



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for kjemi, biologi og matvitenskap

Undersøkelse av teknologiske egenskaper av melkesyrebakterier fra belgvekster, korn og pseudokorn og deres potensiale som starterkultur i surdeig

Investigation of technological properties of lactic acid bacteria from legumes, cereals and pseudocereals and their potential as a starter culture in sourdough

Martine Hilstad

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende masteroppgave i matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Norges miljø- biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 30 sp og er gjennomført våren 2023.

Det har vært et utfordrende og lærerikt halvår, og jeg er takknemlig for alle som hjalp til med å få dette i havn. Takk til hovedveileder førsteamanuensis Davide Porcellato og biveileder stipendiat Charlotte Bauer Munch-Andersen for samarbeidet, veiledning, databearbeiding og tilbakemeldinger. En ekstra takk til Charlotte for veiledning på laboratoriet og i bruk av Rstudio. Takk til senioringeniør Kari Olsen for hjelp med HPLC, HSGC og CO₂-analyser og til May Helene Aalberg for all hjelp på laboratoriet.

Takk til alle medstudenter for gode samtaler og avbrekk innimellom skrivingen. Jeg ønsker også takke alle på sidelinjen som har vært støttende og oppmuntrende underveis i arbeidet. En ekstra takk til Tina Haagensen som tok seg tiden til å korrekturlese oppgaven.

Norges miljø og biovitenskapelige universitet

Ås 15. mai 2023

Martine Hilstad

Sammendrag

Surdeigsfermentering av korn, pseudokorn og belgvekster er en veletablert teknologi for forbedring av egenskaper til produkter. Melkesyrebakterier er mye brukt til fermentering og konservering, enten som naturlig forekommende mikrobiota eller starterkultur som resulterer i forbedring av næringsverdi til fermenterte produkter. Ulike melkesyrebakterier i fermenterte produkter gir stammespesifikke egenskaper. Fermentering ved bruk av surdeig er vist å gi gode teknologiske egenskaper, bedre tekstur, økt holdbarhet, mer aroma og bedre biotilgjengelighet. Hensikten med oppgaven var å undersøke egenskapene til tjeto isolerte melkesyrebakterier for å videre vurdere potensiale for bruk som starterkultur.

Innledningsvis i denne oppgaven ble tjeto isolerte melkesyrebakterier fra to tidligere oppgaver undersøkt for sine funksjonelle egenskaper. Fem ulike meltyper ble brukt: bokhvete, quinoa, fababønne, ert og havre. Analysene for funksjonelle egenskaper viste forskjeller mellom isolatene i evnen til å redusere pH og etablere seg i mediet, EPS produksjon, fytase og proteolytisk aktivitet. Ønskede egenskaper ble grunnlaget for utvelgelse av de seks isolatene som ble med videre til forsøk i surdeig.

Metabolismeforsøk viste at celledtall økte etter 24 timers fermentering og en påfølgende pH-reduksjon, samt viste forskjeller mellom konsentrasjoner av organiske syrer og karbohydrater mellom isolatene. Isolatet CM65 viste best evne til etanol- og CO₂-produksjon, mens isolatene VB29 og CM57 var de to med høyest produksjon av melkesyre etter 24 timers fermentering. VB17 og VB18-1 viste lav metabolsk aktivitet ved å ha lavt innhold av organiske syrer, CO₂ og en del flyktige komponenter, mest sannsynlig på grunn av lavere tilgang på karbohydratene maltose og fruktose. Utregnede verdier av fytinsyre viste forskjell i reduksjon av fytinsyre mellom isolatene, men det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom T0 og T24.

Isolatene viste ulike egenskaper og påvirket surdeigsfermentering i ulik grad. Resultatene viste at fem av isolatene på hver sin måte har potensiale til videre bruk i en starterkultur og surdeigsfermentering, mens den sjetten (VB10) ikke viste like tilstrekkelige egenskaper. Videre tester i laboratoriet og en pilotstudie må gjennomføres før resultater kan overføres til bruk av isolatene i industriell skala.

Abstract

Sourdough fermentation of cereals, pseudo-cereals and legumes is a well-established technology for improving the properties of products. Lactic acid bacteria are widely used for fermentation and preservation either through activity of the natural microbiota or addition of starter culture that result in improvements of the nutritional value of fermented products. Different lactic acid bacteria in fermented products provide strain-specific properties. Fermentation using sourdough has been shown to provide good technological properties, better texture, increased durability, higher aroma and better bioavailability. The purpose of this thesis was to examine the properties of twenty-two isolated lactic acid bacteria and further see if they potentially could be used as a starter culture.

In this thesis, twenty-two isolated lactic acid bacteria from previous assignments were examined for their functional properties, to select six isolates to proceed with for testing in sourdough. Five different types of flour were used: buckwheat, quinoa, faba bean, pea, and oat. Analysis for functional properties showed differences between the isolates in their ability to reduce pH and establish themselves in the medium, EPS production, phytase and proteolytic activity. Desired properties became the base for selection of the six isolates that went on to be tested in sourdough.

Metabolism experiments showed that cell growth increased after 24 hours of fermentation and a subsequent pH reduction. Differences between concentrations of organic acids and carbohydrates between the isolates were also found. The isolate CM65 showed the best ability for ethanol and CO₂ production, while the two isolates VB29 and CM57 were the ones with the highest production of lactic acid after 24 hours of fermentation. VB17 and VB18-1 showed low metabolic activity by having a low content of organic acids, CO₂ and some volatile components, most likely due to a lower supply of the carbohydrates maltose and fructose. Calculated values of phytic acid showed a difference in reduction of phytic acid between the isolates, but no significant difference was found between T0 and T24.

The isolates showed different properties, and each had varying effects on sourdough fermentation. The results showed that five of the isolates each have the potential to be used in a starter culture and sourdough fermentation, while the sixth (VB10) had few attractive properties. Further testing in the laboratory and a pilot study needs to be completed before the use of these isolates can be considered to be applied on an industrial scale.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	III
ABSTRACT	IV
1 INNLEDNING	1
1.1 HENSikten MED OPPGAVEN	1
2 TEORI	3
2.1 KORN, PSEUDOKORN OG BELGVEKSTER	3
2.1.1 Havre	4
2.1.2 Bokhvete	4
2.1.3 Quinoa	5
2.1.4 Erter	6
2.1.5 Fababønner	6
2.1.6 Avvendning av belgfruktmel i næringsmidler	7
2.2 FERMENTERING OG SURDEIG	8
2.2.1 Melkesyrebakterier	9
2.2.2 Gjær	11
2.4 METODER FOR IDENTIFISERING AV EGENSKAPER TIL ISOLATENE	13
2.4.1 API 50	13
2.4.2 Fytinsyre analyse	13
3 MATERIALER OG METODE	14
3.1 OPPRINNELSE TIL ISOLATENE	14
3.2 TESTING AV FUNKSJONELLE EGENSKAPER TIL ISOLATER	15
3.2.1 Vekstmedium	15
3.2.2 Syredannelseegenskaper	17
3.2.3 EPS produksjon	17
3.2.4 Proteolytisk aktivitet	18
3.2.5 Fytase aktivitet	18
3.2.6 Karbohydrat omsetning/API50	18
3.3 TESTING I SURDEIG	19
3.3.1 ETABLERING AV SURDEIG	19
3.3.2 VEKST- OG METABOLISME FORSØK I SURDEIG	20
3.3.2.1 HPLC	21
3.3.2.2 HSGC	21
3.3.2.3 Måling av CO ₂ produksjon	22
3.3.2.4 Analyse av fytinsyre	22
3.4 DATABEHANDLING OG STATISTISKE ANALYSER	24
4 RESULTATER	25
4.1 SYREDANNEELSEGENSKAPER TIL ISOLATENE	25
4.1.1 pH	25
4.1.2 Mikrobiell vekst	28
4.2 FUNKSJONELLE EGENSKAPER TIL ISOLATENE	29
4.2.1 EPS produksjon, proteolytisk og fytase aktivitet	29
4.3 VALG AV ISOLATER FOR VIDERE TESTING AV EGENSKAPER	32
4.4 VEKST OG METABOLISMEFORSØK FOR UTVALGTE ISOLATER	33
4.4.1 Celletall, pH og CO ₂ - produksjon	33
4.4.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer	34
4.4.3 Produksjon av flyktige komponenter	37

4.4.4 <i>Principal component analysis (PCA)</i>	39
4.4.5 <i>Innhold av fytinsyre</i>	40
5 DISKUSJON	42
6 OPPSUMMERING OG VIDERE FORSKING	49
REFERANSER	51
VEDLEGG	57

1 Innledning

Den kontinuerlige veksten av verdensbefolkningen skaper et økende press for å møte nærings- og proteinbehovet. For å sikre global matsikkerhet vil ikke dyreproduksjon være nok til å holde tritt med befolkningsveksten. Planteproteiner som korn, pseudokorn og belgfrukter er i økende etterspørsel som alternative kilder. De fremmes i økende grad av flere motivasjoner som å redusere det økologiske fotavtrykket til animalsk produksjon, øke dyrevelferden og innholdet av verdifulle vitaminer og mineraler som har vist å gi god helseeffekt (Boukid & Castellari, 2022).

Melkesyrebakterier, mikrobiota og karakterisering er svært viktig for både ernæringsmessig og teknologisk forbedring av korn utover hvete. Forskning om biologisk mangfold og utvalg av startkulturer for mel av slike korn har økt de siste årene. Surdeigsfermentering med velkarakterisert melkesyrebakterier kan potensielt være et verktøy for å forbedre smak, prosessevnen og motstanden mot mikrobiell ødeleggelse for en forlenget holdbarhet. Melkesyrebakterier menes at forbedrer næringsverdien til fermenterte kornprodukter ved flere aspekter som ved reduksjon av antinæringsstoffer som fytinsyre, syntetisering av vitaminer, produksjon av antioksidantsstoffer og produksjon av aroma komponenter (Cakir et al., 2020; Wang et al., 2021).

Basert på den ventende veksten av flere vegetariske produkter på markedet, og det anerkjente potensialet til fermentering av melkesyrebakterier, vil det være nødvendig å anvende starterkultur med ønskede egenskaper for å få det optimale utbyttet av plantevekstene.

1.1 Hensikten med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å undersøke teknologiske egenskaper til isolerte melkesyrebakterier, videre se hvordan de påvirker fermentering i surdeig og dermed vurdere om de kan ha potensiale til å brukes i en starterkultur. For bestemmelse av isolater ble det gjort en screening av pH, syredannelse, EPS produksjon, proteolytisk og fytase aktivitet, samt karbohydratomsetning. Deretter ble utvalgte isolater ytterligere undersøkt for deres egenskaper i surdeigsmedie. For å undersøke hvordan isolatene påvirket fermentering ble det gjennomført vekst- og metabolismeforsøk for å se på vekst, pH-senking, produksjon og

omsetning av flyktige komponenter, organiske syrer og karbohydrater og CO₂ i surdeigene.
Det ble også gjennomført analyse for reduksjon av fytinsyre fra frysetørket surdeig.

2 Teori

2.1 Korn, pseudokorn og belgvekster

Korn er en viktig matplante og står for over halvparten av verdens matenergi (Poutanen et al., 2022). Korn er den dominerende maten av flere grunner. De er lett å dyrke av bønder og svært næringsrike. Korn består av den stivelsesholdige endospermen med olje-vitamin og mineral rike aleuronlaget som omgir det, og det ytterste fibrøse lagene av kli. Før maling har det i tillegg lang holdbarhetstid. Et tradisjonelt matkorn er havre. Havre kan være diploid, tetraploid eller heksaploid. Sammenlignet med andre kornsorter krever havredyrking færre behandlinger med insekt-, soppdrepende midler eller gjødsel (Kamal et al., 2022).

Bokhvete og quinoa klassifiseres som pseudokorn. Pseudokorn er spiselige frø som tilhører tofrøbladede arter. De blir beskrevet som fremtidens korn på grunn av deres høye genetiske variasjon, deres utmerkede næringsverdi og at de er glutenfrie. Pseudokorn er rike på stivelse, fiber og proteiner av høy kvalitet med en balansert essensiell aminosyre sammensetning, i tillegg til å være gode kilder til mineralene kalsium, jern og sink (Martínez-Villaluenga et al., 2020).

Belgvekster er tofrøbladede frø av plantene som tilhører familien *Fabaceae*. De er verdifulle avlinger som kan tilpasse seg i mange land, de har gunstig effekt på miljøet siden de forbedrer jordkvaliteten gjennom nitrogenfiksering og de er relativt rimelige. To av de mest kjente belgfruktene er erter og fababønner. De har en svært rik ernæringsprofil, med høyt protein- og kostfiber innhold, vitaminer og mineraler (Saha et al., 2022). Økende bevissthet om belgvekstene sin helse og miljøfordeler har resultert i et skifte mot belgvekster som sunnere alternativer til animalske produkter. De siste årene har interessen for plantebaserte kosthold økt, hvor bærekraft og miljøeffekter er hovedårsakene for den økende interessen. Med økende bevissthet om klimaendringer og vekst av verdensbefolkningen, er matprodukter viktig for å bli mer bærekraftig. Et dyrebasert kosthold anses som en økologisk belastning. Derfor er det behov for å utvikle matprodukter fra alternative, mer bærekraftige kilder som planteproteiner (Yang et al., 2023). Sammen kan pseudokorn og belgvekster gi en proteinsammensetning som ligner på kjøtt. Det har blitt funnet at proteinsammensetningen til belgvekster og kornproteiner er komplementære til hverandre. Dette er fordi belgvekster er dårligere i

svovelholdige aminosyrer som tryptofan, cytein og metionin, men rike på lysininnhold, mens sammensetningen i korn er omvendt (Rahate et al., 2021).

2.1.1 Havre

Havre (*Avena sativa*) som tilhører *Poaceae*-familien, er den syvende mest dyrkede kornavlingen i verden, hvor forbruket har økt de siste årene på grunn av dens bevisste helsefremmende egenskaper. Dyrking, klima og vekstforhold er hovedfaktorene som påvirker havreproduksjonen. Havre er et ettårig gress som antas å være av asiatisk opprinnelse. Før det ble brukt som mat, ble det brukt til medisinske formål. Med utviklingen innen ernæring ble havre anerkjent som en sunn matvare på midten av 1980-tallet (Butt et al., 2008).

Havre er en viktig kilde til løselige kostfibre som β -glukan, vitaminer, polyfenoler og flavonoider, som effektivt kan senke kolestrolnivået i blodet og redusere risikoen for hjertesykdom og tarmsykdom. I likhet med andre korn er stivelse den mest dominerende komponenten, >60% av kornvekten og spiller den viktigste rollen i å definere de strukturelle og fysisk-kjemiske egenskapene til havrebasert mat. Havrestivelse i sin opprinnelige form har ulempen med dårlig skjærmotstand og har vist begrensinger i matapplikasjoner (Rostamabadi et al., 2022). Innholdet av β -glukan i havre er rundt 1,8% som er høyere enn i hvete med 1%. Havre β -glukan har blitt rapportert å bidra til å redusere risikoen for kreft, fedme, diabetes og hjerte-og karsykdommer (Guo et al., 2023).

Havre inneholder omtrent 12–20 % proteiner i hele kjernene, der proteinene er sammensatt av 4–15 % prolaminer, 50–80 % globuliner, 1–12 % albuminer og mindre enn 10 % gluteliner (Mel & Malalgoda, 2021). Et høyt globulininnhold gjør at havreproteiner har høyere varmestabilitet enn mange andre planteavlede proteiner. Havreprotein og proteinrike ingredienser har vært av økende interesse de siste årene for matformulering i matvarer som havrebrød, kakedeig og nudler (Yang et al., 2023).

2.1.2 Bokhvete

Bokhvete (*Fagopyrum sp.*) er en 50- 150 cm høy ettårig urt som tilhører *Polygonaceae*-familien. Den var en viktig avling i noen asiatiske og europeiske land før hveteproduksjonen økte. I dag dyrkes store mengde bokhvete i Brasil og Nord-Amerika. Det har vært en fornyet

interesse for å bruke bokhvetekorn i matproduksjon de siste årene. Bokhvete kan vokse på marginale land og under tøffe forhold, den er en viktig matavling for matsikkerhet i ulike regioner. Den økende populariteten til bokhvete skyldes i stor grad attraktiv ernæringskvalitet som den glutenfrie egenskap. Sammensetningen av bokhvetekorn ligner sammensetningen til korn som hvete. Stivelse er hovedkomponenten, på ca. 70%, etterfulgt av protein 12%, kostfibre 10%, lipider 3%. Mindre komponenter med ernæringsmessig betydning er polyfenoler, D-chiro-inositol og vitaminer, og disse hevdes å bidra til ulike helseeffekter som anti-kreft og anti-inflammatoriske egenskaper (Zhu, 2021). Frøene blir i sin hele form malt til mel. Under avskalningen av frøet blir ikke det ytre skallet fjernet, som gjør at bokhvetemel vanligvis har en ganske mørk farge. Det brukes i stor grad i grøt og andre korn- og mel retter som en erstatning til hvetemel. Bokhvete mel har blitt brukt mye til produksjon av bokhvete nudler, pasta, yoghurt og bakevarer. Proteinfraksjonen i bokhvete og hvete er forskjellig, og bokhvete har derfor ikke like teknologiske egenskaper som hvete. Ved framstilling av produkter har det derfor ofte blitt brukt en kombinasjon av bokhvete og vanlig hvetemel (Gao et al., 2022).

2.1.3 Quinoa

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) er en ettårig glutenfri plante som tilhører *Chenopodiaceae*-familien som stammer fra Andes-regionen i Sør-Amerika. Den har et bredt genetisk mangfold som gjør at den kan tilpasse seg ulike tøffe miljøer som høyland og frost. De spiselige frøene til quinoa er små, runde og flate og blir konsumert etter eliminering av frøskallene som er rikt på saponiner. Frøet blir enten konsumert hele eller bearbeidet til mel som kan brukes til brød og bakverk. Sammensetningen av quinoa inkluderer stivelse (52-69%), kostfiber (7-9%), betydelige mengder mineraler, vitaminer, lipider (4,0-7,6%), proteiner og essensielle aminosyrer (Adetunji et al., 2021). Quinoa-planten er et fokus for oppmerksomhet på grunn av dens lave glykemiske indeks og høye proteinverdi på 12-16,6%, med en balansert aminosyreprofil med høyt innhold av lysin, som mangler i de fleste korn, og metionin (Nowak et al., 2016). I tillegg har quinoa høyere verdier av metionin og cystein enn det man finner i belgfrukter, og kan derfor være et verdifullt supplement til belgfrukter. Hovedmengden av proteinene er plassert i embryoet, men også resten av bestanddelene av quinoa-kornet inneholder noe proteiner. De viktigste proteinfraksjonene av quinoa er 11S-type globuliner og 2S-albuminer som står for henholdsvis 27,9–60,2 % og 13,2–42,3 % av totale frøproteiner, etterfulgt av gluteliner (18,1–31,6%). Prolaminer representerer en mindre proteinfraksjon

(0,5–19,3 % av totalt frøprotein) (Martínez-Villaluenga et al., 2020). Grunnet sitt høye stivelsesinnhold har quinoa fysisk-kjemiske egenskaper som gjør den ideell for bruk som fortykningsmidler i supper, sauser og mel. Den har stabilitet ved lav temperatur, lave geleringspunkter og motstand mot retrogradering (Adetunji et al., 2021).

2.1.4 Erter

Erter (*Pisum sativum*) er en plante i erteblomstfamilien (*Fabaceae*), som er tilpasset de klimatiske forholdene i Sentral-Europa. For tiden brukes mesteparten av erteprotein til fôr, men med en økende bevissthet om sunn og bærekraftig ernæring er det en økende trend å bruke erteprotein i matprodukter (Tanger et al., 2020). Erter er rik på protein, karbohydrater og mineraler, hvor næringsinnholdet avhenger av miljømessige og genetiske faktorer. De har vanligvis et proteininnhold på 20-35%, består av lite fett 1,5-2% og 60-65% karbohydrater, hvor stivelse står for 40-50%. Erteprotein har en velbalansert aminosyreprofil, sammenlignet med kornproteiner inneholder det høye nivåer av lysin, leucin og fenylalanin, men relativt mindre av de svovelholdige aminosyrene metionin og cystein (Lu et al., 2020). Erteprotein kommer hovedsakelig i tre former: ertermel, erteproteinkonsentrat og erteproteinisolat. Ertermel produseres ved tørrmaling av avskallede erter, mens konsentrat produseres gjennom syreutluting og isolat gjennom våtbehandlingsmetoder (Shanthakumar et al., 2022). Erteprotein er et populært tilsetningsstoff, og har blitt inkorporert i flere plantebaserte alternativer som biff, salatdressing, spagetti og hamburger. Ved tilsetning i kjøttdeig ble resultatet en biff som var mykere, mørere og krevde mindre kraft å komprimere enn en kjøttbasert biff (Lu et al., 2020).

2.1.5 Fababønner

Fababønne, *Vicia faba* L., er en belgfrukt som tilhører *Fabaceae* familien. Det er en eldgammel avling og blir brukt både i menneskers og dyrs ernæring. Fababønne har i lang tid blitt brukt som mat i Midtøsten. Det begynner å bli en økende interesse for fababønne i andre deler av verden, som Europa og Australia, ettersom den er en bærekraftig proteinkilde med fordeler for menneskers helse (Augustin & Cole, 2022). Fababønne blir sett på som en av de viktigste belgfruktene grunnet dens høye ernæringsverdier. Den har et høyt innhold av proteiner, en av de høyeste blant belgvekster, men dette kan variere mellom ulike genotyper (25-40%). Fettinnholdet er lavt (1-3%), og inneholder mest karbohydrater (60-65%) hovedsakelig i form av stivelse. Fababønner har et lavere innhold av stivelse (42-47%) enn

erter og inneholder mye av aminosyrene lysin og arginin. Disse aminosyrene er viktige i et plantebasert kosthold (Boukid & Castellari, 2022). Ulike ingredienser av fababønne, som mel og proteinrike fraksjoner har blitt brukt til å erstatte mel og proteinbaserte ingredienser som tradisjonelt brukes i formuleringer som brød, pasta, kjøtt- og melkeerstatninger (Augustin & Cole, 2022).

2.1.6. Avvending av belgfruktmel i næringsmidler

Etterhvert som forbrukernes bevissthet for sunnere matvalg og plantemat utvikler seg vil næringsrike belgfrukt ingredienser bli et attraktivt alternativ i utviklingen av nye høyproteinprodukter. Nyere studier viser at fermentert belgfruktmel kan inkorporeres i produksjon av matvarer som bakevarer og pasta. Belgfruktmel er kjent for å styrke næringsverdien med sitt innhold av proteiner, essensielle aminosyrer, vitaminer og mineraler, til matvarer i tillegg til å ha funksjonelle egenskaper som god løselighet, geldannelse, skummende og emulgerende aktivitet (Augustin & Cole, 2022; Tas et al., 2022).

De karakteriske «bønne»-smaken assosiert med belgfrukter er hovedårsaken til deres lave popularitet for bruk som ingrediens. Smaken blir beskrevet som grønn, jordaktig, harsk og gjørmete. Denne typen smak antas i stor grad å være avledet fra nedbrytningen av lipider og aminosyrer. Til tross for det relativt lave lipidinnholdet i både bønner og erter er begge underbrukt på grunn av deres bønnesmak og andre ikke-flyktige smaker som bidrar til bitterheten som er igjen etter baking (Chandra-Hioe et al., 2016).

Belgfrukter kan brukes som et helt frø eller males til mel og fraksjonert for å utvide bruksområder som en ingrediens. Ved produksjon av belgfruktmel utføres maleprosesser. Prosessen involverer avskalling for å fjerne frøskallet, spalting for å spalte kimbladene og maling for å redusere partikkelstørrelsen og produsere et mel. Frø kan forhåndbehandles ved bløtlegging for å bedre utbyttet og produktkvaliteten ved at det har vist å gi en reduksjon i antinæringsstoffer som lektiner. Ettermalingsbehandlinger som varmebehandling av mel, kan også brukes og vil påvirke de ernæringsmessige og funksjonelle egenskaper, samt at det også kan redusere utviklingen av bismak (Augustin & Cole, 2022).

2.2 Fermentering og surdeig

Fermentering er en velkjent naturlig prosess hvor karbohydrater brytes ned og organiske syrer dannes. Det er en enkel og rimelig prosesseringsteknikk brukt i århundrer for å forbedre ernæringskvaliteten og fjerne uønskede forbindelser. Surdeig er en blanding av mel og vann, som fermenteres spontant med melkesyrebakterier som stammer fra mikrobiotaen til deigingrediensene eller miljøet. Surdeigs fermentering er en av de eldste matpreserveringsprosessene, og kan dateres tilbake til gamle Egypt, hvor både øl og brød ble produsert ved hjelp av melkesyrebakterier i blanding med gjær. Sammensetningen av melkesyrebakterier og gjær er avgjørende for egenskapene til produktet. Denne deigen kan klassifiseres i fire typer i henhold til produksjonsmetoden som brukes. Tradisjonelt lages surdeig (type I) gjennom flere trinn med fermentering og er en lang prosess på 5-7 dager for å få en stabil mikrobiota. Først spontangjæres en deig sammensatt av mel og vann. Deretter brukes denne fermenterte mordeigen som inokulum for fermentering av en nylig tilberedt deig (Arora et al., 2021). I surdeigstype II tilsettes utvalgte melkesyrebakterier som fermenterer deigen i 15-24 timer, type III er en dehydrering av type II. Mens type IV er en blanding av I og II, vanligvis brukt i laboratorier og noen bakerier. Denne typen surdeig består av å inokulere en startkultur til en moden surdeig (Siepmann et al., 2019).

Behovet for å utvikle gjæringsprosessen fra 1900-tallet og utover førte til at bakeriindustrien erstattet tradisjonell surdeig med bakegjær. Men i dag har forbrukernes økende interesse for naturlig gjæring rettet industriproduksjonen mot bruk av type II surdeig, der utvalgte melkesyrebakterier tilsettes deigen som en starter. Dette gjør det mulig å redusere surdeigens tilberedningstid, øker den mikrobiologiske sikkerhet, og standardisere brødkvaliteten. Fermentering har vist å ha sensoriske, teknologiske, helse og ernæringsmessige fordeler i produktene det brukes i. Blant annet vil det gi bedre mineraltilgjengelighet, redusert innhold av FODMAPS, redusert innhold av den glykemisk indeks, redusert gluteninnhold og bedre holdbarhet på produktet. Fermenterings betydning er hovedsakelig assosiert med melkesyrebakteriens evne til å produsere organiske syrer som melkesyre og eddiksyre, aromakomponenter og CO₂. Samt deres påfølgende evne til å senke pH (Menezes et al., 2021). pH-verdien i endelig deig varierer vanligvis fra 4,7 til 5,4 og regnes som en indeks for en velutviklet surdeigsfermentering (Corsetti, 2013).

2.2.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er viktige mikroorganismer i produksjonen av fermenterte råvarer som spiller en stor rolle i næringsmiddelindustrien. De fører til endringer i ernæringsmessig og funksjonell kvalitet i forhold til de opprinnelige ingrediensene. Siden melkesyrebakterier er svært viktig i flere matapplikasjoner, vil næringsmiddelindustrien alltid søke etter stammer med egenskaper for å forbedre sensorisk kvalitet og produktkvalitet. Utvalgte stammer brukes først og fremst på grunn av deres evne til å produsere melkesyre fra karbohydrater og påfølgende pH-reduksjon, men også for deres evne til å forbedre kvaliteten og funksjonaliteten til produktet. Bruk av melkesyrebakterier er en svært gammel konserveringsmetode og benyttes blant annet i meieri, korn og grønnsakprodukter (Ayivi et al., 2020). Melkesyrebakterier er regnet å være gunstige og er generelt anerkjent som trygge (GRAS-status) (Hernández-González et al., 2021).

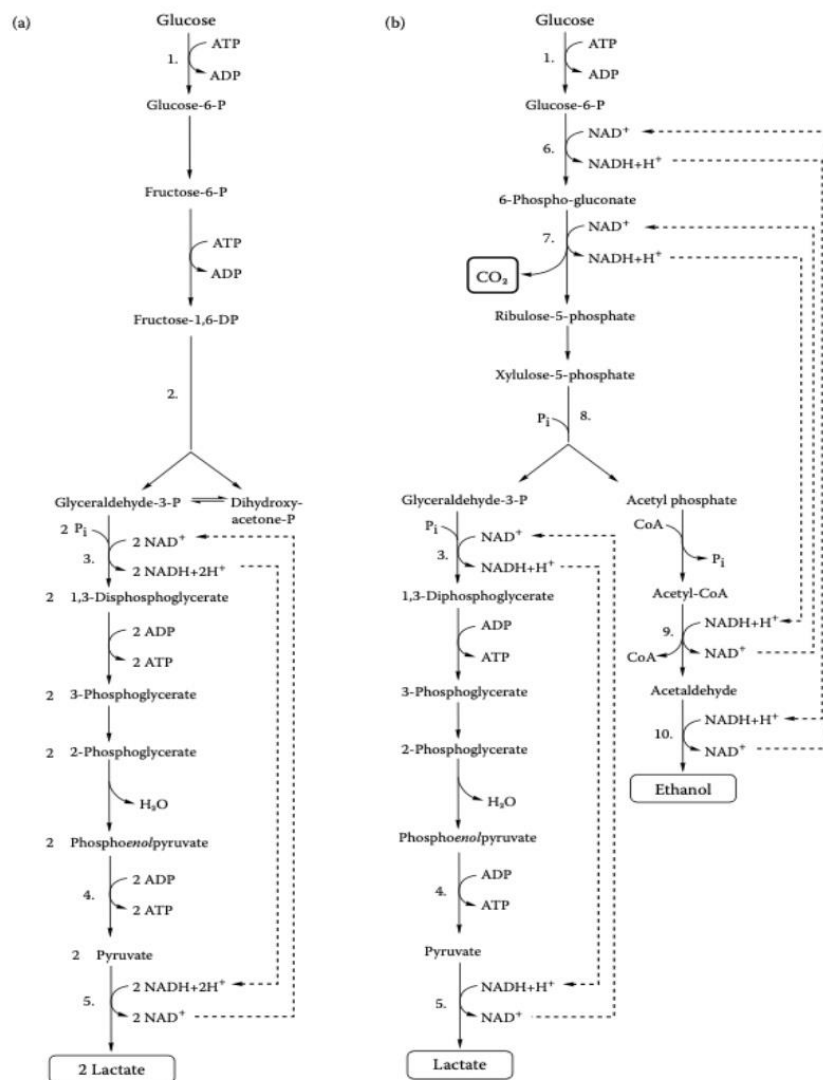
Melkesyrebakteriene tilhører rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og ordenen *Lactobacillales*. Videre deles de inn i familiene *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae* (Doi, 2019).

Før omfattet *Lactobacillaceae*-familien de tre slektene *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* og *Pediococcus*, men det har de siste tiårene vært en utvikling av genetiske sekvenseringsmetoder som har det ført til at antallet arter i *Lactobacillus*-slekten har økt, noe som førte til et behov for å revidere og reklassifisere slekten i 2020 (Zheng et al., 2020). Slekten *Lactobacillus* ble reklassifisert til 25 slekter og det ble foreslått å inkludere *Leuconostocaceae* i *Lactobacillaceae*-familien. Det førte til en reklassifisering av over 300 arter og 2 familier slått sammen til én familie. Tabell 2.1 viser en oversikt over tidligere og nåværende navn på arter som omtales i denne oppgaven.

Tabell 2.1. Oversikt over tidligere og nåværende navn på arter i slekten *Lactobacillus* som omtales i denne oppgaven.

Tidligere navn	Nåværende navn
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>

Melkesyrebakterier er gram-positive, katalase-negative, ikke-sporulerende bakterier. Melkesyrebakterier har behov for å skaffe seg energi for å aktivt vokse og er derfor avhengig av tilstedeværelsen av fermenterbare karbohydrater. Ved melkesyrefermentering klassifiseres de etter deres reaksjonsvei for glukose, som enten kan være homofermentativ eller heterofermentativ. Homofermentative bakterier benytter Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) som reaksjonsvei, hvor melkesyre er hovedproduktet. For heterofermentativ benyttes fosfoketolase-reaksjonsveien, hvor det i tillegg til melkesyre også produseres CO₂, etanol og eddiksyre (Lau et al., 2021; Nicolescu et al., 2023). Figur 2.1 viser de to reaksjonsveiene.



Figur 2.1.

Reaksjonsveier for fermentering av glukose hos melkesyrebakterier. a) homofermentativ reaksjonsvei. b) heterofermentativ reaksjonsvei. Figur er hentet fra Von Wright og Axelsson (2012).

Heterofermentative klassifiseres i to undergrupper, fakultativt heterofermentativ og obligat heterofermentative. Forskjellen mellom den obligat og fakultativt heterofermentative er at foruten å produsere en balansert andel av melkesyre og eddiksyre, kan sistnevnte produsere CO₂ som et av biproduktene uten tilstedeværelse av glukose, men ved å bruke glukonat (Lau et al., 2021). Mens homofermentativ produserer mer melkesyre, som følgelig senker pH og øker den totale titrerbare surheten vil de heterofermentative bidrar til heving på grunn av CO₂-produksjonen, i tillegg til å produsere flere smaksforbindelser (Martín-García et al., 2023).

Noen stammer av forskjellige slekter har også evnen til å syntetisere eksopolysakkarider (EPS). Interessante og attraktive egenskaper for mat vises av EPS produsert av melkesyrebakterier. Egenskaper som tykkelsesforbedring, munnfølelsesmodulering, vannholdende kapasitet og helsemessige fordeler som å redusere blodkolesterol og prebiotiske egenskaper. Typiske melkesyrebakterier tilhører slektene *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* og *Pediococcus*. EPS har også vist å virke som hydrokolloider og gir dermed en positiv effekt på tekstur, smaksoppfatning og holdbarhet (Nicolescu et al., 2023). EPS deles inn i homopolysakkarider (HoPS) og heteropolysakkarider (HePS). HoPS består av én type monosakkarid enten fruktose eller glukose som danner den resulterende EPS enten glukaner eller fruktaner, mens HePS produseres intracellulært fra flere monosakkarider (Guérin et al., 2020). Blant HoPS-er, har dekstran blitt mest undersøkt og vist å gi gode egenskaper ved produksjon av fermenterte matvarer som forbedring av smak, tekstur, den fuktighetsgivende og stabiliserende effekt (Díaz-Montes, 2021).

2.2.2 Gjær

Surdeig er et komplekst biologisk system, hvor gjær vanligvis er assosiert med melkesyrebakterier. 30 forskjellige gjærarter har blitt rapportert i surdeigsmiljøet, men de dominerende gjærartene tilhører slektene *Saccharomyces* og *Candida*. Gjærarter som finnes i surdeig er et resultat av deres tilpasning til det stressende miljøet skapt av melkesyrebakteriene som er preget av lav pH, høy karbohydratkonsentrasjon og høy celletetthet. Gjær bidrar selv til det spesifikke miljøet og hindrer vekst av andre mikroorganismer. Gjærceller metaboliserer fermenterbare sukkerarter, glukose, fruktose, sukrose og maltose under anaerobe forhold og produserer CO₂, fungerer som et hevemiddel og øker deigvolumet. I fermentering er gjær hovedsakelig ansvarlig for produksjon av CO₂, men er også med på å produsere metabolitter som acetaldehyd som videre omdannes til

etanol, høyverdige alkoholer, ester og aldehyder. I forhold til bakterier er gjær vanligvis mer robuste og tåler mer stressende forhold (Martín-García et al., 2023).

2.3 Antinæringsstoffer

En utfordring med belgvekster og korn er deres innhold av antinæringsstoffer (ANS). ANS er knyttet til utfordringer ved redusert fordøyelse og biotilgjengelighet av ulike næringsstoffer i kroppen. På grunn av dette er det et ønske om å redusere forekomsten av ANS i kostholdet. ANS inkluderer blant annet fytinsyre, lektiner, tanniner og saponiner. Disse ANS kan reduseres ved hjelp av metoder som spiring og fermentering (Sozer et al., 2019). Tanniner er sekundære forbindelser som dannes i planteblader, frukt og bark. De inhiberer fordøyelsesenzymer og reduserer opptak av næringsstoffer som proteiner og karbohydrater. Saponiner er planteavlede sekundære forbindelser som har vist hemmende aktiviteter av fordøyelsesenzymer som amylase og glukosidase hvor effektene inkluderer redusert næringsopptak og redusert tarmabsorpsjon av flere næringsstoffer. Lektiner er en form for sukkerbindende proteiner som lett fester seg til røde blodceller forårsaket av agglutinasjon (Samtiya et al., 2020).

Fytinsyre er hovedformen (70%) av fosfor i plantefrø og finnes i de fleste korn/pseudokorn og belgfrukter i konsentrasjoner fra 1-3% (Kumari & Roy, 2023). Fytaseaktivitet avhenger av ulike faktorer, inkludert temperatur, proteolyseresistens og substratspesifisitet. Enzymet fytase defosforylerer fytinsyre til lavere former av myo-inositol fosfor og frigir uorganisk fosfat. Overfloden av fytinsyre i korn er en bekymring i mat og dyrefôrindustrien siden fosfor i denne formen er utilgjengelig for mennesker og en-magede dyr på grunn av mangel på endogene fytase. I tillegg binder fytinsyre andre essensielle næringsstoffer som mineraler, Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, proteiner og aminosyrer og reduserer dermed biotilgjengeligheten av disse (Sharma et al., 2022).

2.4 Metoder for identifisering av egenskaper til isolatene

2.4.1 API 50

API 50 CH-test ble utviklet for å identifisere bakterier, men kan også brukes til å studere substratfermenteringsmønstre av ulike karbohydrater og deres derivater som heterosider, polyalkoholer og uronsyrer. Kitet består av strimler med brønner som inneholder ulike substrater. Ved tilsetning av bakteriesuspensjonen vil den dehydrere karbonkilden som er i kapslene. Under inkubering avsløres eventuell fermentering ved en fargeendring forårsaket av produksjon av syre og detektert av pH-indikatoren som er tilstede i mediet. Når en karbonkilde er metabolisert vil fargen endre seg til gul, bortsett fra kapsel 25 som vil bli svart (Mekonnen et al., 2019).

2.4.2 Fytinsyre analyse

Fytinsyre analysesett er en kvantitativ metode for å måle totalt tilgjengelig fosfor frigjort fra en matprøve. Metoden innebærer syreekstraksjon av inositolfosfater etterfulgt av behandling med en fytase som er spesifikk for fytinsyre og de lavere myoinositolfosfatformene. Når det tilsettes alkalisk fosfatase vil det endelige og siste fosfatet fra myo-inositol monofosfat desforylere. Fargereagens som inneholder ammoniummolybdat tilsettes og det dannes 12-molybdofosforsyre som vil i surt miljø reduseres til molybdenblått. Totalt frigjort fosfat måles ved hjelp av modifisert kolorimetrisk metode og angis som gram per 100 g prøvemateriale. Fargereaksjonen gir en proporsjonal mengde molybdenblåfarge med mengde uorganisk fosfat i prøven. Mengden kan kvantifiseres til fosfor ved å bruke standardkurven laget ved hjelp av standarder med kjent innhold av fosfor (Megazyme, 2019).

3 Materialer og metode

3.1 Opprinnelse til isolatene

Egenskapene til 22 isolater har blitt undersøkt. Isolatene har ulike profiler og ble utvalgt basert på en screening med repPCR gjort før denne masteroppgaven av Charlotte Bauer Munch-Andersen. Arbeidet er per dags dato (14.05.23) ikke publisert. Isolatene som er blitt brukt er isolert fra ulike belgvekster og kornarter ved surdeigsfermenteringsmetode. Det ble til sammen sett på 22 isolater. Fra Leirvik (2022) 4 fra havre, 2 fra bokhvete, 3 fra quinoa og fra Andersen et al. (2020) 6 fra ert og 7 fra bønne. Tabell 3.1 viser oversikt over ID, artsgruppe, hvilken meltype de er isolert fra og fermenteringstemperatur.

Tabell 3.1. Oversikt over id, melkesyrebakterier, meltype og fermenteringstemperatur.

ID	Artsgruppe	Meltype, sort de er isolert fra	Fermenterings-temperatur (°C)
CM3	<i>Lb. Plantarum/pentosus</i>	Bønne, vertigo	30
CM21	<i>Lb. Plantarum/pentosus</i>	Bønne, vertigo	30
CM25	<i>Lb. Plantarum/pentosus</i>	Bønne, vertigo	30
CM57	<i>Lb. Plantarum/pentosus</i>	Bønne, vertigo	22
CM92	<i>Lb. Plantarum/pentosus</i>	Ert, astronaut	22
CM54	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Bønne, vertigo	22
CM87	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ert, Ingrid	22
CM62	<i>Pediococcus pentosaceus/Enterococcus durans</i>	Bønne, sampo	22
CM90	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	Ert, Ingrid	22
CM65	<i>Leuconostoc mesenteroides/citreum</i>	Ert, Ingrid	22
CM40	Ikke identifisert	Ert, astronaut	22
CM58	Ikke identifisert	Bønne, sampo	22
CM96	Ikke identifisert	Ert, Ingrid	22
VB.4	<i>Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides</i>	Havre	22
VB.17	<i>Leuconostoc citreum</i>	Havre	22
VB.18-1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Havre	22
VB.25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Bokhvete	22
VB.10	Ikke identifisert	Bokhvete	22
VB.13	<i>Enterococcus durans</i>	Quinoa	22
VB.51	<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i>	Havre	22
VB.29	<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i>	Quinoa	22
VB.26	Ikke identifisert	Quinoa	22

3.2 Testing av funksjonelle egenskaper til isolater

750 µl overnattkultur i de Man Rogosa and Sharpe (MRS) buljong fra hvert isolat og 250 µl steril 60% glyserol, tilsvarende en konsentrasjon på 15% (v/v) glyserol ble overført i cryorør og oppbevart ved -80°C. Ved lagning av overnattkultur ble isolatene 1% podet fra nedfrosset frysekultur ved -80°C, til 5 ml MRS buljong og satt til inkubering ved 30°C over natten.

3.2.1 Vekstmedium

Det ble benyttet flytende buljongmedier og faste agarmedier til dyrking av bakterier. For å studere vekst og syredannelse av isolatet i det opprinnelige melet ble det benyttet Sterile-Flour-Extract (SFE)-medium. SFE-medie ble laget etter en metode beskrevet av Sáez et al. (2017) med noen modifikasjoner. Blandingen bestod av 200 g mel pr L destillert vann. Ert og bønne ble blandet i 2 timer ved 4°C og sentrifugert ved 800 rpm i 10 min, 4°C. Havre, quinoa og bokhvete ble sentrifugert ved 5000 rpm grunnet gelering av stivelse under autoklaving. 10 ml av mediet ble overført til 15 ml rør og autoklavert ved 121°C i 20 min, og satt til kjøling 4°C frem til bruk. Chalmers buljong og agar til bestemmelse av fytase aktivitet ble laget etter metode beskrevet av Syrokou et al. (2021).

Øvrige vekstmedier ble laget i samsvar med produsentenes anbefalinger og autoklavert ved 121°C i 20 minutter. Alle mediene ble oppbevart mørkt ved 4°C i tiden fra tillaging til de ble benyttet. Tabell 3.2 viser en oversikt over de ulike agarer og buljong som ble benyttet.

Tabell 3.2. Vekstmedier benyttet med inkubasjonstemperaturer og tider.

Agar/Buljong	Produsent	Konsentrasjon (g/l)	Vekst	Inkubasjons- temperatur °C	Inkubasjons tid (dager)
Plate Count Agar (PCA)	Merck KGaA	22, 5	Totalt antall mesofile bakterier	30	2-3
MRS buljong	Merck KGaA	52,2	Melkesyre- bakterier	30	1
SFE medie Bønne	Vestkorn	200	Melkesyre- bakterier	22/30	1
SFE medie Ert	Vestkorn	200	Melkesyre- bakterier	22	1
SFE medie Havre	Møllerens	200	Melkesyre- bakterier	22	1
SFE medie Bokhvete	Det glutenfrie verksted	200	Melkesyre- bakterier	22	1
SFE medie Quinoa	Det glutenfrie verksted	200	Melkesyre- bakterier	22	1
Sukrose agar	Oxoid LTD: Basingstoke, Hampshire, England. Merck; KGaA. VWR international	1% tryptone, 0,5 % gjær ekstrakt, 0,5% K ₂ HPO ₄ , 0,5% Di-NH ₄ -H- citrat, 5% sukrose 1,5% agar	EPS produksjon	30	2-3
PCA+ skummet melk	PCA: Merck, KGaA. Skummet melkepulver: TINE	80/20 ratio, 2% skummet melkeprotein løsning tilsatt i PCA.	Proteolytisk aktivitet	22	1-2

3.2.2 Syredannelsesegenskaper

For å se på syredannelse ble det utført pH-målinger samt bestemt antall kolonidannende enheter. Overnatt kultur i MRS buljong ble inkubert ved 30°C og ble fortynnet med steril MRS buljong slik at absorbans ble OD=1. OD₆₀₀=1 tilsvarer rundt 10⁹ CFU/mL. 100 µl av standardisert kultur ble tilsatt i 2x4 rør med 10 ml SFE medium (2 paralleller) og 1x4 rør med 10 ml MRS buljong for kontroll.

3.2.2.1 pH-måling

For pH-målinger ble det benyttet et PHM92 lab pH-meter (Radiometer, Copenhagen, Denmark). pH-metret ble kalibrert ved bruk av standard bufferløsning ved pH 4,0 og 7,0 (Merck). pH ble målt ved 0, 3, 6 og 24 timer fermentering. Et nytt rør ble åpnet ved neste tidspunkt, i mellomtiden sto rørene i inkubator ved temperaturen de var isolert fra. Rørene ble blandet med vortexmikser før innholdet ble helt over i en pH-målekopp.

3.2.2.2 Celletelling «droplet plate count»

Bestemmelse av CFU/mL ble utført ved bruk av standardisert kultur med droplet plate count metode beskrevet av Naghili et al. (2013). For innstøpning i PCA ble kulturene for T0 og T24 fortynnet for T0 fra 10⁰ til 10³, og for T24 fra 10⁻⁵ til 10⁻⁸. Skålen ble delt i fire og for hver fortynning ble 4 dråper plassert. Dråpene fikk tørke før agarskålene ble inkubert i henhold til informasjon i tabell 3.2. Gjennomsnitt av 2 paralleller av hver fortynning ble beregnet og konsentrasjonen (CFU/mL) ble bestemt ved hjelp av fortynningsfaktoren.

3.2.3 EPS produksjon

Isolatene ble podet i MRS-buljong (1% inokulum) og podete rør ble inkubert ved 30°C over natt. Hvert isolat ble strøket ut på sukroseagar-skåler ved hjelp av en podenål (2 isolater pr skål). Skålene ble inkubert i henhold til informasjon i tabell 3.2. Etter inkubering ble skålene undersøkt for vekst. Indikasjon på EPS produksjon ble ansett som «store bløte kolonier», «slimlag», eller «trådtrekkende». Trådtrekkende ble undersøkt ved å føre en steril podenål til en koloni og prøve å dra denne opp, dersom det dannet en tråd ble isolatet ansett som trådtrekkende.

3.2.4 Proteolytisk aktivitet

For å undersøke proteolytisk aktivitet hos isolatene ble det benyttet diffusjonsanalyse med bruk av skummetmelkagar. Først ble MRS skåler ved bruk av en podenål strøket med overnatt kultur og inkubert ved 30°C i 3 døgn. Fra MRS skålene ble én enkeltkoloni plukket med en steril tannpirker for hvert isolat og prikket på skummetmelkagar-skåler. Det ble laget to paralleller. Skålene ble inkubert i henhold til informasjon i tabell 3.2. Etter inkubering ble eventuelle klaringssoner målt som indikasjon på proteolytisk aktivitet.

3.2.5 Fytase aktivitet

Fytase aktivitet ble målt ved bruk av metode beskrevet av Syrokou et al. (2021) med mindre modifikasjoner. Kort forklart ble fem ml modifisert Chalmers buljong podet med 50 µl overnatt kultur og inkubert ved 30°C i 48 t. Buljongen ble rørt godt rundt i flere ganger under inkubering. 5 µl av hver kultur ble overført til modifisert Chalmers agarskål og inkubert ved 30°C i 72 t. Etter inkubering ble agarskålene tilsatt 2% kobolt klorid, inkubert i 20 min før den ble helt av og repetert. Eventuelle lyse ringer rundt koloniene ble sett etter.

3.2.6 Karbohydrat omsetning/API50

For å evaluere isolatene sin evne til vekst på ulike karbohydrater, og om noen spesifikke egenskaper var tilstede ble API50 CH kit (bioMerieux, Frankrike) benyttet. Bakteriestammer ble dyrket i 24 t i MRS buljong og deretter sentrifugert ved 6000 rpm i 10 min. Den sentrifugerte biomassen ble suspendert i 2 ml ringers løsning før 10 µl ble tilsatt i API 50 CHL-medium. Inkuberingsbrettet ble tilsatt destillert vann for å unngå uttørking og det ble lagt API karbohydrat strimler i inkubasjonssettet. Hver brønn ble tilsatt bakteriesuspensjon. For å forsegle brønnene ble det tilsatt dråper med steril parafin. Kitet ble inkubert ved 30°C i to døgn, og avlest etter 24 og 48 t.

3.3 Testing i surdeig

Ut ifra resultatene fra del 1, ble det tatt en avgjørelse på at isolatene som skulle testes videre var CM65, CM57, VB17, VB18-1, VB10 og VB29.

3.3.1 Etablering av surdeig

For å etablere en steril surdeig ble en Thermomix TM6 (Vorwerk International & Co, Wollerau, Sveits) brukt. Blandingsforhold mellom mel og vann var 10% melblanding med 90% sterilt vann. Blandingsforholdet skyldes forklstringen av stivelsen i melene. Ved bruk av Thermomix ble mel og sterilisert desiltet vann tilsatt. Blandingen ble varmet opp til 100°C i 60 min, for deretter å bli skrudd opp til 121°C i 20 min. Etter deigen var nedkjølt til romtemperatur ble det tilsatt vasket overnatkultur av isolat. Isolat ble først sentrifugert i Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan) ved 3500 rpm i 5 min, så vasket med 5 ml sitratvann, denne prosessen ble repetert 3 ganger. Videre ble OD600=1 justert med ringers løsning. 10 ml av kulturen (poding med 1%) ble tilsatt deigen med omrøring. Deigen ble delt i 3 paralleller og inkubert ved 22°C. Tabell 3.3 viser oversikt over type mel, isolat, innhold av mel og vann og utregnet deigutbytte.

Tabell 3.3 Etablering av surdeig i henhold til oppgitte mengder av isolat/kultur, mel og vann.

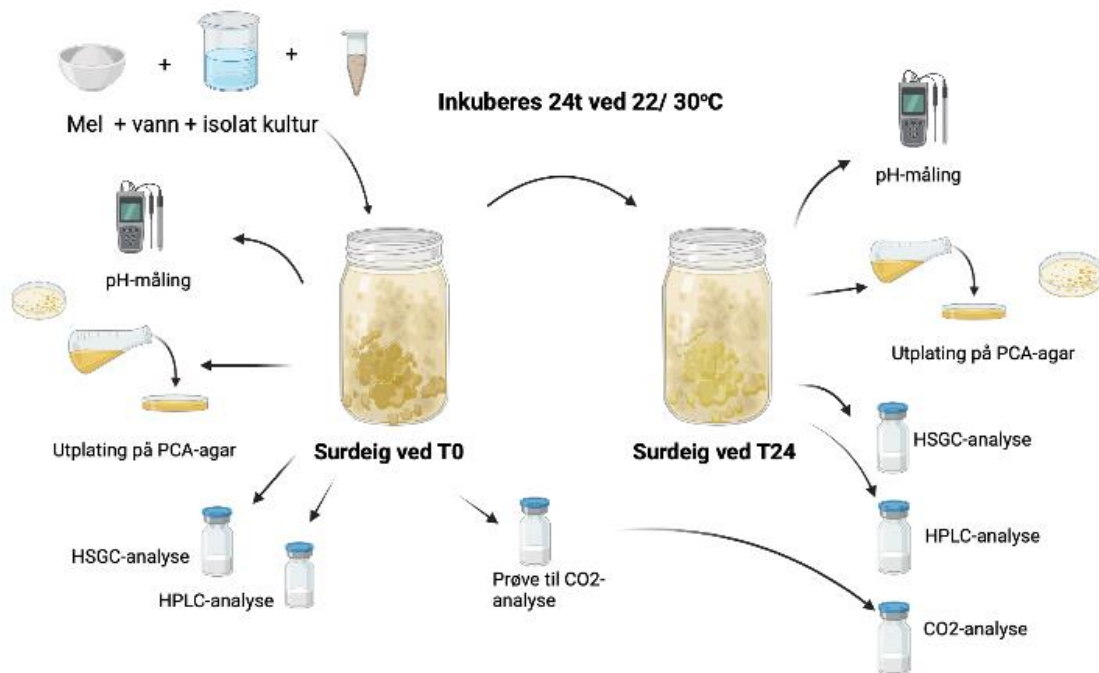
Prøve	Isolat	Isolat/kultur (mL)	Vann (g)	Mel (g)	Deigutbytte (g)*
Havre (Møllerens)	VB.17 VB 18-1	10	900	100	1000
Bokhvete (Det glutenfrie verksted)	VB.10	10	900	100	1000
Quinoa (Det glutenfrie verksted)	VB.29	10	900	100	1000
Ert (Vestkorn)	CM.65	10	900	100	1000
Bønne (Vestkorn)	CM.57	10	900	100	1000

*Deigutbyttet beregnes ut fra formelen: $(\text{vann g/mel g}) * 100 / \text{mel g}$ (Corsetti, 2013).

Ved etablering av surdeigene og etter 24 timer ble det tatt ut 25 g x 2 til nedfrysning og 30 g prøve til frysetørking fra deigen. Disse ble først fryst ned ved -20°C før de ble tatt med til -80°C og deretter frysetørket.

3.3.2 Vekst- og metabolisme forsøk i surdeig

Det ble gjennomført CO₂-analyse for å se på produksjon av CO₂, «high performance liquid chromatography» (HPLC) for å se på sammensetning av karbohydrater og organiske syrer, og «head space gas chromatography» (HSGC) for å bestemme flyktige aromakomponenter. Ytterligere ble fytinsyreinnholdet bestemt. Analysene ble utført på nylig lagd surdeig podet med de ulike isolatene T0 og etter inkubasjon ved 22°C T24. Ved uttak til de ulike analysene ble det tatt ut prøve til utplating og utført pH-målinger. Celletall ble estimert ved innstøpning på PCA agar. For å måle CO₂ ble det tatt ut prøve ved T0 som ble inkubert i headspace-prøveglass i 24 t før CO₂ gass ble målt. Figur 3.1 illustrerer forsøksoppsettet for hver surdeig.



Figur 3.1.

Forsøksoppsett for hver surdeig. Surdeigen ble etablert med steril deig og tilsatt vasket og standardisert (OD₆₀₀=1) isolat. Ved T0 ble deigen delt i 3 for å tilsvare 3 paralleller. Det ble tatt ut prøver til utplating på PCA-agar, pH-måling, CO₂-analyse (som ble målt etter 24 t), HPLC analyse, HSGC analyse samt prøve til frysetørking for bestemmelse av fytinsyre. Surdeigen ble inkubert ved 22°C i 24 timer. Ved T24 ble det tatt ut prøver til utplating på PCA-agar, pH-måling, HPLC analyse, HSGC analyse samt prøve til frysetørking for fytinsyre analyse. *Illustrasjonen er laget i BioRender.com.*

3.3.2.1 HPLC

Det ble gjennomført HPLC for bestemmelse av innhold av organiske syrer og karbohydrater i surdeigene før og etter fermentering, T0 og T24. Metoden ble gjennomført etter beskrivelse av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner. Prøvene ble godt blandet før 1,00 g av hver prøve ble veid inn i hvert sitt 10 ml rør. Prøvene ble så tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) og 8 ml acetonitril (Merck). Etter tilsetning av acetonitril ble prøvene ristet for hånd, deretter satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min. Videre ble prøvene sentrifugert i romtemperatur, 15 min ved 3400 rpm i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan). Supernatanten ble videre filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør.

Analysen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), med pumpe, autosampler, kolonneovn, DAD-UV detektor, og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). 25 µl av prøven ble injisert og kjørt gjennom en forkolonnen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA), separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32°C. Mobile fase var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0,4 mL/min. Standardløsninger ble preparert og analysert på samme måte som prøvene. Komponentene i prøvene ble identifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Standarder benyttet av karbohydrater var maltose, fruktose, laktose og glukose (Merck). Av organiske syrer ble sitronsyre, melkesyre, eddiksyre, urinsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. RI-detektor ble benyttet for å detektere karbohydratene og eddiksyre, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

3.3.2.2 HSGC

I T0 og T24 surdeigene ble det gjennomført måling av flyktige forbindelser ved bruk av HSGC, modifisert etter en metode tidligere beskrevet av Grønnevik et al. (2011). Prøvene ble godt blandet før 10,00 g prøve ble overført til headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Headspaceflaskene ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PFTA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Flaskene ble plassert i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent

Technologies) og en flamme ioniseringsdetektor. Helium (Aga, Norge) ble benyttet som bæregass med en total flow på 11,1 ml/min. Vilråene for headspaceflaskene var 50°C med en forvarmingstid på 45 min, med miksing satt til 70 shakes/min. Headspaceflaskene var trykksatt til 10 PSIG i 1,50 min før injeksjon og injeksjonstiden var på 0,5 min. For separering av komponentene ble det benyttet en CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland). Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, med indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 0,5 µm. Følgende temperaturprogram ble brukt under analysen 53°C, 1 min; økning med 15°C min⁻¹ til 70°C, 2 min; økning med 22°C min⁻¹ til 130°C, 3 min.

Flyktige komponentene ble separert basert på komponentens ulike flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase. Identifisering og kvantifisering av de ulike forbindelsene ble gjennomført ved kalibrering med standardløsninger med kjent konsentrasjon av følgende komponenter: acetaldehyd, diacetyl, 2-butanon, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, iso-butyl-acetat, 2-butanol og 2.3-pentadion (Merck, Tyskland).

3.3.2.3 Måling av CO₂ produksjon

Det ble utført en kvantitativ analyse av CO₂-produksjon i prøvene ved hjelp av en CO₂ analysator (ADC 225 Mk3, Analytical Development, Hoddson, England) etter en metode beskrevet av Narvhus et al. (1993) med noen endringer. Ved T0 ble 10,0 g av deigen fra hver av de 3 parallellene veid opp i hvert sitt sterile headspace-prøveglass, forseglet med sterile septa med aluminiumring (20-CBT3 septa, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble inkubert i 24 t ved 22°C før CO₂ ble målt. Etter 24 timer ble glassene ristet i 2 min. Med en engangssprøyte ble 0,5 ml av gassfasen injisert inn i gummislangen til CO₂ analysatoren. Standardkurven i Vedlegg 6 ble benyttet for omregning til ppm.

3.3.2.4 Analyse av fytinsyre

Fytinsyreinnhold i frysetørket deig ble bestemt ved bruk av Phytic acid (Total Phosphorus) Assay Kit fra Megazyme (Megazyme, Irland). Phytic acid (Total Phosphorus) Assay Kit er en metode som måler totalt innhold av tilgjengelig fosfor i næringsmidler. Ut ifra det totale innholdet av fosfor kan en regne tilbake til innholdet av fytinsyre. For fullstendig beskrivelse av metoden henvises det til protokollen Megazyme (2019).

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

Standardløsningen var stabil i 1 uke ved lagring ved 4°C. Nytt uttak av 1 ml standardløsning ble gjort ved nytt prøvetak. Fargereagenset består av 10% askorbinsyre (VWR Chemicals, USA) løst i destillert vann og 95% svovelsyre, og 5% ammoniummolybdat løst i destillert vann. Fargereagenset ble tillaget ved å blande 1 del ammoniummolybdatløsning i 5 deler askorbinsyreløsning og ble blandet sammen på samme dag som det skulle anvendes.

Dagen før ble det veid opp 1,00 g av frysetørket prøvematerialet og tilsatt 20 ml 0.66 M saltsyre og tilført en magnet. Glassbegeret ble dekket til med aluminiumsfolie og plassert på en magnetrører (RET basic, IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Germany) for røring over natten i romtemperatur. Deretter ble 1 ml av prøvematerialet overført til 1,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-150, Axygen, Mexico) og sentrifugert (Micromax, IEC, USA) ved 13 000 rpm i 10 minutter. 0,5 ml av supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og tilsatt 0,5 ml 0,75 M natriumhydroksidløsning for nøytralisering. Det nøytraliserte prøvematerialet ble brukt videre til enzymatisk defosforylisering reaksjon. Det ble laget to replikater for fritt og to for totalt fosfor. Fra enzymatisk defosforyleringsreaksjonen ble 1 ml av supernatant benyttet videre til den kolorimetrisk bestemmelsen av fritt og totalt fosfor i hver prøve. Prøven ble tilsatt 0,5 ml fargereagens med ammoniummolybdat før de ble blandet med vortexmikser (Vortex-Genie 2, Scientific, Inc, USA) og inkubert i vannbad ved 40°C i en time. Etter inkubering ble prøver igjen blandet med vortexmikser. Standardløsning med fosfor fikk tilsvarende behandling. 1 ml ble overført til 1,5 ml plastkyvetter (Semi-micro cuvette, PS, 1,5 ml, Brand GMBH+ Co KG, Germany). De ble så målt i spektrofotometer (Spectramax M2, Molecular Devices, USA) ved 655 nm innen tre timer. Det ble laget en standardkurve ut fra absorbansmålingene fra standardløsningene som viste sammenheng mellom absorbans og konsentrasjon av fosfor. Konsentrasjonen av fosfor i prøvene ble beregnet med formelen nedenfor.

$$c(\text{fosfor}) = \frac{M_{\text{gjennomsnitt}} * 20 * F}{10\,000 * 1.0 * v} * \Delta A_{\text{fosfor}} \left[\frac{g}{100g} \right]$$

For å beregne fytinsyreinnholdet ut fra innholdet av fosfor ble det antatt at fosfor utgjør 28,2% av fytinsyre, og at all fosfor som ble frigitt i prøvene kommer fra fytinsyre. Utregning av mengde fytinsyre vises med ligningen nedenfor.

$$c(\text{fytinsyre}) = \frac{\text{Fosfor} \left(\frac{g}{100g}\right)}{0.282} [g/100g]$$

3.4 Databehandling og statistiske analyser

Microsoft Office Excel ble benyttet til databehandling av rådata og fremstilling av figurer. RStudio ble brukt til utførelse av statistiske analyser og for analysene ble det benyttet et signifikansnivå på $p < 0,05$. Enveis og toveis variansanalyser (ANOVA) ble benyttet for å finne signifikante forskjeller i fytinsyre, karbohydrater og organiske syrer. Det ble utført en «principal component analysis» (PCA) av analyse resultatene fra pH-målinger, cellevekst, HSGC, HPLC og CO₂-produksjon. Dette ble gjort for å se på korrelasjon og sammenhenger mellom komponentene. Cluster dendrogram ble laget i RStudio for å lage grupperinger av isolatene før videre forsøk.

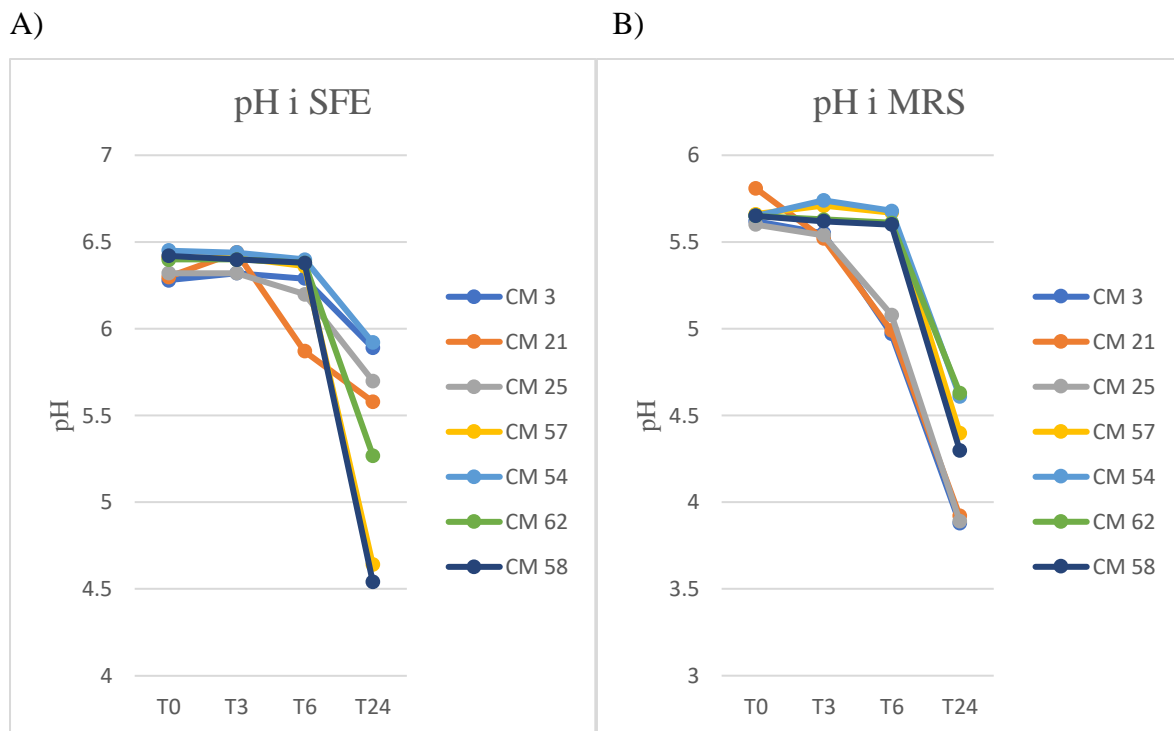
4 Resultater

4.1 Syredannelsesegenskaper til isolatene

4.1.1 pH

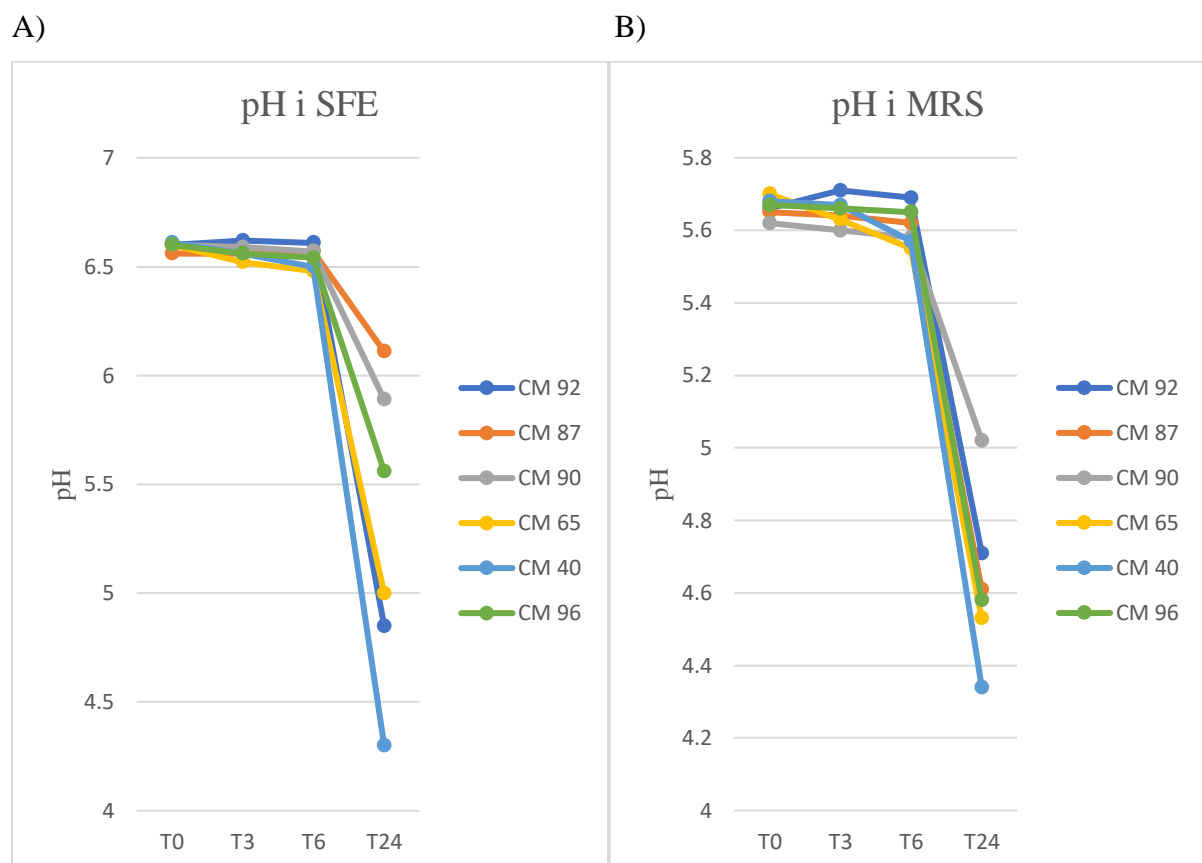
Tjueto isolater ble podet i SFE-medium og MRS. Endring i pH fra T0 til T24 med de 22 isolatene ble undersøkt. Figur 4.1 A viser pH før og etter fermentering for de syv isolatene isolert fra faba bønne i SFE media. Ved T0 lå pH på 6,46-6,28. pH holdt seg stabil de første timene, men sank raskt etter 6 timer inntil 24 timer. For isolat CM21 var det en rask nedgang etter 3 timer. Etter fermentering var størst pH-reduksjon å se i isolat CM58 (1,88) og CM57 (1,77). Minst reduksjon var å finne i isolatene CM3 (0,39) og CM54 (0,54). pH reduksjon fra størst til lavest var som følger CM58 > CM57 > CM62 > CM21 > CM25 > CM54 > CM3.

Figur 4.1B viser pH nedgangen i MRS media. I MRS media lå pH ved T0 på 5,81-5,6. pH reduksjon fra størst til lavest var som følger CM21 > CM3 > CM25 > CM58 > CM57 > CM54 > CM62.



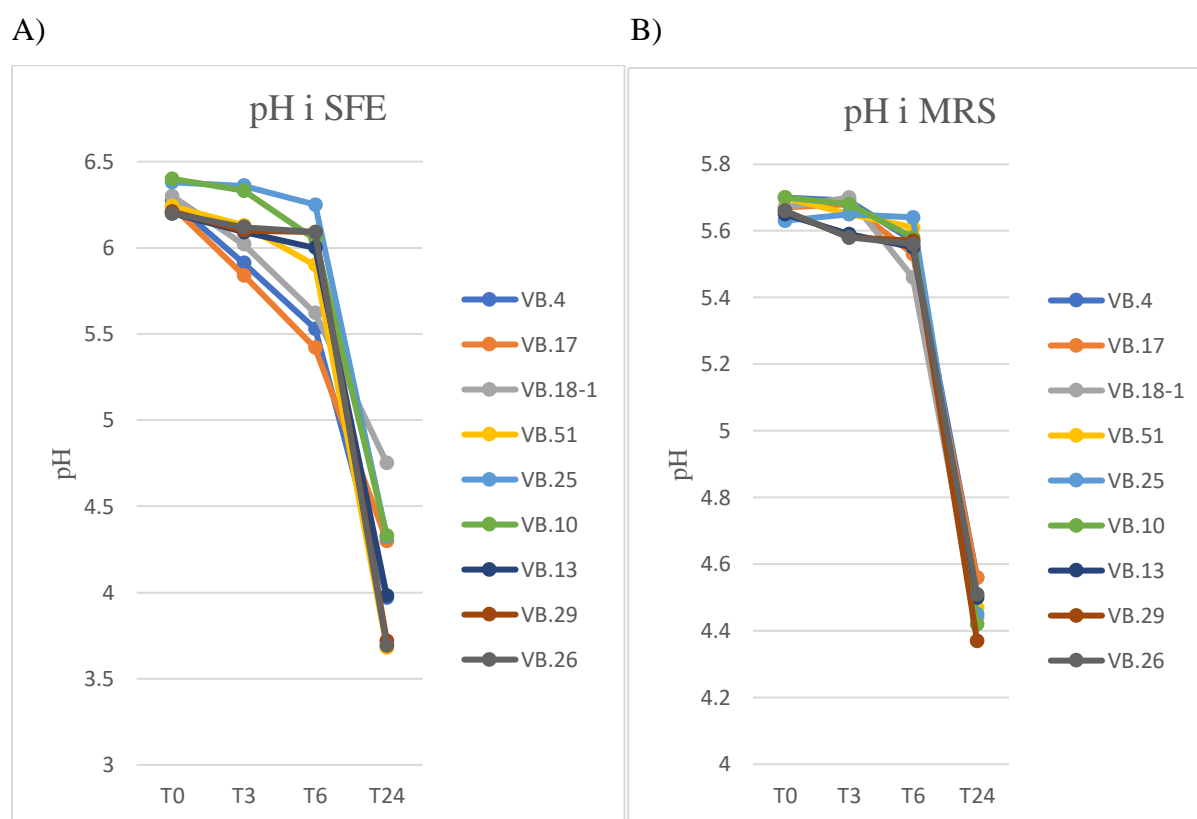
Figur 4.1 pH i isolater isolert fra bønne i SFE (A) og MRS-medium gjennom 24 t (B).

Figur 4.2 A viser pH ved T0 og T24 for isolater isolert fra ert-mel i SFE medie. Ved T0 lå pH på 6,61-6,56. I alle 6 isolatene holdt pH seg stabil fra T0 til T6, mens etter T6 var det en høyere reduksjon. Etter fermentering var størst pH reduksjon å observere i isolat CM40 (2,31) og CM92 (1,75). Minst reduksjon var å finne i isolat CM87 (0,45) og CM90 (0,71). pH reduksjon fra størst til lavest var som følger CM40 > CM92 > CM65 > CM96 > CM90 > CM87. Figur 4.2 B viser pH nedgangen i MRS medie. I MRS medie lå pH ved T0 på 5,7-5,62. pH reduksjon fra størst til lavest var som følger CM40 > CM65 > CM96 > CM87 > CM92 > CM90.



Figur 4.2 pH i isolater isolert fra ert i SFE (A) og MRS-medium gjennom 24 t (B).

Figur 4.3 viser pH ved T0 og T24 for isolater isolert fra havre-, bokhvete- og quinoamel. I SFE lå pH på 6,38-6,2 ved T0. pH-en til de 9 isolatene holdt seg stabil fra T0 til T6, mens etter T6 var det en høyere reduksjon. Etter fermentering var størst pH reduksjon å observere i isolat havre VB51 (2,57) og quinoa VB26 (2,52). Minst reduksjon var å finne i havre isolatene VB18-1 (1,55) og VB17 (1,93). pH i bokhvete isolatene (VB10 og VB25) var relativ lik hverandre. pH reduksjon fra størst til lavest var som følger VB51(havre) > VB26(quinoa) > VB29(quinoa) > VB4(havre) > VB13(quinoa) > VB10(bokhvete) > VB25(bokhvete) > VB17(havre) > VB18-1(havre). Figur 4.3 B viser pH nedgangen i MRS media. I MRS media lå pH ved T0 på 5,7-5,63. pH reduksjon fra størst til lavest var som følger VB29(quinoa) > VB10(bokhvete) > VB51(havre) > VB18-1(havre) > VB25(bokhvete) > VB26(quinoa) > VB13(quinoa) > VB4(havre) > VB17(havre).



Figur 4.3 pH i isolater isolert fra havre, quinoa og bokhvete gjennom 24 t i SFE (A) og MRS-medium (B).

4.1.2 Mikrobiell vekst

Isolatene ble plattet ut ved tid 0 (T0) og etter 24 timers (T24) fermentering på PCA for å bestemme celletall. Resultat fra mikrobiell vekst er vist i tabell 4.1. Størst celletall økning var å observere hos CM58 med økning på 8,78 log CFU/ml etterfulgt av CM96 (6,2), CM57 (6,1), CM62 (6,06) og CM92 (5,89). Lavest økning var i isolatene CM21 (1,1), CM3 (1,32) CM90 (2,33), VB26 (2,74) og VB51 (2,90).

Tabell 4.1. Celletall (log CFU/mL) i de 22 isolatene ved 0t og 24t i SFE-medium. Celletall er gjennomsnittsverdier av 2 paralleller og er oppgitt med standardavvik.

Isolat	Celletall (log cfu/ml)		Forskjell T0-T24	Fermentering- Temperatur (°C)
	T0	T24		
CM 3	6,58±0,02	7,9±0,1	1,32	30
CM 21	6,68±0,06	7,78±0,06	1,1	30
CM 25	6,57±0,01	11,75±2,57	5,18	30
CM 57	5,54±0,01	11,64±0,01	6,1	22
CM 92	5,68±0,11	11,57±0,01	5,89	22
CM 54	6,49±0,02	11,69±0,01	5,2	22
CM 87	5,72±0,03	10,72±0,04	5	22
CM 62	5,53±0,01	11,59±0,08	6,06	22
CM 90	6,18±0,48	8,51±0,05	2,33	22
CM 65	6,49±0,04	11,61±0,03	5,12	22
CM 40	6,36±0,11	11,65±0,16	5,29	22
CM 58	3,12±1,68	11,9±0,02	8,78	22
CM 96	5,69±0,02	11,89±0,08	6,2	22
VB 25	6,63±0,01	10,54±0,01	3,91	22
VB 26	5,87±0,04	8,61±0,05	2,74	22
VB 29	6,54±0,51	10,65±0,04	4,11	22
VB 13	5,83±0,05	10,83±0,17	5	22
VB 18-1	6,79±0,52	10,62±0,02	3,83	22
VB 17	7,61±0,08	10,67±0,05	3,06	22
VB 4	7,74±0,03	10,65±3,65	2,91	22
VB 10	6,72±0,02	11,51±0,03	4,79	22
VB 51	6,76±0,02	9,65±0,05	2,89	22

4.2 Funksjonelle egenskaper til isolatene

4.2.1 EPS produksjon, proteolytisk og fytase aktivitet

Alle isolater ble testet for EPS produksjon, proteolytisk og fytase aktivitet. Tabell 4.2 viser om isolatene var EPS positive (+) eller negative (-), hvordan koloniene til de EPS+ stammene så ut, samt om det var proteolytisk- og fytase aktivitet. Totalt var det 7 av isolatene som var EPS produserende. Dette var isolat VB18-1, CM65, VB17, CM51, VB4, VB25 og VB13. De 5 førstnevnte hadde dannet store bløte kolonier mens den siste VB13 hadde kun en stor bløt koloni. En av de EPS+ dannet et tynnflytende slimlag på skålen, dette var VB25. Skålene kategorisert som EPS – viste ingen/svært lite vekst, og ingen tegn til trådtrekkende egenskaper.

Tabell 4.2 EPS produksjon (+/-), gjennomsnittlig klaringsoner (diameter, cm) for proteolytisk aktivitet og fytase aktivitet (+/-) hos de 22 isolatene.

ID	Proteolytisk aktivitet	Fytase aktivitet	EPS	EPS Observasjon
CM3	0,25 cm	+	-	
CM21	0,4 cm	-	-	
CM25	0,25 cm	+	-	
CM57	0,25 cm	+	-	
CM92	0,2 cm*	-	-	
CM54	0,55 cm	+	-	
CM87	0,01 cm	-	.	
CM62	0,15 cm	-	.	
VB.18-1	0,15 cm	+	+	Store bløte kolonier
VB.25	0,01 cm*	+	+	Slimlag på skål, tynnflytende
CM65	0,2 cm	+	+	Store bløte kolonier
VB.17	0,25 cm	+	+	Store bløte kolonier
VB.4	-	-	+	Store bløte kolonier
CM90	-	-	-	
VB.51	0,2 cm	+	+	Store bløte kolonier
VB.29	0,15 cm	+	-	
VB.13	0,01 cm	+	+	En stor bløt koloni
CM40	0,2 cm	-	-	
CM58	0,05 cm	+	-	
CM96	0,2 cm*	+	-	
VB.10	0,05 cm	+	-	
VB.26	0,15 cm	-	-	

* Indikerer dannelse av klaringsone på en av parallellene

Ut ifra 2 paralleller ble gjennomsnittet på klaringssoner ved proteolytisk aktivitet regnet ut. Analysene viste variasjon i størrelse på klaringszone blant isolatene, det var kun isolat VB4 og VB10 som ikke viste klaringszone. Størst klaringssoner ble målt på isolatene CM21(0,4 cm) og CM54 (0,55 cm). CM92, VB25 og CM96 viste klaringszone hos kun én av parallellene. Fytase aktivitet ble observert i 14 av isolatene, dette var CM3, CM25, CM57, CM54, VB18-1, VB25, CM65, VB17, VB51, VB29, VB13, CM58, CM96 og VB10.

4.2.2 Artsbestemmelse og karbohydrat omsetning

Ved bruk av API 50 CH-test ble de ukjente isolatene identifisert og isolatene sin evne til å metabolisere 48 karbohydrater testet. Tabell 4.3 viser oversikt over artsgruppen til de ukjente isolatene. Resterende isolater fikk bekreftet at de kom fra tidligere til nevnt artsgruppe.

Tabell 4.3. Artsbestemmelse ved bruk av API50 CH-test av ukjente isolater

ID	Artsgruppe
CM40	<i>Lb. plantarum</i>
CM58	<i>Lb. plantarum</i>
CM96	<i>Lb. pentosus</i>
VB26	<i>Lb. plantarum</i>
VB10	<i>P. pentosaceus</i>

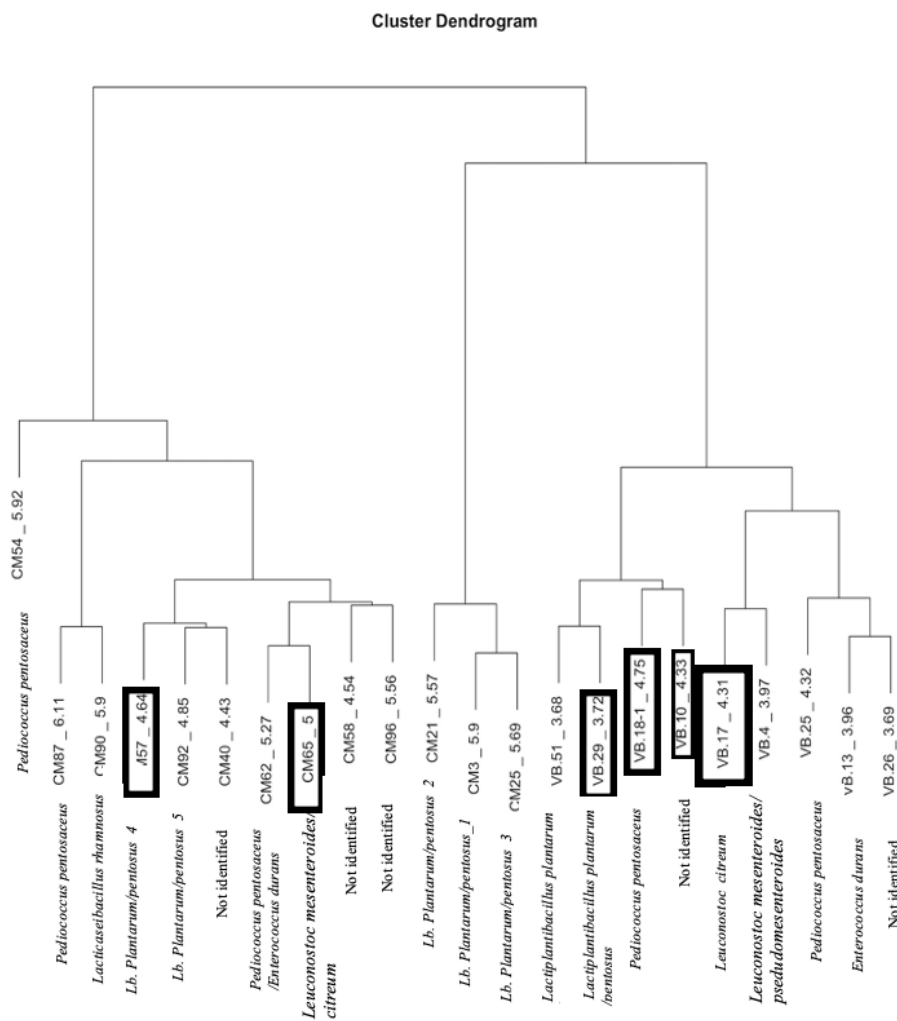
Tabell 4.4 viser karbohydratene som ble metabolisert ved 48t, dette er indikert med gult eller svart som observasjon på metabolisme. Isolatene hadde flere likhetstrekk. De viktigste karbohydratene som ble metabolisert av alle isolatene var D-glukose, D-fruktose og D-maltose. CM54, VB18-1, VB25, VB4, VB51, VB10, CM96 VB13 og VB29 viste evnen til å utnytte D-xylose. D-laktose ble metabolisert av alle utenom CM54, VB18-1, VB4, VB13, VB10 og VB17. Raffinose ble metabolisert av CM92, CM62, CM65, VB4, VB51 og VB29. Sukrose ble metabolisert av alle utenom CM54, VB18-1, CM90 og VB10.

Tabell 4.4. API50 CH-test brukt til å studere bakterievekst fra de 22 isolatene på ulike karbohydrater. Tabellen viser kun karbohydratene som bakteriene hadde vekst på etter 48 timer.

ID	4	5	6	10	11	12	13	15	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	34	35	36	39	40	42	44	47	48		
CM3																																			
CM21																																			
CM25																																			
CM57																																			
CM92																																			
CM54																																			
CM87																																			
CM62																																			
VB.18-1																																			
VB.25																																			
CM65																																			
VB.17																																			
VB.4																																			
CM90																																			
VB.51																																			
VB.29																																			
VB.13																																			
CM40																																			
CM58																																			
CM96																																			
VB.10																																			
VB.26																																			
Karbohydrat	L-arabinose	D-ribose	D-xylose	D-galaktose	D-glukose	D-fruktose	D-mannose	L-rhamnose	Dulcitol	D-mannitol	D-sorbitol	Metyl-alpha-D-mannopyranoside	Metyl-alpha-D-glukopyranoside	acevylglucosamine	N-	Amygdalin	Arbutin	Esculin ferric sitrat	Salicin	D-cellobiose	D-maltose	D-laktose	D-melibiose	D-saccharose	D-trehalose	D-melezirose	D-raffinose	Amidon	Gentobiose	D-turanose	D-tagatose	L-fucose	Potassium gluconate	Potassium 2-ketogluconate	

4.3 Valg av isolater for videre testing av egenskaper

Før videre forsøk av egenskaper ble gjennomført ble seks isolater valgt. Grunnlaget for valg av isolatene var fra resultatene fra del 1. Figur 4.4 viser et cluster dendrogram, som har gruppert isolatene etter de ulike egenskapene. Ut i fra innledende forsøk ble det valgt at isolat for ert CM65, for bønne CM57, for havre VB17 og VB18-1, for bokhvete VB10 og for quinoa VB29 ble tatt med til videre forsøk. Det ble valgt et isolat fra hver meltype, samt to fra havre. To fra havre ble valgt siden de viste ulikheter i karbohydratomsetning. Uten om det falt valget på nevnte isolater siden 3 av dem (CM65, VB17, VB18-1) viste evnen til EPS produksjon, alle viste evnen til proteolytisk og fytase aktivitet, evnen til å senke pH i både MRS og SFE og tilfredsstillende cellevekst. Deres evne til å senke pH til <5 etter 24 timers fermentering ble vektlagt.



Figur 4.4 Cluster dendrogram laget etter resultatene fra 4.1 og 4.2. Dendrogrammet ble brukt til å vise ulikheter og likheter mellom isolatene før valg av isolater til videre forsøk.

4.4 Vekst og metabolismeforsøk for utvalgte isolater

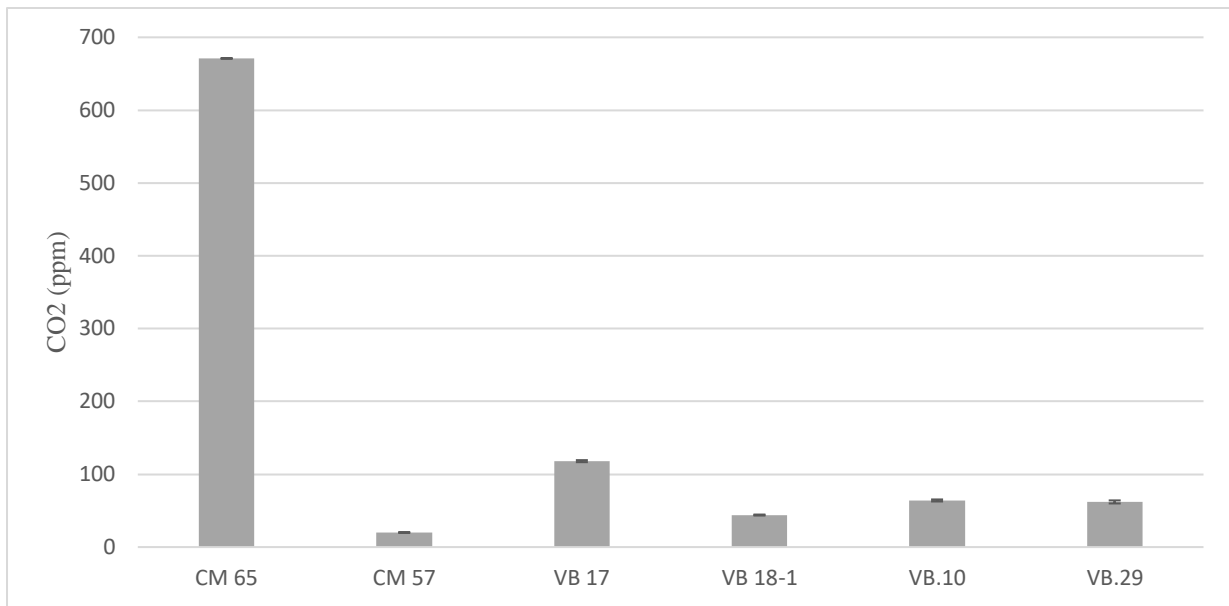
4.4.1 Celletall, pH og CO₂-produksjon

Celletall og pH i surdeigene før og etter 24 timers inkubering er gjengitt i tabell 4.5. Økningen av celletall på PCA-skålene i løpet av 24 timers inkubering var mellom 2,85 log CFU/mL (VB10) og 3,13 log CFU/mL (VB18-1). Isolat VB29 i quinoa hadde en økning på 3,05 log CFU/mL. Mens VB17, CM65 og CM57 hadde noe lignende økning med 2,92 log CFU/mL, 2,91 log CFU/mL og 2,89 log CFU/mL etter fermentering. pH gikk ned i alle surdeigene i løpet av fermenteringstiden. Der den største nedgangen var i quinoa-deigen med isolat VB29 med en nedgang på 1,36 pH-enheter. VB29 var den eneste av surdeigene som hadde en pH på 4 etter 24 timers fermentering. Surdeigene av havre med isolat VB17 og VB18-1 hadde tilnærmet lik nedgang i pH på 0,85 og 0,65 pH-enheter. Surdeigen av ert CM65 og bønne CM57 gikk fra 1,03 og 1,2 pH-enheter. Disse fire kom seg ned til pH 5. Surdeigen av bokhvete med isolat VB10 hadde minst nedgang med 0,36 pH-enheter og holdt seg på pH 6.

Tabell 4.5 Celletall og pH i de ulike surdeigene av ert, bønne, havre, bokhvete og quinoa rett etter poding (T0) og etter 24 timers inkubering (T24). Celletall og pH-verdier oppgitt er gjennomsnittsverdier av 2 paralleller og er oppgitt med standardavvik. PCA-agar ble brukt for tilstedeværelse av melkesyrebakterier.

	Celletall log CFU/mL		pH	
	T0	T24	T0	T24
CM65	6,73±0,05	9,64±0,04	6,31±0,02	5,28±0,01
CM57	6,72±0,18	9,61±0,03	6,38±0,01	5,18±0,03
VB17	6,73±0,03	9,65±0,03	6,37±0,02	5,72±0,01
VB18-1	6,62±0,12	9,75±0,09	6,25±0,01	5,4±0,07
VB10	6,8±0,07	9,65±0,08	6,42±0,15	6,06±0,04
VB29	6,9±0,03	9,95±0,11	6,2±0,03	4,84±0,04

CO₂ ble målt etter 24 timers inkubering i 3 paralleller. Figur 4.5 viser at gjennomsnittlig CO₂-produksjon var høyest i ert-deigen med isolat CM65 med en snittproduksjon på 671 ppm CO₂, etterfulgt av VB17 med 118 ppm. De andre surdeigene hadde tydeligere lavere produksjon hvor bønnedeigen med isolat CM57 hadde lavest produksjon på 20 ppm CO₂ etterfulgt av VB18-1 med 44 ppm. VB10 og VB29 var tilsvarende like med 64 og 62 ppm.



Figur 4.5 Gjennomsnittsverdier av 3 paralleller fra CO₂-målinger ved 24 timers inkubering. Vertikale linjer representerer standardavvik.

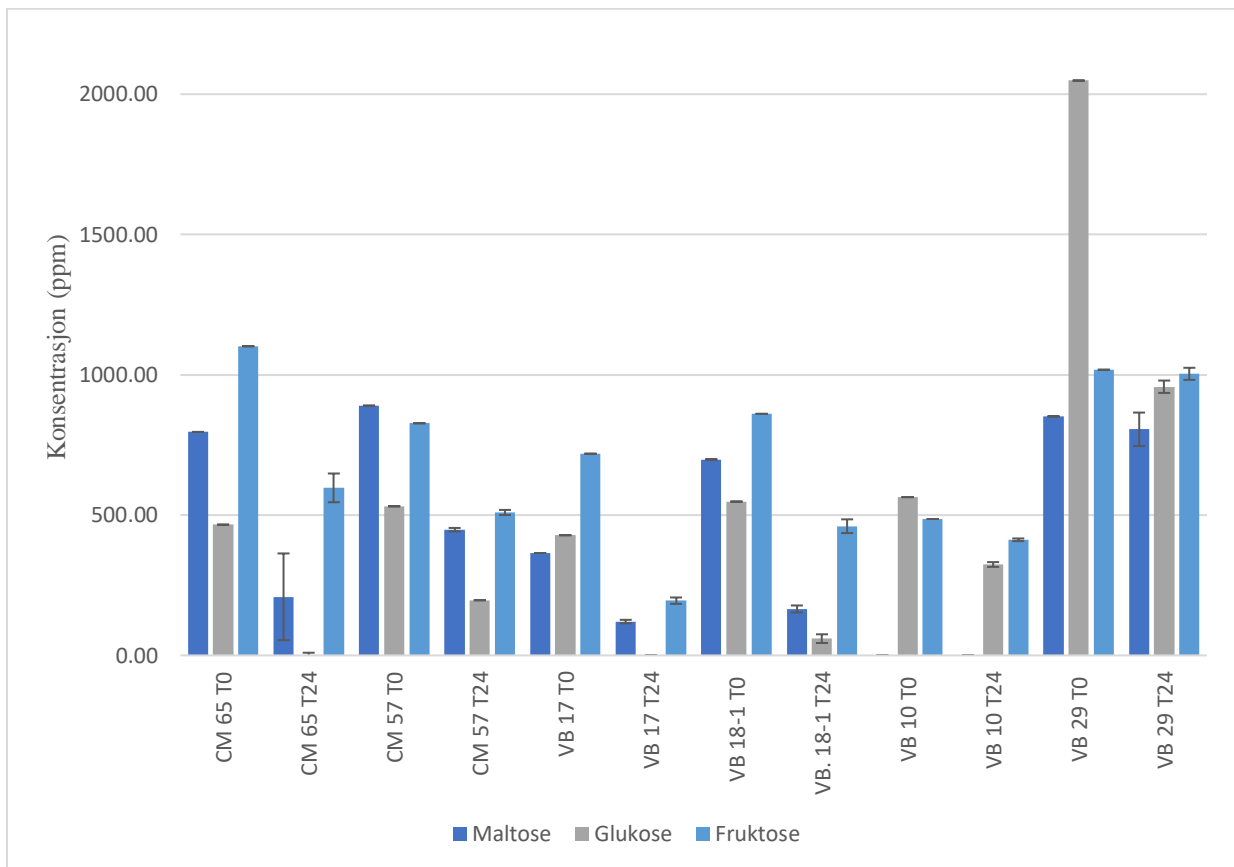
4.4.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer.

Det ble foretatt HPLC-analyse for å undersøke omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer. I løpet av 24 timers fermentering blir karbohydrater omsatt til blant annet melkesyre og eddiksyre. Figur 4.6 viser konsentrasjon av maltose, glukose og fruktose før og etter 24 timers fermentering. Surdeigen fra bokhvete med VB10 var den eneste surdeigen hvor det ikke ble funnet noe maltose, men ble detektert med laktose. Dette er mest sannsynlig ikke laktose, men en ukjent komponent med samme retensjonstid på 10,91 min. Ukjent komponent ble målt til 886,06 ppm før fermentering som ble redusert til 709,21 ppm etter fermentering.

I de resterende surdeigene ble det i løpet av fermentering en nedgang i konsentrasjon av maltose. Høyest konsentrasjon av maltose ble målt i bønne surdeig med CM57 til 889,98 ppm før fermentering og redusert til 447,97 etter fermentering. De laveste startkonsentrasjonene ble målt i havre-surdeigene. I surdeig med VB17 ble startkonsentrasjonen målt til 364,97 ppm og var 120,64 ppm etter fermentering, mens i surdeig med VB18-1 var konsentrasjonen på 688,19 ppm og var 165,62 ppm etter fermentering. Mellom de to isolatene ble det vist ingen signifikant forskjell ved T24 (p-verdi > 0,05). I surdeig av ert med CM65 og quinoa med VB29 ble det målt høyere maltose start- og slutt konsentrasjoner på henholdsvis, 796,38 ppm til 208,81 ppm og 851,60 ppm til 805,68 ppm.

Det var signifikant forskjell mellom T0 og T24 for CM65 (p-verdi<0,008), VB17(p-verdi< 0.001) og VB18-1 (p-verdi< 0,001).

Etter fermentering var det en nedgang i konsentrasjon av glukose og fruktose i alle surdeiger. I surdeig med VB17 og CM65 ble all glukose brutt ned under fermentering, de hadde i tillegg lavest startkonsentrasjon. Det ble funnet signifikant forskjell mellom T0 og T24 for alle isolater (p-verdi < 0,001). I surdeig med VB29 ble det målt høy startkonsentrasjon på 2048,53 ppm glukose og 1018,01 ppm fruktose. Lavest start- og sluttkonsentrasjon av fruktose ble funnet i surdeigene med VB10 og VB17. Det var signifikant forskjell ved T24 av fruktose for CM65 (p-verdi < 0,01), CM57 (p-verdi < 0,03), VB17 (p-verdi < 0,001), VB18 (p-verdi < 0,004), og VB10 (p-verdi < 0,005).

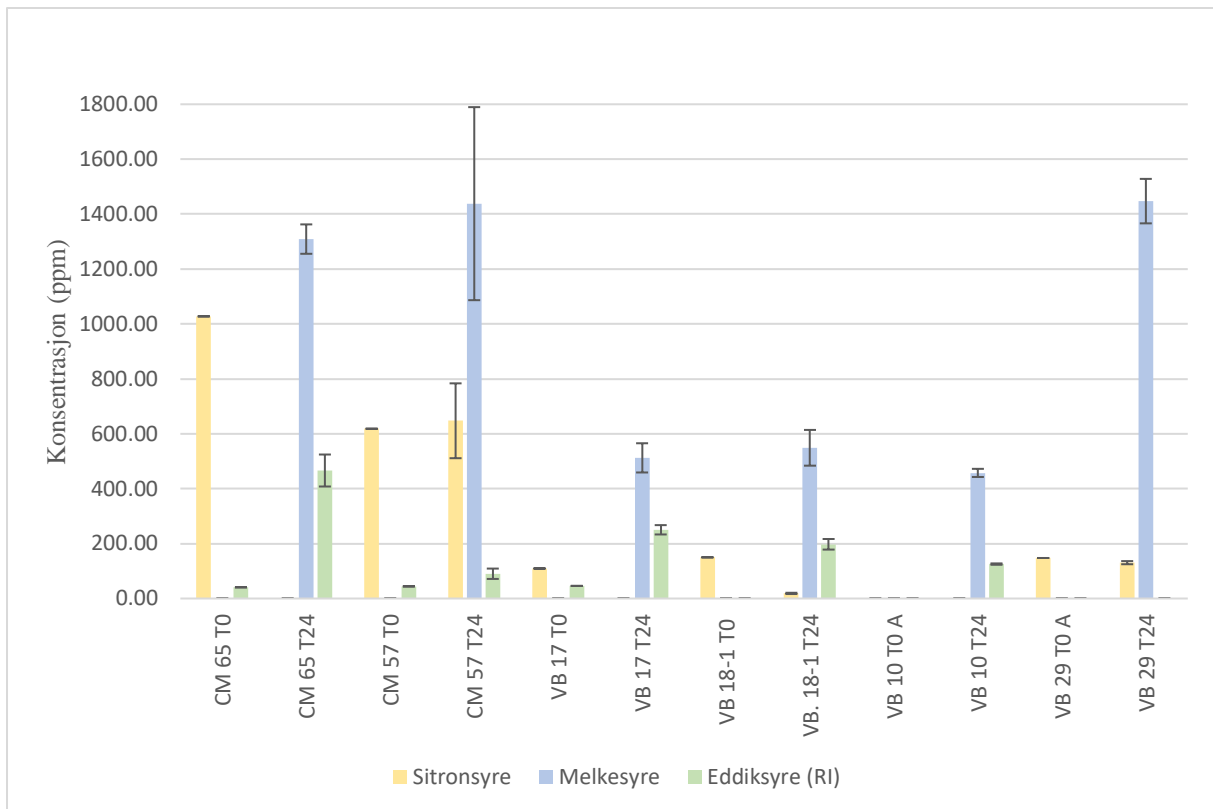


Figur 4.6 Konsentrasjon av maltose, glukose og fruktose i surdeigene ved T0 og T24. Verdiene for T24 er gjennomsnittsverdier fra tre parallelle målinger og er oppgitt med standardavvik.

Endring i konsentrasjon av sitronsyre, melkesyre og eddiksyre er gjengitt i figur 4.7. Melkesyre ble ikke detektert ved T0, men ble funnet i alle surdeigene ved T24. Høyest konsentrasjon ble funnet i quinoa med VB29 og bønne med CM57 med henholdsvis 1447,29 ppm og 1438,05 ppm. Surdeig av ert med CM65 hadde en konsentrasjon på 1308,99 ppm, mens havre surdeigene var noe lavere med 512,21 ppm hos VB17 og 548,92 ppm i VB18-1. Lavest konsentrasjon var i bokhvete med VB10 med 457,44 ppm. Det var signifikante forskjeller i melkesyre mellom T0 og T24 for CM65 (p-verdi < 0,03), VB17 (p-verdi < 0,01), VB18-1 (p-verdi < 0,01), VB10 (p-verdi < 0,001) og VB29 (p-verdi < 0,004). Det var ingen signifikant forskjell mellom T0 og T24 for CM57 (p-verdi > 0,05).

Sitronsyre ble ikke funnet i surdeig av bokhvete med VB10, men i resterende surdeiger. Høyest startkonsentrasjon var i ert surdeig med CM65 med 1027,60 ppm, men det ble ikke detektert noe etter fermentering. I surdeig med CM57 var det en liten økning i konsentrasjon fra 618,33 ppm til 647,31 ppm etter fermentering. For havre med VB18-1 og quinoa med VB29 var det reduksjon i konsentrasjon fra 149,88 ppm til 18,62 ppm og 147,60 ppm til 130,54 ppm. For havre med VB17 ble det vist en startkonsentrasjon på 109,31 ppm, men ikke detektert ved T24. Det var signifikant forskjell (p-verdi < 0,001) mellom T0 og T24 for CM65, VB17 og VB18-1.

Konsentrasjon av eddiksyre ble ikke detektert i surdeig av quinoa med VB29. Høyest produksjon var i surdeig av ert med CM65 etterfulgt av havre med VB17. Lavest produksjon var i surdeig av bønne med CM57. I surdeig av havre med VB18-1 og bokhvete med VB10 ble det ikke funnet eddiksyre før fermentering, men i T24 var det nesten like høye konsentrasjoner på 197,25 ppm og 125,38 ppm. Det var signifikant forskjell (p-verdi < 0,001) mellom T0 og T24 for VB17, VB18-1 og VB10.



Figur 4.7 Konsentrasjon av organiske syrer, sitronsyre, melkesyre og eddiksyre i surdeigene ved T0 og T24 fermentering. Verdiene for T24 er gjennomsnittsverdier fra 3 paralleller og er oppgitt med standardavvik.

4.4.3 Produksjon av flyktige komponenter

Produksjon av flyktige komponenter i løpet av 24 timers fermentering ble målt i surdeigene ved at analyser ble utført før og etter 24 timers inkubering. Målte verdier av komponenter av interesse ved T0 og T24 av surdeigene er gjengitt i tabell 4.6.

Tabell 4.6. Flyktige komponenter i surdeigene ved T0 og T24 målt med HSGC i ppm. For T24 er verdiene gjennomsnittsverdier fra tre målinger og er oppgitt med standardavvik.

Komponenter	Acetaldehyd	Etanol	Aceton	Diacetyl	Acetoin
CM 65 T0	0,86	4,49	0,78	n.d.	2,354
CM 65 T24	1,28±0,02	327,77±0,02	0,95±0,22	1,44±0,07	4,19±0,52
CM 57 T0	0,7	2,34	0,65	n.d.	n.d.
CM 57 T24	0,66±0,06	3,52±1,19	0,95±0,11	0,62±0,12	n.d.
VB 17 T0	0,05	13,1	0,44	n.d.	n.d.
VB 17 T24	0,37±0,07	166,91±7,31	0,39±0,04	0,11±0,06	0,2
VB 18-1 T0	0,14	3,76	0,34	n.d.	n.d.
VB. 18-1 T24	0,17±0,01	95,45±5,04	0,32±0,04	n.d.	n.d.
VB 10 T0	0,24	5,16	0,31	n.d.	n.d.
VB 10 T24	0,26±0,05	55,13±16,84	0,36±0,12	0,12±0,01	n.d.
VB 29 T0	0,72	4,44	0,2	n.d.	n.d.
VB 29 T24	0,69±0,02	5,74±0,87	0,27±0,05	0,29±0,02	1,822±0,52

n.d= ikke detektert

Det ble detektert acetaldehyd i alle prøvene. I surdeig med CM57 og VB29 var verdiene lave og økte ikke etter 24 timer. Mens for CM65 og VB17 var det en økning etter 24 timer. For CM65 fra 0,86 ppm til $1,28 \pm 0,02$ ppm og VB17 fra 0,05 ppm til $0,37 \pm 0,07$ ppm. VB10 og VB18-1 hadde en minimal økning fra 0,24 ppm til $0,26 \pm 0,05$ ppm og 0,14 ppm til $0,17 \pm 0,01$ ppm

Etanol var til stede i alle surdeiger. Høyest produksjon var å finne med CM65 fra 4,49 ppm til $327,77 \pm 0,02$ ppm. Etterfulgt av surdeig av havre med VB17 og VB18-1 med 13,10 ppm til $166,91 \pm 7,31$ ppm og 3,76 ppm til $95,45 \pm 5,04$ ppm. I surdeig med VB29 og CM57 var det en minimal økning på henholdsvis 4,44 ppm til $5,74 \pm 0,87$ ppm og 2,34 ppm til $3,52 \pm 1,19$ ppm. VB10 hadde en litt høyere produksjon fra 5,16 ppm til $55,13 \pm 16,84$ ppm.

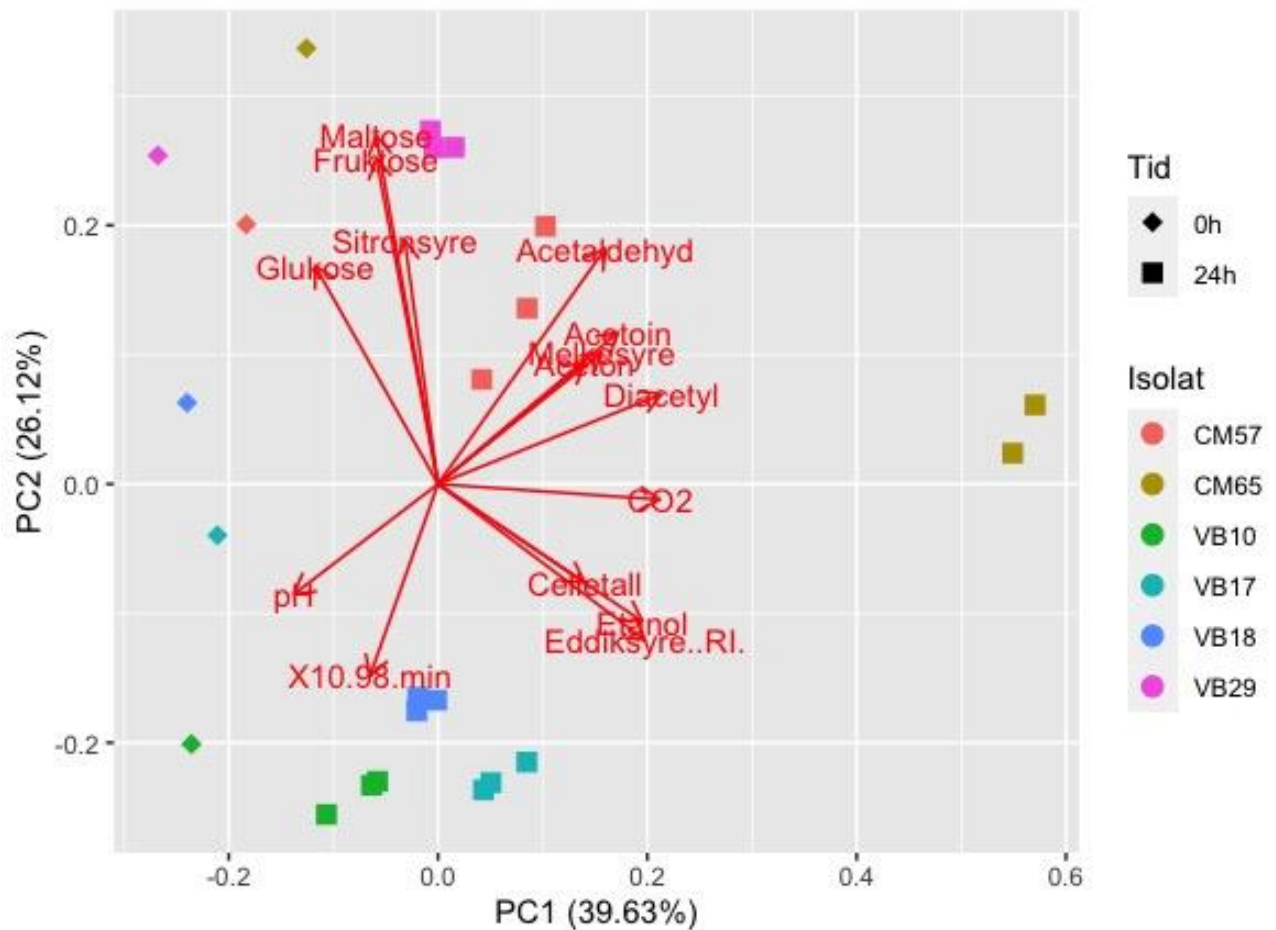
Aceton ble funnet i alle surdeigene i lave konsentrasjoner og minimal økning etter fermentering. Diacetyl ble detektert i alle surdeiger utenom havre med VB18-1 etter fermentering. Høyest produksjon var å finne i surdeig med CM65 med konsentrasjon på $1,44 \pm 0,07$ ppm etter fermentering. Høyest konsentrasjon av acetoin var å finne i surdeig med CM65 fra 2,354 ppm til $4,190 \pm 0,52$ ppm. Det var ellers å finne i lav konsentrasjon med VB17 og VB29 etter fermentering.

4.4.4 Principal component analysis (PCA)

For å evaluere korrelasjon og sammenhenger mellom pH, cellevekst, de flyktige komponentene acetaldehyd, etanol, aceton, diacetyl og acetoin, CO₂-produksjon, karbohydratene glukose, fruktose og maltose, og organiske syrer melkesyre, sitronsyre og eddiksyre, ble det gjennomført en PCA vist i figur 4.8. Dataene som er brukt i PCA-plottet er for T0 en parallell, mens for T24 er det tall fra alle tre uttakene.

De to første komponentene (PC1 og PC2) forklarer 65% av variasjonene i dataene. pH, acetoin, aceton og melkesyre korrelerer sterkt med hverandre. Alle T0 isolatene korrelerer positivt med pH. T0 uttakene korrelerer med glukose, maltose og fruktose. Celletall, etanol og eddiksyre korrelerer sterkt med hverandre. De tre uttakene for T24 ligger i nærheten av hverandre og viser til jevne paralleller. CM57 T24 korrelerer med acetaldehyd, acetoin og melkesyre. CM65 T24 er veldig ulik enn de andre fem isolatene da den ligger langt ifra de andre, og viser til høyest produksjon av CO₂, eddiksyre, etanol og diacetyl. Mens VB29 T24

korrelerer med maltose og fruktose. VB17, VB18-1, og VB10 T24 korrelerer med hverandre og ble detektert med lave nivåer av acetaldehyd, acetoin, aceton og melkesyre. Høyt celltall korrelerer med T24 surdeigene.

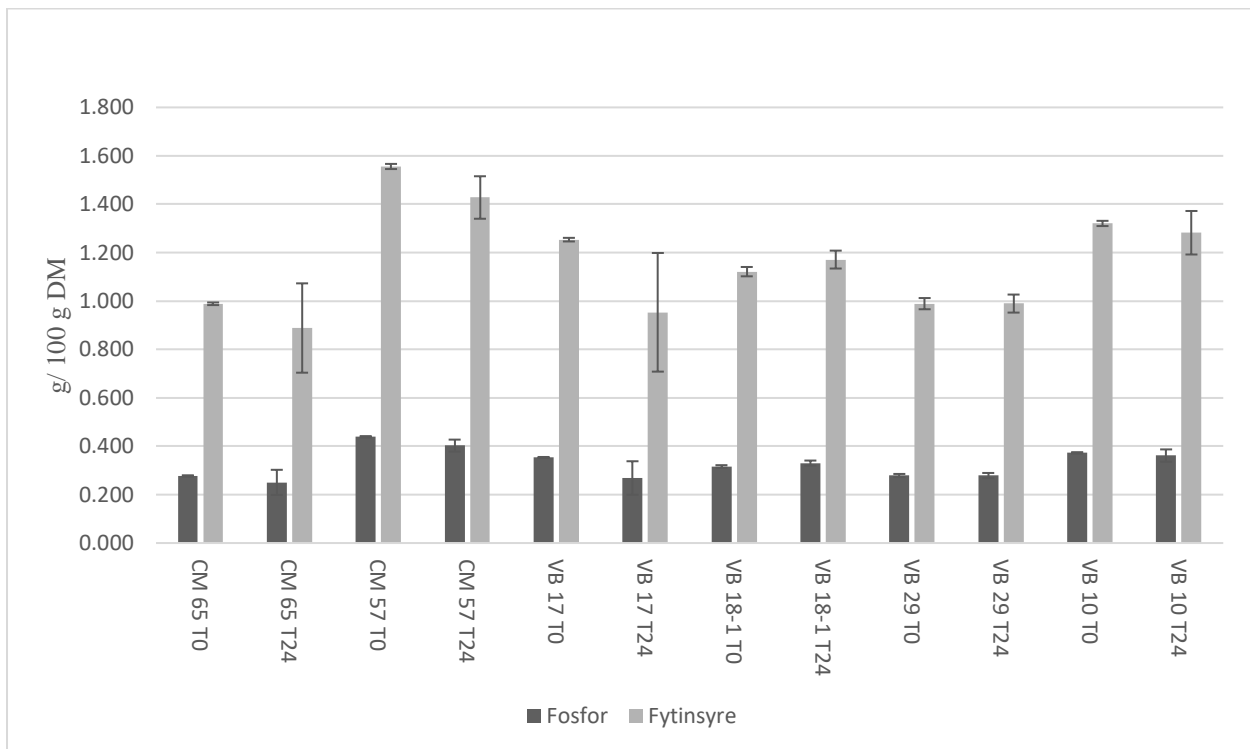


Figur 4.8 PCA-plott som viser korrelasjon mellom variablene og isolatene ved T0 og T24, 3 gjentak for T24.

4.4.5 Innhold av fytinsyre

De frysetørkede surdeigene ble målt for fritt og totalt fosfor ved kolorimetrisk bestemmelse. Resultatene fra de spektrofotometriske målingene ble brukt til å beregne innholdet av fosfor i prøvene, som deretter ble beregnet til fytinsyre. Figur 4.9 viser beregnet innhold av totalt fosfor og fytinsyre oppgitt i g/100 g DM. Etter 24 timers fermentering viste beregnet innhold av fytinsyre en minking i fire av surdeigene. Surdeig av havre med VB17 hadde et fytinsyreinnhold på 1,246 som ble redusert til 0,9534 g/100g DM. Lavest fytinsyreverdier var å finne i surdeig av ert med CM65 som ved T0 hadde et fytinsyreinnhold på 0,992 g/100g DM og ble redusert til 0,888 g/100g DM etter fermentering. I surdeig med CM57 var innholdet på

1,555 g/100g DM før det ble redusert til 1,427 g/100g DM. VB10 fra 1,333 til 1,281g/100g DM. For beregnede verdier av VB18-1 og VB29 viste det ingen reduksjon av fytinsyre, men i stedet en økning. VB 18-1 hadde henholdsvis et innhold på 1,1289 til 1,171 g/100g DM, mens VB29 hadde 0,978 til 0,989 g/100g DM etter fermentering. Ved utregning av signifikant forskjell mellom fosfor- og fytinsyreinnhold ved T0 og T24 ble det vist at det var ingen signifikant forskjell (p-verdi > 0,05).



Figur 4.9 Innhold av fosfor og fytinsyre (g/100 g DM) i frysetørket surdeiger ved T0 og T24. Standardavvik for hver prøve er illustrert i feilfelt.

5 Diskusjon

Melkesyrefermentering fører til endringer i ernæringsmessig og funksjonell kvalitet i forhold til de opprinnelige ingrediensene. Ved å pøse inn utvalgte melkesyrebakterier kan en kontrollere effektiviteten av fermenteringsprosessen. En får bedre kontroll over fermenteringsprosessen, oppnår ønskede teknologiske egenskaper, og forbedrer metabolske produksjoner. Melkesyrebakterier brukes først og fremst på grunn av deres evne til å produsere melkesyre fra karbohydrater og påfølgende pH-reduksjon, men også for deres evne til å forbedre kvaliteten, sensorisk og funksjonaliteten til fermentert mat (Castellone et al., 2021). Av denne grunn var målet med denne oppgaven å studere egenskapene til isolerte melkesyrebakterier, og se om de har potensiale til å kunne brukes som en starterkultur i surdeigsfermentering.

Poding i SFE viste variasjon i cellevekst mellom de tjuto isolatene. Generelt så det ut til at dyrkingssted SFE ga tilfredsstillende god vekst, men $OD_{600}=1$ kan ha vært for høy konsentrasjon for flere isolater da det ga celletall mellom 7,78-11,90 log CFU/mL. Sammenlignet med andre studier hvor tilfredsstillende cellevekst etter 24 timers fermentering har ligget mellom 7,0-9,6 log CFU/mL (Bartkiene et al., 2020; Limbad et al., 2020). For høyt celletall gir en risiko for å uttømme substratet og vil dermed ikke gi en effektiv nok fermentering, da det fører til konkurranse om næring eller en kan risikere en for rask forsuring av deigen som foringer kvalitet. Resultatene i denne oppgaven viste ingen klare forskjeller mellom celleveksten til isolatene fra samme art. Høyest celletall ble funnet i isolat CM57, CM25, CM92 og CM96. CM96 tilhører *Lb. pentosus* ut ifra API50, men de andre isolatene tilhører *Lb. plantarum*. *Lb. plantarum* har i surdeig vist seg å dominere. Denne dominansen kommer av at de er mer robuste ved at de har kapasitet til stor tilpasning til ulike miljøforhold, allsidig metabolisme og storspektret antimikrobiell aktivitet (Montemurro et al., 2020).

Alle isolatene viste evnen til å senke pH både i MRS og SFE. Forklaringen på den raske pH nedgangen er i hovedsak melkesyrebakteriens evne til å produsere melkesyre som syrliggjør og senker pH. pH-verdiene var generelt lavere i MRS medie enn SFE. MRS-medium er et rikt medium med en blanding av ulike karbonkilder og komplekse nitrogenkilder som bidrar til vekst, mens SFE er laget av sterilt mel hvor stivelsen blir gelatinisert, noe som kan bidra til mindre gode vekstbetingelser. *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* har vist tidligere å gi

lav pH i SFE. Dette stemmer overens med resultatene her hvor isolatene VB29 og VB51 som tilhører denne arten hadde lavest pH (Gunduz et al., 2022). Det samme ble sett for *Enterococcus durans*, VB13 (Sáez et al., 2017). Det har tidligere blitt rapportert at *Leu. mesenteroides*, *Lb. plantarum* og *P. pentosaceus* også skal gi tilfredsstillende vekst i SFE (Alfonzo et al., 2013). Isolatene CM3, CM21, CM25, CM54, CM87 ga ikke forventet pH, da pH etter 24 timer lå ved >5. Årsaker til at pH-en ikke reduseres så mye som forventet kan skyldes blant annet substrattilgjengelighet og vekstbetingelser. Det ble ikke funnet noen tidligere studier med informasjon ved bruk av SFE for de *Leu. citreum* eller *Lacticaseibacillus rhamnos*.

Proteolytisk aktivitet er en ønsket egenskap ved surdeigsfermentering, det bidrar til forbedring av deigbakeprosessen ved at enzymene forkorter eltetiden, myker deigen og øker volumet (Lancetti et al., 2021). Det ble målt synlig aktivitet i tjue av tjueto isolater, hvor det var større grad hos enkelte isolater. Isolat CM54 hadde høyest grad av aktivitet og tilhørte slekten *Pediococcus*. Andre isolater som viste høy aktivitet var CM3, CM21, CM25, CM57 alle av arten *Lb. plantarum/pentosus*. Evnen til proteolytisk aktivitet har flere ganger blitt rapportert for melkesyrebakteriene fra slektene *Lactobacillus*, *Lactococcus* og *Pediococcus*, som samsvarer med resultatene i denne oppgaven (Lim et al., 2019). Grad av aktivitet mellom isolatene fra samme slekt var her tilsvarende likt. Det er uvisst om isolatene er genetisk like, men likheten i aktivitet kan skyldes at isolatene stammer fra samme type plantebasert mel. Metoden som ble brukt for proteolytisk aktivitet var basert på melkeproteiner, resultatene burde derfor sjekkes ytterligere med andre protein som substrat.

Syv av tjueto isolater viste evnen til å produsere EPS. Dette var isolat CM65 fra *Leu. mesenteroides/citreum*, VB17 tilhørende *Leu. citreum*, VB51 tilhørende *Lb. plantarum/pentosus*, VB13 tilhørende *E. durans*, tre isolater tilhørende *P. pentosaceus* CM62, VB25 og VB18-1. Disse slektene har fra tidligere studier vist evnen til EPS produksjon og var i samhold med teorien (Guérin et al., 2020; Rahnema Vosough et al., 2021). EPS produsert fra melkesyrebakterier er en attraktiv egenskap. De har vist potensial til å forbedre kvaliteten til glutenfrie bakeriprodukter ved at de positivt påvirker de teksturmessige egenskapene, og tilbyr et naturlig alternativ til kommersielt brukte hydrokolloider (Elmansy et al., 2022; Franco et al., 2020).

Evalueringen av den metabolske profilen til isolatene via API 50 CH ga en generell identifikasjon over deres evne til å utnytte ulike karbohydrater. Glukose, fruktose og maltose var blant karbohydratene som alle isolatene viste evnen til å metabolisere. Det ble bemerket at det var likheter mellom isolatene som var isolert fra samme råmateriale. Opprinnelsen til melkesyrebakterier har vist i tidligere forskning å være med på å påvirke deres evne til metabolisere karbohydrater (Leska et al., 2022). Isolatene kunne fermentere et bredere spekter av karbohydrater, noe som bør vurderes nærmere ved utvikling av nye matvarer.

Til videre metabolisme forsøk ble seks isolater valgt på bakgrunn av deres evne til pH-reduksjon, samt ulike funksjonelle egenskaper, hvor 3 av de var EPS+, mens alle viste proteolytisk og fytase aktivitet. For å undersøke bakterievekst i surdeig ble det utført analyse av celletall og pH før og etter fermentering. Surdeig fermentert fra de heterofermentative stammene ga generelt høyt celletall, lave pH-verdier og høye syreverdier. *Lb.plantarum* CM57, *Leuconostoc* CM65 og VB17, hadde CFU-verdier $>9 \log \text{ cfu/ml}$ som ligner på tidligere rapporterte tall (Fazeli et al., 2004). Det var høy endring i celletallene fra T0 til T24 i metabolismeforsøkene. Dette viser til god produksjon av syre og gode vekstvilkår som ideell temperatur (22), pH-verdi mellom 4,5-6,5 og høy tilgang på karbohydrater.

Fermentering av karbohydrater til melke-og eddiksyre av melkesyrebakteriene er en av de viktigste fermenteringsprosessene i surdeig. Avhengig av typen stamme melkesyrebakteriene tilhører kan de metabolisere karbohydrater til ulike metabolitter. Isolat VB18-1 tilhørende *P. pentosaceus*, og VB29 tilhørende *Lb. plantarum/pentosus*, er homofermentativ og vil produsere melkesyre som hovedendeprodukt fra karbohydratene. Som endeprodukt i fermentering var det melkesyre de begge produserte mest av samt lav produksjon av CO₂. Av de seks isolatene hadde VB29 høyest produksjon av melkesyre og viste høyt innhold av maltose, glukose og fruktose. Den hadde derfor optimale forhold for vekst noe som ble vist i at den hadde høyest celletall etter fermentering. Ifølge API identitet er VB10 tilhørende *P. pentosaceus*, som er homofermentativ. Identiteten går overens med den lave produksjon av CO₂ og at den hadde melkesyre som hovedendeprodukt.

Isolat CM65 og VB17 som tilhører den heterofermentative *Leuconostoc*, vil ha endeprodukter som melkesyre, etanol, eddiksyre, CO₂ og acetat (Martín-García et al., 2023). CO₂ produsert i løpet av 24 timers fermentering var betraktelig høyere i surdeig av ert med CM65 enn de andre surdeigene som samsvarer med at den også hadde høyest etanolproduksjon. VB17 og CM57 kommer også fra heterofermentative bakterier, likevel viste de CO₂ produksjon innenfor hva en homofermentativ melkesyrebakterie produserer, ca. 40-200 ppm (Lahtinen et al., 2012). CM57 er fakultativ heterofermentativ og vil kun produsere CO₂ under spesifikke forhold eller fra spesifikke substrater. For VB17 kan en årsak til den lave produksjon være den lave tilgangen på karbohydrater.

Som forventet var det en pH-nedgang i alle surdeigene i løpet av fermenteringstiden. Fem av isolatene surgjorde surdeigen til rundt pH 5, som tidligere har blitt rapportert til vellykket fermentering (Corsetti, 2013). Denne oppførselen er ønskelig siden rask vekst og pH-reduksjon er viktig for å sikre konkuransesevnen til melkesyrebakteriestammen i en surdeig (Vuyst et al., 2014). pH-reduksjonen samsvarer med at karbohydratene var redusert under fermentering hos disse isolatene. Tidligere studie av Paramithiotis et al. (2005), har også funnet at homofermentative stammer surgjorde surdeigene mer sammenlignet med heterofermentative. De homofermentative stammer i denne oppgaven (VB29, VB18-1 og VB10) viste blandet oppførsel. VB29 var den av de seks isolatene som ga høyest pH reduksjon, mens VB18-1 viste høyere pH enn flere av heterofermentative i surdeig, det gjorde i tillegg VB10 som ikke hadde tilfredsstillende pH reduksjon, da denne var på over pH 6. I MRS og SFE derimot var de tre blant isolatene med lavest pH. Dette tyder på forskjeller i mediet, hvor forsuringshastigheten avhenger av mange faktorer som type mel/medie, deigutbytte og fermenteringstemperatur. Det har blitt erkjent at jo høyere deigutbytte, desto rasker skjer forsuringen, på grunn av bedre diffusjon av de produserte organiske syrene til miljøet (Chavan & Chavan, 2011). Deigutbyttet var her høyt som vanligvis betyr en flytende deig, men på grunn av gelering var ikke deigen så flytende. Dette kan ha påvirket diffusjonsevnen. I dette tilfellet er nok den høye pH-verdien forårsaket av type mel som har påvirket syredannelse. Høy slutt-pH kan ha blitt påvirket av tilstedeværelsen av forbindelser med høy bufferkapasitet som proteiner og kostfiber i materialene (Xie et al., 2021). VB10 hadde også høy tilstedeværelse av fruktose og glukose etter fermentering, som også kan være en grunn til den høye slutt pH-en.

Etanol er viktig smakskomponent i surdeig. Produksjon av etanol varierte mye mellom surdeigene. I PCA-plottet viste CM65 høy korrelasjon med denne komponenten. Surdeig med CM65 hadde en god del høyere produksjon av etanol enn de andre. Etanol produseres fra heterofermentative melkesyrebakterier, og var nest høyest med VB17, mens med CM57 ble det detektert lav konsentrasjon. Tilsvarende hadde de tre homofermentative isolatene lav konsentrasjon som forventet. Alle surdeigene ble detektert med en lav konsentrasjon av acetaldehyd. Acetaldehyd har blitt beskrevet å gi en skarp, fruktig og floral lukt og har blitt funnet fermentert surdeig og i brød direkte fermentert med bakegjær (Nissen et al., 2020).

Isolat CM65 og VB17 produserte høyest konsentrasjon av eddiksyre, mens CM57 var den av de heterofermentative med høyest produksjon melkesyre. Innhold av eddiksyre er relevant til aromaprofilen, når det i små konsentrasjoner virker som en smaksforsterker. Den lavere produksjonen av eddiksyre fra CM57 er i samsvar med resultatene fra HPLC, som viste høy tilstedeværelse av monosakkarider, spesielt maltose ved 24 timer, som er substratet for eddiksyreproduksjon. CM57 tilhørende *Lb. plantarum* foretrekker glukose og fruktose som karbonkilde og har vist å gi lavere eddiksyreproduksjon med maltose (Vuyst et al., 2014). Videre har det blitt rapportert at *Leu. mesenteroides* produserer mer eddiksyre enn *Lb. plantarum*, men produserer mindre melkesyre enn *Lb. plantarum* under fermentering av ren kultur (Liu et al., 2022). Det var uforventet at isolat VB18-1 og VB10 som er homofermentative hadde produksjon av eddiksyre. En mulig forklaring kan være at det har blitt vist at enkelte stammer fra *P. pentosaceus* kan omgjøre sukker med fem karboner som xylose, til eddiksyre (Wade et al., 2019). VB18-1 og VB10 var to av isolatene som viste evnen til å utnytte xylose i API50-kit.

Ved måling av karbohydrater viste VB10 innhold av en ukjent komponent med retensjonstid på 10,91 min isteden for maltose. Dette stammer fra at VB10 kommer fra bokhvete mel som inneholder veldig lavt innhold av maltose (0,11%) (Sturza et al., 2020). Alle isolatene viste produksjon av melkesyre, som er overens med teorien. Målte verdier av melkesyre var høyest i surdeigen med quinoa med VB29 og lavest i begge surdeigene av havre med VB17 og VB18-1, noe som sannsynligvis hører sammen med at det var vesentlig høyere konsentrasjon av maltose og glukose ved T0 for VB29-surdeigen enn for begge havre-surdeigene. Ved bruk av API50 CH-kit ble det observert at alle isolatene hadde evnen til å utnytte glukose, fruktose og maltose. Dette ble også observert ved HPLC, når det etter fermentering ble målt en

nedgang i komponentene. Mens VB17, VB18-1 og VB10 viste ikke evnen til å utnytte laktose da de ikke har enzymet til å bryte det ned.

De fleste *Leuconostoc* er sitratforgjærende og dette stemmer med resultatene i dette forsøket hvor isolatene *Leu. mesenteroides/citreum* CM65 og *Leu. citreum* VB17 fullstendig reduserte sitronsyreinnholdet. Det ble heller ikke detektert sitronsyre i VB10, som tyder på at den også er sitratforgjærende. Disse isolatene produserte i tillegg konsentrasjon av diacetyl og acetoin. Konsentrasjonen fra CM65 kan komme av at det i *Leu. mesenteroides* stammer har blitt vist at de inneholder gener som koder for acetolaktatsyntase og diacetylreduktase som omdanner pyruvat til diacetyl og /eller acetoin (Chun et al., 2017).

Fytase er ett kjent antinæringsstoff og er viktig for fytatdefosforlysering og økt mineralbiotilgjengelighet. Derfor er bruk av fytase-aktive melkesyrebakterier under surdeigsfermentering av fytinsyre-rike plantevekster/mel/belgvekster av interesse. Fytase aktivitet ble påvist i fjorten isolater, og viste som forventet likheter mellom isolatene som var isolert fra samme art. Tidligere studie har vist fytase-aktive melkesyrebakterie arter som *Leu. citreum*, *P. pentosaceus* og *Lb. plantarum* (Mohammadi-Kouchesfahani et al., 2019). En reduksjon av fytinsyre kan bidra til bedre biotilgjengelighet for mange andre komponenter som protein, vitaminer og mineraler. I tidligere studier har fermentering med melkesyrebakterier hatt suksess i reduksjon av antinæringsstoffer i belgfrukter og korn (Cakir et al., 2020). I denne oppgaven viste fermentering ingen signifikant forskjell fytinsyreinnholdet i surdeig med noen av isolatene mellom T0 og T24. De seks utvalgte isolatene viste alle evnen til fytase aktivitet. Det er brukt to ulike medier, hvor fytase aktivitet test ble utført i sterilt medie, mens fytinsyre ble detektert i frysetørket surdeig. De ulike mediene har ulik innvirkning på fytase-enzym aktivitet og fast sterilt medie gir en mer kontrollert prosess.

Isolat VB18-1 og VB29 viste en økning i utregnet fytinsyreinnhold, noe som mest sannsynlig hadde med feilkilder av metoden å gjøre. Det skal tilsettes svært små mengder av bufferne og dette kan fort ha satt seg fast i siden av Eppendorfrøret eller at viktige dråper satt igjen i pipetten som derfor har unngått og blitt rørt inn. Metoden som er benyttet har også noen svakheter som kan føre til feilestimering av fytinsyreinnhold. Kitet fra Megazyme skiller ikke mellom fosfat frigitt fra fytinsyre (IP6) og fosfat frigitt fra andre former myo-inositol fosfater som IP5, IP4, IP3, IP2 og IP1. IP6 og IP5 har større evne til å danne komplekser med kationer

og proteiner. De har derfor større negativ helseeffekt enn lavere formere av myo-inositol fosfater. Det er mulig at innholdet av fytinsyre har blitt mer redusert enn det som er observert her siden metoden baserer seg på at alt fosfat i prøven kommer fra fytinsyre vil mengden dette overestimeres dersom noe av fytinsyren har blitt brutt ned til lavere myo-inositol fosfater (Ma et al., 2007).

6 Oppsummering og videre forskning

I denne oppgaven ble melkesyrebakterie isolater sine egenskaper undersøkt med tanke på at de skal brukes videre i en starterkultur og til utvikling av produkter. En rekke isolater ble testet for sine funksjonelle egenskaper, og videre ble seks isolater tatt med videre til testing i surdeig. Det ble undersøkt hvordan tilsetningen av isolatet påvirket cellevekst, pH, innhold av organiske syrer og karbohydrater, aromatiske komponenter og CO₂-produksjon. Til slutt ble deres evne til å redusere fytinsyre undersøkt.

De screenede isolater viste ulike egenskaper for EPS produksjon, proteolytisk og fytase aktivitet og fermenteringsmønster. Seks isolater med forskjellig profil ble utvalgt på bakgrunn av screening. Metabolisme studiene for det seks isolatene viste forskjeller mellom isolatene. CM65 hadde høy metabolsk aktivitet da den produserte høyest konsentrasjon av CO₂ og eddiksyre. VB17, VB18-1 og VB10 viste lav produksjon av organiske syrer. Mens VB29 og CM57 var de med høyest produksjon av melkesyre. PCA plottet viste at CM65 var mest ulik de andre isolatene ved T24 og at forskjellen mellom de andre isolatene ved T24 var mest styrt av ulikheter i konsentrasjon av acetaldehyd, acetoin og melkesyre.

Basert på resultatene i denne oppgaven var det spesielt to isolater som har stort potensiale til å brukes videre i en startkultur. Mens VB29 ga høyest produksjon av melkesyre, lavest pH verdi og god vekst, ga CM65 høyest produksjon av CO₂ og de aromatiske komponentene. Egenskapene til disse isolatene er lovende for surdeigsfermentering, men må testes videre for deres egnethet i produkter i et laboratorium og pilot før de eventuelt kan brukes i industriell skala. VB10 viste lite tiltrekkende egenskaper i surdeig. Mens de tre siste CM57, VB17 og VB18-1 også kan vurderes, da de viste alle evnen til å redusere pH samt god cellevekst. CM57 viste samtidig god produksjon av melkesyre, VB17 og VB18-1 viste god proteolytisk aktivitet samt evnen til EPS produksjon.

Til gjentak og videre arbeid er det flere retninger en kan ta. For å få oversikt over melet sine naturlige egenskaper burde det blitt lagd kontroll deiger uten varmebehandling, for å se påvirkningen den hadde. Dette ble her kun gjort for ert med isolat CM65 med pH-måling og utplating på PCA ved T0 og T24. Det ble ikke detektert forskjell i resultatene mellom de to deigene med og uten varmebehandling, men burde gjøres for de andre meltypene med og uten isolat for å få påvirkningen av varmebehandlingen bekreftet. En er avhengig av at

varmebehandlingen var nok til å inaktivere og drepe mikroorganismer i melet før poding av isolat. Det kan derfor også være hensiktsmessig å teste lengre varmebehandling eller andre typer varmebehandling/steriliserings metoder. Det ble ikke tid til å utføre produktutviklings forsøk i denne oppgaven, men dette vil også være et naturlig neste skritt. Ingen av isolatene hadde alle egenskaper en gjerne skulle hatt i en starterkultur, videre oppgaver kan se om det å lage en kombinasjon av isolatene kan være optimalt, teste det sammen med gjær og videre bruke det som en starter i et produkt.

For videre studier kan en vurdere å se om isolatene har effekt på andre antinæringsstoffer enn fytinsyre, som alkaloider, tanniner og lektiner. I denne oppgaven ble det ikke vist noen signifikant forskjell i reduksjon av fytinsyre for T0 og T24. For å se hele effekten er det å anbefale å måle fytinsyreinnholdet før varmebehandling, slik at man har en ekstra verdi å sammenligne med.

Referanser

- Adetunji, C. O., Michael, O. S., Kadiri, O., Varma, A., Akram, M., Oloke, J. K., Shafique, H., Adetunji, J. B., Jain, A., Bodunrinde, R. E., et al. (2021). Quinoa: From Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology. I: Varma, A. (red.) *Biology and Biotechnology of Quinoa: Super Grain for Food Security*, s. 439-466. Singapore: Springer Singapore.
- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Gerlando, R. D., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G. & Settanni, L. (2013). Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology*, 36: 342-354. doi: doi:10.1016/j.fm.2013.07.003.
- Andersen, C. B. M., Paulsen, J., Porcellato, D., Devold, T. G. & Østlie, H. (2020). Microbiota and metabolism studies in spontaneous sourdough fermentations of legumes and wheats. *SCIFOOD*.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G. & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108: 71-83. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>.
- Augustin, M. A. & Cole, M. B. (2022). Towards a sustainable food system by design using faba bean protein as an example. *Trends in Food Science & Technology*, 125: 1-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.029>.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. d. & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1 (3): 202-232.
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Klupsaite, D., Juodeikiene, G., et al. (2020). Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms*, 8 (1): 64.
- Boukid, F. & Castellari, M. (2022). How can processing technologies boost the application of faba bean (*Vicia faba* L.) proteins in food production? *eFood*, 3 (3): e18. doi: <https://doi.org/10.1002/efd2.18>.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R. & Butt, M. S. (2008). Oat: unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, 47: 68-79. doi: <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0698-7>.
- Cakir, E., Arici, M. & Durak, M. Z. (2020). Biodiversity and techno-functional properties of lactic acid bacteria in fermented hull-less barley sourdough. *Bioscience and Bioengineering*, 130 (5): 450-456. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.05.002>.
- Castellone, V., Bancalari, E., Rubert, J., Gatti, M., Neviani, E. & Bottari, B. (2021). Eating Fermented: Health Benefits of LAB-Fermented Foods. *Foods*, 10 (11). doi: 10.3390/foods10112639.
- Chandra-Hioe, M. V., Wong, C. H. M. & Arcot, J. (2016). The Potential Use of Fermented Chickpea and Faba Bean Flour as Food Ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71 (1): 90-95. doi: 10.1007/s11130-016-0532-y.
- Chavan, R. S. & Chavan, S. R. (2011). Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (3): 169-182. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>.
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeon, H. H., Lee, S. H. & Jeon, C. O. (2017). Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation. *Scientific Reports*, 7 (1): 11504. doi: 10.1038/s41598-017-12016-z.

- Corsetti, A. (2013). Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications. I: Gobbetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*, s. 85-103. New York, NY: Springer US.
- Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: Sources, Structures, and Properties. *Polysaccharides*, 2 (3): 554-565.
- Doi, Y. (2019). Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (13): 5079-5093. doi: 10.1007/s00253-019-09830-y.
- Elmansy, E. A., Elkady, E. M., Asker, M. S., Abdou, A. M., Abdallah, N. A. & Amer, S. K. (2022). Exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 isolated from Romi cheese: characterization, antioxidant and burn healing activity. *World J Microbiol Biotechnol*, 38 (12): 245. doi: 10.1007/s11274-022-03439-6.
- Fazeli, M. R., Shahverdi, A. R., Sedaghat, B., Jamalifar, H. & Samadi, N. (2004). Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent anti-mould preservative of a traditional Iranian bread. *European Food Research and Technology*, 218 (6): 554-556. doi: 10.1007/s00217-004-0898-1.
- Franco, W., Pérez-Díaz, I. M., Connelly, L. & Diaz, J. T. (2020). Isolation of Exopolysaccharide-Producing Yeast and Lactic Acid Bacteria from Quinoa (*Chenopodium Quinoa*) Sourdough Fermentation. *Foods*, 9 (3): 337.
- Gao, L., Cheng, W., Fu, M., Wu, D. & Tang, X. (2022). Effect of improved extrusion cooking technology modified buckwheat flour on whole buckwheat dough and noodle quality. *Food Structure*, 31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100248>.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *international Dairy Journal*, 21 (9): 601-606. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>.
- Guérin, M., Silva, C. R., Garcia, C. & Remize, F. (2020). Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. *Fermentation*, 6 (4): 115.
- Gunduz, C. P. B., Agirman, B., Gaglio, R., Franciosi, E., Francesca, N., Settanni, L. & Erten, H. (2022). Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation. *Food Chemistry; X*, 14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100357>.
- Guo, H., Wu, H., Kong, X., Zhang, N., Li, H., Dong, X. & Li, Z. (2023). Oat β -glucan ameliorates diabetes in high fat diet and streptozotocin-induced mice by regulating metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109251>.
- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E. & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, 11 (4): 979.
- Kamal, N., Tsardakas Renhuldt, N., Bentzer, J., Gundlach, H., Haberer, G., Juhász, A., Lux, T., Bose, U., Tye-Din, J. A., Lang, D., et al. (2022). The mosaic oat genome gives insights into a uniquely healthy cereal crop. *Nature*, 606 (7912): 113-119. doi: 10.1038/s41586-022-04732-y.
- Kumari, A. & Roy, A. (2023). Enhancing micronutrient absorption through simultaneous fortification and phytic acid degradation. *Food Science and Biotechnology*. doi: 10.1007/s10068-023-01255-8.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & von Wright, A. (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, b. 4: CRC Press.

- Lancetti, R., Sciarini, L., Pérez, G. T. & Salvucci, E. (2021). Technological Performance and Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Argentinian Grains as Starters for Wheat Sourdough. *Current Microbiology*, 78 (1): 255-264. doi: 10.1007/s00284-020-02250-6.
- Lau, S. W., Chong, A. Q., Chin, N. L., Talib, R. A. & Basha, R. K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9 (7): 1355.
- Leirvik, V. (2022). Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av spontanfermenterte surdeiger av havre, bokhvete og quinoa. *Masteroppgave, NMBU*.
- Leska, A., Nowak, A. & Motyl, I. (2022). Isolation and Some Basic Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Honeybee (*Apis mellifera* L.) Environment—A Preliminary Study. *Agriculture*, 12 (10): 1562.
- Lim, Y. H., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R. & Abdullah, N. (2019). Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10 (1): 15. doi: 10.1186/s40104-019-0323-z.
- Limbad, M., Gutierrez Maddox, N., Hamid, N. & Kantono, K. (2020). Sensory and Physicochemical Characterization of Sourdough Bread Prepared with a Coconut Water Kefir Starter. *Foods*, 9 (9): 1165.
- Liu, Z., Xiao, M., Xu, Y., Li, D., Zhu, W., Huang, T., Peng, F., Guan, Q., Peng, Z., Xie, M., et al. (2022). Effect of homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria on physicochemical properties, amino acid, and volatile flavor compounds during paocai fermentation by pure culture. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46 (12): e17052. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.17052>.
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C. & Bing, D. J. (2020). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (15): 2593-2605. doi: 10.1080/10408398.2019.1651248.
- Ma, G., Li, Y., Jin, Y., Zhai, F., Kok, F. J. & Yang, X. (2007). Phytate intake and molar ratios of phytate to zinc, iron and calcium in the diets of people in China. *Eur J Clin Nutr*, 61 (3): 368-74. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602513.
- Martín-García, A., Riu-Aumatell, M. & López-Tamames, E. (2023). Influence of Process Parameters on Sourdough Microbiota, Physical Properties and Sensory Profile. *Food Reviews International*, 39 (1): 334-348. doi: 10.1080/87559129.2021.1906698.
- Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E. & Hernández-Ledesma, B. (2020). Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology*, 137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111178>.
- Megazyme. (2019). *Phytic acid (Phytate)/Total Phosphorus Assay Procedure* Wicklow, Ireland, Megazyme: Bray Business Park, Bray, Co.
- Mekonnen, E., Kebede, A., Tafesse, T. & Tafesse, M. (2019). Investigation of carbon substrate utilization patterns of three ureolytic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101429>.
- Mel, R. & Malalgoda, M. (2021). Oat protein as a novel protein ingredient: Structure, functionality, and factors impacting utilization. *Cereal Chemistry*, 99 (1): 21-36. doi: <https://doi.org/10.1002/cche.10488>.
- Menezes, L. A. A., De Marco, I., Neves Oliveira dos Santos, N., Costa Nunes, C., Leite Cartabiano, C. E., Molognoni, L., Pereira, G. V. d. M., Daguer, H. & De Dea Lindner, J. (2021). Reducing FODMAPs and improving bread quality using type II sourdough with selected starter cultures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72 (7): 912-922. doi: 10.1080/09637486.2021.1892603.

- Mohammadi-Kouchesfahani, M., Hamidi-Esfahani, Z. & Azizi, M. H. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough. *Food Science & Nutrition*, 7 (11): 3700-3708. doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1229>.
- Montemurro, M., Celano, G., Angelis, M., Gobbetti, M., Rizzello, C. G. & Pontonio, E. (2020). Selection of non-Lactobacillus strains to be used as starters for sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103491>.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A. & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet Res Forum*, 4 (3): 179-83.
- Narvhus, J. A., Thorvaldsen, K. R. & Abrahamsen, R. K. (1993). A Method for the Quantitative Analysis of Carbon Dioxide Produced by Dairy Starters Growing in Milk.
- Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Buruleanu, C. L., Popescu, E. C., Stanescu, S. G., Georgescu, A. A. & Toma, S. M. (2023). Biopolymers Produced by Lactic Acid Bacteria: Characterization and Food Application. *Polymers (Basel)*, 15 (6). doi: 10.3390/polym15061539.
- Nissen, L., Samaei, S. P., Babini, E. & Gianotti, A. (2020). Gluten free sourdough bread enriched with cricket flour for protein fortification: Antioxidant improvement and Volatilome characterization. *Food Chemistry*, 333. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127410>.
- Nowak, V., Du, J. & Charrondi re, U. R. (2016). Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chemistry*, 193: 47-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>.
- Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E. & Kalantzopoulos, G. (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochemistry*, 40 (8): 2813-2819. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.021>.
- Poutanen, K. S., K rlund, A. O., G mez-Gallego, C., Johansson, D. P., Scheers, N. M., Marklinder, I. M., Eriksen, A. K., Silventoinen, P. C., Nordlund, E., Sozer, N., et al. (2022). Grains – a major source of sustainable protein for health. *Nutrition Reviews*, 80 (6): 1648-1663. doi: 10.1093/nutrit/nuab084.
- Rahate, K. A., Madhumita, M. & Prabhakar, P. K. (2021). Nutritional composition, anti-nutritional factors, pretreatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): A comprehensive review. *LWT*, 138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110796>.
- Rahnama Vosough, P., Habibi Najafi, M. B., Edalatian Dovom, M. R., Javadmanesh, A. & Mayo, B. (2021). Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from Enterococcus strains isolated from traditional Iranian Kishk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15 (6): 5221-5230. doi: 10.1007/s11694-021-01092-5.
- Rostamabadi, H., Can Karaca, A., Deng, L., Colussi, R., Narita, I. M. P., Kaur, K., Aaliya, B., Sunooj, K. V. & Falsafi, S. R. (2022). Oat starch - How physical and chemical modifications affect the physicochemical attributes and digestibility? *Carbohydrate Polymers*, 296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119931>.
- S ez, G. D., H bert, E. M., Saavedra, L. & Z rate, G. (2017). Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (*Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus*) in northwestern Argentina. *Food Research International*: 605-615. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.042>.

- Saha, D., Patra, A., Prasath, V. A. & Pandiselvam, R. (2022). Anti-nutritional Attributes of Faba-Bean. I: Punia Bangar, S. & Bala Dhull, S. (red.) *Faba Bean: Chemistry, Properties and Functionality*, s. 97-122. Cham: Springer International Publishing.
- Samtiya, M., Aluko, R. E. & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2 (1): 6. doi: 10.1186/s43014-020-0020-5.
- Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B. & Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules*, 27 (16): 5354.
- Sharma, S., AnandKumar, L. H. D., Tyagi, A., Muthumilarasan, M., Kumar, K. & Gaikwad, K. (2022). An insight into phytic acid biosynthesis and its reduction strategies to improve mineral bioavailability. *The Nucleus*, 65 (2): 255-267. doi: 10.1007/s13237-021-00371-2.
- Siepmann, F. B., Almeida, B. S., Waszcynskyj, N. & Spier, M. R. (2019). Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread. *LWT*, 108: 199-206. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>.
- Sozer, N., Melama, L., Silbir, S., Rizzello, C. G., Flander, L. & Poutanen, K. S. (2019). Lactic Acid Fermentation as a Pre-Treatment Process for Faba Bean Flour and Its Effect on Textural, Structural and Nutritional Properties of Protein-Enriched Gluten-Free Faba Bean Breads. *Foods*, 8 (10): 431.
- Sturza, A., Păucean, A., Chiş, M. S., Mureşan, V., Vodnar, D. C., Man, S. M., Urcan, A. C., Rusu, I. E., Fostoc, G. & Muste, S. (2020). Influence of Buckwheat and Buckwheat Sprouts Flours on the Nutritional and Textural Parameters of Wheat Buns. *Applied Sciences*, 10 (22): 7969.
- Syrokou, M. K., Tziompra, S., Psychogiou, E.-E., Mpisti, S.-D., Paramithiotis, S., Bosnea, L., Mataragas, M., Skandamis, P. N. & Drosinos, E. H. (2021). Technological and Safety Attributes of Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from Spontaneously Fermented Greek Wheat Sourdoughs. *Microorganisms*, 9 (4): 671.
- Tanger, C., Engel, J. & Kulozik, U. (2020). Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*, 107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105949>.
- Tas, O., Ertugrul, U., Grunin, L. & Oztop, M. H. (2022). An investigation of functional quality characteristics and water interactions of navy bean, chickpea, pea, and lentil flours. *Legume Science*, 4 (1): e136. doi: <https://doi.org/10.1002/leg3.136>.
- Vuyst, L. D., Kerrebroeck, S. V., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.-M. & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37: 11-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>.
- Wade, M. E., Strickland, M. T., Osborne, J. P. & Edwards, C. G. (2019). Role of *Pediococcus* in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25 (1): 7-24. doi: <https://doi.org/10.1111/ajgw.12366>.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y. & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285.
- Xie, C., Coda, R., Chamlagain, B., Edelmann, M., Varmanen, P., Piironen, V. & Katina, K. (2021). Fermentation of cereal, pseudo-cereal and legume materials with *Propionibacterium freudenreichii* and *Levilactobacillus brevis* for vitamin B12 fortification. *LWT*, 137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110431>.

- Yang, Z., Xie, C., Bao, Y., Liu, F., Wang, H. & Wang, Y. (2023). Oat: Current state and challenges in plant-based food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 134: 56-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.017>.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70 (4): 2782-2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zhu, F. (2021). Buckwheat proteins and peptides: Biological functions and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 110: 155-167. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.081>.

Vedlegg

Vedlegg 1 pH-målinger i tjueto isolater i MRS-buljong ved T0, T3, T6 og T24.

	T0	T3	T6	T24
CM 3	5,62	5,55	4,97	3,88
CM 21	5,81	5,52	4,99	3,92
CM 25	5,6	5,54	5,08	3,89
CM 57	5,66	5,71	5,67	4,4
CM 92	5,66	5,71	5,69	4,71
CM 54	5,65	5,74	5,68	4,61
CM 87	5,65	5,64	5,62	4,61
CM 62	5,65	5,63	5,61	4,63
CM 90	5,62	5,6	5,58	5,02
CM 65	5,7	5,63	5,55	4,53
CM 40	5,68	5,67	5,57	4,34
CM 58	5,65	5,62	5,6	4,3
CM 96	5,67	5,66	5,65	4,58
VB.4	5,7	5,69	5,57	4,56
VB.17	5,67	5,68	5,53	4,56
VB.18-1	5,67	5,7	5,46	4,44
VB.25	5,63	5,65	5,64	4,45
VB.10	5,7	5,68	5,58	4,42
VB.13	5,65	5,59	5,55	4,5
VB.51	5,7	5,65	5,61	4,47
VB.29	5,66	5,58	5,57	4,37
VB.26	5,66	5,58	5,56	4,51

Vedlegg 2 pH-målinger i tjueto isolater i SFE ved T0, T3, T6 og T24.

	T0 A	T0 B	T3 A	T3 B	T6 A	T6 B	T24 A	T24 B
CM 3	6,3	6,27	6,33	6,31	6,3	6,28	5,94	5,84
CM 21	6,28	6,32	6,42	6,46	5,95	5,82	5,55	5,61
CM 25	6,32	6,32	6,3	6,34	6,27	6,16	5,68	5,72
CM 57	6,41	6,42	6,41	6,41	6,36	6,36	4,67	4,61
CM 92	6,62	6,59	6,62	6,62	6,61	6,61	4,87	4,82
CM 54	6,46	6,45	6,43	6,45	6,42	6,39	5,95	5,91
CM 87	6,54	6,58	6,53	6,59	6,52	6,48	6,1	6,12
CM 62	6,41	6,4	6,42	6,41	6,39	6,38	5,26	5,28
CM 90	6,63	6,57	6,61	6,56	6,6	6,55	5,9	5,89
CM 65	6,59	6,61	6,54	6,5	6,48	6,47	5,1	4,9
CM 40	6,59	6,63	6,57	6,55	6,51	6,5	4,43	4,43
CM 58	6,42	6,41	6,41	6,4	6,37	6,39	4,53	4,56
CM 96	6,61	6,6	6,58	6,55	6,55	6,54	5,57	5,55
VB.4	6,26	6,28	5,92	5,9	5,51	5,56	3,97	3,98
VB.17	6,27	6,19	5,85	5,84	5,41	5,43	4,32	4,29
VB.18-1	6,28	6,32	6,02	6,02	5,61	5,63	4,74	4,76
VB.25	6,38	6,37	6,37	6,36	6,25	6,26	4,32	4,32
VB.10	6,4	6,4	6,34	6,32	6,05	6,06	4,33	4,32
VB.13	6,2	6,19	6,1	6,07	6	6	4,01	3,95
VB.51	6,26	6,23	6,15	6,11	6,03	5,78	3,68	3,69
VB.29	6,2	6,22	6,1	6,1	6,09	6,08	3,76	3,68
VB.26	6,19	6,21	6,13	6,11	6,09	6,08	3,69	3,69

Vedlegg 3 Celletall ved utplating av de tjueto isolatene fra MRS og SFE på PCA-agar ved T0 og T24, 2 paralleller for SFE

	MRS T0	MRS T24	SFE T0A	SFE T0B	SFE T24A	SFE T24B
CM 3	10 ⁻³ *56	10 ⁻⁵ *46	10 ⁻³ *38	10 ⁻³ *41	10 ⁻⁵ *8	10 ⁻⁵ *11
CM 21	10 ⁻³ *37	10 ⁻⁵ *50	10 ⁻³ *48	10 ⁻³ *40	10 ⁻⁵ *6	10 ⁻⁵ *5
CM 25	10 ⁻³ *41	10 ⁻⁵ *47	10 ⁻³ *37	10 ⁻³ *38	10 ⁻⁸ *56	10 ⁻⁵ *13
CM 57	10 ⁻³ *41	10 ⁻⁵ *42	10 ⁻² *35	10 ⁻² *36	10 ⁻⁸ *44	10 ⁻⁸ *43
CM 92	10 ⁻³ *50	10 ⁻⁵ *58	10 ⁻² *48	10 ⁻² *34	10 ⁻⁸ *37	10 ⁻⁸ *36
CM 54	10 ⁻³ *70	10 ⁻⁶ *44	10 ⁻³ *31	10 ⁻³ *33	10 ⁻⁸ *49	10 ⁻⁸ *50
CM 87	10 ⁻² *51	10 ⁻⁵ *40	10 ⁻² *52	10 ⁻² *47	10 ⁻⁷ *53	10 ⁻⁷ *47
CM 62	10 ⁻² *31	10 ⁻⁵ *44	10 ⁻² *34	10 ⁻² *33	10 ⁻⁸ *39	10 ⁻⁸ *50
CM 90	10 ⁻² *20	10 ⁻⁵ *18	10 ⁻³ *15	10 ⁻² *31	10 ⁻⁵ *32	10 ⁻⁵ *27
CM 65	10 ⁻³ *15	10 ⁻⁵ *24	10 ⁻³ *31	10 ⁻³ *27	10 ⁻⁸ *41	10 ⁻⁸ *45
CM 40	10 ⁻³ *30	10 ⁻⁵ *44	10 ⁻³ *23	10 ⁻³ *33	10 ⁻⁸ *45	10 ⁻⁸ *76
CM 58	10 ⁻² *46	10 ⁻⁵ *49	10 ⁻² *33	10 ⁻² *31	10 ⁻⁸ *80	10 ⁻⁸ *75
CM 96	10 ⁻² *60	10 ⁻⁵ *49	10 ⁻² *49	10 ⁻² *52	10 ⁻⁸ *77	10 ⁻⁸ *101
VB 25	10 ⁻³ *43	10 ⁻⁵ *65	10 ⁻³ *43	10 ⁻³ *42	10 ⁻⁷ *35	10 ⁻⁷ *34
VB 26	10 ⁻³ *35	10 ⁻⁵ *60	10 ⁻² *74	10 ⁻² *65	10 ⁻⁵ *41	10 ⁻⁵ *35
VB 29	10 ⁻³ *38	10 ⁻⁶ *45	10 ⁻³ *35	10 ⁻² *67	10 ⁻⁷ *45	10 ⁻⁷ *40
VB 13	10 ⁻² *68	10 ⁻⁵ *57	10 ⁻² *68	10 ⁻² *57	10 ⁻⁷ *67	10 ⁻⁷ *39
VB 18-1	10 ⁻³ *38	10 ⁻⁶ *57	10 ⁻³ *62	10 ⁻⁴ *34	10 ⁻⁷ *42	10 ⁻⁷ *45
VB 17	10 ⁻³ *52	10 ⁻⁵ *25	10 ⁻⁴ *41	10 ⁻⁴ *32	10 ⁻⁷ *47	10 ⁻⁷ *55
VB 4	10 ⁻³ *53	10 ⁻⁵ *40	10 ⁻⁴ *55	10 ⁻⁴ *61	10 ⁻⁵ *31	10 ⁻⁸ *45
VB 10	10 ⁻³ *42	10 ⁻⁶ *43	10 ⁻³ *52	10 ⁻³ *55	10 ⁻⁸ *32	10 ⁻⁸ *35
VB 51	10 ⁻³ *39	10 ⁻⁶ *51	10 ⁻³ *57	10 ⁻³ *54	10 ⁻⁶ *45	10 ⁻⁶ *38

Vedlegg 4 pH-målinger i surdeig ved metabolismeforsøk i seks utvalgte isolater ved T0 , T18 og T24 med 3 paralleller

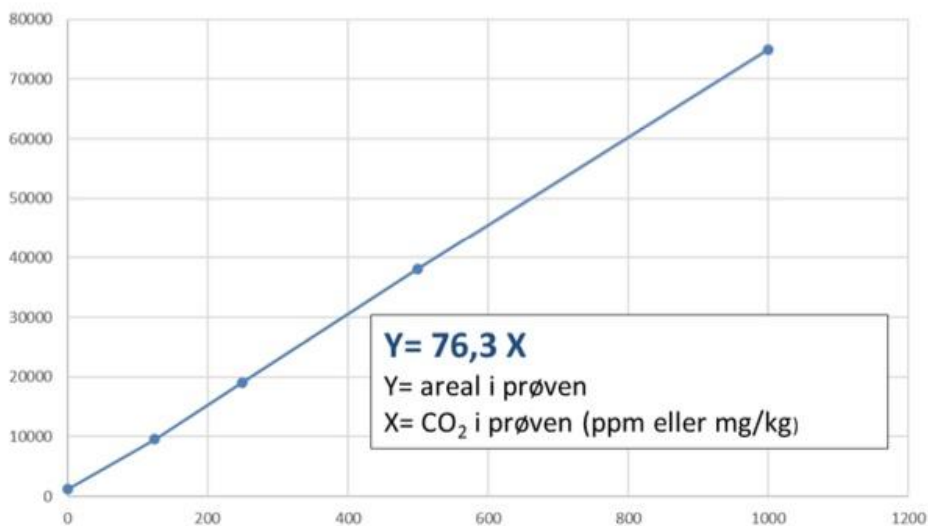
	CM 65	CM 57	VB 17	VB 18-1	VB.10	VB.29
T0A	6,32	6,38	6,27	6,38	6,42	6,23
T0B	6,31	6,39	6,24	6,37	6,43	6,19
T0C	6,34	6,39	6,25	6,37	6,17	6,18
T18A	5,3	5,44	5,41	6,08	6,13	4,89
T18B	5,32	5,44	5,41	5,95	6,13	4,89
T18C	5,31	5,43	5,38	5,83	6,17	4,87
T24A	5,28	5,16	5,41	5,76	6,1	4,88
T24B	5,29	5,21	5,41	5,77	6,11	4,81
T24C	5,27	5,2	5,39	5,65	6,03	4,86

Vedlegg 5 Celletall i surdeig ved metabolismeforsøk i seks utvalgte isolater ved T0 , T18 og T24 med 3 paralleller

	CM 65	CM 57	VB 17	VB 18-1	VB.10	VB.29
T0A	$54 \cdot 10^{-5}$	$63 \cdot 10^{-5}$	$55 \cdot 10^{-5}$	$32 \cdot 10^{-5}$	$57 \cdot 10^{-5}$	$75 \cdot 10^{-5}$
T0B	$63 \cdot 10^{-5}$	$78 \cdot 10^{-5}$	$57 \cdot 10^{-5}$	$39 \cdot 10^{-5}$	$73 \cdot 10^{-5}$	$79 \cdot 10^{-5}$
T0C	$67 \cdot 10^{-5}$	$35 \cdot 10^{-5}$	$49 \cdot 10^{-5}$	$56 \cdot 10^{-5}$	$75 \cdot 10^{-5}$	$85 \cdot 10^{-5}$
T24A	$50 \cdot 10^{-8}$	$45 \cdot 10^{-8}$	$66 \cdot 10^{-8}$	$67 \cdot 10^{-8}$	$57 \cdot 10^{-8}$	$65 \cdot 10^{-8}$
T24B	$43 \cdot 10^{-8}$	$40 \cdot 10^{-8}$	$71 \cdot 10^{-8}$	$61 \cdot 10^{-8}$	$45 \cdot 10^{-8}$	$94 \cdot 10^{-8}$
T24C	$41 \cdot 10^{-8}$	$39 \cdot 10^{-8}$	$76 \cdot 10^{-8}$	$45 \cdot 10^{-8}$	$39 \cdot 10^{-8}$	$103 \cdot 10^{-8}$

Vedlegg 6 Kalibreringskurve for beregning av CO₂ innhold

Calibration of CO₂ in milk



Vedlegg 7 Areal i prøvene ved CO₂ analyse med 3 paralleller og utregnede gjennomsnitt og mengde CO₂

		Gjentak	A	B	C	Gjennomsnitt	CO2 (ppm)
Ert	CM 65	1	40883	64140	48720	51247	671
/ / /							
Bønne	CM 57	1	1272	1580	1753	1535	20
		2	1492	1479	1755	1575	20
/ / /							
Havre	VB 17	1	7985	9566	9331	8960	117
		2	8830	9316	9007	9051	119
	VB 18-1	1	3980	3198	2998	3392	44
2		4398	2604	2930	3311	43	
/ / /							
Bokhvete	VB.10	1	4440	4566	5420	4808	63
		2	4496	5132	5282	4970	65
/ / /							
Quinoa	VB.29	1	4983	4032	5388	4801	63
		2	4620	4266	4807	4564	60
/ / /							

Vedlegg 9 Rådata for HSGC-analyse. Konsentrasjonene er oppgitt i ppm. Målingene er utført ved T0 og T24, og 3 paralleller for T24.

Komponenter	Acetaldehyd	Etanol	Aceton	Diacetyl	2-butanon	2-butanol	2-metyl-1-propanol	2.3-pentadion	Acetoin	Iso-butylacetate
CM 57 T0	0,70	2,34	0,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,008
CM 57 T24	0,66	3,52	0,95	0,62	0,054	0,194	0,107	0,667	n.d.	0,014
CM 65 T0	0,86	4,49	0,78	n.d.	n.d.	n.d.	0,116	n.d.	2,354	n.d.
CM 65 T24	1,28	327,77	0,95	1,44	n.d.	n.d.	0,094	0,361	4,190	0,005
VB 17 T0	0,05	13,10	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	0,084	n.d.	n.d.	n.d.
VB 17 T24	0,37	166,91	0,39	0,11	0,004	n.d.	n.d.	0,614	0,200	0,002
VB 18-1 T0	0,14	3,76	0,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,282	n.d.	n.d.
VB. 18-1 T24	0,17	95,45	0,32	n.d.	n.d.	n.d.	0,096	n.d.	n.d.	n.d.
VB 10 T0	0,24	5,16	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VB 10 T24	0,26	55,13	0,36	0,12	0,029	0,115	0,211	0,065	n.d.	0,003
VB 29 T0	0,72	4,44	0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,655	n.d.	n.d.
VB 29 T24	0,69	5,74	0,27	0,29	n.d.	n.d.	0,081	0,187	1,822	n.d.

Vedlegg 10 Rådata fra HPLC-analyse. Konsentrasjoner er oppgitt i ppm. Målingene er utført ved poing ved T0 og T24 og 3 paralleller for T24

ID	Maltose	Laktose	Sitronsyre	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre (RI)	Urinsyre	DL-pyroglutamin syre
CM 57 T0	889,98	n.d.	618,33	531,37	827,28	n.d.	44,18	30,61	n.d.
CM 57 T24.1	371,74	n.d.	603,03	206,45	568,58	1363,37	93,89	27,88	n.d.
CM 57 T24.2	625,83	n.d.	800,25	187,27	481,21	1820,91	106,91	37,97	n.d.
CM 57 T 24.3	346,33	n.d.	538,64	196,31	478,68	1129,85	69,80	30,95	n.d.
CM 65 T0	796,38	n.d.	1027,60	465,93	1101,84	n.d.	40,79	n.d.	29,18
CM 65 T24.1/2	204,38	n.d.	n.d.	n.d.	590,72	1271,16	424,97	n.d.	26,79
CM 65 T24.3	213,24	n.d.	n.d.	n.d.	603,53	1346,83	507,39	n.d.	28,92
VB 17 T0	364,97	n.d.	109,31	428,30	718,77	n.d.	45,96	n.d.	20,85
VB 17 T24.1	113,53	n.d.	n.d.	n.d.	181,75	496,87	237,50	n.d.	19,65
VB 17 T24.2	123,94	n.d.	n.d.	n.d.	201,91	571,41	269,55	n.d.	22,20
VB 17 T24 3	124,45	n.d.	n.d.	n.d.	201,33	468,37	243,81	n.d.	19,82
VB 18-1 T0	698,19	n.d.	149,88	548,09	860,90	n.d.	n.d.	n.d.	28,68
VB 18-1 T24.1	168,84	n.d.	18,07	46,34	470,58	621,68	217,86	n.d.	23,45
VB 18-1 T24.2	151,85	n.d.	16,64	56,16	432,54	496,22	179,58	n.d.	19,84
VB 18-1 T24 3	176,16	n.d.	21,15	76,79	478,25	528,87	194,89	n.d.	23,61
VB 10 T0 A	n.d.	886,06	n.d.	564,12	486,17	n.d.	n.d.	n.d.	17,65
VB 10 T24 .1	n.d.	736,13	n.d.	319,09	417,43	449,28	122,58	n.d.	16,15
VB 10 T24 2	n.d.	708,94	n.d.	319,12	410,35	474,52	126,12	n.d.	16,07
VB 10 T24 3	n.d.	682,55	n.d.	333,84	408,31	448,52	127,46	n.d.	15,60
VB 29 T0 A	851,60	n.d.	147,60	2048,53	1018,01	n.d.	n.d.	n.d.	13,97
VB 29 T24 .1	867,23	n.d.	135,49	977,33	1021,43	1481,26	n.d.	n.d.	13,98
VB 29 T24.2	748,01	n.d.	124,32	933,73	979,57	1354,84	n.d.	n.d.	12,82
VB 29 T24 3	801,82	n.d.	131,83	961,27	1009,50	1505,78	n.d.	n.d.	13,29

Vedlegg 11 Rådata for fytinsyre-analyse. Utregnede fosfor og fytinsyre verdier i g/100 g DM. Ved 3 paralleller, ved T0 og T24.

	Fosfor	Fytinsyre
CM 65 T0 1	0,2798	0,9921
2	0,277	0,9823
3	0,2737	0,9913
CM 65 T24 A	0,1915	0,6791
CM65 T24 B	0,2898	1,0275
CM 65 T24 C	0,2703	0,9587
CM 57 T0 1	0,4385	1,5551
2	0,4359	1,5457
3	0,4419	1,5669
CM 57 T24 A	0,3747	1,3287
CM 57 T24 B	0,4113	1,4586
CM 57 T24 C	0,4219	1,496
VB 17 T0 1	0,3514	1,246
2	0,3536	1,2539
3	0,3555	1,2608
VB 17 T24 A	0,1943	0,689
VB 17 T24 B	0,3308	1,1732
VB 17 T24 C	0,2814	0,998
VB 18-1 T0 1	0,3184	1,1289
2	0,31	1,0994
3	0,3203	1,1358
VB 18-1 T24 A	0,3197	1,1338
VB 18-1 T24 B	0,3306	1,1722
VB 18-1 T24 C	0,3406	1,2077
VB.29 T0 1	0,2759	0,9783
2	0,2864	1,0157
3	0,2745	0,9734
VB.29 T24 A	0,2864	1,0157
VB.29 T24 B	0,2837	1,0059
VB.29 T24 C	0,267	0,9468
VB.10 T0 1	0,3758	1,3327
2	0,3714	1,3169
3	0,37	1,312
VB.10 T24 A	0,3325	1,1791
VB.10 T24 B	0,3791	1,3445
VB.10 T24 C	0,373	1,3228



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway