasket ved at supernatanten ble fjernet og pellet ble oppløst i Ringers løsning (25 ml) for ny sentrifugering. Denne vaskingen ble gjentatt to ganger. Pellet ble så resuspendert i Ringers løsning (10 ml) med 15% glyserol. Bakterieløsningene ble så overført (0,5 ml) til sterile fryserør og plassert i fryser (-80°C).

For å undersøke celledallet i frysestockene ble 0,1 ml frysestock overført til 9,9 ml Ringers løsning (1/10² fortynning), deretter ble 0,1 ml fra denne løsningen overført til 9,9 ml Ringers løsning (1/10⁴ fortynning). Dette ble repetert to ganger til en 1/10⁸ fortynning var nådd. Utplating ved innstøping i MRS-agar med konsentrasjonene

1/10⁶, 1/10⁷ og 1/10⁸ ble deretter utført. Det ble laget 2 paralleller av hver fortykning og disse ble inkubert ved 30°C i 2 døgn. Skåler mellom 30 – 300 kolonier etter inkubering ble telt og bakteriekonsentrasjonen ble utregnet.

2.3 Undersøkelse av melkesyrebakterie stammer

2.3.1 Screening av melkesyrebakterier for EPS-produksjon

Screeningen av melkesyrebakterie stammene ble utført ved at 29 MSB stammer (Tabell 1) ble valgt ut inkluderende en referanse stamme og hvor 28 av disse var tidligere isolert fra forskjellige plantemateriale og fryst ned på NMBU (Leirvik, 2022; Ng'ong'ola-Manani et al., 2015; Østlie et al., 2021). Alle stammene ble tint og podet over i MRS-buljong før inkubert ved 30°C i 24 t. Stammene ble ompodet en ekstra gang før bruk ved samme betingelsene. Ved å bruke en steril podenål ble hver av stammene strøket ut på karbohydrat-agarene, to stammer per skål. De ble så inkubert ved 30°C i 48 t. Stammene ble så undersøkt for vekst og EPS-produksjon. Utsende og trådtrekkenhet på koloniene ble undersøkt og brukt som en indikasjon på EPS-produksjon. Utsende ble delt inn i enten små tørre (-), små slimete (+), slimete (++) og store slimete kolonier (+++) (Figur 4). Trådtrekkenheten ble testet ved å berøre koloniene med en pode nål og undersøke om kolonien hang igjen i en tynn tråd, hvor ca. 5 mm ble regnet som litt trådtrekende (+) og ca. 10 mm eller lengere ble regnet som trådtrekende (++) (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).



Figur 4: Forskjellige utsende med hensyn til vekst og EPS-produksjon av melkesyrebakterier på karbohydrat-agar hvor kategoriene brukt under screeningen var. A; små tørre, B; Små slimete, C; Slimete, D; store slimete kolonier.

Tabell 1: Utvalgte MSB stammer brukt til screening av EPS-produksjon. Angitt informasjon er nr. brukt videre i oppgaven, stammer benyttet, kilden stammen ble isolert fra, og om de er homofermentative (HoF) eller heterofermentative (HeF). Stamme nr. 1-4 (Ng'ong'ola-Manani et al., 2015; Østlie et al., 2021), 1-14 (Leirvik, 2022), 15-28 (Munch-Andersen et al., 2022).

Nr.	Stammer	Kilde	Fermentering
1	<i>Weisella confusa</i> TM 76	Soyabønner	HeF
2	<i>Weisella cibaria</i> <TM 120	Soyabønner	HoF
3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> TM 336	Soyabønner	HeF
4	<i>Leuconostoc citreum/holzapfelii</i> GK 50	Bygg	HeF
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> VL9	Bokhvete	HoF
6	<i>P. pentosaceus</i> VL25	Bokhvete	HoF
7	<i>Leu. mesenteroides/pseudomesenteroides</i> VL1	Havre	HeF
8	<i>Leu. mes./pseudomes.</i> VL18-2	Havre	HeF
9	<i>Leu. mes./pseudomes.</i> VL19	Havre	HeF
10	<i>Lactopantibacillus plantarum/pentosus</i> VL51	Havre	HoF
11	<i>Lpb plantarum</i> VL53	Havre	HoF
12	<i>Lpb plantarum</i> VL11	Quinoa	HoF
13	<i>P. pentosaceus</i> VL14	Quinoa	HoF
14	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> VL29	Quinoa	HoF
15	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM2	Fadabønner	HoF
16	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM12	Erter	HoF
17	<i>P. pentosaceus</i> CM54	Fadabønner	HoF
18	<i>P. pentosaceus</i> CM81	Fadabønner	HoF
19	<i>P. pentosaceus</i> CM73	Erter	HoF
20	<i>Leu.mes./Leu citreum</i> CM87	Erter	HeF
21	<i>P. pentosaceus</i> CM64	Erter	HoF
22	<i>P. pentosaceus/Lpb. plantarum</i> CM67	Erter	HoF
23	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	Fadabønner	HoF
24	<i>P. pentosaceus</i> CM90	Fadabønner	HoF
25	<i>P. pentosaceus</i> CM57	Erter	HoF
26	<i>Leu. mesenteroides</i> CM78	Erter	HeF
27	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> CM61	Erter	HoF
28	<i>P. pentosaceus/Enterococcus durans</i> CM84	Erter	HoF
29	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> DSM 20484		HeF

2.3.2 Test av EPS-produksjon i kikertpuré 1

Det ble valgt ut 5 MSB stammer etter screeningresultatet fra avsnitt 2.3.1. Stammene som ble valgt ut var *W. cibaria* <TM 120 (nr. 2), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5), *Leu. mes. /pseudomes.* VL18-2 (nr. 8), *P. pentosaceus/Lpb. plantarum* CM67 (nr. 22), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23). De utvalgte stammene ble podet (1%) i MRS-buljong (5 ml) og inkubert ved 30°C i ca. 24 t, dette ble gjort i to omganger for å få de i aktiv vekst.

Kikertpuré 1 (KP1) (avsnitt 2.2.1) podet med MSB stammer (1% w/v) ble benyttet i første test. Prøvene med 5% sukrose var sammensatt av kikertpuré (46,8 g), 80%S (3,125 ml), og 1% (v/w) MSB stammer dyrket i MRS-buljong (0,5 ml). Prøvene uten sukrose var sammensatt av kikertpuré (46,8g), sterilt vann (3,125 ml) og 1% (v/w) MSB stammer dyrket i MRS-buljong (0,5 ml). En kontroll ble laget av kikertpuré (46,8 g) og sterilt vann (3,625 ml) uten MSB tilsatt.

Prøvene ble inkubert ved 30°C i 24 t. pH ble målt før og etter inkubasjonstiden (avsnitt 2.4.2). Prøvene ble så visuelt undersøkt for teksturendring ved bruk av skje.

2.3.3 Test av EPS-produksjon i kikertpuré 2

Det ble så valgt ut 3 MSB stammer etter resultatene fra screeningen (avsnitt 2.3.1) og første EPS-produksjons test (avsnitt 2.3.2). Stammene som ble valgt ut var *W. cibaria* <TM 120 (nr. 2), 5 (*P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23). De utvalgte stammene ble 1% podet i MRS-buljong (5ml) og inkubert ved 30°C i ca. 24 t, dette ble gjort i to omganger for å få de i aktiv vekst.

Kikertpuré 2 (KP2) (avsnitt 2.2.1) podet tilsvarende KP1 ble benyttet i den andre testen. Prøvene med 5% karbohydrat-løsning hadde en kombinasjon av kikerter (71%), aquafaba eller sterilt vann (17%), 44%S/44%M eller sterilt vann (11%), og 1% (v/w) MSB stammer dyrket i MRS-buljong (0,5 ml). En kontroll ble laget av kikerter (71%) og sterilt vann (29%). Det ble veid ut 50 g KP2 i sterile syltetøyglass før poding med MSB stammer (1% v/w) dyrket i MRS-buljong (0,5 ml) eller tilsetning av sterilt vann (0,5ml). Sammensetningene til prøvene er vist i Tabell 2.

Tabell 2: Sammensetningen av de forskjellige prøvene testet under den andre EPS testen. Kodene på prøvene er angitt sammen med nr. på stammen som ble brukt, karbohydrat tilsetning (S; sukrose, M; maltose, -; uten), og uten eller med aquafaba (A; med aquafaba, -; uten aquafaba). Temperatur er angitt hvor 22; 22°C og 30; 30°C.

Kode	Stamme	Sakkarid	Aquafaba
2SA30/2SA22	2	S	A
5MA30/5MA22	5	M	A
23SA30/23SA22	23	S	A
2SU30/2SU22	2	S	-
5MU30/5MU22	5	M	-
23SU30/23SU22	23	S	-
2UA30/2UA22	2	-	A
5UA30/5UA22	5	-	A
23UA30/23UA22	23	-	A
2UU30/2UU22	2	-	-
5UU30/5UU22	5	-	-
23UU30/23UU22	23	-	-
KUU30	Uten	-	-

Prøvene ble inkubert ved enten 22°C eller 30°C i 24 t. pH ble målt før og etter inkubasjonstiden (avsnitt 2.4.2). Teksturen ble undersøkt ved reologianalyser (avsnitt 2.5).

2.4 Metabolismeforsøk

For å undersøke vekst og metabolisme av MSB i kikertpuréen i løpet av fermenteringstiden ble celletall, pH, og innhold av karbohydrater og organiske syrer undersøkt. Disse analysene ble utført før (T0) og etter (T24) fermentering. Alle analysene ble repetert i 3 omganger.

2.4.1 Preparering av kikertpuré

Det ble valgt ut 3 MSB stammer etter resultatene fra screeningen (avsnitt 2.3.1), testen av EPS-produksjon i kikertpuré 2 (avsnitt 2.3.3) og en tidligere masteroppgave ved KBM fra Øyehaug F. (2022). Stammene som ble valgt ut til dette forsøket var *Lfb. fermentum* TM 336 (nr. 3), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23).

Kikertpuré 2 (KP2) (avsnitt 2.2.1) med 5% karbohydrat tilsetning ble igjen benyttet. Prøvene hadde en kombinasjon av kikerter (71%), aquafaba (17%), og 44%S/44%M (Stamme 5 med maltose, stamme 3 og 23 med sukrose) eller sterilt vann (11%). En kontroll ble laget med kombinasjonen kikerter (71%), aquafaba (17%) og sterilt vann

(11%), og ble ikke podet med MSB. Det ble målt ut 100 g KP2 med kombinasjonene beskrevet ovenfor i hvert sitt syltetøyglass, disse ble podet med frysestockløsning av de 3 stammene til 10^6 kde/g. De ble podet med 1,5 – 2 t mellomrom. Podet kikertpuré, 50 g, ble fordelt i syltetøyglass og inkubert ved 30°C i $24 \pm 0,5$ t. Det ble tatt ut prøver ved tid 0 (T0) og etter 24 t (T24). Totalt 14 prøver per fermenteringsforsøks runde.

Disse forsøkene gikk over 3 uker med ett fermenteringsforsøk hver uke, og ble utført på samme måte gjennom alle ukene.

2.4.2 Analyse av bakteriell vekst

Det ble veid ut 10 g prøvematerielle fra kikertpureene som ble overført til en Stomacherpose, og tilsatt 90 ml Ringens løsning, tilsvarende $1/10$ fortynning. Prøvene ble homogenisert i 2 min ved medium hastighet i en Stomacher (Stomacher 400 Lab Blender, Seward Medical, England). En fortynningsrekke ble laget ved å overføre 1 ml fra Stomacherposen til 9 ml Ringersrør ($1/10^2$ fortynning). Deretter ble 0,1 ml fra $1/10^2$ fortynningen overført til 9,9 ml Ringersrør ($1/10^4$ fortynning), og fra denne fortynningen ble 0,1 ml overført 9,9 ml Ringersrør ($1/10^6$ fortynning).

Fortynningene som ble benyttet for T0 prøvene var $1/10^3$, $1/10^4$ og $1/10^5$, og for T24 prøvene ble $1/10^5$, $1/10^6$ og $1/10^7$ benyttet. Disse ble støpt inni MRS-agar, med 2 paralleller per fortynning. Disse ble inkubert ved 30°C i 48-56 t. Dette ble gjennomført ved alle 3 fermenteringsforsøkene. Skåler mellom 30 – 300 kolonier etter inkubering ble telt og bakteriekonsentrasjonen ble utregnet.

2.4.3 pH analyse

For å undersøke pH endring i kikertpureene ble pH målt før og etter fermenteringen. Det ble tatt ut ca. 5 g prøvemateriale fra kikertpureene hvor pH ble målt med en pH elektrode (Radiometer, København, Danmark) og et pH-meter (PH92 Lab pH meter, Radiometer). pH-meteret ble kalibrert daglig ved bruken av standard bufferløsning (Merck) på pH 4,0 og 7,0.

2.4.4 Analyse av karbohydrater og organiske syrer

Innholdet av karbohydrat og organiske syrer før og etter fermenteringen ble analysert med «High Performanse Liquid Chromotography» (HPLC) beskrevet av Grennevik (2011). Analysen ble gjennomført ved alle 3 fermenteringsforsøkene.

Det ble veid ut 1,00 g prøvemateriale i 15 ml reagensrør med kork. Deretter ble det tilsatt 2,50 ml ionebyttet vann, 0,200 ml 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland), og 8 ml CH₃CN (Merck, Tyskland). Prøvene ble vendt forhånd og deretter plassert i en Multi RS-60 Biosan vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min. Prøvene ble så sentrifugert i en Kubota 2010 (Kubota Corporation, Tokyo, Japan) ved 3500 RPM i 15 min. Supernatanten ble filtrert med en 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC rør, hvor 1 ml supernatant ble brukt for å vaske filteret mellom prøvene (Grønnevik et al., 2011).

Prøvene ble analysert ved hjelp av programvaren OpenLab CDS (Agilent Technologies) og HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), bestående av pumpe (Agilent Technologies), auto sampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Det ble injisert 25 µl prøvemateriale inn i en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Det ble brukt en kolonnetemperatur på 32°C, en mobilfase av 5 mM H₂SO₄ og en hastighet på 0,4 ml/min (Grønnevik et al., 2011).

En standardløsning ble preparert og analysert på samme måte som prøvene for å bestemme innholdet av de ulike komponentene i prøvene. Komponentene i prøvene ble indentifisert ved retensjonstid i sammenligning med standardløsningen. Standardløsningen hadde en sammensetning av maltose, fruktose, glukose, melkesyre, citratsyre og eddiksyre. Eddiksyre og karbohydratene ble detektert ved hjelp av RI-detektor, og resten av organiske syrene ble detektert med DAD-UV detektor (Grønnevik et al., 2011).

2.5 Utvikling av kikerburger

Etter resultatene fra de reologiske analysene (avsnitt 2.5.1) av fermenteringsforsøkene ble stamme 3 (*Lfb. fermentum* TM 336) og med sukrose tilsetning valgt ut til produksjonen av kikerburgere. Tillagingen av fermenterte kikerpuréen som ble brukt er beskrevet i avsnitt 2.3.4, hvor stamme 3 og 5% sukrose ble benyttet. Ikke-fermentert kikerpuré ble laget ved å blande 250 g kikerter (71%), 60 g aquafaba (17%) og 40 g vann (11%) i en foodprosessor (Bosch Multi Talent 3 MCM3110W), ved trinn 1 i 1 min. Det ble laget tre (A, B, og C) forskjellige

burgermikser med et varierende forhold av fermentert og ikke-fermentert kikertpuré. Burgermiks A inneholdt 1:0 forhold av fermentert til ikke-fermentert kikertpuré, miks B inneholdt 1:1 forhold av fermentert til ikke-fermentert kikertpuré, og miks C inneholdt 0:1 forhold av fermentert og ikke-fermentert kikertpuré.

Det ble også tilsatt potetmel (Hoff, Norge), rapsolje (Rema 1000, Nederland) og salt (Dansk salt A/S, Danmark). Burgermiksene bestod av 75% kikerpuré, 12,5% rapsolje, 11,5% potetmel og 1% salt, og det ble laget ca. 400 g oppskrifter av alle burgermiksene. I en bakebolle ble 300 g kikertpuré, 50 g rapsolje, 46 g potetmel og 4 g salt blandet til en homogen blanding ved hjelp av en slikkepott. Blandingsforholdene til de tre burgermiksene er vist i Tabell 3.

Tabell 3: Ingrediensene brukt til tre forskjellige burgermikser, A, B og C. Viser andelen fermentering og ikke fermentert kikerpuré brukt, samt mengden olje, potetmel, salt og slutt volumet.

Ingredienser	A	B	C
Fermentert kikertpuré	300	150	0
Kikertpuré	0	150	300
Potetmel	46	46	46
Rapsolje	50	50	50
Salt	4	4	4
Total mengde	400	400	400

For å lage burgerne ble det tatt ut ca. 100 g materiale fra burgermiksene som ble formet til runde burgere med en diameter på ca. 10 cm og en høyde på ca. 2 cm. Det ble laget 3 burgere av hver burgermikser. Disse burgerne ble lagt på små firkantede biter av bakepapir og veid, før de ble plassert på et stekebrett. Burgerne ble stekt i stekeovn på samme brett ved 230 °C med over – under varme i 20 min. Etter steking ble de overført til et romtemperert steke brett og et ark med bakepapir ble lagt over de for å redusere inntørking av overflaten. Etter steking endret formene på burgerne seg til ca. 12-14 cm diameter og en høyde på 1-1,5 cm. Etter 40 min nedkjøling ble de igjen veid, for å undersøke vekttapet under steking.

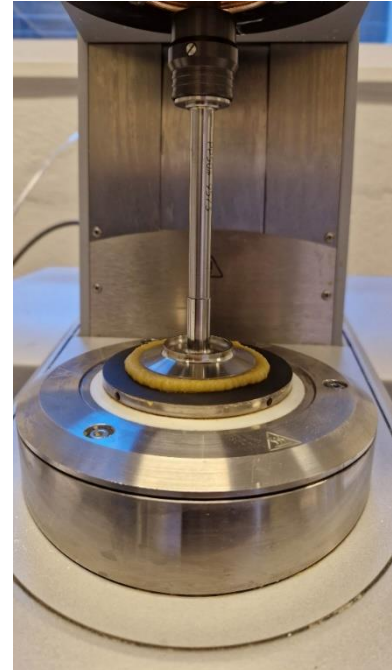
2.6 Reologiske analyser av kikertpuré og -burger

2.6.1 Kikertpuré

For å undersøke effekten av EPS produserende MSB på teksturen i kikertpuré og kikerburger ble reometer med plate-plate målesystem som beskrevet nedenfor benyttet til reologiske analysene. Analysene ble gjennomført på alle 25 prøvene fra den andre fermenteringsforsøket for EPS-produksjon i kikertpuré (Avsnitt 2.3.3), uten paralleller. Og alle 7 prøvene benyttet til metabolismeforsøket (avsnitt 2.3.4), i 3 paralleller.

Det ble benyttet et reometer modell Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Graz, Østerrike), og plate-plate målesystem (PP50/P2-SN9573) til reologianalysene (Figur 5). Dataen ble produsert og analysert av Rheoplus (RHEOPLUS/32 V3.40). Det ble overført ca. 20 g prøvemateriale på platen, hvor så platen ble senket

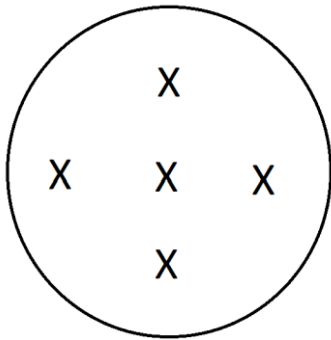
til måleposisjonen (3 mm). Overskuddsmateriale ble ikke fjernet før målingen for å redusere inntørking av prøven under analysene. Det ble brukt en målingstemperatur på 20°C. Analysene som ble benyttet var; 1: «Amplitude sweep» (AS) med en økende kontrollert tøyning (0,01-10%) og konstant angulær frekvens (10 rad/s) med 19 målepunkter, 2: «Shear rate test» (SRT) med konstant skjæringshastighet på 0,1 s⁻¹ og 120 målepunkter med økende intervaller mellom 0,1-10 s, 3: «Rotasjonstest» (RT) med økende kontrollert skjæringshastighet mellom 1-300 s⁻¹, og 4: Temperatur avhengig oscillasjons test (TDOT) med konstant tøyning (0,1%) og angulær frekvens (10 rad/s), og kontrollert temperaturendring. Temperaturen til TDOT startet ved 20°C, forså bli økt til 90°C, deretter nedkjølt igjen til 20°C. Rheoplus ble benyttet for å finne område for det viskoelastiske området (LVER) for AS når G' gikk ned 3% fra startsverdi.



Figur 5: Reometer med plate-plate målesystem med kikertpuré

2.6.2 Kikertburger

For å undersøke tekstur forskjellene mellom burgermiksene og referanse burgere ble en «texture profile analysis» (TPA) benyttet. Teksturen på burgerne ble undersøkt ved bruk av TA.HDplus Texture Analyser (Stable Mirco system, UK), med en sylinder sonde (SMS P/0.5). Dataen ble produsert av Exponent connection V. 7.0.1.0. Det ble brukt en hastighet på 5 mm/s og sonden gikk ned 50%. Burgerne ble laget som beskrevet i avsnitt 2.6. Etter 40 min nedkjøling av burgerne etter steking ble det gjort målinger på burgerne laget av de tre burgermiksene, hvor det ble kjørt to paralleller. Det ble gjort målinger på 5 punkter (Figur 7), totalt 10 målinger per burgermiks (Figur 6).



Figur 7: Illustrasjon av målepunktene brukt i TPA.



Figur 6: Bilde av kikertburger under TPA målt med en sylinder sonde.

Det ble også gjort TPA på 2 frosne referanse burgere, Classic Hamburger 8stk (Nortura AS (Gilde), Norge) og Naturli-burger (Orkla Foods Norge AS, Norge). Burgerne ble tint og temperert til 4°C og veid før steking. Disse burgerne ble stekt i stekeovn på 230°C ved over – under varme i 20 min, deretter ble de overført til et nytt stekbrett og et lag med bakepapir ble plassert over dem. Disse ble nedkjølt i 40 min før de ble veid igjen og TPA ble utført på samme måte beskrevet ovenfor, disse ble også kjørt i to paralleller.

2.7 Databehandling og statistiske analyser

Rstudio (Rstudio-2022.12.0. Build 353) og Microsoft Excel ble brukt til data behandling, og tillaging av figurer og tabeller. Det ble utført ANOVA og Tukeys test for å undersøke forskjeller og sammenhenger mellom pH, innhold av karbohydrater og organiske syrer, viskositet og reologiske verdier fra Rheoplus og Exponent connection. Rstudio ble brukt for å undersøke forskjeller mellom prøvene ved et signifikansnivå på 0,05, samt til å lage korrelasjonsplot, boksplots og skatterplots. Excel ble brukt for å lage søyle- og linjediagram og tabeller.

2.8 Prøvekoder

Oversikten over prøvekodene brukt i denne oppgaven (materialer og metoder, og resultatdelen) er vist i Tabell 4. Her vises hvilke stammer som ble brukt, karbohydrat (sukrose, maltose eller ingen), med eller uten aquafaba og inkuberingstemperatur.

Tabell 4: Forklaring på prøvekode med hensyntil variablene brukt under forsøkene beskrevet i materialer og metoder kapitelet og i resultater. Her vises prøvekodene, stamme benyttet, sukkerarten brukt (S; sukrose, M; maltose, -; uten sukker), innholdet av aquafaba (A; med aquafaba, -; uten aquafaba), og inkuberingstemperatur 22°C (22) eller 30°C (30).

Prøve kode	Stamme	Sukkerart	Aquafaba	Inkuberings-temperatur (°c)
2S	<i>W. cibaria</i> <TM 120	S	-	30
5S	<i>P. pentosaceus</i> VL9	M	-	30
8S	<i>Leu. mesenter. /pseudomesenteroides</i> VL18-2	S	-	30
22S	<i>P. pentosaceus/Lpb. plantarum</i> CM67	S	-	30
23S	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	S	-	30
2U	<i>W. cibaria</i> <TM 120	-	-	30
5U	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	-	30
8U	<i>Leu. mesenter. /pseudomesenteroides</i> VL18-2	-	-	30
22U	<i>P. pentosaceus/Lpb. plantarum</i> CM67	-	-	30
23U	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	-	-	30
KU	-	-	-	30
2SA22	<i>W. cibaria</i> <TM 120	S	A	22
5MA22	<i>P. pentosaceus</i> VL9	M	A	22
23SA22	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	S	A	22
2UA22	<i>W. cibaria</i> <TM 120	-	A	22
5UA22	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	A	22
23UA22	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	-	A	22
2SU22	<i>W. cibaria</i> <TM 120	S	-	22
5MU22	<i>P. pentosaceus</i> VL9	M	-	22
23SU22	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	S	-	22
2UU22	<i>W. cibaria</i> <TM 120	-	-	22
5UU22	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	-	22
23UU22	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	-	-	22
2SA30	<i>W. cibaria</i> <TM 120	S	A	30
5MA30	<i>P. pentosaceus</i> VL9	M	A	30
23SA30	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	S	A	30
2UA30	<i>W. cibaria</i> <TM 120	-	A	30
5UA30	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	A	30
23UA30	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	-	A	30
2SU30	<i>W. cibaria</i> <TM 120	S	-	30
5MU30	<i>P. pentosaceus</i> VL9	M	-	30
23SU30	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	S	-	30
2UU30	<i>W. cibaria</i> <TM 120	-	-	30
5UU30	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	-	30
23UU30	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	-	-	30
KUU30	-	-	-	30
3SA30	<i>Llb. fermentum</i> TM 336	S	A	30
KUA30	-	-	A	30

3 Resultater

Resultatene er fordelt inn i 5 seksjoner; EPS screening av MSB, Test av EPS-produksjon i kikertpuré, metabolismeforsøk, reologianalyser, og burgerforsøk.

3.1 Screening av EPS-produksjon hos utvalgte MSB

Det var totalt 29 MSB stammer som ble utvalgt for EPS screening og som da kunne blitt brukt videre i oppgaven, av disse var nr. 29 en referanse stamme. Tabell 5 viser resultatene fra EPS screeningen av de 29 MSB stammene, hvor det ble brukt 3 forskjellige karbohydrat-agarer (sukrose, maltose, og glukose). Stammene ble kategorisert etter koloniutseende og om de hadde trådtrekkende egenskaper (beskrevet i avsnitt 2.3.1). Totalt var det 11 stammer som ga slimete kolonier, hvor av disse var det 4 som var veldig slimete, 4 slimete og 3 litt slimete kolonier. Det var stammene *W. confusa* TM76 (nr. 1), *W. cibaria* TM120 (nr. 2), *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3), og *Leu. Citreum/holzapfelii* GK50 (nr. 4) som ga veldig slimete kolonier på sukrose-agaren, mens stammene *Leu.mes./pseudomes.* VL1 (nr. 7), *Leu.mes./pseudomes* VL18-2 (nr. 8), *P. pentosaceus/Llb. plantarum* CM65 (nr.22), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) ga slimete kolonier. Stammene *P. pentosaceus* VL25 (nr. 6), *P. pentosaceus* CM54 (nr. 17) og *P. pentosaceus* CM73 (nr. 19) litt slimete kolonier på glukose-agar, mens *P. pentosaceus* CM73 (nr. 17) ga også litt slimete kolonier på maltose-agar. Det var totalt 14 stammer som var trådtrekkende, hvor 2 av stammene hadde tråder på 10 mm og 12 stammer som hadde tråder på 5 mm. Stammene *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *P. pentosaceus* VL25 (nr. 6) på maltose-agar som gå tråder på 10 mm, mens *Leu.mesenter./pseudomes.* VL19, *P. pentosaceus* VL14, *P. pentosaceus* CM54, og *P. pentosaceus* CM73 (nr. 9, 13,17, 19) hadde tråder på 5 mm på maltose-agar. På sukrose-agar var det *W.cibaria* <TM120, *Llb. fermentum* TM336, *Leu. citreum/holzapfelii* GK50, *Lpb. plantarum* VL53, *Lpb. plantarum/pentosus* VL29, *P. pentosaceus* CM81, *P. pentosaceus/Llb. plantarum* CM65 og *Leu.mes. ssp. Dextranicum* DSM20484 (nr. 2, 3, 4, 11, 14, 18, 22, 29) som hadde tråder på 5 mm. Mens på glukose-agar var det *P. pentosaceus* VL9, *P. pentosaceus* VL25, *Leu.mes./pseudomes.* VL18-2, *P. pentosaceus* VL14, *P. pentosaceus* CM54, og *P. pentosaceus* CM73 (nr. 5, 6, 9, 13, 17, 19) som hadde tråder på 5 mm.

Etter resultatene fra EPS screeningen (Tabell 5) ble stammene *W. cibaria* <TM120 (nr. 2), *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5),

Leu.mes./pseudomes. VL1 (nr. 8), *P. pentosaceus/Llb. plantarum* CM65 (nr.22), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) ut for å bli brukt videre i oppgaven.

Tabell 5: Resultatene fra EPS screening av 29 utvalgte MSB stammer. Tabellen viser nr. på stammene, stammens navn, agarene brukt (sukrose, maltose og glukose), og utsende og trådtrekkenheten. Utsende er kategorisert etter utsende på koloniene; små tørre (-), små slimete (+), slimete (++) og store slimete (+++). Trådtrekkenheten er kategorisert etter om de ikke lagde en tråd (-), tråd på 5 mm (+) eller <10 mm (++) testet med podenål.

Nr.	Stammer	Sukrose		Maltose		Glukose	
		Utsende	Tråd- trekkende	Utsende	Tråd- trekkende	Utsende	Tråd- trekkende
1	<i>W. confusa</i> TM 76	+++	-	-	-	-	-
2	<i>W. cibaria</i> <TM 120	+++	+	-	-	-	-
3	<i>Llb. fermentum</i> TM 336	+++	+	-	-	-	-
4	<i>Leu. citreum/holzapfelii</i> GK 50	+++	+	-	-	-	-
5	<i>P. pentosaceus</i> VL9	-	-	-	++	-	+
6	<i>P. pentosaceus</i> VL25	-	-	-	++	+	+
7	<i>Leu.mes./pseudomes.</i> VL1	++	-	-	-	-	-
8	<i>Leu.mes./pseudomes.</i> VL18-2	++	-	-	-	-	-
9	<i>Leu.mes./pseudomes.</i> VL19	-	-	-	+	-	+
10	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> VL51	-	-	-	-	-	-
11	<i>Lpb. plantarum</i> VL53	-	+	-	-	-	-
12	<i>Lpb. plantarum</i> VL11	-	-	-	-	-	-
13	<i>P. pentosaceus</i> VL14	-	-	-	+	-	+
14	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> VL29	-	+	-	-	-	-
15	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM2	-	-	-	-	-	-
16	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM12	-	-	-	-	-	-
17	<i>P. pentosaceus</i> CM54	-	-	+	+	+	+
18	<i>P. pentosaceus</i> CM81	-	+	-	-	-	-
19	<i>P. pentosaceus</i> CM73	-	-	-	+	+	+
20	<i>Leu.mes./Leu. citreum</i> CM87	-	-	-	-	-	-
21	<i>P. pentosaceus</i> CM64	-	-	-	-	-	-
22	<i>P. pentosaceus/Lpb. plantarum</i> CM67	++	+	-	-	-	-
23	<i>Lpb. plantarum/pentosus</i> CM65	++	-	-	-	-	-
24	<i>P. pentosaceus</i> CM90	-	-	-	-	-	-
25	<i>P. pentosaceus</i> CM57	-	-	-	-	-	-
26	<i>Leu. mesenteroides</i> CM78	-	-	-	-	-	-
27	<i>Lc. hamnosus</i> CM61	-	-	-	-	-	-
28	<i>P. pentosaceus/E. durans</i> CM84	-	-	-	-	-	-
29	<i>Leu.mes. ssp. dextranicum</i> DSM 20484 (kontroll)	-	+	-	-	-	-

3.2 Test av EPS-produksjon i kikertpuré

3.2.1 Undersøkelse av vekst og EPS-produksjon i kikerter

For å undersøke om de 5 utvalgte stammene vokste i kikertpuré ble det undersøkt om pH ble redusert og om kikertpureens tekstur endret seg etter fermentering. Det var *W. cibaria* <TM120 (nr. 2), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5), *Leu.mes/pseudomes*. VL18-2 (nr. 8), *P. pentosaceus/Lpb. plantarum* CM67 (nr. 22) og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) som ble brukt til testen, samt en kontrollprøve som ikke ble podet. Alle ble inkubert ved 30°C i 24 t, med og uten 5% sukrose. Tabell 6 viser endringene observert etter fermentering med de 5 stammene og kontroll med og uten sukrose. Det var observert en pH-nedgang i alle prøvene tilsatt MSB stamme, med unntak av 5U. Den høyeste pH nedgangen var i prøve 2S, 8S, 22S og 23S, disse hadde også gassdannelse. Kontrollen (KU) hadde ingen pH nedgang, gassdannelse eller tekstur endring under inkuberingsperioden. Tekstur endring var observert i alle prøvene med sukrose tilsetning, men i varierende grad, og to av prøvene uten sukrose tilsetning. Prøve 2S og 23S ble mye mer tykkflytende enn prøvene 5S, 8S, 22S, 5U, og 22U som kun ble litt tykkere under inkuberingsperioden. Teksturen var ikke forandret hos prøve 2U, 8U, 23U og KU.

Stammene som ble valgt ut for videre bruk var *W. cibaria* <TM120 (nr. 2), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23).

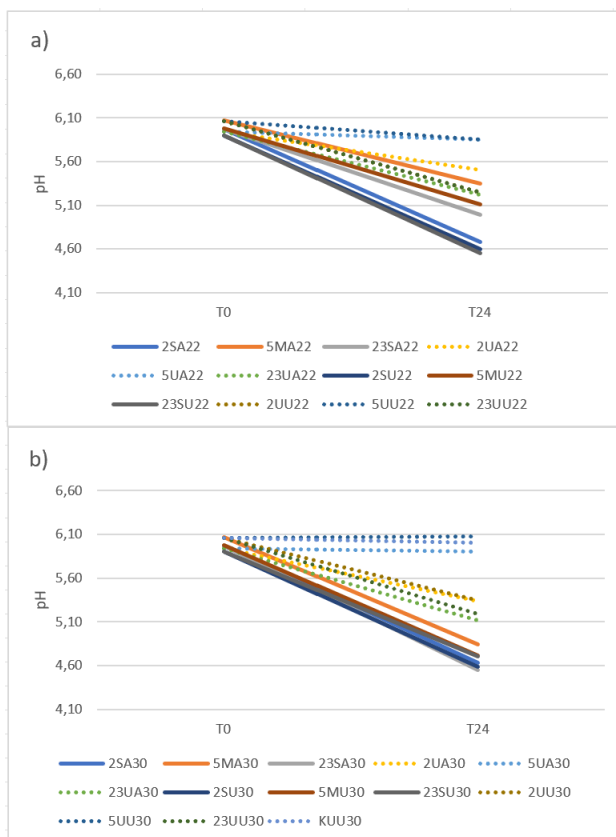
Tabell 6: Observerte endringene i kikertpuré etter fermentering med 5 utvalgte MSB stammer, samt en kontroll uten MSB. Prøvekodene viser stamme (2 – *W. cibaria* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, 8 – *Leu.mes/pseudomes* VL18-2, 22 – *P. pentosaceus/Lpb. plantarum* CM67, 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65), sukkerart (S; 5% sukrose, U; vann), tekstur endring (-; ingen endring, +; litt tykkere, ++; mye tykkere), dannelse av gass bobler (-; uten gassbobler, +; med gassbobler), og pH før (T0) og etter (T24) fermentering.

Kode	Stamme nr.	Sukkerart	Tekstur	Gassbobler	pH T0	pH T24
2S	2	S	++	+	6,01	4,41
5S	5	S	+	-	6,05	5,81
8S	8	S	+	+	6,06	3,99
22S	22	S	+	+	6,01	4,44
23S	23	S	++	+	6,02	4,45
2U	2	U	-	-	6,10	5,51
5U	5	U	+	-	6,04	6,14
8U	8	U	-	-	6,05	4,62
22U	22	U	+	-	6,16	5,22
23U	23	U	-	-	6,12	5,21
KU	Kontroll	U	-	-	6,15	6,12

3.2.2 Undersøkelsen av vekst i kikertpuré for utvalgte stammer.

Stammene *W. cibaria* TM120 (nr. 2), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) bruk i denne undersøkelsen. Effekten av tilsetning av karbohydrater, aquafaba og valget inkuberingstemperatur undersøkt med hensyn på pH-nedgang. Prøvene som ble undersøkt hadde en kombinasjon av en av de tre MSB stammer, med eller uten karbohydrat (maltose eller sukrose), med eller uten aquafaba, og inkuberingstemperatur var 22°C eller 30°C. Alle prøvene ble inkubert i 24 t og pH ble målt ved fermenteringsstart og etter fermenteringstiden.

pH endringen under inkubasjons tiden hos prøvene inkubert ved 22°C og 30°C er vist i Figur 8. Prøvene fermentert ved 22°C var det 23SU22 som hadde den laveste slutt pH på 4,55, mens det var prøve 5UA22 og 5UU22 som hadde de høyeste slutt pH-ene på 5,85, se figur 8a. Prøvene fermentert ved 30°C var det 23SA30 som hadde den laveste slutt pH-en på 4,55 og den høyeste slutt pH-en var hos KUU30 og 5UU30 som hadde pH på 6,00 og 6,08. Prøvene med karbohydrat tilsetning så ut til å ha lavere slutt pH en de som ikke var tilsatt ekstra karbohydrater.

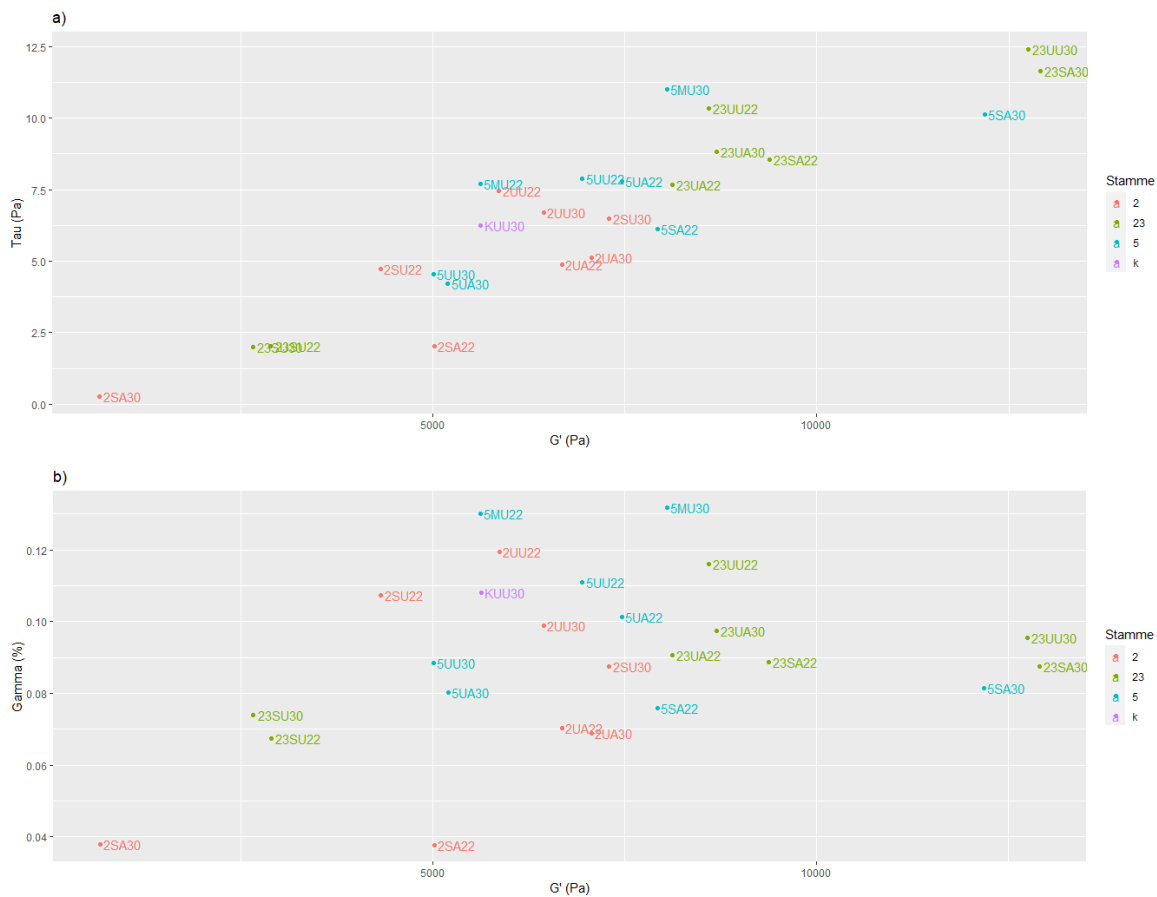


Figur 8: Start (T0) og slutt (T24) pH i prøvene fra fermenteringsforsøket med kikerter fermentert ved 22°C (a) og 30°C (b) med og uten karbohydrat og med og uten aquafaba. Prøvekodene beskriver stamme, karbohydrat og aquafaba tilsetning, og inkuberingstemperatur, 2 – *W. cibaria* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. planetarum/pentosus* CM65. S – 5% sukrose, M – 5% maltose, A – aquafaba, U – uten karbohydrat/aquafaba, 22 – 22°C, 30 – 30°C.

3.2.3 Teksturanalyser av kikerter fermentert med utvalgte stammer

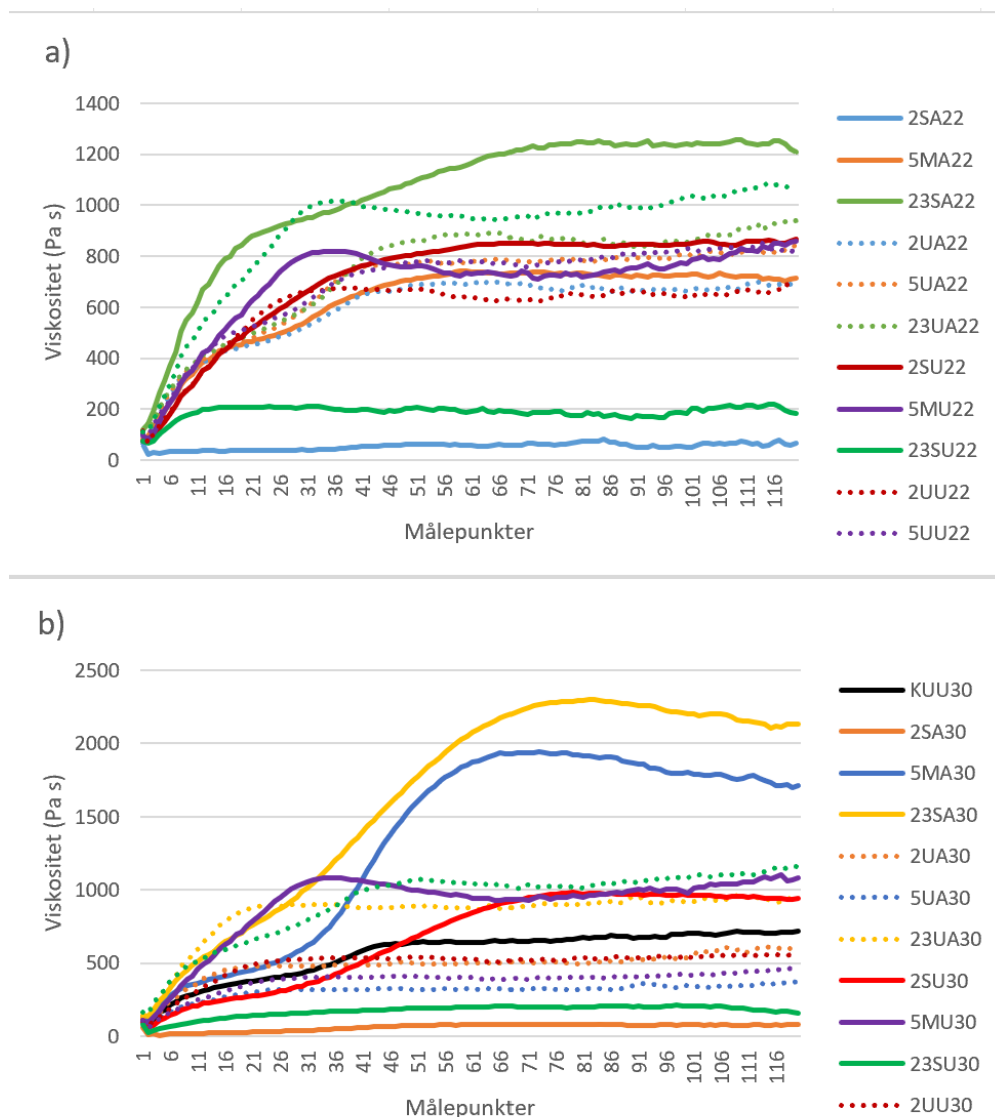
For å undersøke endringene på ført kikertpureene under fermentering og effektene til variablene ble det utført reologiske analyser på prøvene fra 3.2.2. Det ble utført 4 reologiske analyser på prøvene fra det andre fermenterings forsøket, analysene som ble utført var som følger: AS, SRT, RT og TDOT. Prøvene ble analysert over en 4 dagers periode.

«Amplitude sweep» (AS) ble brukt for å finne LVER (3%) hos prøvene. Figur 9 viser gjennomsnittts verdiene for prøvenes styrke (Tau), lagringsmodul (G'), og tøyning (gamma) ved LVER. Det var prøve 23SA30 og 23UU30 som hadde de høyeste G' verdiene på 12 912 Pa, og 12 752 Pa. Disse prøvene hadde også de høyeste Tau verdiene på 11,6 Pa, og 12,4 Pa. De laveste G' og Tau var hos 2SA30 med henholdsvis 666 Pa, og 0,25 Pa. Det var 5MU30 og 5MU22 som hadde de høyeste gamma verdiene på 0,13%. Prøvene med de laveste Gamma var 2SA22 og 2SA30 på 0,04%. Det var signifikante forskjeller mellom prøvenes gamma, G' og Tau verdier, se vedlegg 3a, 3b, og 3c. Det var også signifikante forskjeller mellom prøvene og stammene brukt for G' og Tau verdiene.



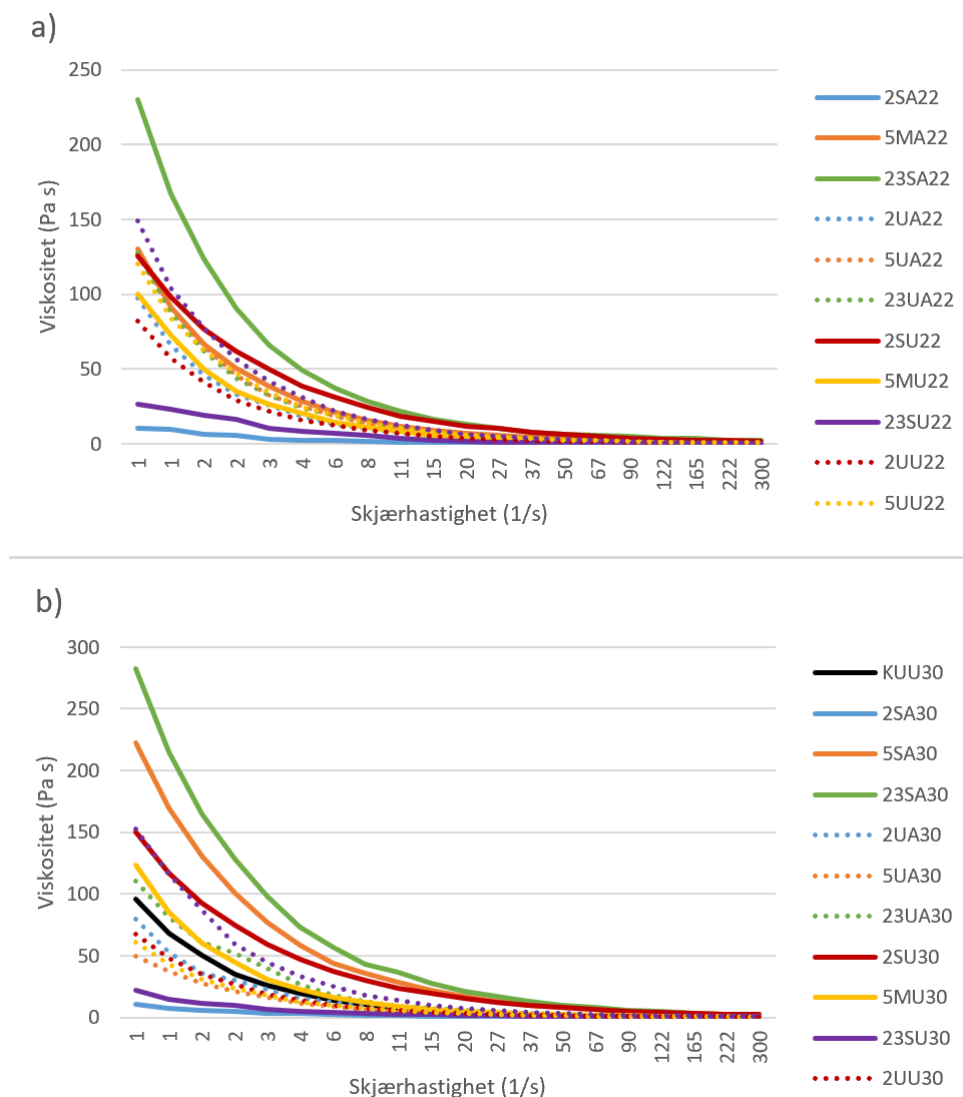
Figur 9: Gjennomsnittsverdien for LVER målt hos prøver laget med kikerter fermentert ved 22°C og 30°C med og uten karbohydrat og med og uten aquafaba. Plot a viser lagringsmodul (G') mot styrke (τ), og b viser lagringsmodul (G') mot tøyning (γ) ved LVER (3%). Prøvekodene beskriver stamme, karbohydrat og aquafaba tilsetning, og inkuberingstemperatur, 2 – *W. cibaria* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. planetarium/pentosus* CM65. S – 5% sukrose, M – 5% maltose, A – aquafaba, U – uten karbohydrat/aquafaba, 22 – 22°C, 30 – 30°C.

For å undersøke prøvenes viskositet og om de hadde trådtrekkende egenskaper ble det benyttet en «shear rate test» (SRT), kurvene er vist i Figur 10. Prøvene 23SA30, 5MA30, 5MU30, 23UU22, og 5MU22 viste tegn til trådtrekkendeegenskaper. Prøvene fermentert ved 30°C var det 23SA30 som hadde den høyeste slutt viskositeten på 2134 Pa s, mens 2SA30 hadde den laveste på 82 Pa s, se figur 10a. Prøvene fermentert ved 22°C var det 23SA22 som hadde den høyeste slutt viskositet på 1207 Pa s, og den laveste ble observert hos 2SA22 på 66 Pa s, se figur 10b.



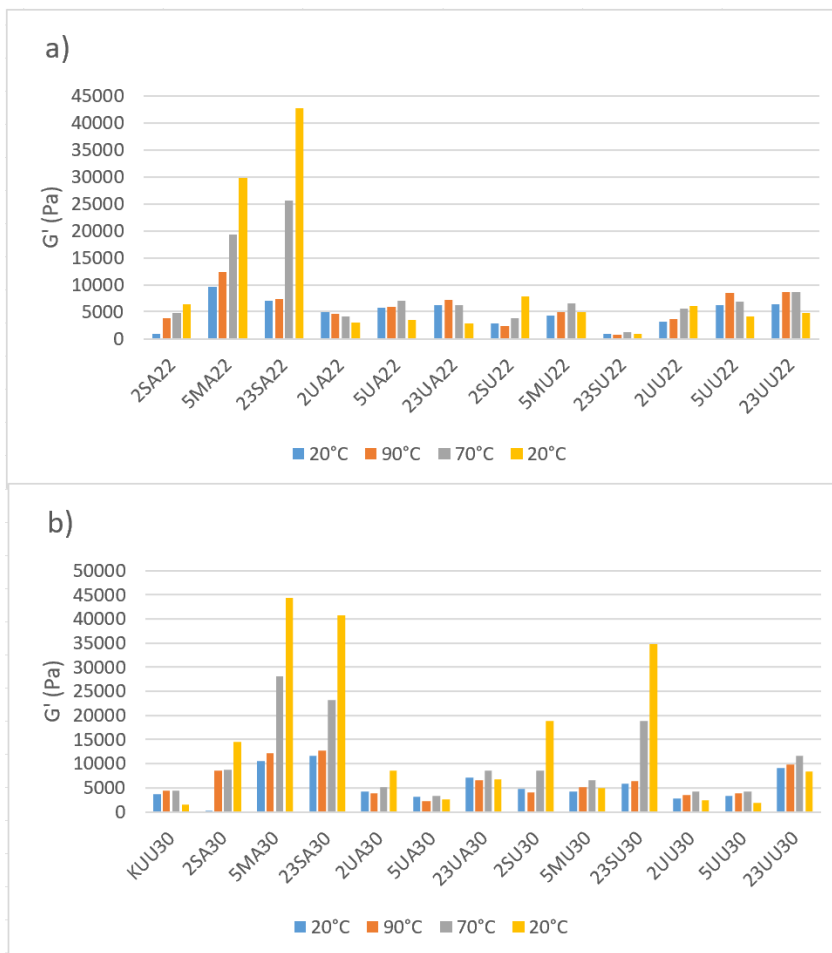
Figur 10: Shear rate test (SRT) kurver for prøvene fermentert i fermenteringsforsøket med kikerter ved 22°C (a), og 30°C (b). Prøvekodene beskriver stamme, karbohydrat og aquafaba tilsetning og inkuberingsstemperatur, 2 – *W. cibaria* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. planetarum/pentosus* CM65. S – 5% sukrose, M – 5% maltose, A – aquafaba, U – uten karbohydrat/aquafaba, 22 – 22°C, 30 – 30°C.

For å undersøke prøvenes viskositet og om de hadde newtonske eller ikke-newtonske flyteegenskaper ble det utført en rotasjonstest (RT), kurvene fra denne testen er vist i Figur 11. Alle prøvene hadde ikke-newtonske flyteegenskaper, i form av skjærtynnende flyttegenskap. Prøve fermentert ved 30°C var det 23SA30 som hadde den høyeste starts viskositeten på 282 Pa s, og 2SA30 hadde den laveste på 10,7 Pa s. Alle prøvene hadde en slutts viskositet på 0,4 – 2,2 Pa s, se figur 11a. Prøvene fermentert ved 22°C var det 23SA22 som hadde den høyeste starts viskositeten på 230 Pa s, og 2SA22 hadde den laveste på 10,6 Pa s. Alle prøvene hadde en slutts viskositet på 0,04 – 2,1 Pa s, se figur 11b.



Figur 11: Rotasjonstest (RT) kurver for prøvene fermentert i fermenteringsforsøket med kikerter ved 22°C (a), og 30°C (b). Prøvekodene beskriver stamme, karbohydrat og aquafaba tilsetning og inkuberingsstemperatur, 2 – *W. cibra* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. planetarum/pentosus* CM65. S – 5% sukrose, M – 5% maltose, A – aquafaba, U – uten karbohydrat/aquafaba, 22 – 22°C, 30 – 30°C.

For å undersøke lagringsmodulen (G') ved og etter oppvarming til 90°C ble det utført en temperatur avhengig oscillasjons test (TDOT). Lagringsmodulene (G') målt ved TDOT er vist i Figur 12. Lagringsmodulen (G') fra prøvene fermentert ved 22°C økte hos 2SA22, 5MA22, 23SA22, 2SU22, og 2UU22, se Figur 12a. Prøven med den høyeste G' ved 20°C etter oppvarming var hos 23SA22 på 42 650 Pa, og den laveste var hos 23SU22 på 926 Pa. Ved 70°C etter oppvarming var det også prøve 23SA22 som hadde den høyeste verdien på 25 530 Pa, og den laveste hos 23SU22 på 1222 Pa. Figur 12b viser at G' til prøvene fermentert ved 30°C økte etter oppvarming hos 2SA30, 5MA30, 23SA30, 2UA30, 2SU30, og 23SU30, se figur 13b. Etter oppvarming ved 20°C var det 5MA30 som hadde den høyeste G' på 44 320 Pa, og den laveste var hos KUU30 på 1573 Pa. Ved 70°C etter oppvarming var det 5MA30 som hadde den høyeste G' på 28 160 Pa, og 5UA30 den laveste på 3382 Pa.



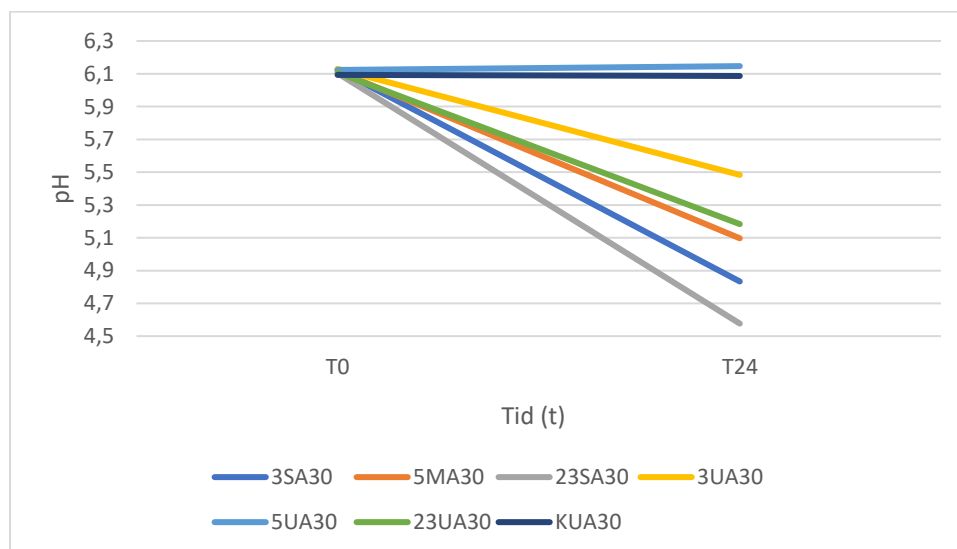
Figur 12: Temperatur avhengig oscillasjons test (TDOT) brukt for å måle lagringsmodulen (G') ved og etter oppvarming opptil 90°C, til prøvene fermentert ved 22°C (a) og 30°C (b). Lagringsmodulene ved temperatuene 20°C før oppvarming (blå), 90°C (oransje), 70°C etter oppvarming (grå), og 20°C etter oppvarming (gul). Prøvekodene beskriver stamme, karbohydrat og aquafaba tilsetning og inkuberingstemperatur, 2 – *W. ciberia* <TM120, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. planetarum/pentosus* CM65. S – 5% sukrose, M – 5% maltose, A – aquafaba, U – uten karbohydrat/aquafaba, 22 – 22°C, 30 – 30°C.

3.3 Metabolismeforsøk

For å undersøke endringene i kikertpuré under fermentering med utvalgte MSB ble det utført et metabolismeforsøk med 3 gjentak. Det ble utført en HPLC analyse for å bestemme innholdet av utvalgte karbohydrater og organiske syrer. Celletall og pH ble også analysert og målt før og etter fermentering. Prøvene ble fermentert ved 30°C i 24 t. Stammene som ble benyttet var *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23). Det ble også laget en kontroll uten MSB. Det ble også testet ut effekten av karbohydrattilsetning, hvor stamme nr. 3 og 23 ble tilsatt 5% sukrose og nr. 5 5% maltose. Alle prøvene ble tilsatt aquafaba.

3.3.1 pH-analyse

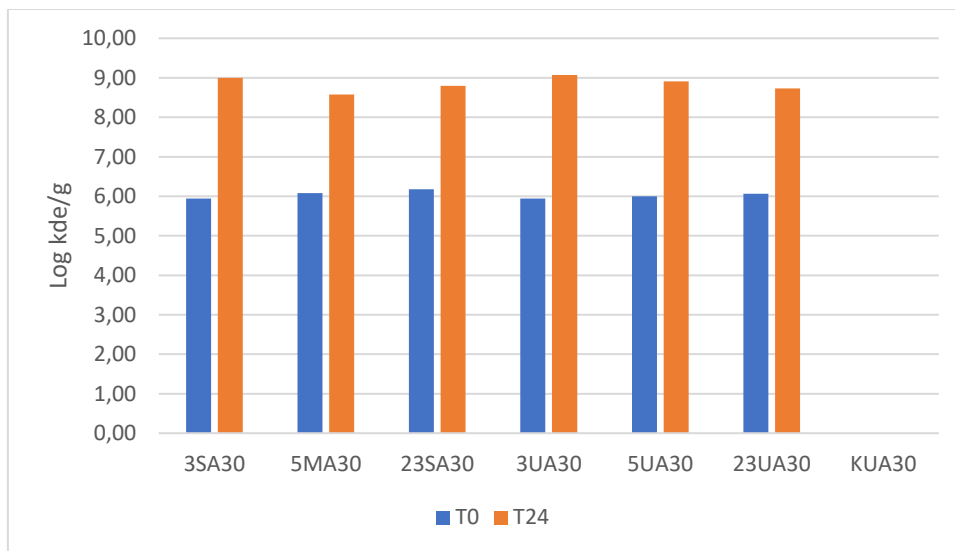
Det ble målt pH før (T0) og etter (T24) fermentering, hvor gjennomsnittsverdiene er presentert i Figur 13. Nesten alle prøvene fikk en reduksjon i pH etter fermentering, bortsett fra 5UA30 og KUA30. Prøve 23SA30 hadde den laveste pH-en etter fermentering på 4,6. Alle prøvene hadde en start pH på 6,09 – 6,13. Prøvene med lavest slutt pH etter 24 t til alle prøvene er presentert i stigende rekkefølge som følger: 23SA30, 3SA30, 5MA30, 23UA30, 3UA30, KUA30, og 5UA30. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom prøvenes slutt pH, se vedlegg 4a.



Figur 13: pH endring i prøvene brukt under metabolismeforsøket før (T0) og etter (T24) fermentering. Stammene som ble brukt var 3 – *Llb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

3.3.2 Celletall

Celletallet til prøvene ble undersøkt ved innstøpning i MRS-agar, og estimert ut ifra antallet kolonier. Gjennomsnitts Log kde/g for prøve før (T0) og etter (T24) fermentering er vist i Figur 14. Alle prøvene hadde et celletall på ca. 6 log kde/g før fermentering, og ca. 9 log kde/g etter fermentering, bortsett fra kontrollen KUA30 uten tilsatt MSB. Prøve 3UA30 hadde det høyeste celletallet etter fermentering på 9,07 log kde/g, og det laveste var 5MA30 på 8,61 log kde/g. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom prøvenes celletall før og etter fermentering, se vedlegg 4b.

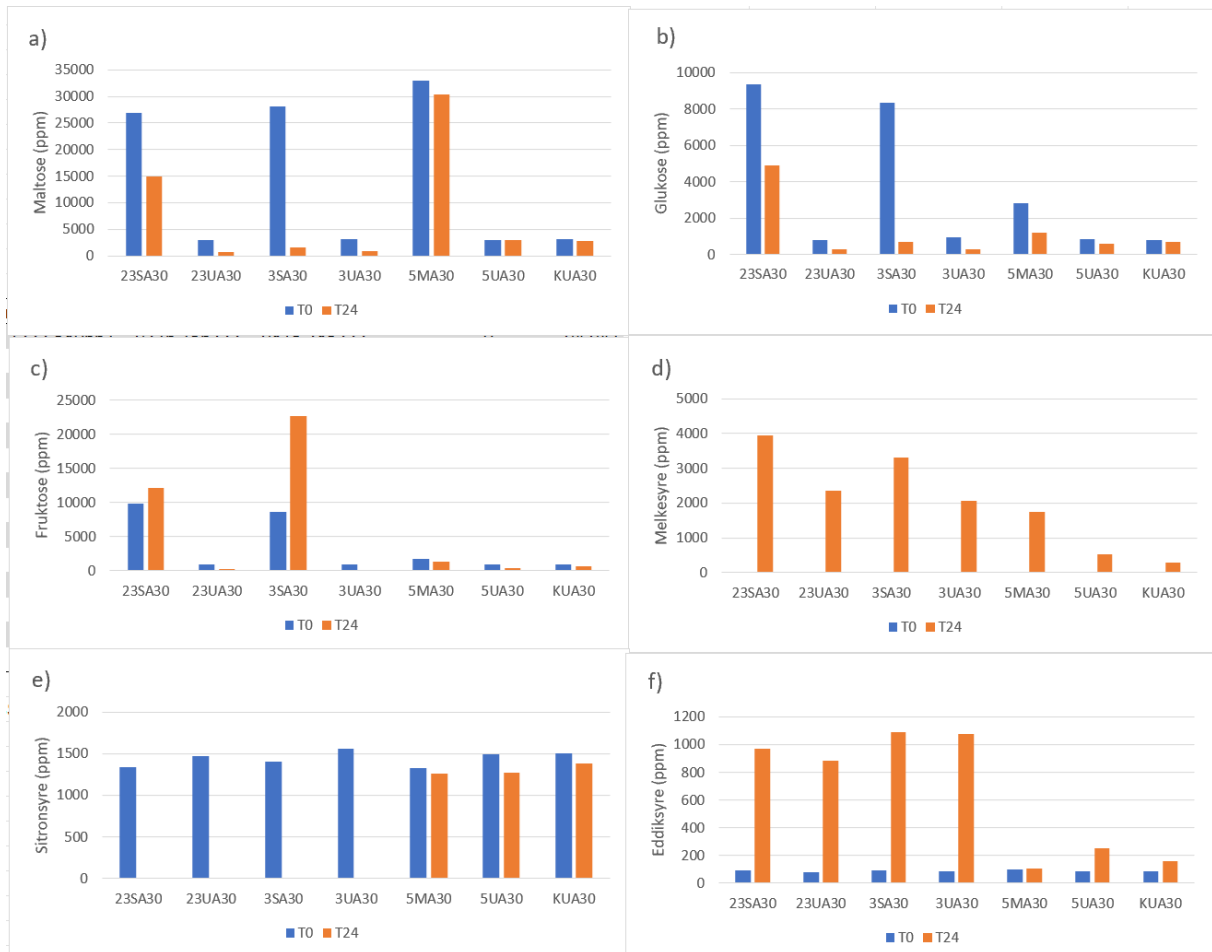


Figur 14: Celletallet for prøvene brukt i metabolismeforsøket før (0t) og etter (24t) fermentering. Stammene som ble brukt var 3 – *Lb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

3.3.3 Organiske syrer og karbohydratinnhold

For å undersøke innholdet av maltose, glukose og fruktose i prøvene ble det utført en HPLC analyse. Det gjennomsnittlige innholdet av disse tre karbohydratene før (T0) og etter (T24) fermentering er vist i Figur 15a, b og c. Det høyeste innholdet av maltose var i 5MA30 før og etter fermentering på henholdsvis 32 906 ppm og 30 318 ppm. Det var svært stor forskjell i maltoseinnholdet mellom 23SA30 og 3SA30 etter fermentering. Innholdet av glukose var høyest hos 23SA30 før og etter fermentering på henholdsvis 9376 ± 3202 ppm og 4881 ± 1962 ppm. Innholdet av fruktose var høyest hos 23SA30 før fermentering på 9815 ± 3392 ppm, og høyest etter fermentering hos 3SA30 på $22 612 \pm 526$ ppm. Det laveste maltose innhold var hos

23UA30 både før og etter fermentering på 2989 ± 199 ppm og 741 ± 51 ppm. Laveste glukose innholdet var hos 23UA30 både før og etter fermentering på 810 ± 186 ppm og 276 ± 49 ppm. Det laveste innholdet av fruktose var hos 3UA30 før og etter fermentering på henholdsvis 810 ± 421 ppm og 118 ± 86 ppm. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) mellom prøvenes maltose og glukoseinnhold før og etter fermentering, og fruktoseinnholdet mellom 3SA30 og resten av prøvene, se vedlegg 4j, 4k og 4l.



Figur 15: Innholdet av maltose (a), glukose (d), fruktose (c), melkesyre (d), sitronsyre (e) og eddiksyre (f) før (T0), og etter (T24) fermentering av prøvene fra metabolismeforsøket. . Stammene som ble brukt var 3 – *Lb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

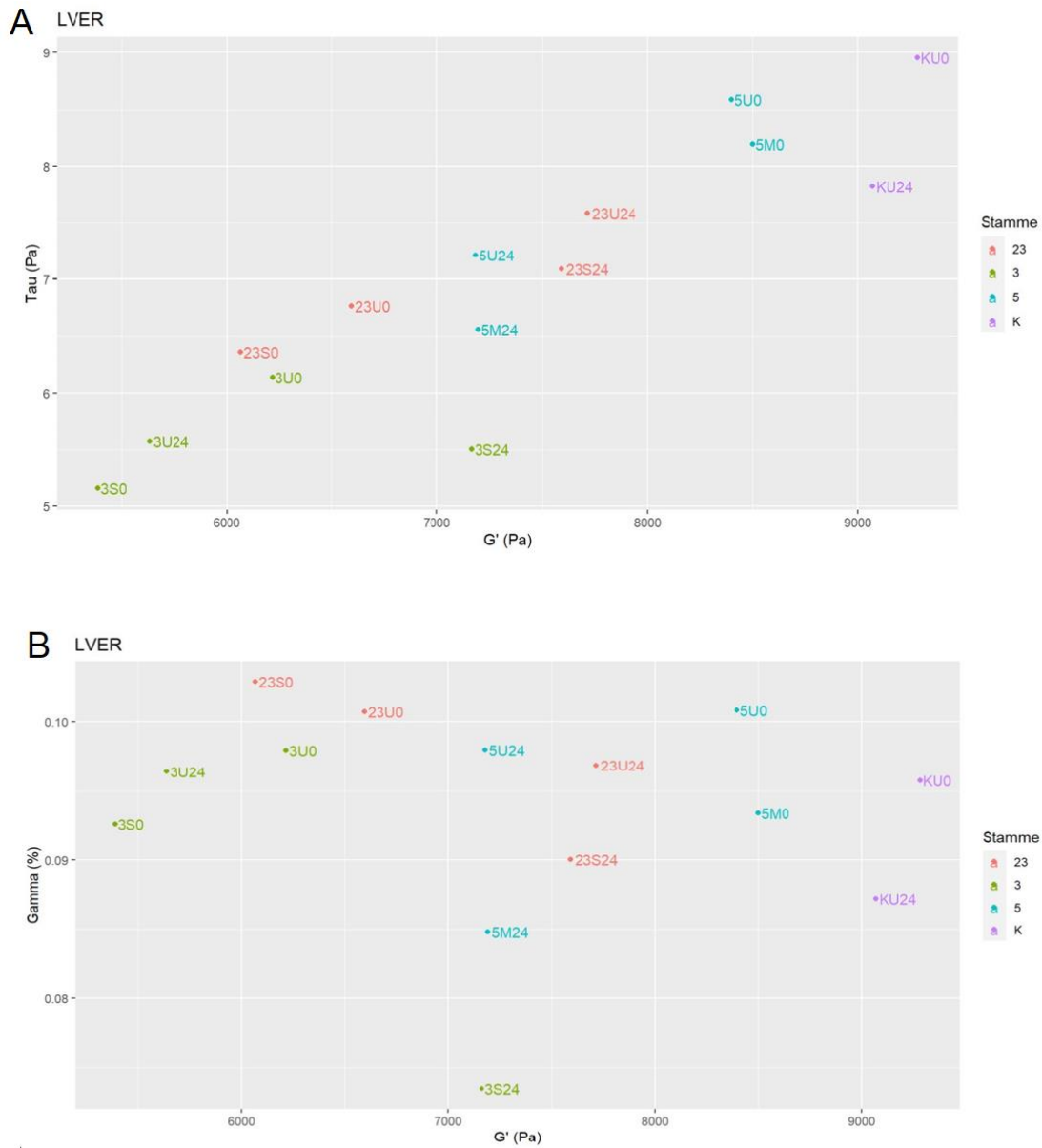
For å finne innholdet av sitronsyre, melkesyre, og eddiksyre før (0) og etter (T24) fermentering ble analysert med HPLC, og det gjennomsnittlige innholdet av disse komponentene er vist i figur 15d, e, og f. Innholdet av sitronsyre, melkesyre og eddiksyre før fermentering var ca. likt mellom de ulike prøvene med henholdsvis 1300 – 1500 ppm, 0 ppm, og 80 – 100 ppm. Etter 24 t fermentering hadde 3SA30, 23SA30, 3UA30 og 23UA30 et sitronsyreinhold på tilnærmet 0 ppm, mens 5MA30 og 5UA30 hadde et sitronsyreinhold på 1257-1275 ppm. Det høyest innholdet av melkesyre ble målt i 23SA30 på 3956 ± 282 ppm, og det laveste hos KUA30 på 293 ± 415 ppm. Det høyeste innholdet av eddiksyre ble målt i 3SA30 og 3UA30 på 1076-1086 ppm, og det laveste hos 5MA30 på 104 ± 8 ppm. Det var signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i sitronsyre- og eddiksyreinholdet i prøvene 3SA30 og 23SA30 før og etter fermentering, og melkesyreinnholdet var signifikant forskjellig før og etter fermentering hos alle prøvene bortsett fra 5UA30 og KUA30, se vedlegg 4m, 4n, og 4o.

3.4 Reologianalyser av prøvene brukt til metabolismeforsøk.

For å undersøke teksturendringene de utvalgte stammene påførte kikertpuréen under fermenteringen ble det utført 4 reologiske analyser. Det ble utført AS, SRT, RT og TDOT på prøvene fra fermenteringsforsøket med stammene *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3), *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5), og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23).

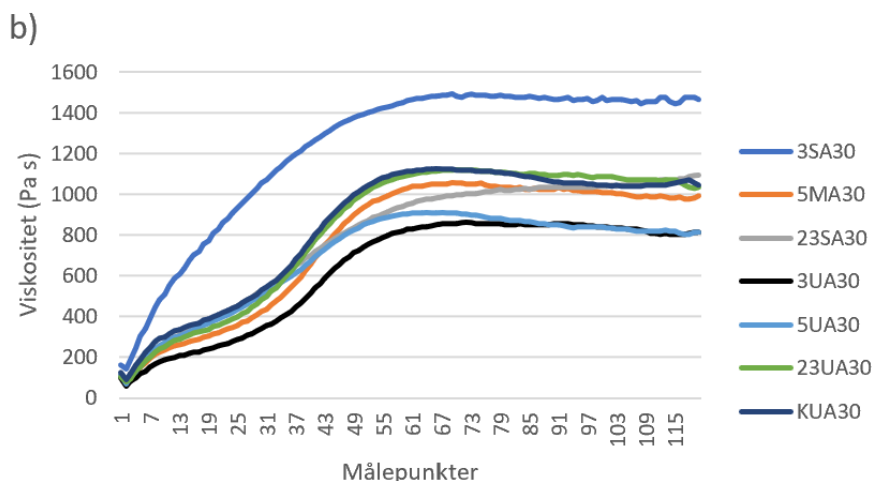
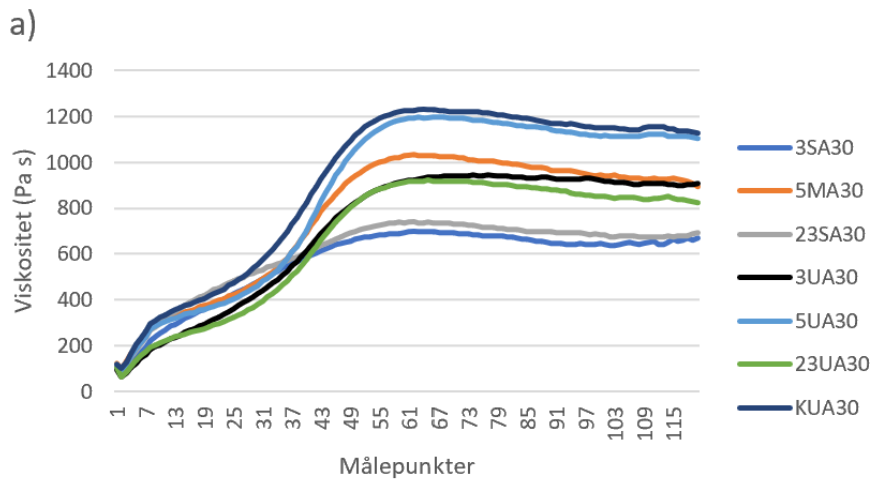
For å finne LVER (3%) for lagringsmodulen (G') til prøvene ble det utført en AS på prøvene fra metabolismeforsøket før og etter fermentering, de gjennomsnittlige verdiene for G' , Tau og gamma er presentert i Figur 16. De høyeste G' var hos KU24 og KU0 på 9066 ± 3301 og 9282 ± 3555 Pa, mens de laveste var hos 3S0 på 5388 ± 2465 Pa. Kontroll KU0 hadde også den høyeste Tau verdien på $8,95 \pm 3,44$ Pa, og 3S0 hadde den laveste på $5,15 \pm 2,60$ Pa. For de fermenterte prøvene etter fermentering var det 23U24 og 23S24 som hadde de høyeste G' verdiene på 7715 ± 1401 og 7590 ± 1069 Pa, mens de laveste var hos 3U24 på 5635 ± 2226 Pa. Prøvene 23U24 og 5U24 hadde de høyeste Tau verdiene på $7,58 \pm 1,29$ og $7,21 \pm 2,92$ Pa, og 3U24 hadde den laveste på $5,57 \pm 2,31$ Pa. Det var ingen signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom prøvenes Tau eller G' verdier, se vedlegg 4c og 4d. Figur 16b viser Gamma og G' verdiene til LVER. Av de fermenterte prøvene var det 5U24, 3U24 som hadde de høyeste Gamma verdiene på $0,10 \pm 0,01\%$, mens den

laveste var hos 3S24 på $0,07 \pm 0,01\%$. Det var signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom gamma verdiene til 23SA30, 23UA30 og 5UA30 før fermentering, og 3SA30 etter fermentering, se vedlegg 4r.



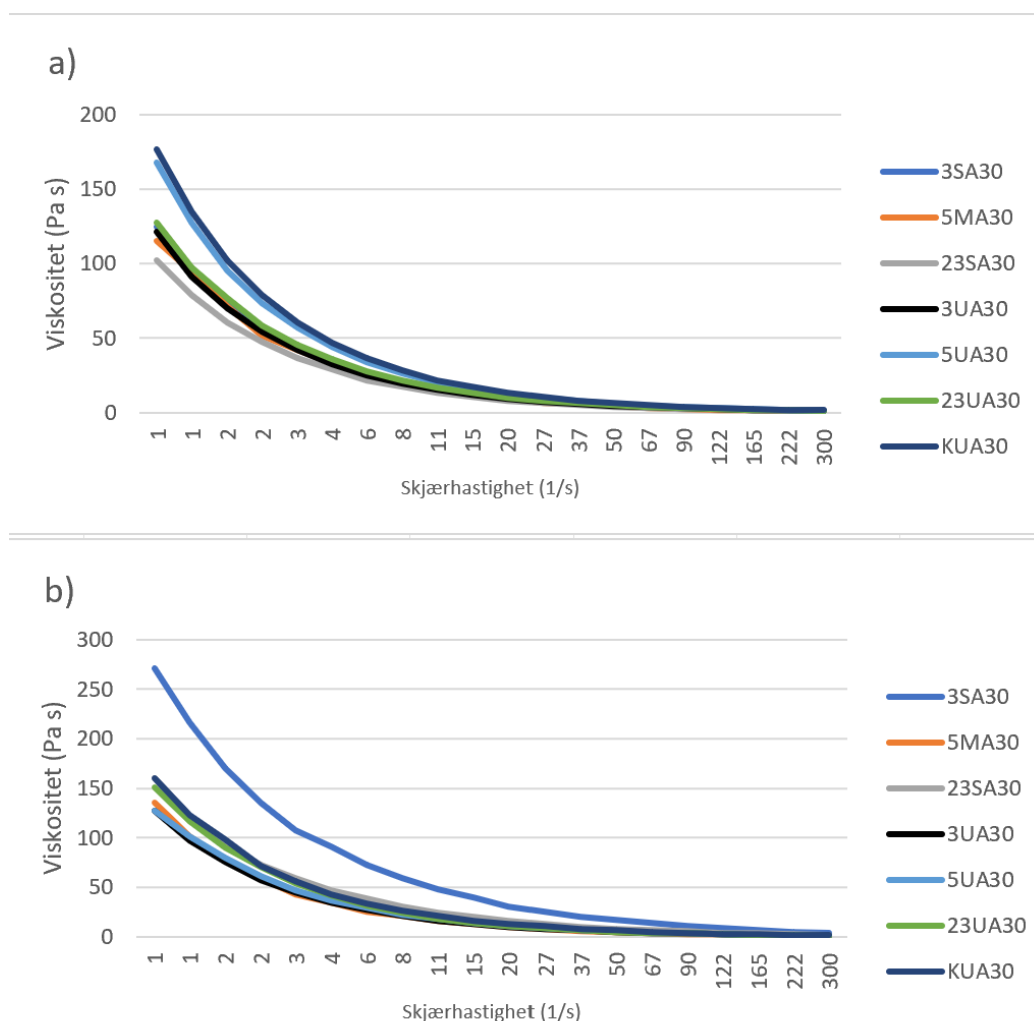
Figur 16: Gjennomsnittlig LVER (3%) for Lagringsmodulen (G') til prøvene fra metabolismeforsøket målt ved en amplitude sweep, før (0), og etter (24) fermentering ved 30°C i 24 t. Figur A viser G' og Tau, B viser Gamma og G' . . Stammene som ble brukt var 3 – *Lb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

For å undersøke viskositeten ved en konstant skjæringshastighet og om prøvene viste tegn til trådtrekkendeegenskaper ble det utført en SRT. Gjennomsnitts kurver fra SRT utført på prøvene fra metabolismeforsøket er presentert i Figur 17. Før (a) fermentering viste prøvene 3SA30, KUA30, 5MA30, 23UA30 og 3UA30 trådtrekkendeegenskaper. Prøvene hadde en slutts viskositet på mellom 720 – 1126 Pa s. Mens etter (b) fermentering var det kun 5UA30, 5MA30, og KUA30 som viste trådtrekkendeegenskaper. Den høyeste slutts viskositeten etter fermentering var hos 3SA30 med 1462 ± 408 Pa s, og den laveste var hos 3UA30 på 811 ± 245 Pa s. Det var ingen signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom prøvenes slutt viskositet, se vedlegg 4f.



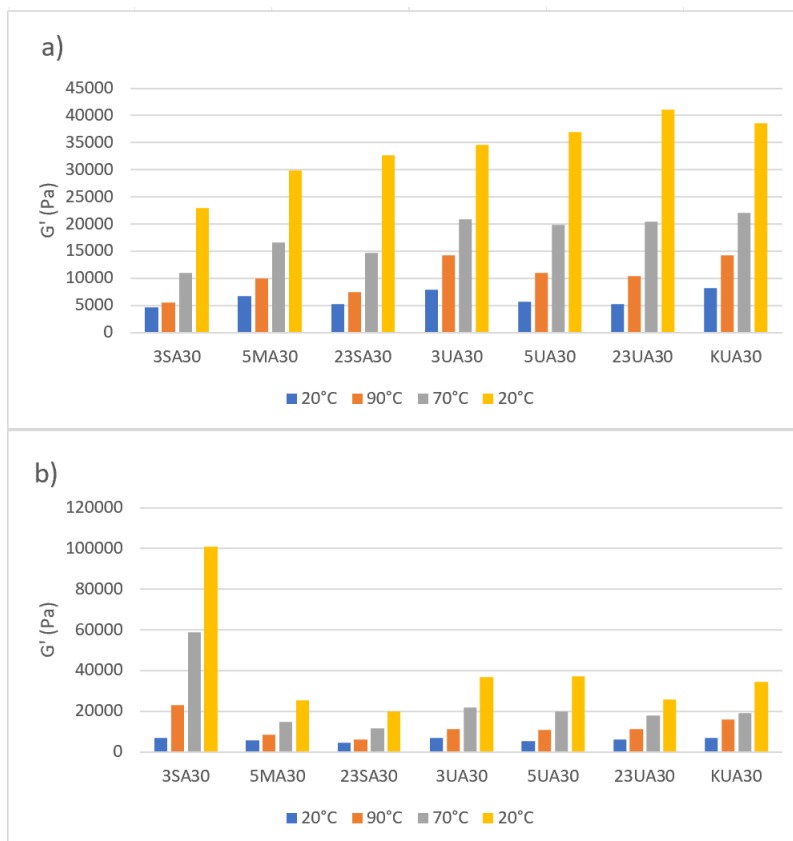
Figur 17: Gjennomsnitts kurver for «shear rate test» (SRT) av prøvene til metabolismeforsøket, før (a) og etter (b) fermentering ved 30°C i 24 t. Stammene som ble brukt var 3 – *Lb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

For å undersøke viskositet ved en økende skjærhastighet og flyteegenskapene til prøvene fra metabolismeforsøket ble det utført en RT. Gjennomsnitts kurver fra RT utført på prøvene fra metabolsimeforsøket er presentert i Figur 18. Alle prøvene, både før (a) og etter (b) fermentering, viste ikke-newtonske, skjærtynnende flyteegenskap. Prøvene før fermentering hadde en start viskositet på 102 – 176 Pa s, og en slutt viskositet på 0,2-2 Pa s. Etter fermentering var det større forskjeller mellom prøvene, det var 3SA30 som hadde den høyeste start viskositeten på 270 ± 97 Pa s. Den laveste start viskositeten ble målt hos 3UA30 og 5UA30 på 127 ± 40 Pa s og 127 ± 52 Pa s. Det var ingen signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom prøvenes starts viskositet, se vedlegg 4g.



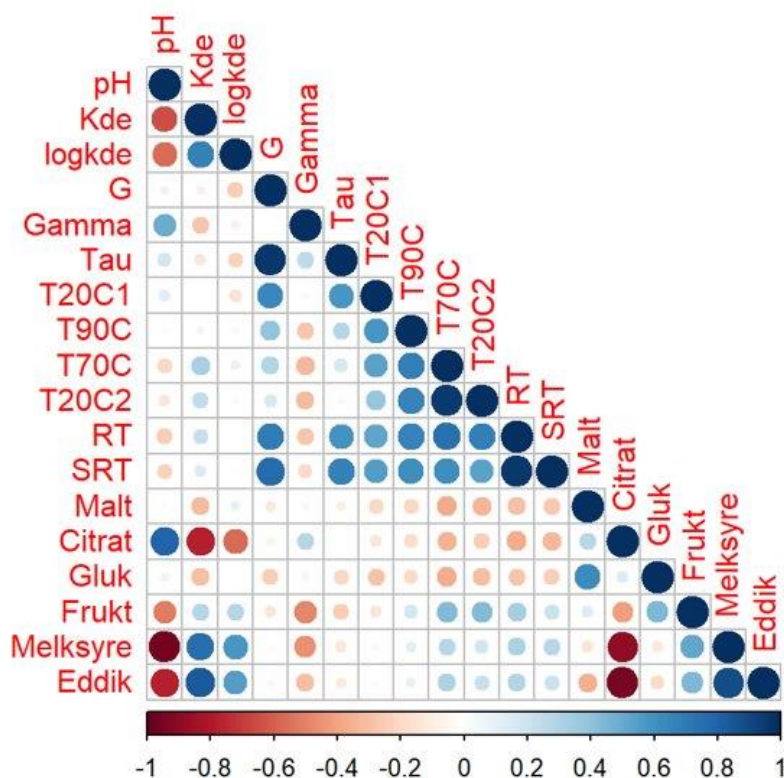
Figur 18: Gjennomsnitts kurvene fra rotasjonstest (RT) av prøvene fra metabolismeforsøket, før (a) og etter (b) fermentering ved 30°C i 24 t. Stammene som ble brukt var 3 – *Lb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Karbohydratene tilsatt var 5% sukrose (S), 5% maltose (M) og uten karbohydrat (U), aquafaba tilsetning (A), og inkuberings temperatur på 30°C (30). Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert.

For å undersøke endring i lagringsmodulen (G') under og etter oppvarming til 90°C ble det utført en temperaturavhengig oscillasjonstest (TDOT). Gjennomsnittsverdiene for lagringsmodul (G') hos prøvene fra metabolsimeforsøket ved bestemte temperaturer (20°C, 90°C, 70°C og 20°C) er vist i Figur 19. Lagringsmodulen (G') økte under og etter oppvarming. Før (a) fermentering hadde prøvene uten karbohydrat tilsetning en høyere viskositet enn prøvene med karbohydrat tilsetning. Etter oppvarming ved 70°C hadde prøvene før fermentering en G' mellom 10 986 – 20 456 Pa, og 20°C etter oppvarming ved en G' mellom 22 915 – 37 190 Pa. Etter (b) fermentering var det 3SA30 som hadde de høyeste G' etter oppvarming ved 70°C på $58\,993 \pm 22\,613$ Pa, og 20°C etter oppvarming på $101\,110 \pm 40\,940$ Pa. Den laveste G' var hos 23SA30 etter fermentering og 23S24 ved 70°C på $11\,606 \pm 5299$ Pa, og 20°C etter oppvarming på $19\,747 \pm 10\,819$ Pa. Det var signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom 3SA30 etter fermentering og de andre prøvene ved 70°C og 20°C etter oppvarming, se vedlegg 4h og 4i.



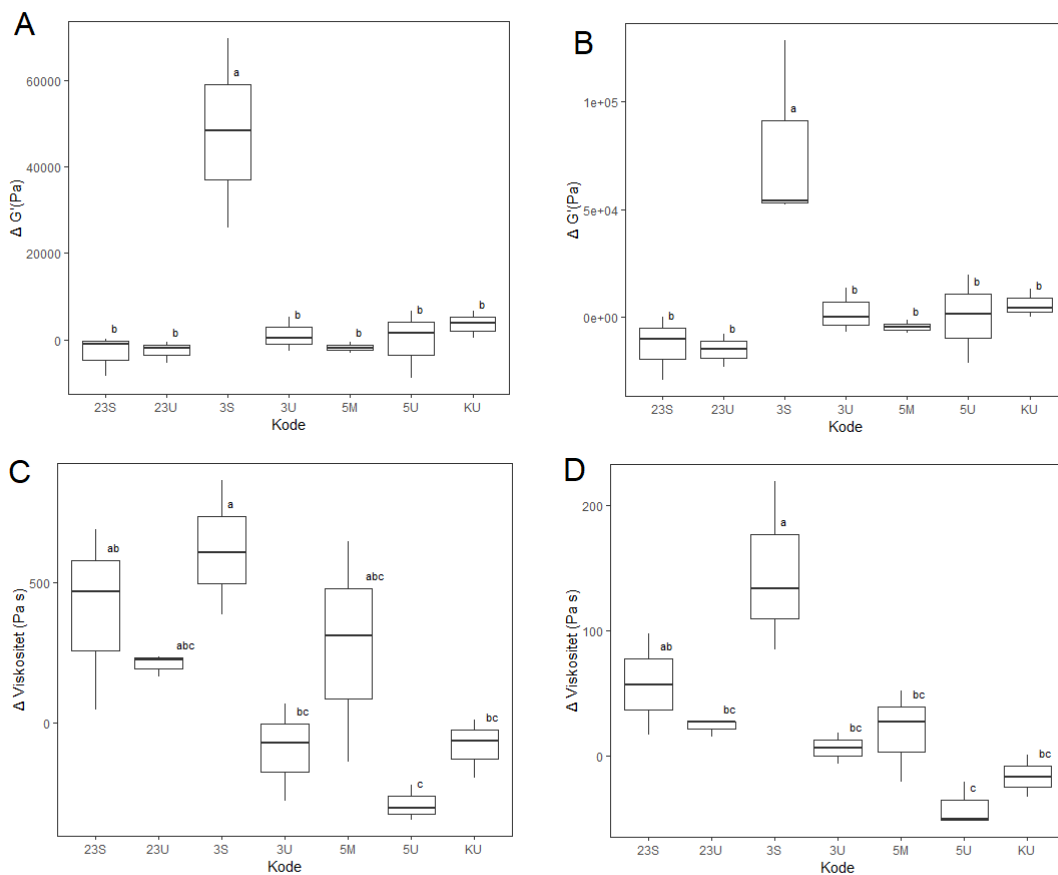
Figur 19: Gjennomsnitts lagringsmodul (G') verdier fra Temperatur avhengig oscillasjon test (TDOT) etter bestemte temperaturer var nådd (Før oppvarming 20°C (blå), 90°C (oransje), etter oppvarming 70°C (grå) og 20°C (gul). Resultatene kommer fra prøvene brukt under metabolsimeforsøket, før (a) og etter (b) fermentering ved 30°C i 24 t. Stammene som ble brukt er 3 – *Llb. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Prøver med 5% sukrose (S), 5% maltose (M), og uten karbohydrat tilsetning(U). Figuren viser også CLD signifikant (alfa = 0,95) grupper.

Det ble laget et korrelasjonsplot av resultatene fra prøvene som ble brukt i metabolismeforsøket, hvor dette plottet er presentert i Figur 20. Store sirkler representerer mer signifikante korrelasjoner mellom variablene enn små sirkler, røde sirkler viser en negativ korrelasjon og blå viser en positiv korrelasjon. Det var en sterk positiv korrelasjon mellom Tau og G', pH og sitronsyre, kde/ml og melkesyre, kde/ml og eddiksyre, G' og SRT, G' og RT, og melkesyre og eddiksyre. Tau hadde en sterk positiv korrelasjon med G' ved 20°C før oppvarming, 90°C under oppvarming, 70°C etter oppvarming og 20°C etter oppvarming. Det var en sterk negativ korrelasjon mellom pH og log kde/g, kde/ml og sitronsyre, pH og melkesyre, pH og eddiksyre, sitronsyre og melkesyre, og eddiksyre og sitronsyre.



Figur 20: Korrelasjonsplot av resultatene fra metabolismeforsøket dannet i Rstudio. Variablene er pH, kde (kde/ml), logkde (log x kde/ml), G' (G' (Pa) ved LVER(3%)), Gamma (Gamma (%) ved LVER(3%)), Tau (Tau (Pa) ved LVER(3%)), T20C1 (G' ved 20°C før oppvarming), T90C (G' ved 90°C ved slutten av oppvarmingen), T70C (G' ved 70°C etter oppvarming), T20C2 (G' ved 20°C etter oppvarming), RT (starts viskositet i rotasjonstest), SRT (slutt viskositet i Shear rate test), Malt (Maltose (ppm)), Citrat (sitronsyre (ppm)), Gluk (Glukose (ppm)), Frukt (fruktose (ppm)), Melksyre (melkesyre (ppm)), Eddik (eddiksyre (ppm)).

På bakgrunn av at det var store forskjeller mellom prøvenes start verdier ble det regnet ut endringene i disse parameterne under fermentering, dette ble regnet ut ved å ta sluttverdi minus startverdiene. Parameterne som ble undersøkt var slutts viskositeten hos prøvene målt med SRT, starts viskositet målt med RT, og G' verdiene ved 70°C og 20°C etter oppvarming, vist i Figur 21. Som vist i figuren var det større forskjeller mellom prøvene, hvor 3S ga den høyeste økningen i viskositet ved SRT (618 ± 169 Pa s) og RT (146 ± 55 Pa s), og økning i G' etter oppvarming (70°C: $48\,000 \pm 17\,915$ Pa, 20°C: $78\,194 \pm 35\,580$ Pa). De andre prøvene fikk en reduksjon i G' etter oppvarming som betyr at elastisiteten ble redusert under fermentering. Prøvene med 5M og 23S fikk en økning i viskositet vist av SRT og RT med 272 ± 322 og 19 ± 30 Pa s, og 399 ± 266 og 57 ± 33 Pa s.



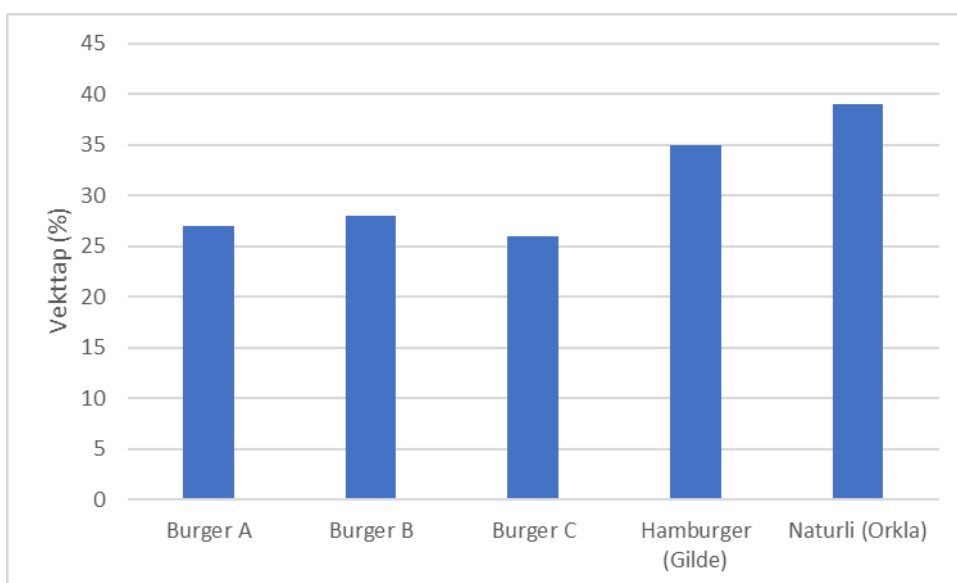
Figur 21: Endring under fermentering på parameterne undersøkt av C) Shear rate test, D) Rotasjonstest, og Temperatur avhengig oscillasjons test etter oppvarming ved A) 70°C og B) 20°C. Endring ble regnet som følgende: Slutt verdi – Start verdi = endring. Stammene som ble brukt er 3 – *L. fermentum* TM336, 5 – *P. pentosaceus* VL9, og 23 – *Lpb. plantarum/pentosus* CM65. Kontroll uten stamme (K). Prøver med sukrose (S), maltose (M), og uten karbohydrat tilsetning(U). Bokstavene a – c viser grupper som er/ikke er signifikant forskjellige (alfa = 0,95).

3.5 Produksjon av burger og teksturanalyser (TPA).

For å undersøke hvordan *in situ* EPS-produksjon påvirker teksturen og vekttapet i en fermentert kikertbasert planteburger ble det utført TPA på stekte kikertburgere. Det ble laget tre burgermikser med forskjellige forhold mellom fermentert og ikke-fermentert kikertpuré (totalt 75%), hvor miksene inneholdt også rapsolje (12,5%), potetstivelse (11,5%) og salt (1%). De tre burgermiksene som ble laget hadde følgende forhold mellom fermentert og ikke-fermentert kikertpuré: A, 1:0; B, 1:1; C, 0:1. Kikertpuréene som ble benyttet var tilsatt sukrose (5%), aquafaba og ble podet med *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3) før inkubring ved 30°C i 24 t.

3.5.1 Vekttap under steking

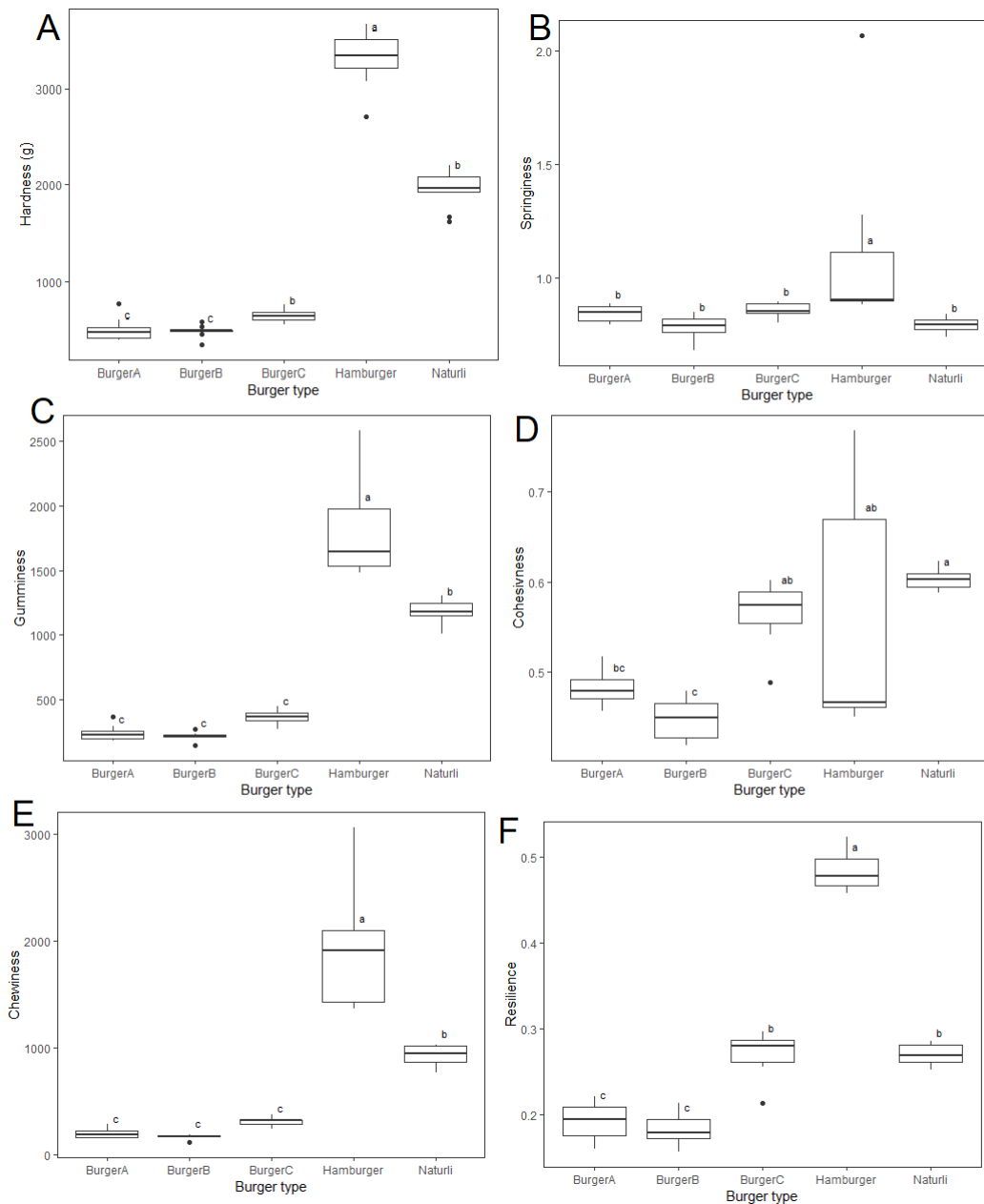
For å undersøke hvordan forholdet mellom fermentert og ikke-fermentert kikertpuré påvirket vekttapet under steking ble de tre burgermiksene (burger A, B, og C) stekt i stekeovn, og veid før og etter steking. To andre kommersielle referanseburgere (hamburger (Gilde) og Naturli-burger (Orkla)) ble også stekt ved de samme parameterne som de tre burgermiksene for å sammenligne vekttapet deres under steking. Gjennomsnittlig vekttap under steking for burgerne testet er vist i Figur 22. Det laveste vekttapet var hos burger C på 26%, og det høyeste var hos Naturli-burgeren på 38%. Det var ingen signifikant forskjell mellom vekttapet til de tre forskjellige kikertburgerne (A, B, og C), se vedlegg 5a.



Figur 22: Vekttap under steking av kikertburger mikser (Fermentert: ikke-fermentert, A: 1:0, B: 1:1, C: 0:1) og 2 standard burgere (Hamburger (Gilde, Norge), Naturli-burger (Orkla, Norge)). Burgerne ble stekt i stekeovn ved over – undervarme på 230°C i 20 min. Fermenterte kikerpureene hadde en sammensetning av sukrose (5%), aquafaba og ble fermentert med stamme 3 – *Llb. fermentum* TM336 ved 30°C i 24 t.

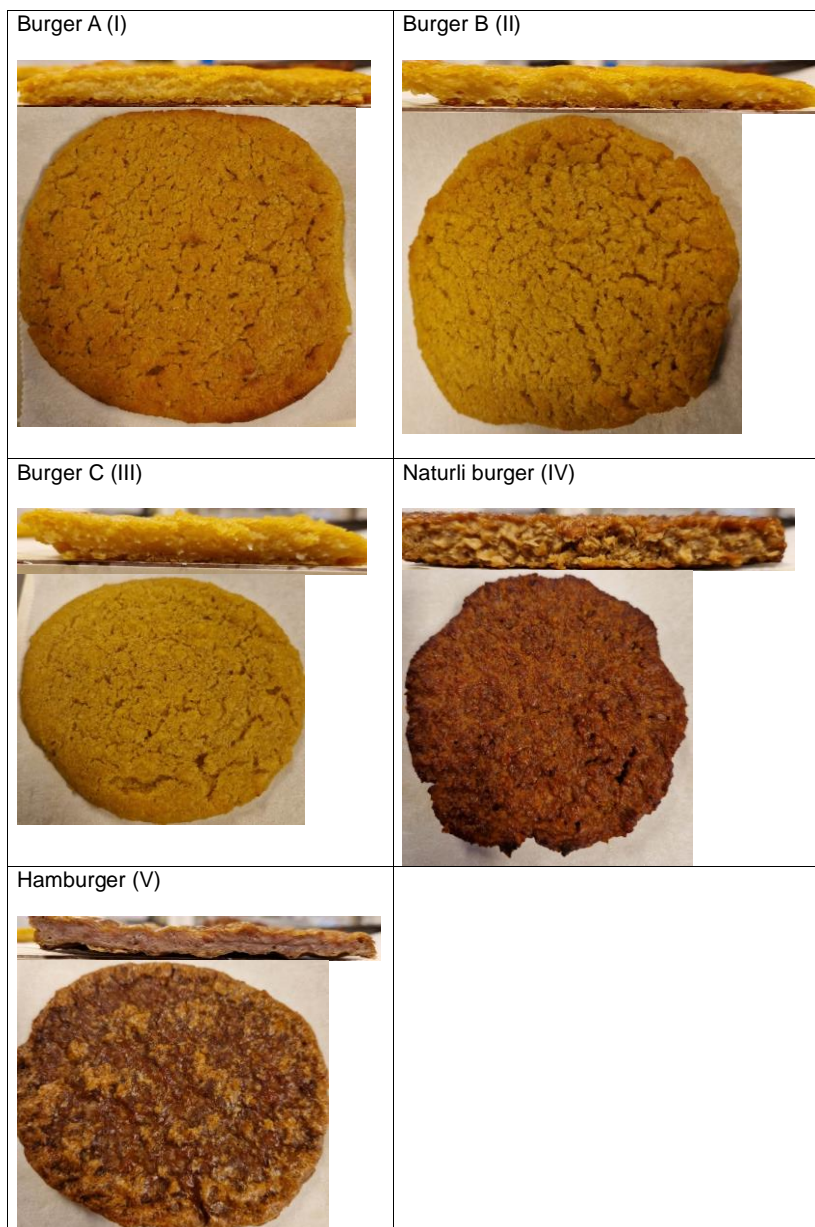
3.5.2 «Texture profile analysis» av kikertburgere

For å undersøke hvordan den fermenterte kikertpureen påvirket teksturen i kikertburgerne ble det utført en TPA på 3 kikerburgermikser (burger A, B og C) med forskjellig innhold av fermentert kikertpuré, og 2 kommersielle referanseburgere (hamburger (Gilde) og Naturli-burger (Orkla)). «Texture profile analysis» ble brukt for å måle parameterne: hardhet, «cohesivness», spenst, «resilience», klebrighet, og tyggemotstand. Gjennomsnittsverdier for parameterne til de 3 burgermiksene og de 2 kommersielle burgerne er vist i Figur 23. Det var kun 3 av parameterne hvor burgermiksene var signifikant forskjellige ($p \leq 0,05$) fra hverandre, det var hardhet og «resilience», se vedlegg 5a, e og g. Det var burger C som hadde høyeste verdiene av disse parameterne sammenlignet med burger A og B; med en hardhet på 691 ± 86 g, «cohesivness» på $0,531 \pm 0,064$, og «resilience» på $0,252 \pm 0,038$. Hamburgeren fra Gilde hadde de høyeste verdiene for nesten alle parameterne med hardhet (3313 ± 286 g), spenst ($1,081 \pm 0,37$), klebrighet (1803 ± 392), tyggemotstand (1899 ± 530) og «resilience» ($0,484 \pm 0,023$). Naturli-burger hadde den høyeste verdien for «cohesivness» ($0,603 \pm 0,011$).



Figur 23: Gjennomsnitt verdiene for parameterne målt av «texture profile analysis» (TPA) utført på 3 kikerburgermikser (fermentert: ikke-fermentert, A: 1:0, B: 1:1, C: 0:1) og 2 kommersielle burgere (Hamburger (Gilde, Norge), Naturli-burger (Orkla, Norge)). TPA målte parameterne; A) hardhet, B) spenst, C) klebrighet, D) «cohesivness», E) tyggemotstand, F) «resilience». Burgerne ble varmebehandlet i stekeovn ved over – undervarme på 230°C i 20 min. Fermenterte kikerpureene hadde en sammensetning av sukrose (5%), aquafaba og ble fermentert med *Lb. fermentum* TM336 (nr. 3) ved 30°C i 24 t. Bokstavene a – c viser hvilke prøver som er/ikke er signifikante forskjellige fra hverandre ($\alpha = 0,95$).

Figur 24 viser bilder av burgerne laget av de tre kikertburgermiksene (burger A, B, og C), og to kommersielle referanseburgere (hamburger (Gilde), og Naturli-burger (Orkla)). Burger A hadde en mørkere brunfarge enn burger B, som igjen var noe mørkere enn burger C. Fargen på burger A, B og C var mye lysere enn Naturli-burgeren og hamburger-burgeren. Burgerne laget av kikertburgermiksene var også mye lavere enn Naturli-burgeren, men ca. lik høyde som hamburgeren. Under steking ble burger A, B og C tynnere enn før steking, hvor de gikk fra ca. 2 cm høye til 1 – 1,5 cm høye.



Figur 24: Bilder av burgere laget av tre burgermiksere og to kommersielle referanseburgere. Forholdet mellom Fermentert :ikke-fermentert kikerpuré i burgermiksene er: Burger A, 1:0 (I), Burger B, 1:1 (II), Burger C, 0:1 (III). Kommersielle referanseburgere var Naturli burger (Orkla, Norge) (IV) og hamburger (Gilde, Norge) (V).

4 Diskusjon

Under denne oppgaven ble *in situ* EPS produksjon ved fermentering med melkesyrebakterier av kikertpuré utført for å undersøke effekten på tekstur, pH, celletall, og innhold av karbohydrater og organiske syrer. Kikerter ble utvalgte siden det allerede brukes i et «burgerlignende» produkt, falafeler. Forsøkene startet ved å screene et utvalg av MSB for EPS-produksjon som videre ble brukt videre i oppgaven. Stammene som ble valgt ut ble brukt til å fermentere kikertpuré for å undersøke endringen i pH, cellevekst, metabolitter og tekstur. Kikertpuréene ble også tilsatt ekstra karbohydrat for å øke pH nedgangen og EPS-produksjonen, samt ble aquafaba tilsatt for å undersøke effekt på teksturen i kikertpuré.

Under EPS screeningen ble MSB kategorisert ut fra utseende til koloniene og om de dannet tråder ved kontakt. Screeningen ble utført ved platespredning på agar tilsatt sukrose, maltose eller glukose for å finne ut om karbohydratkilde påvirket EPS-produksjonen. Det var totalt 29 MSB stammer som ble undersøkt, hvor 6 av disse ble brukt videre i oppgaven.

For å undersøke vekst og EPS-produksjon til utvalgte MSB i kikertpuré ble det gjort to innledende forsøk hvor kikerpuré ble fermentert. Det ble her målt pH og undersøkt teksturendringer. Sukrose ble brukt som tilsetning for å se om pH og tekstur ble videre påvirket. Deretter ble effekten av karbohydrat, aquafaba tilsetning og ulik inkuberingstemperatur undersøkt med hensyn til påvirkning på pH og tekstur i kikertpuréen. Teksturen ble undersøkt ved reologiske analyser.

Videre ble det utført et metabolismeforsøk hvor innholdet av karbohydrater og organiske syrer ble undersøkt før og etter fermentering, for å undersøke hvordan stammenes metabolisme påvirket kikertprøvene (med og uten matose/sukrose). Her ble også pH og celletall undersøkt. Teksturen til kikertpuréene ble så undersøkt ved bruken av reologiske analyser for å undersøke hvordan fermenteringen påvirket viskositeten og de viskoelastiske egenskapene deres.

Til slutt ble en av stammene valgt ut for å bli brukt til å produsere kikertbaserte planteburgere. For å undersøke hvordan fermentert kikertpuré påvirket teksturen og vekttafet til planteburgerne ble det laget 3 burgermikser med varierende sammensetningsforhold mellom fermentert og ikke-fermentert kikertpuré. Vekttafet og teksturen ble undersøkt til burgerne etter varmebehandling.

4.1 Screening og innledende fermenteringsforsøk.

Det ble valgt ut 29 MSB stammer fra tidligere arbeid på NMBU (Leirvik, 2022; Ng'ong'ola-Manani et al., 2015; Østlie et al., 2021). Tre forskjellige karbohydrat-agarer ble brukt til å screene disse for EPS-produksjon. Karbohydratene som ble brukt var sukrose, maltose og glukose. Disse ble brukt for å øke mengden EPS som blir produsert under fermentering ved å gi bakteriene en enkel monosakkaridkilde til oppbygning av EPS (Prete et al., 2021; Torino et al., 2015). På sukrose-agaren var det 8 stammer som dannet slimete kolonier, av disse var det 5 stammer som var trådtrekkende. På maltose- og glukose-agaren var det 3 stammer som dannet slimete kolonier. Stammene som dannet slimete kolonier på sukrose-agaren fikk generelt et tykkere slimlag enn de som vokste på maltose- og glukose-agar. Dette kan komme av at HoPs-ene alfa-glukaner og fruktaner, trenger sukrose som donor sakkarid og blir syntetisert passivt på utsiden av bakterien. Syntetisering av beta-glukaner og HePs kan bruke flere typer sakkarider som donor sakkarid, men må også bli aktivt syntetisert på innsiden av bakteriene, noe som gjør dette til en mer energikrevende metode i sammenligning med alfa-glukaner og fruktaner (Prete et al., 2021).

Mange av de slimete koloniene viste ikke tegn til trådtrekkendeegenskaper og noen av de tørre koloniene viste tegn til trådtrekkendeegenskaper. Dette kan komme av typen EPS som ble produsert varierte mellom stammene, og som da ga de forskjellige egenskaper (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).

Det var 6 EPS+ stammer som ble brukt videre i oppgaven, men *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3) ble ikke brukt før i metabolismeforsøket. Totalt 5 EPS+ stammer ble brukt for å undersøke vekst i hermetiske kikerter, og hvor veksten og EPS-produksjonen ble estimert ut ifra pH nedgang og viskositetsøkning i kikertpuréen. En ikke-fermentert kikertpuré ble også inkubert for å undersøke om det var endringer i kun kikertpuré under inkuberingsperioden. Viskositetsendring og pH-nedgang ble undersøkt med og uten sukrosetilsetning.

Alle prøvene som ble tilsatt sukrose hadde en høyere pH-nedgang og større teksturendring enn prøvene som ikke ble tilsatt sukrose. Det var kun *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *P. pentosaceus/Lpb. plantarum* CM67 (nr. 22) som ga lik viskositetsøkning uavhengig av sukrose tilsetning. Dette kan bety at EPS-

produksjonen deres ikke var like avhengig av sukrose som de andre stammene. Den gjennomsnittlige pH-nedgangen på prøvene med sukrose tilsats var på $1,37 \pm 0,66$, mens prøvene uten-sukrose hadde en pH-nedgang på $0,62 \pm 0,62$ (Tabell 6). Prøven 5U hadde en svak pH økning under fermentering på 0,10, som kan komme av variasjonen i pH-måleren brukt og svak vekst i kikertpuréen når de ikke hadde en enkel karbohydratkilde (Tabell 6).

Etter dette ble det undersøkt om tilsetningen av aquafaba, og ulike inkuberingstemperatur hadde en effekt på pH og tekstur. Det ble også undersøkt om bruken av karbohydratet som ga best resultatet ved EPS screeningen for stammene spilte en rolle, hvor *W. cibaria* TM120 (nr. 2) og *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 22) ble tilsatt sukrose og *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) ble tilsatt maltose. Aquafaba ble tilsatt for å undersøke om den hadde en tydelig effekt på tekstur til kikertpuréene (He et al., 2021).

Inkuberingstemperaturen utgjorde små forskjeller på den gjennomsnittlige pH-nedgangen. Ved inkubering ved 22°C hadde prøvene en gjennomsnittlig pH-nedgang på $0,80 \pm 0,41$, og ved 30°C hadde prøvene en pH-nedgang på $0,83 \pm 0,53$ (Figur 8). Ved 30°C inkuberingstemperatur var det 6 av prøvene som fikk en pH <5, mens ved 22°C var det 4 prøver. Dette skyldes en økt metabolisme når inkuberingstemperaturen er nærmere bakterienes optimumstemperatur (König & Fröhlich, 2017).

Det ble utført 4 reologiske analyser for å undersøke tekstur endringene på prøvene. Under AS ble LVER (øvre grense for viskoelastisk område) undersøkt for når G' gikk ned 3% fra initialverdi. Tilsetning av karbohydrat og aquafaba, eller valget av inkuberingstemperatur ga ingen signifikant effekt på prøvenes G' og Tau verdier ved LVER, men gamma ble signifikant redusert ved tilsetning av aquafaba og karbohydrat noe som ikke var forventet. Men valget av stamme hadde en signifikant påvirkning på G', Tau og gamma, se vedlegg 3d, e og f. Det var forventet at aquafaba skulle ha en fortykkende effekt på kikertpuréen, etter som at det er vist at aquafaba kan ha en fortykkende effekt (He et al., 2021). Det var også forventet at sukrose/maltose tilsetningen skulle ha en fortykkende effekt på teksturen, siden det er vist i tidligere arbeid at fermentert bønnemikser med 5% sukrose kunne øke EPS produksjonen til MSB (Yan et al., 2019; Yan et al., 2017).

Forskjeller mellom prøvene kan komme av at noen av prøvene stå en lengere periode på kjølerom som kan ha gitt bakteriene muligheten for videre fermentering. Prøvene ble dannet ved å blande en boks hermetiske kikerter (ca. 250 g) med væsken, noe som også kan ha ført til små forskjeller i tørrstoff innholdet mellom prøvene siden innholdet av kikerter ikke er eksakt i hver boks.

Stamme nr. 5 og nr. 23 ga de høyeste G' og Tau verdiene hos prøve 23UU30, 23SA30, 5SA30, 5SU30 og 23SA22. Prøvene med stamme nr. 2 ga lavere verdier for G', Tau og gamma. Denne stammen ga også lav viskositet ved SRT og RT. Etter dårlige resultater fra stamme nr. 2 ble den byttet ut med *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3) siden den også fikk store slimete kolonier under screeningen.

4.2 Cellevekst og endring av karbohydrater og organiske syrer

For å undersøke innholdet av karbohydrat, organiske syrer, pH og celletall ble det utført et metabolismeforsøk. Under dette forsøket ble innholdet av karbohydrat og organiske analysert ved HPLC, pH ble målt med pH-måler og celletall ble undersøkt ved innstøpning i MRS-agar.

Det ble benyttet frystestock-løsninger til metabolismeforsøket for å redusere forskjellen mellom fermenteringsforsøk ved å få likest mulig celletall ved starten av forsøket. Ønsket starts celletall var 6 log kde/g. Mengde MSB tilsatt ble beregnet ut i fra celletallet etter utplating av ting frysestock, se vedlegg 1. Alle prøvene fikk et starts celletall på ca. 6 log kde/g, og etter fermentering ved 30°C i 24 t endte opp i ca. 9 log kde/g.

Nedgangen i pH hos prøvene med karbohydrat tilsetning var større enn de uten karbohydrat tilsetning med en gjennomsnittlig slutt pH på $4,84 \pm 0,22$, sammenligning med prøvene uten karbohydrat tilsetning med pH på $5,60 \pm 0,44$. Det var også forskjeller mellom stammenes pH-nedgang (med og uten karbohydrat tilsetning), hvor *Llb. fermentum* TM336 (nr. 3) reduserte pH til $4,83 \pm 0,02$ og $5,48 \pm 0,10$, *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) til $5,10 \pm 0,03$ og $6,15 \pm 0,11$, og *Llb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) på $4,58 \pm 0,02$ og $5,18 \pm 0,13$. Dette kan skyldes at *Llb. fermentum* og *Lpb. plantarum* generelt har et lavere pH optimum sammenlignet med *P. pentosaceus*, og som igjen påvirkes av lavere melkesyreproduksjon hos *P. pentosaceus* kontra *Llb. fermentum* og *Lpb. plantarum* (Giraud et al., 1991; LeBlanc et al., 2004; Papagianni & Anastasiadou, 2009). Dette stemmer med at det var *Llb.*

fermentum TM336 (nr. 3) og (nr. 23) som hadde det høyeste innholdet av melkesyre og eddiksyre etter 24 t fermentering ved 30°C når sukrose var tilsatt. Et høyt innhold av melkesyre og eddiksyre var forventet for nr. 3 siden den er HeF, men nr. 23 var satt opp som HoF, men noen stammer av *Lpb. plantarum* er fakultative heterofermentative, dette betyr at de kan gå imellom HoF og HeF etter karbohydratkilden (De Angelis & Gobbetti, 2016; Quatravaux et al., 2006). Stamme nr. 5 er HoF som forklarer at innholdet av eddiksyre økte svært lite under fermentering (Leirvik, 2022).

Innholdet av både melkesyre og eddiksyre var sterkt korrelert med pH senking noe som kommer av at begge disse er svake organiske syrer produsert av MSB for under fermentering. Det var nok også derfor melkesyre og celletall var sterkt korrelert. Dette skyldes at melkesyre fermentering er metoden MSB i hovedsak bruker for energiproduksjon og cellevekst i et medium (Müller, 2008).

Sitronsyreinnholdet til prøvene med stamme nr. 3 og 23 ble fullstendig omsatt under fermentering, dette tyder da på at disse stammene er sitrat-positive. Dette har også vært observert hos andre stammer av de samme artene *Lpb. plantarum* og *Llb. fermentum* (Illeghems et al., 2015). Innholdet av sitronsyre innholdet i prøvene fermentert med stamme nr. 5 hadde ingen tydelig reduksjon, noe som tyder på at denne stammen ikke var sitrat-positiv. Det er derimot observert at noen *Pediococcus* sp. også kan være sitrat-positive (Todorov et al., 2022).

Innholdet av nesten alle karbohydratene ble redusert under fermenteringen, bortsett fra hos 3SA30 og 23SA30 hvor innholdet av fruktose økte med $13\,930 \pm 1480$ og 2354 ± 975 ppm. Disse prøvene ble tilsatt sukrose før fermentering noe som ga bakteriene muligheten til å hydrolysere og frigjøre fruktose og glukose. Det høyere innholdet av fruktose i prøvene med stamme nr. 3 tyder på at denne stammen brukte mindre fruktose i sin metabolisme i sammenlignet med stamme nr. 23. Prøve 3SA30 hadde også et lavere innhold av maltose og glukose i sammenlignet med 23SA30 etter fermentering. Dette kan bety at stamme nr. 3 produserer mere alfa-glukaner i forhold til fruktaner sammenlignet med stamme nr. 23. Sammenhengen mellom fruktose og fruktan innholdet i fermenterte bønner tilsatt sukrose har tidligere vært observert (Xu et al., 2017; Yan et al., 2017). Reduksjonen av karbohydrat innholdet hos prøvene podet med stamme nr. 5 var mye lavere enn de andre stammene, noe

som kan være med å forklare hvorfor innholdet av melkesyre også var lavere i disse prøvene.

4.3 Teksturendring i kikertpuré

«Amplitude sweep» ble brukt for å finne G' ved 3% LVER som ble brukt for å finne parameterne τ og γ . Denne testen viste at G' og τ ved LVER økte hos *Lpb. plantarum/pentosus* CM65 (nr. 23) både med og uten 5% sukrose, mens *Lfb. fermentum* TM336 (nr. 3) med 5% sukrose hadde kun en økning i G' under fermentering. Dette viser at disse stammene økte elastisiteten til prøvene under fermentering når sukrose ble tilsatt (Anton-Paar, 2023a). Alle prøvene fikk en liten reduksjon i γ på $0,009\% \pm 0,006$, noe som tyder på at strukturen deres ble skjørere/sprøere (Anton-Paar, 2023a).

Det ble observert stor variasjon parameterne til prøvene før fermentering i både AS, SRT, RT og TDOT, men generelt hadde prøvene med karbohydrat en lavere start viskositet, G' - og τ -verdiene enn prøvene uten karbohydrat. Dette faktum at prøvene hadde store variasjon i parameterne før fermentering kan forklare hvorfor det ikke ble påvist signifikante forskjeller mellom mange av prøvenes parametere etter fermentering (vedlegg 4). En av forklaringene med hensyn til den store variasjonen kan være forskjeller i partikkelstørrelser i puréene, etter som mange av prøvene måtte ha lengre homogeniseringstid i omni-mikserne ettersom puréene var svært faste og motstod bevegelse og homogenisering i mikserne. En puré med mindre partikler enn en puré med store partikler vil kunne få en økt lagringsmodul (G') og viskositet (Pal, 1997). En annen bakgrunn kan at det var små forskjeller i innholdet av kikerter per hermetikk boks, som da kan ha ført til forskjeller i tørrstoffinnholdet mellom prøvene.

For å undersøke endring i viskositet og lagringsmodul ble det regnet ut prosentvis endring i disse parameterne med følgende ligning:

$$\frac{\text{Slutt verdi}}{\text{Start verdi}} - 1 \times 100\% = \text{Prosentvis endring}$$

Lfb. fermentum TM336 (nr. 3) med sukrose ga den høyeste økningen i viskositet ved SRT og RT på 73% og 117%, og økning i G' etter oppvarming på 341 – 437%. De andre prøvene fikk en reduksjon i G' etter oppvarming som betyr at elastisiteten ble redusert under fermentering. Prøvene med *P. pentosaceus* VL9 (nr. 5) og *Lpd.*

plantarum/pentosus CM65 (nr. 23) tilsatt 5% maltose/sukrose fikk en økning i viskositet vist hos både SRT og RT, viskositetøkningen var på 17 – 38% hos nr. 5 og 55 – 57% hos nr. 23. Dette kan ha noe å gjøre med typene EPS stammene produserte som ikke påvirket elastisiteten, men økte viskositeten (Yan et al., 2017). Kontroll prøven hadde en liten økning i G' og reduksjon i viskositet under inkuberingsperioden, noe som tyder på kjemiske endringer av kikertpuréene under lagring som igjen påvirket de reologiske egenskapene. Stamme nr. 5 ga de laveste endringene i G' og viskositet. Noe av endringene påført prøvene kan komme av pH-reduksjonen og andre endringer påført proteinene under fermentering (Ronda et al., 2014).

Økningen i viskositet i prøvene tilsatt karbohydrat antyder til en økt produksjon av EPS når karbohydrat ble tilsatt, noe som også er vist i tidligere arbeid (Íspirli et al., 2020; Yan et al., 2019; Yan et al., 2017; Øyehaug, 2022). Viskositet økningen kan ha med vannbindings evnen til EPS-en som blir produsert. Påvirkningen av prøvenes viskoelastiske egenskaper varierte ut ifra stammene som ble brukt, som tyder på at stammene produserer forskjellige mengder av forskjellige typer EPS (Íspirli et al., 2020; Yan et al., 2017).

Temperaturavhengig oscillasjons test (TDOT) viste at G' økte under oppvarmingen i alle kikertpuréene. Dette tyder på gel-dannelse i kikertpuréene under oppvarming (Anton-Paar, 2023c). Denne gel-dannelsen kan skyldes at stivelse gelatiniserer under oppvarming, og dannelse av tre dimensjonale nettverk mellom proteiner i kikertene. Økningen i G' hos prøvene fermentert med stamme nr. 3 kan komme av interaksjoner mellom EPS og kikertproteinene (Yan et al., 2017).

4.4 Produksjonen av kikertburgere med fermentert kikertpuré

Kikertburgere ble laget for å undersøke om *in situ* EPS-produksjon gjennom melkesyrebakteriefermentering har en positiv effekt på teksten i en kikertburger. Det ble laget 3 forskjellige kikertburgere med forskjellig innhold av fermentert kikertpuré for å undersøke effekt på vekttap og tekstur. Kikertburgerne ble stekt i stekeovn for å redusere forskjeller fra steketid og temperatur mellom burgerne. Teksturen ble analysert ved en TPA hvor 6 parametere ble undersøkt; hardhet, cohesivness, spenst, tyggemotstand, resilience, og klebrighet. De 3 kikertburgerne

ble sammenlignet med 2 kommersielle referanseburgere (Hamburger (Gilde) og Naturli-burger (Orkla)).

Det var *Llb. Fermentum* TM336 (nr. 3) som ble valgt ut til å fermentere kikertpuréen brukt i kikertburgerne. Dette er også den samme stammen som ble brukt i en tidligere masteroppgave hvor effekten av *in situ* EPS-produksjon i ertebasert planteburger ble studert (Øyehaug, 2022). Vekttapet til kikertburgerne lå på mellom 26 – 28%, og var ikke signifikant forskjellige fra hverandre (vedlegg 5a). Dette var ikke forventet ettersom at burger A inneholdte kun fermentert kikertpuré, og burger C inneholdt kun ikke-fermentert kikertpuré. Det er tidligere vist at EPS er med på å redusere vekttap under steking i ertebaserte planteburgere (Øyehaug, 2022), eller i produksjonen av surdeigsbrød med EPS produserende MSB (Íspirli et al., 2020). Manglende forskjeller i vekttap kan komme av interaksjoner mellom EPS og de andre ingrediensene i kikertburgeren som olje, stivelse eller aquafaba. Sammenligning med Naturli-burgeren og Gilde hamburgeren hadde kikertburgerne et signifikant lavere vekttap etter som disse hadde vekttap på 39% og 35%.

Når kikertburgerne ble stekt ble høyden deres redusert fra ca. 2 cm til 1 – 1,5 cm, og dette gjorde at alle kikertburgerne ble mye lavere enn Naturli-burgeren. Naturli-burgeren fikk en røffere tverrsnitt sammenlignet med de andre burgerne. Dette røffere tverrsnittet kan komme at bruken av texturert plante proteinet som blir brukt (Ishaq et al., 2022). Disse burgerne ble ikke lavere under steking, noe som kan komme av innholdet av metylcellulose som stabiliserer strukturen under oppvarming (Ishaq et al., 2022). Kikertburgerne fikk etter steking en høyde tilsvarende Gilde hamburgeren. Burger A ble noe brunere etter steking sammenlignet med burger B og C. Årsaken til dette kan være at burger A hadde det høyeste innholdet av fermentert kikertpuré som igjen hadde et høyere innhold av sukrose og fruktose. Et høyere sukrose og fruktose innhold vil føre til økt karamellisering, og et høyere innhold av reduserbart sukker vil øke graden av Maillardreaksjoner (Tamanna & Mahmood, 2015). Denne bruningen kan være gunstig for å gi burgerne en mere typisk burgerlignende farge.

Teksturen til burgerne ble analysert med TPA. Det var kun signifikante forskjeller mellom kikertburgernes «cohesivness», hvor burger C hadde en verdi på $0,531 \pm 0,064$ og burger A og B hadde verdier på $0,451 \pm 0,048$ og $0,433 \pm 0,028$. Det var store forskjeller mellom kikertburgerne og referanseburgerne. Hamburgeren fra Gilde

hadde de høyest verdiene for hardhet, «resilience», klebrighet, spenst og tyggemotstand, og Naturliburgeren hadde de nest høyeste verdiene for disse parameterne. Den fermenterte kikertpuréen hadde en liten effekt på kikertburgernes tekstur i dette forsøket. Dette kan være på grunn av at andre komponenter i oppskriften som olje, stivelse og aquafaba ble dominerende faktorer med hensyn til dannelsen av tredimensjonale nettverk som påvirker teksturen. Det kan også hende at aquafabas sin geldannelsevne overstyrte EPS sin tekstur endrende egenskaper (He et al., 2021). Dette burde bli videre undersøkt ved å se om forskjellig innhold av ingredienser, spesielt hvordan aquafaba påvirker en fermentert kikertburger.

4.5 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke effekten av *in situ* produksjon av eksopolysakkarider fra melkesyrebakteriefermentering i en kikertbasert planteburger. Dette ble undersøkt for å finne ut om *in situ* EPS produsert ved fermentering kan være et alternativ til fortyknings- og emulgeringsmidler (eks: metylcellulose) brukt for å forbedre teksturen i kommersielle planteburgere.

Under EPS screeningen ble 29 MSB-er undersøkt for deres EPS-produksjon på tre forskjellige karbohydrat-agarer, fra disse ble det valgt ut 6 EPS+ stammer. Fem av disse MSB stammene hadde den høyeste EPS-produksjonen i sukrose og en hadde den høyeste i maltose, disse karbohydratene ble derfor brukt videre. Deretter ble fem av disse stammene brukt til å fermentere kikertpuré for å undersøke veksten deres i kikertpuré med 5% sukrose. Viskositetsøkningen og pH-nedgangen økte når sukrose ble tilsatt. Etter dette ble 3 av stammene brukt for å undersøke om valget av inkuberingstemperatur og tilsetningen av aquafaba kunne videre påvirke viskositetsøkningen og pH-nedgangen. En inkuberingstemperatur på 30°C så ut til å øke pH-nedgangen mer enn en temperatur på 22°C.

Det ble deretter utført et metabolismeforsøk hvor innholdet av et utvalg av metabolitter, pH, cellevekst og reologiske egenskaper ble undersøkt. Innholdet av melkesyre og eddiksyre økte, og sitronsyre sank når stammene *Llb. fermentum* TM336 og *Llb. plantarum/pentosus* CM65 ble tilsatt med sukrose. Celletallet økte hos alle fermenterte prøvene fra ca. 6 log kde/g til ca. 9 log kde/g. Kikertpuré med 5% sukrose og 17% aquafaba fermentert med *Llb. fermentum* TM336 ga den høyeste økningen i viskositet og lagringsmodulen etter oppvarming til 90°C. Denne kikertpuréen ble brukt videre i burgerforsøket.

Til slutt ble det laget 3 kikertburgere med forskjellige innhold av fermentert kikertpuré for å undersøke om EPS-en produsert hadde en positiv effekt på teksturen og vekttapet. Det ble ikke observert noen tydelige sammenhenger mellom innholdet av fermentert kikertpure og tekstur eller vekttap. Dette kan komme av de andre ingrediensene brukt hadde en dominerende effekt på teksturen, for eksempel aquafaba og potetmel. Dette burde derfor bli undersøkt videre om valget av andre ingredienser kan fremme EPS sine teksturforbedrende egenskaper bedre.

4.5.1 Videre forskning

For videre forskning er det mange faktorer som hadde vært interessante å undersøke. Blant annet se om bruken av andre ingredienser eller miljø hadde gikk bakteriene et bedre utgangspunkt for veksten og EPS-produksjonen, som eksempel prosent andelen karbohydrattilsetning, og valget av inkuberingstemperatur og tid. Det kunne også vært ønsket ha laget en puré med et høyere tørrstoffinnhold.

I denne oppgaven ble bruken av kikerter undersøkt, siden at kikerter allerede blir brukt i «burger-lignende» produkter som falafeler. Bruken av andre belgvekster kunne også ha vært interessant å undersøke. Bruken av for eksempel soyabønner eller fada bønner kunne vært interessant etter som at disse har et høyere proteininnhold, noe som ville etterligne næringsinnholdet til kjøtt bedre. Fada bønner kunne vært ekstra interessant ettersom at dette er et produkt som kan produseres i Norge.

Videre undersøkelse av effekt til aquafaba på teksturen i planteburgere eller andre plantebaserte produkter kunne også vært interessant. Blant annet kunne det vært interessant å undersøke om aquafaba gir noen forbedrende effekter i gluten-fritt brød.

Under denne oppgaven ble det ikke lagt vekt på innholdet av anti-næringsstoffer i kikertpuréene, og hvordan melkesyrebakteriefermenteringen påvirket dette innholdet. Det kunne derfor vært interessant å undersøke om fermenteringen påvirket innholdet av anti-næringsstoffer, ettersom at det er tidligere vist at noen melkesyrebakterier kan redusere innholdet av noen typer anti-næringsstoffer (Michela et al., 2022). Hvordan tilsetningen av aquafaba påvirket innholdet av anti-næringsstoffer hadde også vært interessant å undersøke, slik at man da kunne ha vurdert om denne ingrediensen i det hele tatt er vært å bruke.

Referanser

- Alsaman, F. B., Tulbek, M., Nickerson, M., & Ramaswamy, H. S. (2020). Evaluation and optimization of functional and antinutritional properties of aquafaba. *Legume Science*, 2(2), e30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/leg3.30>
- Anton-Paar. (2023a). *Amplitude Sweeps*. Anton-Paar. Retrieved 03.05 from <https://wiki.anton-paar.com/en/amplitude-sweeps/>
- Anton-Paar. (2023b). *Basics of rheology*. Anton-Paar. Retrieved 22.02 from <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/#references-and-further-reading>
- Anton-Paar. (2023c). *Temperature-dependent behavior (oscillation)*. Anton-Paar. Retrieved 22.02 from <https://wiki.anton-paar.com/en/temperature-dependent-behavior-oscillation/>
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Res Int*, 99(Pt 1), 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>
- Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D., Monforti-Ferrario, F., Tubiello, F. N., & Leip, A. (2021). Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions. *Nature Food*, 2(3), 198-209. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00225-9>
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Lactobacillus SPP.: General Characteristics☆. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- Elisashvili, V. I., Kachlishvili, E. T., & Wasser, S. P. (2009). Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(5), 531-535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>
- FN-Sambandet. (2023). *FNs bærekraftsmål*. <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal>

- Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H., & Urashima, T. (2010). Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1040-1045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.037>
- Giraud, E., Lelong, B., & Rimbault, M. (1991). Influence of pH and lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36. <https://doi.org/10.1007/BF00164706>
- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), 601-606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>
- He, J., Evans, N. M., Liu, H., & Shao, S. (2020). A review of research on plant-based meat alternatives: Driving forces, history, manufacturing, and consumer attitudes. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19(5), 2639-2656. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12610>
- He, Y., Meda, V., Reaney, M. J. T., & Mustafa, R. (2021). Aquafaba, a new plant-based rheological additive for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 27-42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.035>
- Illegheems, K., De Vuyst, L., & Weckx, S. (2015). Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. *BMC Genomics*, 16(1), 766. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1927-0>
- Ishaq, A., Irfan, S., Sameen, A., & Khalid, N. (2022). Plant-based meat analogs: A review with reference to formulation and gastrointestinal fate. *Curr Res Food Sci*, 5, 973-983. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.06.001>
- İspirli, H., Özmen, D., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O., & Dertli, E. (2020). Impact of glucan type exopolysaccharide (EPS) production on technological characteristics of sourdough bread. *Food Control*, 107, 106812. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106812>
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British*

Journal of Nutrition, 108(S1), S11-S26.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>

- 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.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.031>
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic Acid Bacteria. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3-41). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- LeBlanc, J. G., Garro, M. S., & Savoy de Giori, G. (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, alpha-galactosidase activity and fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(1), 119-123.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1532-z>
- Leirvik, V. (2022). *Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av spontanfermenterte surdeiger av havre, bokhvete og quinoa* [Master thesis, NMBU]. NMBU.
<https://hdl.handle.net/11250/3046156>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Liu, S., & Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26(3), 117-121.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y. S., & Park, I. (2021). Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112861>
- Michela, V., Erica, P., Marco, M., & Carlo Giuseppe, R. (2022). Fermentation as Strategy for Improving Nutritional, Functional, Technological, and Sensory Properties of Legumes. In C. J.-L. Jose & C. Alfonso (Eds.), *Legumes Research* (pp. Ch. 13). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.102523>

- Mıdık, F., Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., & Özçelik, F. (2020). Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. *Archives of Microbiology*, 202(4), 875-885. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01799-6>
- Munch-Andersen, C. B., Paulsen, J., Østlie, H. M., Porcellato, D., & Devold, T. G. (2022). *Micorbiota and metabolisme studies in spontaneous sourdough fermentations of legumes and wheats* Foodmicro 2022, Athen, Greece.
- Müller, V. (2008). Bacterial Fermentation. In. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001415.pub2>
- Nersten, S. (2021). *Vegetable emulsions and Norwegian-grown pulses as ingredients in plant-based food products : effects on quality characteristics of falafel* Norwegian University of Life Sciences, Ås]. Norwegian University of Life Sciences, Ås. <https://hdl.handle.net/11250/2832769>
- Netland, M. (2015). *Tettemelk og Pinguicula vulgaris : et forsøk på å påvise EPS-produserende Lactococcus lactis subsp. cremoris på blader av P. vulgaris* Norwegian University of Life Sciences]. Norwegian University of Life Sciences, Ås. <http://hdl.handle.net/11250/295921>
- Ng'ong'ola-Manani, T., Wicklund, T., Mwangwela, A., & Ostlie, H. (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. <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.996894>
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiol*, 6(4), 451-469. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>
- Oleksy-Sobczak, M., & Klewicka, E. (2020). Optimization of Media Composition to Maximize the Yield of Exopolysaccharides Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09581-2>
- Pal, R. (1997). Viscosity and storage/loss moduli for mixtures of fine and coarse emulsions. *Chemical Engineering Journal*, 67(1), 37-44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(97\)00011-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1385-8947(97)00011-9)

- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact*, 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-3>
- Patel, A., & Prajapat, J. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1-8.
- Peetermans, A., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2021). Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*, 8(6), 111-130. <https://doi.org/10.15698/mic2021.06.751>
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., & Corsetti, A. (2021). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Producers: A Sustainable Tool for Functional Foods. *Foods*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/foods10071653>
- Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., & Guzzo, J. (2006). Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 903-912. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02955.x>
- Reid, G., Gadir, A. A., & Dhir, R. (2019). Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Front Microbiol*, 10, 424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00424>
- Ronda, F., Villanueva, M., & Collar, C. (2014). Influence of acidification on dough viscoelasticity of gluten-free rice starch-based dough matrices enriched with exogenous protein. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 12-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.052>
- Rosenthal, A. (2010). Texture Profile Analysis – How important are the parameters? *Journal of Texture Studies*, 41, 672-684. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2010.00248.x>
- 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(3), 843-856. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8)
- Sanlibaba, P., & Çakmak, G. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: open access*, 2. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>

- Sofi, S. A., Muzaffar, K., Ashraf, S., Gupta, I., & Mir, S. A. (2020). Chickpea. In A. Manickavasagan & P. Thirunathan (Eds.), *Pulses: Processing and Product Development* (pp. 55-76). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41376-7_4
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (Second ed.). Freeman Press, USA.
- Tachie, C., Nwachukwu, I. D., & Aryee, A. N. A. (2023). Trends and innovations in the formulation of plant-based foods. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00129-0>
- Tamanna, N., & Mahmood, N. (2015). Food Processing and Maillard Reaction Products: Effect on Human Health and Nutrition. *Int J Food Sci*, 2015, 526762. <https://doi.org/10.1155/2015/526762>
- Tian, F. (2019). Introduction. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Omics and Functional Evaluation* (pp. 1-33). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7832-4_1
- Todorov, S. D., Dioso, C. M., Liong, M.-T., Nero, L. A., Khosravi-Darani, K., & Ivanova, I. V. (2022). Beneficial features of pediococcus: from starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03419-w>
- Torino, M., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>
- TTC. (2023). *Overview of TPA* Texture Technologies Corp. and Stable Micro Systems, Ltb. Retrieved 24.04.23 from <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#select-characteristics>
- United-Nations. (2023). *Food and Climate Change: Healthy diets for a healthier planet*. <https://www.un.org/en/climatechange/science/climate-issues/food>
- Xu, Y., Coda, R., Shi, Q., Tuomainen, P., Katina, K., & Tenkanen, M. (2017). Exopolysaccharides Production during the Fermentation of Soybean and Fava Bean Flours by *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2805-2815. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05495>

- Yan, X., Rossana, C., Ulla, H.-M., Arja, L., Kati, K., & Maija, T. (2019). Impact of in situ produced exopolysaccharides on rheology and texture of fava bean protein concentrate. *Food Research International*, 115, 191-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.054>
- Yan, X., Yaqin, W., Rossana, C., Elina, S., Päivi, T., Maija, T., & Kati, 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.012>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109059>
- Øyehaug, F. (2022). *Fermentering av exopolysakkaridproduserende bakterier : effekt på tekstur* Norwegian University of Life Sciences, Ås]. Norwegian University of Life Sciences, Ås. <https://hdl.handle.net/11250/3036704>

Vedlegg

1. Kolonier på MRS-agar utplatet med stamme nr. 3, 5 og 23, og utregnet cellekonsentrasjon i MRS-buljong.

Stamme nr.	Kolonier			Gjennomsnittlig (kde/ml)
	1/10 ⁶	1/10 ⁷	1/10 ⁸	
3	>300/>300	>300/>300	34/30	3,20*10 ⁹
5	>300/>300	>300/>300	224/225	2,25*10 ¹⁰
23	>300/>300	>300/>300	73/63	6,8*10 ⁹

Utregning av mengde frysestock-løsninger for å få et starts celletall på 10⁶ kde/g.

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$\text{Stamme 3: } \frac{50\text{ml} \times 10^6}{3,2 \times 10^9} = 15 \mu\text{L}$$

$$\text{Stamme 5: } \frac{50\text{ml} \times 10^6}{2,25 \times 10^{10}} = 2 \mu\text{L}$$

$$\text{Stamme 23: } \frac{50\text{ml} \times 10^6}{6,8 \times 10^9} = 7 \mu\text{L}$$

2. Rådata fra metabolismeforsøket. Hvis med prøvekoder, stamme nr., sukkerart (S; sukrose, M; maltose, U; uten), før (0) eller etter (24) fermentering. Og deres resultater fra pH-måling, celletall utplating, reologiske analyser og HPLC.

Kode	Stamme	Sukkerart	Tid	pH	Kde	logkde	G'	Gamma	Tau	20C1	90C	70C	20C2	RT	SRT	Maltose	Citrat	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Acetat	
					kde/ml	Log kde/ml	Pa	%	Pa	G' (Pa)	G' (Pa)	G' (Pa)	G' (Pa)	Pa*s	Pa*s	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
3S0	3	S	0	6,02	9,15E+05	5,96	2,21E+03	0,09	0,09	2,10	1,76E+03	1,37E+03	1,93E+03	4,46E+03	27,94	221,5	30194,26	1759,38	9582,73	10047,41	0,00	103,32
5M0	5	S	0	6,05	9,00E+05	5,95	5,33E+03	0,09	0,09	4,74	2,23E+03	1,78E+03	2,49E+03	4,85E+03	57,62	393,8	34777,08	1635,18	3199,26	2237,65	0,00	94,99
23S0	23	S	0	6,03	1,09E+06	6,04	6,91E+03	0,09	0,09	6,65	4,63E+03	2,96E+03	4,20E+03	5,38E+03	79,25	619,8	27019,54	1582,27	11836,94	12420,12	0,00	94,54
3S24	3	S	24	4,84	9,55E+08	8,98	4,58E+03	0,08	0,08	3,62	3,81E+03	2,87E+03	2,78E+04	5,65E+04	161,7	826,8	2881,62	0,00	1293,95	22400,57	3102,35	1250,76
5M24	5	S	24	5,07	4,95E+08	8,69	3,45E+03	0,07	0,07	2,39	1,58E+03	1,61E+03	2,05E+03	3,40E+03	37,12	252,7	33058,66	1558,32	1530,98	1598,04	1941,07	103,27
23S24	23	S	24	4,55	6,60E+08	8,82	6,34E+03	0,08	0,08	5,63	3,52E+03	2,81E+03	4,40E+03	5,60E+03	95,94	664,3	16920,64	0,00	6904,25	14643,19	4314,32	1080,66
3U0	3	U	0	6,01	1,00E+06	6,00	3,17E+03	0,10	0,10	3,14	3,38E+03	3,52E+03	1,52E+04	3,69E+04	66,74	509,1	3288,42	1774,27	1307,91	1462,71	0,00	88,70
5U0	5	U	0	6,01	1,03E+06	6,01	5,28E+03	0,10	0,10	5,35	4,60E+03	5,01E+03	1,76E+04	3,76E+04	115,9	750	2854,90	1549,00	1065,15	1324,21	0,00	77,49
23U0	23	U	0	6,03	1,40E+06	6,15	5,31E+03	0,10	0,10	5,19	4,79E+03	5,25E+03	1,92E+04	4,20E+04	111	724,9	2867,51	1499,01	1022,93	1263,05	0,00	75,86
KU0	K	U	0	6,03	0,00E+00	0	4,41E+03	0,10	0,10	4,55	3,38E+03	3,52E+03	1,52E+04	3,69E+04	93,17	583,8	3041,22	1601,94	1055,95	1301,80	0,00	86,43
3U24	3	U	24	5,35	1,16E+09	9,06	3,15E+03	0,09	0,09	3,01	3,42E+03	2,54E+03	1,26E+04	2,98E+04	85,47	575,3	688,84	0,00	232,22	202,90	2425,37	1047,11
5U24	5	U	24	6,14	6,75E+08	8,83	3,76E+03	0,10	0,10	3,65	3,52E+03	4,19E+03	1,91E+04	3,91E+04	64,48	403,7	3240,15	1589,03	796,45	770,67	466,60	180,85
23U24	23	U	24	5,06	6,50E+08	8,81	5,75E+03	0,10	0,10	5,77	5,03E+03	3,49E+03	1,73E+04	2,73E+04	126,7	887	669,52	0,00	213,63	447,66	2667,58	936,95
KU24	K	U	24	6,01	0,00E+00	0	4,43E+03	0,10	0,10	4,35	3,37E+03	3,17E+03	1,55E+04	3,71E+04	94,13	593,5	2986,81	1560,50	998,78	1215,56	0,00	79,48
3S0	3	S	0	6,08	8,65E+05	5,94	5,73E+03	0,08	0,08	4,92	4,97E+03	7,93E+03	1,10E+04	2,69E+04	178	1259	24621,60	1109,34	9469,74	9814,97	0,00	76,60
5M0	5	S	0	6,01	1,16E+06	6,06	1,07E+04	0,09	0,09	9,51	9,33E+03	1,97E+04	2,32E+04	4,15E+04	118,4	735,2	30585,33	948,36	2198,17	1062,75	0,00	97,18
23S0	23	S	0	6,01	2,03E+06	6,31	5,96E+03	0,10	0,10	6,37	6,10E+03	1,40E+04	2,19E+04	5,07E+04	127,2	839,6	23898,09	1013,69	11439,84	12001,78	0,00	104,08
3S24	3	S	24	4,86	9,30E+08	8,97	7,66E+03	0,06	0,06	4,88	7,26E+03	4,69E+04	8,07E+04	1,55E+05	397,6	2124	800,75	0,00	444,71	23336,92	3578,04	1007,26
5M24	5	S	24	5,08	1,96E+08	8,29	8,22E+03	0,09	0,09	7,56	6,88E+03	1,52E+04	2,14E+04	3,71E+04	170,7	1381	29685,92	923,90	577,16	866,45	1756,71	95,85
23S24	23	S	24	4,61	4,65E+08	8,67	7,48E+03	0,10	0,10	7,40	5,02E+03	1,12E+04	1,34E+04	2,18E+04	184,4	1307	12237,94	0,00	5527,74	13231,75	3622,92	781,30
3U0	3	U	0	6,2	8,90E+05	5,95	5,25E+03	0,10	0,10	5,38	1,23E+04	2,45E+04	2,92E+04	4,25E+04	108,6	783,5	3084,70	1531,82	954,08	1074,89	0,00	75,27
5U0	5	U	0	6,23	9,50E+05	5,98	1,28E+04	0,10	0,10	12,95	6,36E+03	1,54E+04	2,26E+04	3,81E+04	243,2	1570	2986,68	1513,15	916,96	1040,54	0,00	85,86
23U0	23	U	0	6,22	9,50E+05	5,98	6,81E+03	0,11	0,11	7,42	4,53E+03	1,28E+04	1,91E+04	4,02E+04	128,5	817,3	2829,68	1438,62	838,92	926,93	0,00	79,70
KU0	K	U	0	6,2	0,00E+00	0,00	1,28E+04	0,10	0,10	12,95	6,36E+03	1,54E+04	2,26E+04	3,81E+04	243,2	1570	3232,04	1586,03	850,46	940,32	0,00	89,62
3U24	3	U	24	5,59	1,11E+09	9,05	5,20E+03	0,10	0,10	5,11	9,79E+03	1,92E+04	2,97E+04	4,25E+04	115,2	709,7	994,72	0,00	334,83	153,70	2051,35	1074,37
5U24	5	U	24	6,01	9,90E+08	9,00	1,06E+04	0,10	0,10	10,80	5,61E+03	1,28E+04	1,38E+04	1,71E+04	193,4	1266	2301,97	976,50	560,08	382,46	1143,65	495,38
23U24	23	U	24	5,36	7,30E+08	8,86	8,47E+03	0,10	0,10	8,73	5,61E+03	1,28E+04	1,38E+04	1,71E+04	155,8	1053	773,09	0,00	334,36	358,08	2250,48	875,63
KU24	K	U	24	6,17	0,00E+00	0,00	1,19E+04	0,08	0,08	10,06	1,23E+04	2,45E+04	2,92E+04	4,25E+04	210,3	1372	1792,07	1090,63	678,20	795,31	881,01	349,63
3S0	3	S	0	6,28	8,70E+05	5,94	8,22E+03	0,10	0,10	8,44	7,42E+03	6,96E+03	2,01E+04	3,74E+04	167,7	1053	29324,39	1350,56	6006,21	6184,03	0,00	89,86
5M0	5	S	0	6,29	1,62E+06	6,21	9,44E+03	0,11	0,11	10,31	8,48E+03	7,74E+03	2,40E+04	4,34E+04	170,7	1031	33356,67	1408,87	3001,67	2096,54	0,00	105,17
23S0	23	S	0	6,27	1,55E+06	6,19	5,33E+03	0,11	0,11	6,05	5,16E+03	4,70E+03	1,79E+04	4,21E+04	101,1	623,4	29864,45	1404,78	4853,49	5024,26	0,00	86,22
3S24	3	S	24	4,8	1,10E+09	9,04	9,24E+03	0,08	0,08	8,02	9,30E+03	8,12E+03	6,84E+04	9,14E+04	253	1438	1220,12	0,00	382,94	22099,31	3247,44	1001,76
5M24	5	S	24	5,14	5,40E+08	8,73	9,91E+03	0,10	0,10	9,74	8,44E+03	8,41E+03	2,09E+04	3,60E+04	197,8	1341	28211,13	1290,63	1534,46	1359,69	1503,14	115,02
23S24	23	S	24	4,57	7,90E+08	8,90	8,95E+03	0,09	0,09	8,24	5,37E+03	3,38E+03	1,70E+04	3,19E+04	198,7	1311	15566,71	0,00	2213,44	8633,52	3933,67	1041,81
3U0	3	U	0	6,18	7,40E+05	5,87	1,02E+04	0,10	0,10	9,90	8,22E+03	9,13E+03	1,83E+04	2,46E+04	188,4	1431	3114,93	1373,10	602,46	439,90	0,00	89,48
5U0	5	U	0	6,13	1,03E+06	6,01	7,11E+03	0,10	0,10	7,47	6,32E+03	6,86E+03	1,96E+04	3,51E+04	144,4	988,5	3285,95	1423,64	619,20	299,84	0,00	98,91
23U0	23	U	0	6,07	1,18E+06	6,07	7,66E+03	0,10	0,10	7,69	6,37E+03	7,23E+03	2,31E+04	4,10E+04	143,7	930,5	3271,23	1472,83	569,10	478,84	0,00	90,68
KU0	K	U	0	6,05	0,00E+00	0,00	1,06E+04	0,09	0,09	9,36	8,80E+03	9,21E+03	2,19E+04	3,66E+04	193,6	1226	3137,45	1333,21	530,51	434,36	0,00	80,40
3U24	3	U	24	5,51	1,27E+09	9,10	8,55E+03	0,10	0,10	8,61	8,19E+03	6,48E+03	2,37E+04	3,83E+04	182	1150	879,10	0,00	323,26	0,00	1692,42	1107,07
5U24	5	U	24	6,29	7,80E+08	8,89	7,18E+03	0,10	0,10	7,19	6,76E+03	6,39E+03	2,63E+04	5,49E+04	124,2	766,2	3502,23	1254,78	380,59	0,00	0,00	70,61
23U24	23	U	24	5,13	3,30E+08	8,52	8,93E+03	0,09	0,09	8,24	7,50E+03	6,92E+03	2,26E+04	3,32E+04	171,7	1155	781,86	0,00	281,50	115,31	2125,31	840,43
KU24	K	U	24	6,08	0,00E+00	0	1,09E+04	0,08	0,08	9,05	8,99E+03	9,14E+03	2,59E+04	4,97E+04	176,8	1162	3442,05	1482,12	468,15	167,45	0,00	42,26

3. Enveis ANOVA og CLD for andre fermenteringsforsøk.

a. Variansen i Gamma mellom prøvene

```
> AnovM <- aov(Gamma~Name, data = TestAMP)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Name      24  0.04105  0.0017104   13.84 1.14e-14 ***
Residuals 50  0.00618  0.0001236
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Name
 5MU30    5MU22    2UU22    23UU22    5UU22    KUU30    2SU22    5UA22    2UU30    23UA30
  "a"     "ab"    "abc"   "abcd"  "abcde" "abcdef" "abcdef" "abcdefg" "abcdefg" "abcdefg"
23UU30  23UA22  23SA22  5UU30   23SA30  2SU30   5MA30   5UA30   5MA22   23SU30
"bcdefg" "cdefg" "cdefg" "cdefg" "cdefg" "cdefg" "defg"   "efg"   "fg"    "fg"
2UA22   2UA30   23SU22  2SA30   2SA22
"gh"    "gh"    "gh"    "h"     "h"
```

b. Variansen i G' mellom prøvene

```
> AnovM <- aov(G~Name, data = TestAMP)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Name      24 627036072 26126503   9.316 2.53e-11 ***
Residuals 50 140216974 2804339
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Name
23SA30  23UU30   5MA30  23SA22  23UA30  23UU22  23UA22  5MU30  5MA22  5UA22  2SU30
  "a"     "ab"    "abc"   "abcd"  "abcd"  "abcd"  "abcde" "abcde" "abcdef" "bcdef" "cdef"
2UA30   5UU22  2UA22  2UU30  2UU22  KUU30  5MU22  5UA30  2SA22  5UU30  2SU22
"cdef"  "cdef"  "def"   "def"   "defg"  "defg"  "defg"  "defg"  "defg"  "defg"  "defg"
23SU22  23SU30  2SA30
"efg"   "fg"    "g"
```

c. Variansen i Tau mellom prøvene.

```
> AnovM <- aov(Tau~Name, data = TestAMP)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Name      24  725.3    30.22   6.932 4.74e-09 ***
Residuals 50  218.0     4.36
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Name
23UU30  23SA30   5MU30  23UU22  5MA30  23UA30  23SA22  5UU22  5UA22  5MU22  23UA22
  "a"     "ab"    "abc"   "abcd"  "abcd"  "abcd"  "abcde" "abcde" "abcde" "abcde" "abcde"
2UU22  2UU30  2SU30  KUU30  5MA22  2UA30  2UA22  2SU22  5UU30  5UA30  2SA22
"abcde" "abcdef" "abcdef" "abcdef" "abcdef" "bcdef" "cdef"  "cdef"  "cdef"  "def"   "ef"
23SU22  23SU30  2SA30
"ef"    "ef"    "f"
```

d. To-vies anova for G' og valget av stamme, karbohydrat, aquafaba og inkuberingstemperatur

```
> summary((aov(G~Stamme+Sakkarid+Aquafaba+Temperatur, data = TestAMP)))
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Stamme    3 104887777 34962592   3.899 0.0124 *
Sakkarid   1  12258462 12258462   1.367 0.2464
Aquafaba   1  27617882 27617882   3.080 0.0838 .
Temperatur 1  12748271 12748271   1.422 0.2373
Residuals 68 609740655 8966774
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

- e. To-vies anova for Tau og valget av stamme, karbohydrat, aquafaba og inkuberingstemperatur

```
> summary((aov(Tau~Stamme+Sakkarid+Aquafaba+Temperatur, data = TestAMP)))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Stamme	3	144.4	48.14	4.303	0.00772	**
Sakkarid	1	28.7	28.69	2.564	0.11396	
Aquafaba	1	4.6	4.63	0.414	0.52235	
Temperatur	1	4.8	4.80	0.429	0.51477	
Residuals	68	760.8	11.19			

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

- f. To-vies anova for gamma og valget av stamme, karbohydrat, aquafaba og inkuberingstemperatur

```
> summary((aov(Gamma~Stamme+Sakkarid+Aquafaba+Temperatur, data = TestAMP)))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Stamme	3	0.006556	0.002185	5.799	0.00137	**
Sakkarid	1	0.002148	0.002148	5.700	0.01975	*
Aquafaba	1	0.011963	0.011963	31.747	3.66e-07	***
Temperatur	1	0.000938	0.000938	2.490	0.11921	
Residuals	68	0.025625	0.000377			

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

4. Enveis anova og CLD for prøvene fra metabolismefrosøket

- a. Variansen i pH mellom prøvene.

```
> AnovM <- aov(pH~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Kode	13	12.692	0.9763	78.99	<2e-16	***
Residuals	28	0.346	0.0124			

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

```
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
```

```
$Kode
5U24 3U0 3S0 5U0 5M0 23U0 23S0 KU0 KU24 3U24 23U24 5M24 3S24 23S24
"a" "a" "a" "a" "a" "a" "a" "a" "a" "b" "bc" "cd" "de" "e"
```

- b. Variansen i log x kde/g mellom prøvene.

```
> AnovM <- aov(logkde~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Kode	13	356.4	27.417	2338	<2e-16	***
Residuals	28	0.3	0.012			

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

```
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
```

```
$Kode
3U24 3S24 5U24 23S24 23U24 5M24 23S0 5M0 23U0 5U0 3S0 3U0 KU0 KU24
"a" "ab" "ab" "abc" "bc" "c" "d" "d" "d" "d" "d" "d" "e" "e"
```

- c. Variansen i G' mellom prøvene.


```

> AnovM <- aov(G-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 58824457 4524958  0.512 0.898
Residuals 28 247226111 8829504
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
$Kode$Letters
  KU0  KU24  5M0  5U0 23U24 23S24  5M24  5U24  3S24 23U0  3U0 23S0 3U24  3S0
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"

```

d. Variansen i Tau ved LVER mellom prøvene.

```

> AnovM <- aov(Tau-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13  53.65  4.127  0.482 0.917
Residuals 28 239.76  8.563
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
$Kode$Letters
  KU0  5U0  5M0  KU24 23U24  5U24 23S24 23U0  5M24 23S0  3U0 3U24 3S24  3S0
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"

```

e. Variansen i Gamma ved LVER mellom prøvene.

```

> AnovM <- aov(Gamma-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 0.002354 1.811e-04  2.685 0.0139 *
Residuals 28 0.001889 6.746e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
$Kode$Letters
23S0  5U0 23U0  5U24  3U0 23U24  3U24  KU0  5M0  3S0 23S24  KU24  5M24 3S24
"a"  "a"  "a"  "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "b"

```

f. Variansen i slutt viskositeten målt av «shear rate test» mellom prøvene.

```

> AnovM <- aov(SRT-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 1615773 124290  0.693 0.754
Residuals 28 5020528 179305
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
$Kode$Letters
3S24  KU0  5U0 23S24  KU24 23U24  5M24  3U0  3S0 23U0  5U24 3U24  5M0 23S0
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"

```

g. Variansen i starts viskositeten målt av rotasjonstest mellom prøvene.

```

> AnovM <- aov(RT-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13  67175  5167  1.195 0.333
Residuals 28 121096  4325
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
$Kode$Letters
3S24  KU0  5U0  KU24 23S24 23U24  5M24 23U0  3U24  5U24  3S0  3U0  5M0 23S0
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"

```

- h. Variansen i G' målt ved temperatur avhengig oscillasjons test etter oppvarming målt ved 70°C mellom prøvene.

```
> AnovM <- aov(T70C~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode      13 5.255e+09 404228899  3.734 0.00169 **
Residuals 28 3.031e+09 108242940
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
3s24  KU24  3U24  3U0  23U0  5U0  KU0  5U24 23U24  5M0  5M24  23s0 23s24  3s0
"a"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"
```

- i. Variansen i G' målt ved temperatur avhengig oscillasjons test etter oppvarming målt ved 20°C mellom prøvene

```
> AnovM <- aov(T20C2~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode      13 1.496e+10 1.151e+09  3.231 0.00451 **
Residuals 28 9.974e+09 3.562e+08
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
3s24  KU24  23U0  KU0  5U24  5U0  3U24  3U0  23s0  5M0 23U24  5M24  3s0 23s24
"a"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"
```

- j. Variansen i maltoseinnhold mellom prøvene målt av HPLC

```
> AnovM <- aov(Malt~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode      13 6.274e+09 482596680  183 <2e-16 ***
Residuals 28 7.383e+07  2636665
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
5M0  5M24  3s0  23s0 23s24  3U0  KU0  5U0  5U24 23U0  KU24  3s24  3U24 23U24
"a"  "ab"  "b"  "b"  "c"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"
```

- k. Variansen i fruktoseinnholdet mellom prøvene målt av HPLC

```
> AnovM <- aov(Frukt~Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode      13 1.709e+09 131428175  53.87 2.71e-16 ***
Residuals 28 6.831e+07  2439636
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
3s24 23s24 23s0  3s0  5M0  5M24  3U0  KU0 23U0  5U0  KU24  5U24 23U24  3U24
"a"  "b"  "b"  "b"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"
```

- l. Variansen i glukoseinnholdet mellom prøvene målt av HPLC

```

> AnovM <- aov(Gluk-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 357634991 27510384  14.48 3.95e-09 ***
Residuals 28  53192435  1899730
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
23S0  3S0 23S24  5M0  5M24  3U0  5U0  KU0  23U0  KU24  3S24  5U24  3U24  23U24
"a"  "ab" "bc"  "cd"  "cd"  "cd"  "cd"  "cd"  "cd"  "d"  "d"  "d"  "d"  "d"

```

m. Variansen i sitronsyreinnhold mellom prøvene målt av HPLC

```

> AnovM <- aov(Citrat-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 17119331 1316872  28.69 9.75e-13 ***
Residuals 28 1285203  45900
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
3U0  KU0  5U0  23U0  3S0  KU24  23S0  5M0  5U24  5M24  23S24  23U24  3S24  3U24
"a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "a"  "b"  "b"  "b"  "b"

```

n. Variansen i melkesyreinnholdet mellom prøvene målt av HPLC

```

> AnovM <- aov(Melksyre-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 75770111 5828470  79.07 <2e-16 ***
Residuals 28 2064072  73717
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
23S24  3S24  23U24  3U24  5M24  5U24  KU24  23S0  23U0  3S0  3U0  5M0  5U0  KU0
"a"  "a"  "a"  "b"  "b"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"  "c"

```

o. Variansen i eddiksyreinnholdet mellom prøvene målt av HPLC

```

> AnovM <- aov(Eddik-Kode, data = Metaresultat)
> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Kode   13 6951677  534744  58.78 <2e-16 ***
Residuals 28  254745  9098
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Kode
3S24  3U24  23S24  23U24  5U24  KU24  5M24  5M0  23S0  3S0  5U0  KU0  3U0  23U0
"a"  "a"  "a"  "a"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"  "b"

```

5. Enveis anova og CLD for burgerforsøket. Hvor vektøst og teksturen ble analysert ved en «texture profile analysis»

a. Variansen i vektøst mellom prøvene etter oppvarming

```

> summary(AnovM)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Name   4  0.05435  0.01359  68 0.000151 ***
Residuals 5  0.00100  0.00020
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukM <- TukeyHSD(AnovM)
> cld <- multcompLetters4(AnovM, TukM)
> print(cld)
$Name
Naturli Hamburger  BurgerB  BurgerC  BurgerA
"a"  "b"  "c"  "c"

```

b. Variansen i hardhet mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Hard~Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn      4 61627625 15406906  560.4 <2e-16 ***
Residuals 45 1237185   27493
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
Hamburger  Naturli  BurgerC  BurgerA  BurgerB
  "a"         "b"         "c"         "c"         "c"
```

c. Variansen i spenst mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Spring~Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn      4  0.6001  0.15001   5.187 0.0016 **
Residuals 45  1.3014  0.02892
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
Hamburger  BurgerC  BurgerA  Naturli  BurgerB
  "a"         "b"         "b"         "b"         "b"
```

d. Variansen i cohesivnessen mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Cho~Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn      4  0.1617  0.04043   9.079 1.83e-05 ***
Residuals 45  0.2004  0.00445
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
  Naturli  BurgerC Hamburger  BurgerA  BurgerB
    "a"     "ab"     "ab"     "bc"     "c"
```

e. Variansen i resilience mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Res~Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn      4  0.5863  0.1466  365.1 <2e-16 ***
Residuals 45  0.0181  0.0004
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
Hamburger  BurgerC  Naturli  BurgerA  BurgerB
  "a"         "b"         "b"         "c"         "c"
```

f. Variansen i klebrighet mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Gum-Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df   Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn       4 19744872 4936218  144.1 <2e-16 ***
Residuals 45  1541470   34255
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
Hamburger  Naturli  BurgerC  BurgerA  BurgerB
  "a"       "b"       "c"       "c"       "c"
```

g. Variansen i tyggemotstand mellom prøvene målt av TPA.

```
> AnovTPA <- aov(Chew-Navn, data = TPAtest)
> summary(AnovTPA)
          Df   Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Navn       4 21682509 5420627  92.12 <2e-16 ***
Residuals 45  2647911   58842
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> TukTPA <- TukeyHSD(AnovTPA)
> cld <- multcompLetters4(AnovTPA, TukTPA)
> print(cld)
$Navn
Hamburger  Naturli  BurgerC  BurgerA  BurgerB
  "a"       "b"       "c"       "c"       "c"
```

6. Næringsinnhold burgere (per 100 g) i burgerne brukt under burgerforsøket

	Hamburger (Gilde)	Naturli (Orkla)	Burger A	Burger B	Burger C
Kcal	224	203	224	224	224
Fett (g)	17	16	13	13	13
Karbohydrat (g)	2	2,6	21	19	17
Kostfiber (g)	0	4,5	2,9	2,9	2,9
Protein (g)	16	12	3,5	3,5	3,5
Salt (g)	1,5	1,2	1,4	1,4	1,4
Vann (g)	63,5	63,5	57,4	57,4	57,4



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway