

Szymon Gradek

Bananskall til proteiner:

bananskall som substrat for *E. coli* K12

Mai 2021

NTNU

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Bacheloroppgave

2021



Szymon Gradek

Bananskall til proteiner:

bananskall som substrat for *E. coli* K12

Bacheloroppgave
Mai 2021

NTNU

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet.
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Dette er et resultat av bachelor-emnet gjennomført våren 2021 ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Institutt for bioteknologi og matvitenskap. Opprinnelig fikk jeg lov å gå utenom normen og skrive en teoretisk oppgave, men etter hvert økte interessen for å sette teorien i praksis. På bekostning av de ansatte på NTNU klarte jeg å mase meg til et praktisk forsøk. Denne oppgaven er en takk til alle som har bidratt og hjulpet meg til den praktiske og teoretiske gjennomføringen av bacheloroppgaven. Selv om jeg har stått ansvarlig for alt rundt oppgaven inkludert de praktiske forsøkene, ville det ikke vært mulig uten alle som har veiledet meg underveis. Jeg må gi en spesiell takk til Veronica Hjellnes som har påtatt seg ansvaret for veiledningen av hydrolyseforsøket, Novozymes som så veldig generøst sponset enzymene til dette forsøket, hovedveilederen min Eirin Bar, samt venner og familie som har hjulpet meg frem til målstreken.

Skjemon Anadele
Trondheim, 20. Mai 2021

Innhold

Forord	i
Figurer	iv
Tabeller	v
1 Sammendrag	1
2 Innledning	2
3 Bakgrunn	3
3.1 Et stort problem: matsvinn	3
3.2 Bananskallet	3
3.2.1 Enzymatisk hydrolyse	4
3.3 Encellede proteiner	5
3.3.1 Utfordringer med ECP	6
3.4 Substrat	6
3.4.1 Utfordringer med bananskallet som substrat	6
3.5 Mikroorganisme	7
3.5.1 Vekstkrav	7
3.6 <i>E.coli</i> K-12	7
3.7 Spektrofotometri	8
3.8 Frysedestillering	8
3.9 Maillardreaksjonen	8
4 Materiale og metode	10
4.1 Bananskall til substrat ved bruk av enzymatisk hydrolyse	10
4.2 Sammenligning av <i>E. coli</i> K12 sin vekst på hydrolysatet med vekst på et optimalt substrat	14
4.3 Illustrasjon av <i>E.coli</i> sin vekst på hydrolysatet	15
4.3.1 Måling av OD	15
4.3.2 Inokulering av agarplater og platespredning	16
4.4 Måling og utregning av tørrstoffet til substratet	16
4.5 Gjentakelse av inokulering og måling av OD	17
4.6 Gjentakelse av platespredning	17
5 Resultat	18

5.1	Hydrolyseforsøket	18
5.2	Første målingen av OD	18
5.3	Kimtall og vekst	19
5.4	Tørrstoff og utbytte	20
5.5	Den andre OD målingen	20
5.6	Gjentakelse av platespredning	20
6	Diskusjon	22
6.1	Problemer med foredling av bananskall til et substrat	22
6.2	Tørrstoffet av hydrolysatet	22
6.3	Resultatene for platespredning	24
6.4	Resultatene for OD	24
6.5	Mulige årsaker for den dårlige veksten	25
6.6	Kan bananskall og <i>E. coli</i> K12 brukes til produksjon av ECP?	26
7	Konklusjon	27
8	Videre arbeid	27

Bibliografi

Figurer

1	Flytskjema over hele forsøket	10
2	Flytskjema for tillaging av forkultur	11
3	Flytskjema for enzymatisk hydrolyse	12
4	Hydrolysatet i bioreaktor og sentrifugerør	13
5	Frosset, tint og filtrert hydrolysat	14
6	Hydrolysat før og etter autoklivering	15
7	Absorbans etter inokulering med <i>E.coli K12</i> . Gjennomsnittet av hydrolysat med hydrolysat som referanseprøve (A), gjennomsnittet av hydrolysat med avionisert vann som referanseprøve (B) og BHI med BHI som referanseprøve (C).	19
8	Første platespredning: agarskålene etter inkubering	21
9	Absorbans etter inokulering med <i>E.coli K12</i> . A, gjennomsnittet av hydrolysat parallellene med hydrolysat som referanse; B, gjennomsnittet av BHI (0,75% TS) med BHI (0,75% TS) som referanse; C, gjennomsnittet av BHI (1,5% TS) parallellene med BHI (1,5% TS) som referanse	22
10	Andre platespredning: agarskålene etter inkubering	23

Tabeller

1	Bananskallets komposisjon i prosent av tørrstoff (Mohapatra et al., 2010)	3
2	Komposisjon av ECP fra forskjellige MO i % av tørrvekt (Adedayo et al., 2011) . .	7
3	Makronæringsstoffer, deres tørrstoff prosent av cellen og deres funksjon (Bhatia og Ichhpujani, 2008; Merchant og Helmann, 2012)	8
4	Absorbans for prøvene ved første måling	18
5	Resultat for måling av tørrstoff	20

1 Sammendrag

Det kastes ufattelig store mengder mat globalt og i 2019 ble 17% av all mat kastet. I butikkene er bananen mest utsatt på grunn av dens evne til å lett brunes ved modning og skade. 35% av bananen består av bananskallet som blir med fra dyrkingen og frem til forbrukeren. Det brukes altså store ressursmengder på dyrking og transport av bananskallet uten at det har en anvendelse etter at bananen er spist. Det høye fiberinnholdet i bananskallet gjør det vanskelig å benytte for humant konsum, mens det høye fenol- og tannininnholdet gjør det vanskelig å anvende til dyrefôr og derfor havner mesteparten av bananskallene i søpla. Ofte kastes hele overmodne bananer. Disse kan brukes direkte til produksjon av encellede proteiner (ECP) for å redusere matsvinnet, men fruktkjøttet egner seg bedre som ingrediens i andre næringsmidler som for eksempel bakverk. Bananskallet er litt mindre anvendelig og egner seg derfor bedre til produksjon av ECP, dette vil ikke bare redusere matsvinnet, men også gjenvinne det til menneskelig ernæring.

Denne oppgaven ser på bruken av bananskall til produksjon av ECP. Med et mål om å se om bananskall kan benyttes til produksjon av ECP av *E. coli* K12 ved bruk av enzymatisk hydrolyse. Forsøkene som ble utført for å finne ut av dette var enzymatisk hydrolyse, platespredning med sammenligning opp mot et optimalt medium, måling av OD opp mot et optimalt medium og tørrstoff (TS) utbyttet av hydrolysatet. Novozymes sponset enzymene Celluclast®, Pectinex® XXL og Saczyme® Yield til gjennomførelsen av den enzymatiske hydrolysen. Platespredningen viste ikke vekst av *E. coli* K12 på autoklavert hydrolysat agar med noe høyere vekst på kun varmebehandlet hydrolysat agar, men sammenlignet med det optimale mediet (BHI) var veksten betraktelig lavere. Ganske like resultat ble oppnådd for måling av absorban, hvor veksten var veldig lav på hydrolysatet sammenlignet med BHI. Veksten var opp mot fire ganger høyere på BHI (0,75% TS) enn på hydrolysat (3% TS) etter 8 timer med inkuberingstid. Dette tyder på at varmebehandling av hydrolysatet kan ha negativ effekt på vekst av *E. coli* K12, men også at *E. coli* K12 vokser dårligere på hydrolysatet (3% TS) enn på BHI (0,75% TS).

Det er en del usikkerhet rundt årsakene, men mulige grunner til den dårlige veksten kan være: manglende makronæringsstoffer, maillardreaksjon under autoklaving med binding av næringsstoffer eller danning av vekstinhiberende maillardreaksjon produkter, innhold av vekstinhiberende tanniner og fenoler eller kontaminasjon av sprøytemidler eller andre kjemikalier. Det har blitt oppnådd vekst av *E. coli* K12 på bananskallhydrolysatet, og det kan derfor sies at bananskall kan benyttes til produksjon av ECP ved bruk av enzymatisk hydrolyse og *E. coli* K12. Graden av vekst var veldig lav, så det er ikke en lønnsom eller effektiv prosess. Videre arbeid er nødvendig, slik at prosessen kan effektiviseres og høyere utbytte kan oppnås.

2 Innledning

Matsvinn er mat som kastes, men som kunne vært spist av mennesker (Matstart). I 2019 ble så mye som 17% av all mat kastet (FN-sambandet, 2021) og samme året ble 417 000 tonn matsvinn registrert i Norge med en markedsverdi på 20,7 milliarder NOK (Sampieri, 2020). I butikken er det bananen som er mest utsatt (Mattsson et al., 2018). Den brunes lett ved skade og modning, og blir derfor ofte stygg og uappetittlig før den kommer til forbrukeren. Til tross for et stygt utseende er bananen likevel lett anvendelig. Den kan brukes som en ingrediens i et næringsmiddel for å unngå matsvinn, men over en tredjedel av bananen havner i søpla uansett! For å videre redusere matsvinnet, må også bananskallet brukes. Det egner seg ikke som ingrediens, men kan brukes som substrat i en mer avansert prosess for å produsere proteiner.

Bananskallet representerer 35% av bananen og alle ressursene som kreves for å dyrke bananen inkluderer også dyrking av skallet (Giri et al., 2016). Selv om skallet ikke representerer en høy verdi, er det likevel med gjennom hele transportkjeden frem til bananen er spist. Bananskallet består av lignocellulose som har tre hovedkomponenter: cellulose, hemicellulose og lignin (Fatmawati et al., 2017). Lignocellulosen er rik på karbohydrater, men disse er sterkt bundet, derfor er det få bruksområder for bananskallet. I tillegg er det lite egnet som dyrefôr siden det inneholder store tanninmengder som har en bitter smak og kan være skadelig for dyrene (Nawab et al., 2020). Det er likevel en rekke forskning på anvendelsen av bananskallet. Fatmawati et al. (2017) beskriver bruken av bananskall til produksjon av etanol ved hjelp av enzymatisk hydrolyse og El-Din et al. (2018) beskriver bruken av bananskall som et billigere alternativ til å håndtere oljesøl. Etanolproduksjon og håndtering av oljesøl kan være lukrativt, men hva med å redde maten?

Adedayo et al. (2011) beskriver bruken av encellede proteiner som en menneskelig proteinkilde. En av fordelene ved produksjon av encellede proteiner er at de kan dyrkes på det meste av substrat (Adedayo et al., 2011). Bruken av prosessvann fra matindustrien til en slik produksjon er blitt beskrevet av Liu et al. (2014) og det kan derfor tenkes at bananskallet også egner seg til en tilsvarende prosess. Ved å kombinere en enzymatisk hydrolyse av bananskall, som er beskrevet av Fatmawati et al. (2017), sammen med en lignende prosess til den beskrevet av Liu et al. (2014), kan man muligens utnytte bananskallet som utgangspunkt for proteinproduksjon og slik gi det et nytt liv i matkjeden.

Denne oppgaven har som hovedmål å undersøke om bananskall kan benyttes som utgangspunkt til produksjon av mat gjennom utnyttelse til substrat for produksjon av encellede proteiner. Ved bruk av enzymatisk hydrolyse med kommersielle enzymer, tillages et substrat og *Escherichia coli* K12 sin vekst testes på det. Oppgaven er delt opp i fire delmål:

1. Foredling av bananskall til et substrat for dyrking av encellede proteiner ved bruk av enzymatisk hydrolyse.
2. Måling og utregning av tørrstoffet til substratet og tillaging av agar.
3. Sammenligne *E. coli* K-12 sin vekst på hydrolysatet opp mot et optimalt substrat.
4. Illustrere *E. coli* K-12 sin vekst på hydrolysatet.

3 Bakgrunn

3.1 Et stort problem: matsvinn

I Norge har de fleste tilgang på trygg og næringsrik mat, derfor kan det virke som om sult ikke er et stort problem i dagens samfunn, men det er ikke tilfellet. I 2019 var 8,9% (ca. 690 millioner) av verdens befolkning rammet av sult og 25% (ca. 2 millioner) var uten tilgang på sikker, næringsrik eller nok mat (FN-sambandet, 2021). Mens så mange sulter, kastes det ca. 417 000 tonn matsøppel i Norge hvert år (Sampieri, 2020). Slike ressurstap kategoriseres som mattap eller matsvinn. Mattap beskriver tapet av mat i de tidligste leddene i matkjeden som produksjon, lagring og bearbeiding, og forekommer hovedsakelig i utviklingsland (Every Crumb Counts, 2018). I mer industrialiserte land som Norge er matsvinn et større problem, som betyr at mat kastes i de senere leddene i matkjeden som distribusjon, matvarehandel, restauranter og husholdninger. Et eksempel på matsvinn er brune bananer som havner i søpla.

Matsvinnet representerer mat som kunne blitt utnyttet, men som gikk tapt på grunn av holdninger, handlinger, preferanser, god råd, overskudd av mat og dårlig tid (Every Crumb Counts, 2018). De vanligste grunnene til kasting av mat er utløpt dato, produksjonsfeil, kvalitetsavvik eller skade (Sampieri, 2020). Det er ikke bare maten som går i søpla, men det medfølger også avgifter for avfallshåndtering og transport. Disse prosessene slipper ut 400 000 tonn CO₂-ekvivalentener årlig i Norge, og medfører et markedsverditap. I 2019 ble tapet på 6,49 milliarder NOK (Sampieri, 2020). På toppen av det hele har man bananskallet som tar opp store energimengder under dyrking og transport, men som foreløpig ikke lar seg anvende i særlig stor grad.

3.2 Bananskallet

Det produseres 144 millioner tonn frukt årlig (Ahmad og Danish, 2018). Bananen står for 16% med India som den største produsenten (Mohapatra et al., 2010). I tillegg til produksjonen av selve frukten medfører avlingen en rekke biprodukter. Bananplanten bruker 9 måneder på å vokse og for hvert tonn banan produseres det 300kg bananskall (Lapo et al., 2020). Bananskallet har få reelle anvendelser, men det er en del forskning som fokuserer på utnyttelsen av bananskallet. Parmar og Kar (2008) har utført en studie på bananskallets medisinske egenskaper, Tewari et al. (1986) beskriver en prosess for fremstilling av etanol fra bananskall, og El-Din et al. (2018) har sett på muligheten til å benytte bananskall til håndtering av oljesøl.

Tabell 1 Bananskallets komposisjon i prosent av tørrstoff (Mohapatra et al., 2010)

Bananskallets komposisjon	
Stivelse	3 %
Protein	6 - 9 %
Fett	3,8 - 11 %
Totalt fiber	43,2 - 49,7 %
Kostfibrets komposisjon	
Lignin	6 - 12 %
Pektin	10 - 20 %
Cellulose	7,7 - 9,6 %
Hemicellulose	6,4 - 9,4 %

Bananskallet består i størst grad av vann (83,5%) og tørrstoffet består i hovedsak av kostfiber med lavere innhold av protein, fett og stivelse som illustrert i **tabell 1** (Mohapatra et al., 2010). Kostfiber er et samlebegrep for ufordøyelige karbohydrater fra planter. Fibrene danner fundamentet for plantens struktur, hovedsakelig i cellevegger. Kjemiske forbindelser som faller under denne kategorien er cellulose, hemicellulose, pektiner og ligniner (Svihus, 2021). Cellulosen består av lange kjeder på flere tusen d-glukose molekyler bundet med sterke glykoksidbindinger (Bøhmer, 2019). Cellulosen er den vanligste kostfiberforbindelsen i naturen og utgjør mesteparten av plantene. He-

micellulosen består også av lange sukkerkjeder, men de er mye kortere enn i cellulosen og består av en rekke forskjellige sukkerarter (Ebringerová et al., 2005). Pektin og lignin er også lange kjeder, men kjedene består ikke av monosakkarider. Pektinet består hovedsakelig av galakturonsyre som er oksidert d-galaktose (Mohren, 2008). Pektinets hovedoppgave er å trekke til seg og holde på vannet i planten (Aarnes, 2018). Lignin er mer strukturløst, består av fenoler (Lebo Jr. et al., 2001) og fungerer som et lim for cellulosen og polysakkaridene. Det bidrar til den rigide strukturen i for eksempel treverk (Manum, 2018).

De sterke bindingene som forekommer i kostfiber lar seg ikke bryte uten kraftig mekanisk bearbeiding og tilførselen av kostfiberspaltende enzymer (Wenk, 2001). Mennesker klarer ikke å spalte kostfiber i stor nok grad til å få næring ut av det, men det spiller likevel en essensiell rolle i kostholdet, anvendt i veldig små mengder (Kendall et al., 2010). Kostfiberet er ikke bare bra for tarmen, men minsker også risiko for fedme og kroniske sykdommer som diabetes, hjerte- og karsykdommer og kreft (Kendall et al., 2010). Drøvtyggere produserer heller ikke enzymene selv, men får de produsert av MO i fordøyelsessystemet og klarer derfor å fordøye planter som er rike på cellulose (Weimer, 1996). Det kan derfor tenkes at bananskallet kan brukes som fôr for dyrene i kjøttindustrien, men tannininnholdet har vist seg å være en stor utfordring (Robbins et al., 1987). Bananskallet inneholder nemlig for høye tanninmengder som tilfører skallet en bitter smak som gjør det vanskelig å anvende i dyrefôr. I tillegg kan forhøyet inntak av tanniner ha negative effekter på dyrene som forverret fordøyelighet av proteiner og tørrstoff, men kan også være giftige og forårsake død (Aboul-Enein et al., 2016; Nawab et al., 2020).

Siden karbohydratene er for sterkt bundet i kostfiber til at mennesker klarer å fordøye de og tannininnholdet er for høyt til at det egner seg som dyrefôr, kan det kanskje være ønskelig å spalte kostfiberet før det anvendes videre.

3.2.1 Enzymatisk hydrolyse

Enzymatisk hydrolyse er en prosesseringsmetode som kan fungere som et alternativ for å bryte ned polymere. Hydrolyse er en betegnelse for spaltning ved hjelp av vann, mens enzymatisk hydrolyse er en spaltingsprosess som oppnås ved tilførsel av enzymer og vann eller ved utnyttelse av enzymene og vannet som allerede finnes i råvaren (Yin et al., 2012). Enzymer har i lang tid blitt brukt i matproduksjonen, men det er først etter 1900-tallet at bruken har økt betraktelig på grunn av effektivisering av produksjonsprosesser for enzymatiske preparater (Kirk et al., 2002).

Enzymer er globulære proteiner som katalyserer reaksjoner ved å minke reaksjonens aktiveringsenergi som videre øker reaksjonens hastighet (van Oort, 2010). Det er over 5500 kjente enzymer. Disse klassifiseres etter hvilke reaksjoner de katalyserer og deles i seks klasser: oksoreduktaser (katalyserer redoksreaksjoner), transferaser (katalyserer forflytting av en kjemisk gruppe mellom to molekyler), hydrolaser (katalyserer hydrolyse), lysaser (katalyserer elimineringsreaksjoner), isomeraser (katalyserer isomerisk omstrukturering), ligaser (katalyserer kondensasjonsreaksjoner) (Fernandes, 2018). Denne oppgaven vil kun fokusere på hydrolasene: amylase, cellulase og pectinase.

Stivelse er plantenes viktigste næringsreservoar og består av en blanding amylose og amylopektin. Begge polysakkaridene består av lange kjeder av D-glukose monomere bundet med α -1,4 bindinger. Stivelsesrike planter som korn og knoller utvinnes og bearbeides til stivelse som benyttes i næringsmiddelindustrien (Whistler og Daniel, 2000). Naturlig fordøyer mennesker stivelse ved hjelp av amylase som finnes i spytt og bukspytt (Des Gachons og Breslin, 2016). Amylasen benyttes også av MO til å spalte den komplekse stivelsesstrukturen for å utnytte glukose monomere i metabolismen. Forskjellige amylaser spalter forskjellige deler av stivelsen, noen spalter endene av kjedene, mens andre kun spalter kjeder med tre eller flere monomere, men sammen klarer de å forsukre stivelsen helt. Amylasen benyttes også utenfor fordøyelsen til for eksempel produksjon av glukose og fruktose sirup (Souza et al., 2010). (Fernandes, 2018)

Cellulosen har mindre bruk i næringsmiddelindustrien, men kan brukes til etanolproduksjon (Badger et al., 2002). De lange sukkerkjedene kan spaltes ved bruk av cellulase. Cellulase er en betegnelse på en enzymløsning som er nødvendig for fullstendig hydrolyse av cellulose (Fernandes, 2018). På lik linje med amylasen har også cellulaseenzymene forskjellige funksjonsområder, noen katalyserer hydrolyse av endene, mens andre katalyserer hydrolyse av bindingene i midten av kjeden. (Hildén og Mäkelä, 2018; Fernandes, 2018). Enzymatisk hydrolyse av cellulase kan blant annet benyttes til produksjon av biodrivstoff (Kim et al., 2014).

Pektiner er vannløselige karbohydrater som finnes i planter (Mukherjee, 2019), mens pektinaser er gruppen enzymer som katalyserer spaltning av pektiner (Fernandes, 2018). Pektin kan for eksempel være rhamnogalakturonaner med rhamnose og galakturonsyre (Yahia et al., 2019). Disse deles også opp til de monomere komponentene ved enzymatisk hydrolyse. Pektinasene spalter bindingene som holder de sammen på forskjellige måter, noen spalter kun mono- og di-mere fra endene, mens andre spalter de tilfeldig utover strukturen (Fernandes, 2018). Pektinaser har i lang tid blitt brukt i fruktbehandlesindustrien for å øke utbytte (Belafi-Bako, 2015)

En enzymatisk hydrolyse som benytter en blanding av amylase, cellulase og pektinase skal inneholde alle de nødvendige enzymene til å spalte mesteparten av bindingene i bananskallet og gjøre det lettere å anvende til produksjon av encellede proteiner.

3.3 Encellede proteiner

Begrepet encellede proteiner (ECP) beskriver tørkede celler av bakterier, alger, mugg og sopp (Suman et al., 2015). I litteraturen vil det forekomme flere forskjellige betegnelser som mikrobielt protein og petroprotein. For å gjøre produktet mindre urovekkende ble ECP, single-cell protein (SCP) på engelsk, fastsatt som den nye betegnelsen under et møte på Massachusetts Institute of Technology (MIT) i 1968 (Ravindra et al., 2000). ECP benyttes hovedsakelig til dyrefôr, men det er lite som står i veien for at det skal kunne spises av mennesker. ECP har en sammensetning av essensielle aminosyrer som tilfredsstiller FAO/WHO sine krav for humant konsum (Matassa et al., 2016).

Assosiasjoner som medfølger mikroorganismer (MO) er ofte dårlig hygiene og sykdom (Peng et al., 2018), det kan derfor være mye uro rundt konsumet av ECP. I tillegg har mange erfart MO sin evne til å forringe mat hvor sensorisk kvalitet i form av smak, lukt og konsistens forverres (Holban og Grumezescu, 2018). Det er også mange patogene MO som forårsaker ubehagelige symptomer som diaré, feber og oppkast, men de kan også medføre farligere utfall som nerveskader og død (Granum et al., 2015). De fleste MO er ufarlige og mange er fordelaktige for oss, et slikt eksempel kan være probiotiske MO i tarmen som hjelper med fordøyelsen (Da Silva og Domingues, 2017). I tillegg har mikroorganismene en betydelig rolle i daglig kost og har vært med å forme kokkekunsten som vi kjenner den i dag. Vi benytter for eksempel gjær i bakst, øl- og alkoholproduksjon (Suman et al., 2015; Bokulich og Bamforth, 2013), samt bakterier til å lage yoghurt og ost (Adedayo et al., 2011); og sist, men ikke minst benyttes muggsopp til produksjon av forskjellige muggoster og til og med allment medisin som penicillin (Shlaes, 2010).

Bruken av ECP til humant konsum er ikke en ny tanke. Så tidlig som under den første verdenskrig ble *Saccharomyces cerevisiae* brukt av tyskerne til menneskelig ernæring. Tyskland benyttet *Candida arborea* og *C. utilis* til å erstatte ca. 60% av matinntaket under andre verdenskrig. MO kan brukes til å omdanne lavverdig organisk materiale til høyverdige proteiner. Det vil si at avfallsstoffer også kan benyttes som substrat. To eksempler er prosessvann og metangass som kan benyttes til produksjon av ECP (Liu et al., 2014; Pasotti et al., 2017). (Adedayo et al., 2011)

Siden restråstoff er en billig og lett tilgjengelig ressurs, vil det være ønskelig å utnytte det i en verdiskapende prosess. En aktør som valgte denne retningen er The Imperial Chemical Industries

(ICI). ICI var en av de første til å produsere ECP på full skala og nå har de et produkt som kalles Pruteen[®] (Matassa et al., 2016). Prosessen benytter metanol som substrat for dyrking av *Methylophilus methylotrophus* og det ferdige produktet inneholder 70% protein av tørrmassen. Andre aktører benytter alternative metoder og substrat, for eksempel kloakkvann. Forskning og praktiske driftsforsøk fokuserer på bruken av *Cupriavidus necator* til produksjon av ECP, bio-plastikk og til rengjøring av kloakkvann (Matassa et al., 2015). Disse aktørene inspirerer og vekker interesse rundt utnyttelsen av avfallsstoffer, i dette tilfellet er det bananskallet som skal foredles.

3.3.1 utfordringer med ECP

Til tross for det lovende proteininnholdet og den gode aminosyresammensetningen, er det likevel en del utfordringer som medfølger bruken av ECP til human konsum. Et av de største utfordringene for alle rasktvoksende organismer er et høyt nukleinsyreinnhold. Nukleinsyreinnholdet i ECP er betydelig høyere enn i andre proteinkilder og utgjør 20-30% av det totale nitrogenet (Adedayo et al., 2011). Nukleinsyre er en viktig del av kostholdet og et voksent menneske vil ha behov for 2g/dag med en trygg øvre grense på 4g/dag (Adjei et al., 1995). Ved for høyt inntak øker urinsyreinnholdet i blodet og forårsaker urinsyre gikt og nyresteindannelse (Adjei et al., 1995). Det er mange metoder som kan benyttes for å redusere innholdet av ribonukleinsyre fra 7% til et akseptabelt nivå på 1% (Adedayo et al., 2011). Mulige alternativ er å behandle ECP med lut, 10% saltløsning, aktivering av endogene nukleaser og ved termisk sjokk (Suman et al., 2015).

En stor utfordring som også står i veien for at ECP kan brukes vidt til menneskelig kost er aksept. Selv om det er en mer bærekraftig og effektiv måte å produsere proteiner på, kan det likevel være vanskelig å etablere et slikt produkt på markedet. Utfordringer som uønsket farge og smak bidrar til usikkerheten rundt produktet (Adedayo et al., 2011) og som nevnt tidligere medfølger MO dårlige assosiasjoner som forsterker utfordringen. Substratet som benyttes kan også bidra til å danne et bilde av selve produktet, dersom billige avfall-substrat benyttes, kan det være mer problematisk å innføre produktet. Markedsføring og strategisk lansering kan medvirke til økt aksept.

3.4 Substrat

For å produsere ECP er det nødvendig å ha en grobunn for MO. En slik grobunn kalles for et substrat. Et substrat kan forekomme i mange forskjellige former, men det er mest vanlig med flytende medier ved produksjon av ECP for å lettere skille ECP fra substratet (Adedayo et al., 2011). Substratet har som formål å tilfredstille vekstkravene til MO og dersom det ikke inneholder alt MO trenger, vil veksten og utbyttet påvirkes negativt. Substratet kan også påvirke veksten til MO ved å inneholde vekstinhiberende stoffer som også vil prege vest og utbytte. En av de største fordelene ved produksjon av ECP er fleksibiliteten, man kan velge hvilket substrat og MO som benyttes på grunnlag av tilgjengelighet og pris. Populære valg til substrat vil være parafin, hydrokarboner, metan, alkoholer og karbohydrater (Cooney et al., 1980).

3.4.1 utfordringer med bananskallet som substrat

I tillegg til utfordringene som følger med bruken av ECP til human konsum, har man også en rekke utfordringer som medfølger produksjonen av ECP med bananskall som substrat. Opprinnelig produserer bananen tanniner for å beskytte dens ytre mot MO og store planteetere (Scalbert, 1991). Tanninene beskytter planten ved å redusere tilgjengeligheten av proteiner, sukker og andre makromolekyler (Nawab et al., 2020). Disse tanninene som finnes i bananskallet funker antimikrobielt mot både gram negative og gram positive bakterier (Aboul-Enein et al., 2016). Veksten inhiberes ved at tanninene binder ekstracellulære polymere, inhiberer cellemembranen og enzymaktivitet, i tillegg til å utilgjengeliggjøre substratet og metallioner (Lyte, 1997). Bananskallet inneholder også fenoler som er vist å inhibere vekst av en rekke MO hvorav *E. coli* var en av de (Aboul-Enein

et al., 2016). I tillegg beskriver Phirom-on og Apiraksakorn (2021) at *E. coli* ikke klarer å vokse på hydrolysat av bananskall som har blitt spaltet ved hjelp av cellulase. Det er visstnok en rekke MO som ikke klarer å utnytte hydrolyseproduktene som kommer av å spalte cellulose.

3.5 Mikroorganisme

Mikroorganismen som benyttes til produksjon av ECP må være trygg å spise. Derfor er det viktig at den ikke forårsaker ubehag, irritasjon eller toksiske symptomer ved konsum. I tillegg vil MO også være avhengig av substratet og det må derfor tilfredstille alle vekstkravene til MO. Bakterier har bedre vekstkapasitet enn gjær og vokser på billige substrat i tillegg til at de har høyere proteininnhold (Adedayo et al., 2011). Bakterier er også de mest allsidige og kan vokse på det meste, alt fra stivelse og sukker til gasser og hydrokarboner som metan og petroleumfraksjoner (Suman et al., 2015). Alger (utenom Spirulina) egner seg ikke for humant konsum på grunn av det høye klorofyllinnholdet (Adedayo et al., 2011). Spirulina benyttes hovedsakelig som et kosttilskudd, det er en god proteinkilde, har gode antioksidative egenskaper, evnen til å beskytte stamceller, samt motvirker fettlevs sykdom (Suman et al., 2015). Sopp vokser tregere enn både bakterier og gjær, samt er det kun noen arter som egner seg til produksjon av ECP på grunn av produksjonen av mykotoksiner (Adedayo et al., 2011). Sopp har noen arter som egner seg godt som proteinkilde, men utbyttet er veldig avhengig av substratet (Suman et al., 2015).

Tabell 2 Komposisjon av ECP fra forskjellige MO i % av tørrvekt (Adedayo et al., 2011)

Næringsstoff	Sopp	Alger	Gjær	Bakterier
Protein	30-45	40-60	45-55	50-65
Fett	2-8	7-20	2-6	1,5-3
Aske	9-14	8-10	5-9,5	3-7
Nukleinsyre	7-10	3-8	6-12	8-12

MO er ikke skapt like. Derfor vil deres egenskaper være avgjørende for anvendelsen. Næringsinnholdet og vekstegenskapene til bakterier og gjær har vist seg å være mest gunstig og derfor er de dem mest omtalte kildene til ECP. Komposisjonen av MO er fremstilt i **tabell 2**. Bakterier og gjær har det høyeste proteininnholdet, men også det høyeste innholdet av nukleinsyre som gjør at de krever prosessering.

3.5.1 Vekstkrav

MO trenger næringsstoffer på lik linje med mennesker og dyr. Alle MO har sine spesifikke vekstkrav for å kunne utføre energiomdannelse og biosyntese (Bhatia og Ichhpujani, 2008). Næringsstoffene som MO trenger mye av kalles makronæringsstoffer, og de som det trengs mindre av kalles mikronæringsstoffer (Glazer og Nikaido, 2007). Makronæringsstoffene og deres funksjon er satt opp i **tabell 3**. Mikronæringsstoffene er metallioner som trengs i så små mengder at de er vanskelig å måle. Disse trenger man ikke å tilføre et medie, siden de vil være til stedet i store nok mengder som kontaminanter i vann eller råstoffene som benyttes til dannelsen av mediet (Bhatia og Ichhpujani, 2008).

3.6 *E.coli* K-12

Escherichia coli finnes i tarmen til varmblodige dyr og mennesker (Granum et al., 2015). Det er en stavformet, gram negativ og fakultativt anaerob koliform bakterie (Tenailon et al., 2010). Den er kjemoheterotrof og vokser optimalt ved 37°, men kan vokse mellom 7° til 48° (Granum et al., 2015). Lettilgjengeligheten og de gode vekstegenskapene har gjort at *E.coli* har blitt forsket på i over 60 år (Tortora et al., 2010). Innen mikrobiologien kalles et isolat av en ren kultur for en

Tabell 3 Makronæringsstoffer, deres tørstoff prosent av cellen og deres funksjon (Bhatia og Ichhpujani, 2008; Merchant og Helmann, 2012)

Grunnstoff	Tørstoff (%)	Hovedfunksjon og bruksområder i mikrobielle celler
Karbon	50	Grunnlaget for alle organiske forbindelser
Oksygen	20	H ₂ O, organiske forbindelser
Nitrogen	14	Organiske forbindelser, spesielt proteiner og nukleinsyre
Hydrogen	8	H ₂ O, organiske forbindelser
Fosfor	3	Proteiner, antioksidanter, metabolitter, fosfolipider
Svovel	1	Proteiner, antioksidanter, biotin, tiamin
Magnesium	0,5	Viktig kation; kofaktor for fosfotransferase reaksjoner
Kalsium	0,5	Cellulær kation, kofaktor for visse enzymer
Jern	0,2	Hem, ikke-jern-proteiner og kofaktor for noen enzymatiske reaksjoner

stamme. *E.coli K12* er en av stammene, men er antakeligvis den stammen som man vet mest om (Riley et al., 2006). Den anses som den fremste modellorganismen. *E.coli K12* ble først isolert i 1922 og utsatt for ioniserende stråling, ultra fiolett lys og mutagener. Denne behandlingen førte til en rekke genetiske endringer som manglende F plasmid, samt manglende evne til å produsere mange av overflatestrukturene (Browning et al., 2013). Bakterien ble veldig populær på grunn av at den egner seg godt til RNA-sekvensering, men kan antageligvis også benyttes til produksjon av ECP.

3.7 Spektrofotometri

Spektrofotometri eller optical density (OD) er en metode for måling av absorban. Det gjøres ved å sende lys gjennom en prøve og måle hvor mye som trenger gjennom på den andre siden (Pavia et al., 2014). Det fins mange anvendinger for måling av OD, men i denne oppgaven skal det kun benyttes til måling av mengden mikroorganismer. Bølgelengden som benyttes for måling av mikrobiell vekst er 600nm fordi den verken skader eller minker veksthastigheten til MO (Sezonov et al., 2007). En slik måling følger prinsippet av at cellene til MO absorberer mer lys enn næring som er oppløst i prøven. Det vil si at absorbanen i prøven vil øke ved formering. En slik metode vil ikke ha muligheten til å differensiere døde og levende celler, men vil si noe om total mengde celler i væsken. Ved å måle OD med jevne intervaller og plotting av absorbanen inn i et diagram vil man få en vekstkurve. (Germer et al., 2014)

3.8 Frysedestillering

Fraksjonell frysing, også kjent som frysedestillering er en prosess som brukes for å skille stoffer med ulike smeltepunkt. Ved å la løsningen delvis krystallisere, vil stoffet med det høyeste frysepunktet krystallisere først. Disse krystallene kan deretter skilles og den gjenværende væsken eller konsentratet vil da ha høyere konsentrasjon av stoffet med lavest frysepunkt. Dette er en prosess som kan foregå begge veier. Ved å tine en blokk med for eksempel sukkerlake, vil sukkeret senke frysepunktet til vannet og derfor lekke ut først (Raventós et al., 2007). En slik prosess er mindre lønnsom enn andre konsentrasjonsmetoder som for eksempel fordamping, men vil være mye mer skånsom og gi høyere kvalitet på konsentratet på grunn av den lave prosessstemperaturen (Sánchez et al., 2009).

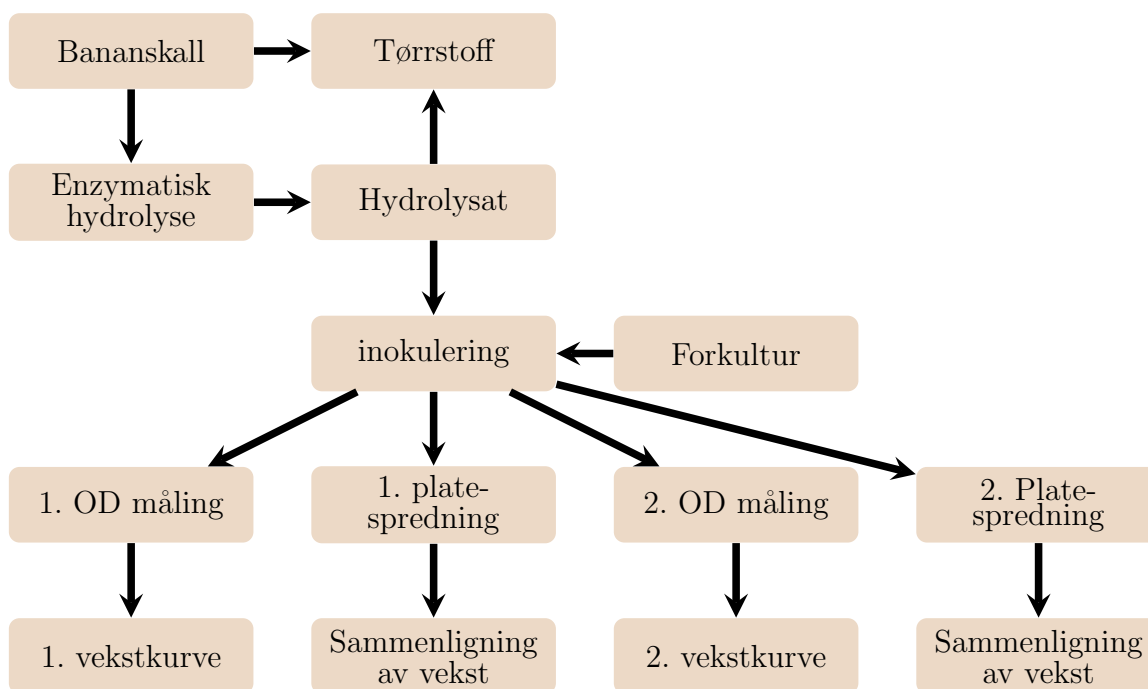
3.9 Maillardreaksjonen

Maillardreaksjoner er ikke-enzymatiske bruningsreaksjoner mellom reduserende sukker og aminosyrer, proteiner eller peptider (Frazier, 2005). Disse reaksjonene er ansvarlig for dannelsen av maillardreaksjonprodukter (MRP). Blant dem finnes mange smaks-, lukt- og fargestoffer som forekommer ved for eksempel steking av mat (Rychlik et al., 2019). Reaksjonene er ofte veldig kom-

plekse og danner titalls mellomprodukter (Nursten, 2002). Noen av mellomproduktene er også ansett som helseskadelig med akrylamid som et eksempel (Tareke et al., 2002). Disse reaksjonene kan i tillegg redusere proteinkvaliteten, binde livsviktige sporstoffer og vitaminer (Hurrell, 1990). Selv om maillardreaksjoner er ønskelig i matlaging, kan de være problematiske på mikrobiologisk laboratorium hvor prøvene må autoklaveres før inokulering kan ta sted.

4 Materiale og metode

En grov oversikt over prosessene er illustrert i figur 1 som viser alle de viktigste stegene fra råvare til endelig analyse. Forsøkene kan deles inn i fire deler: enzymatisk hydrolyse, tørrstoff, platespredning 1 og 2, og OD måling 1 og 2.



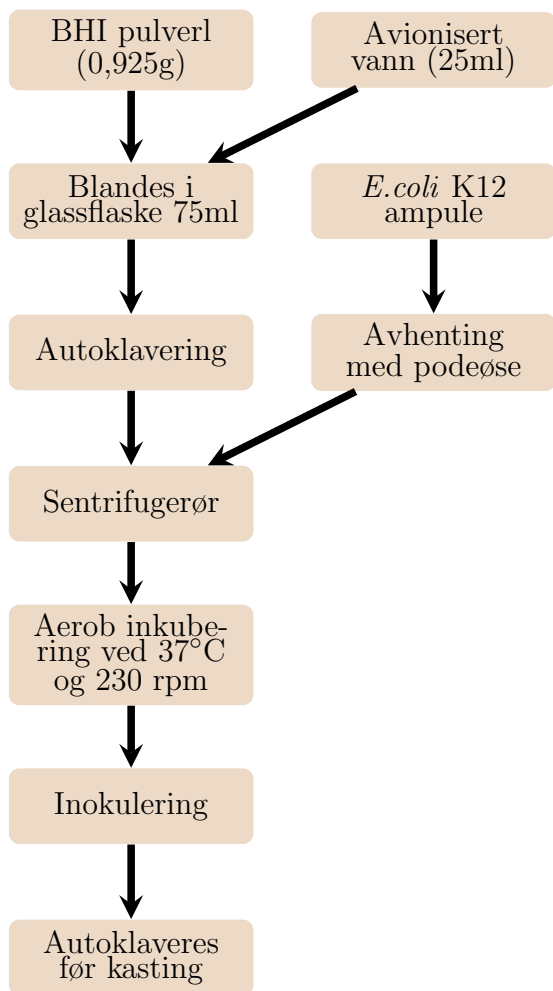
Figur 1 Flytskjema over hele forsøket

4.1 Bananskall til substrat ved bruk av enzymatisk hydrolyse

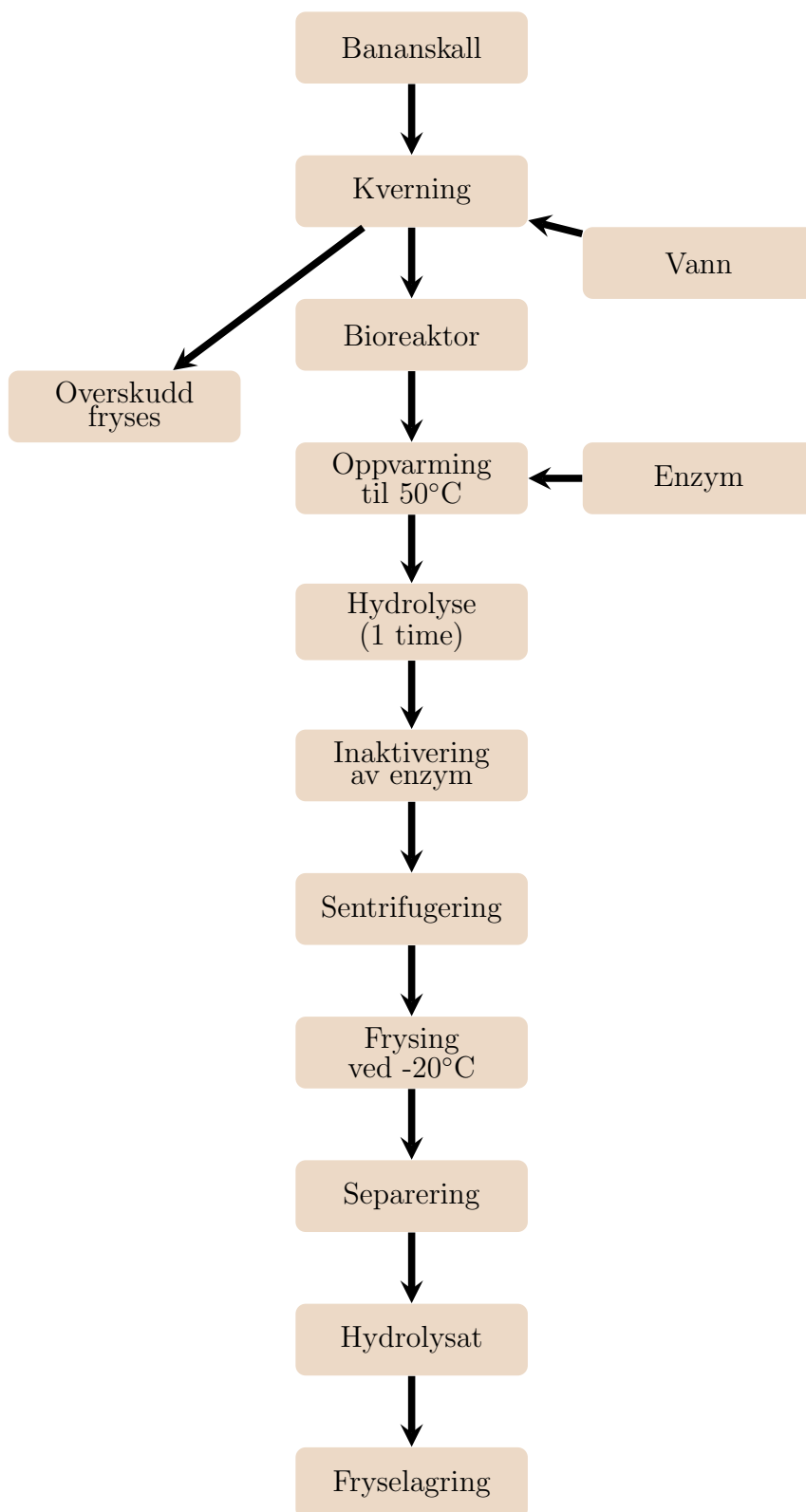
Utvinning av næringsstoffer fra matavfall kan gjøres på flere forskjellige måter (Mehta et al., 2015). Formålet i dette forsøket var å velge en enkel, billig og kontrollert prosess som gir høy utnyttelsesgrad av råvaren. Enzymatisk hydrolyse tilfredsstiller disse kravene og derfor ble den valgt. Pocan et al. (2018) beskriver metoden for hydrolyse av fruktskall og andre vegetabiliske avfallsstoffer, mens Fatmawati et al. (2017) beskriver en spesifikk prosess for etanolfermentering av bananskall, hvor hydrolyse er en del av prosessen. En kombinasjon av disse metodene ble benyttet for å oppnå en optimal prosess.

I metoden til Fatmawati et al. (2017) ble det brukt pulver av tørkede bananskall, mens Pocan et al. (2018) beskrev kverning av ferske skall. Den sistnevnte metoden var lettest å foreta og dermed ble den valgt. Videre beskrev både Pocan et al. (2018) og Fatmawati et al. (2017) at råstoff med høyt lignininnhold kan behøve basisk forbehandling, men en slik behandling ble ikke brukt i metoden for denne oppgaven på grunn av tidspress og begrenset kapasitet. I tillegg til forbehandlingen avviket også enzymene fra de overnevnte metodene. Begge metodene beskrev bruken av Celluclast® (cellulase) og Novozyme 188 (β -glucosidase), men Novozyme 188 var ikke lengre produksjon og ble derfor erstattet med enzymblandingen Sachzyme® Yeald (glucoamylase, amylase og cellulase) etter veiledning fra produsenten. Metoden beskrevet av Pocan et al. (2018) benyttet Pectinex Ultra SP-L (pektinase), men etter videre veiledning fra Novozymes ble Pectinex® XXL (pektinase) anbefalt og dermed ble det brukt i stedet for Pectinex Ultra SP-L.

Forberedelsen av forsøket begynte dagen før selve hydrolysen. Tre kilo Cavendish-bananer ble kjøpt og skrelt. Klistermerkene på bananskallet ble fjernet og bananskallene ble kuttet opp i ca. 2cm x

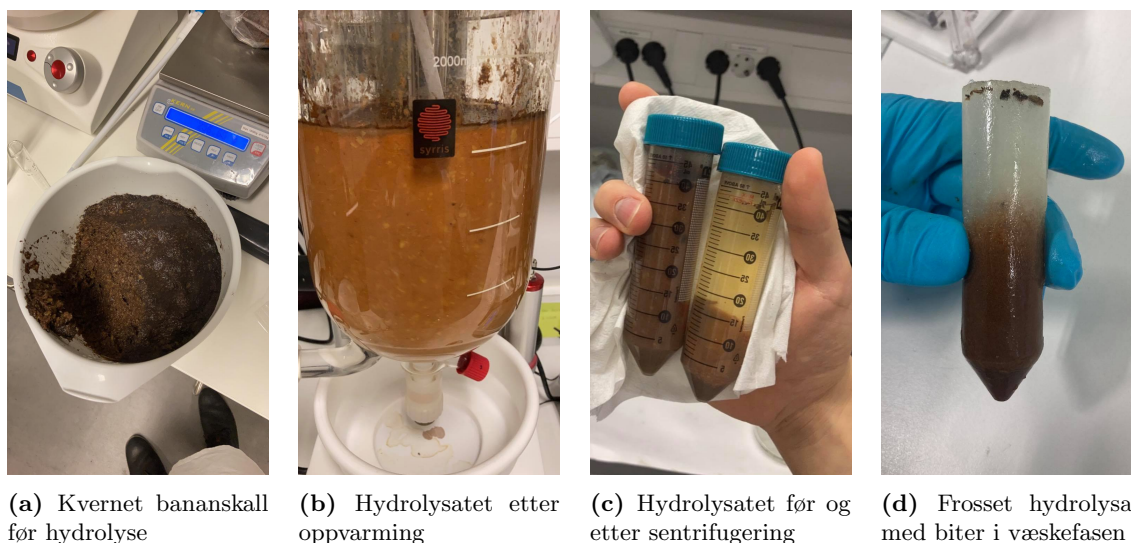


Figur 2 Flytskjema for tillaging av forkultur



Figur 3 Flytskjema for enzymatisk hydrolyse

2cm store biter. Deretter ble bitene veid (1,150kg), emballert i en frysepose og lagret i et kjøleskap ved 3°C.



Figur 4 Hydrolysatet i bioreaktor og sentrifugerør

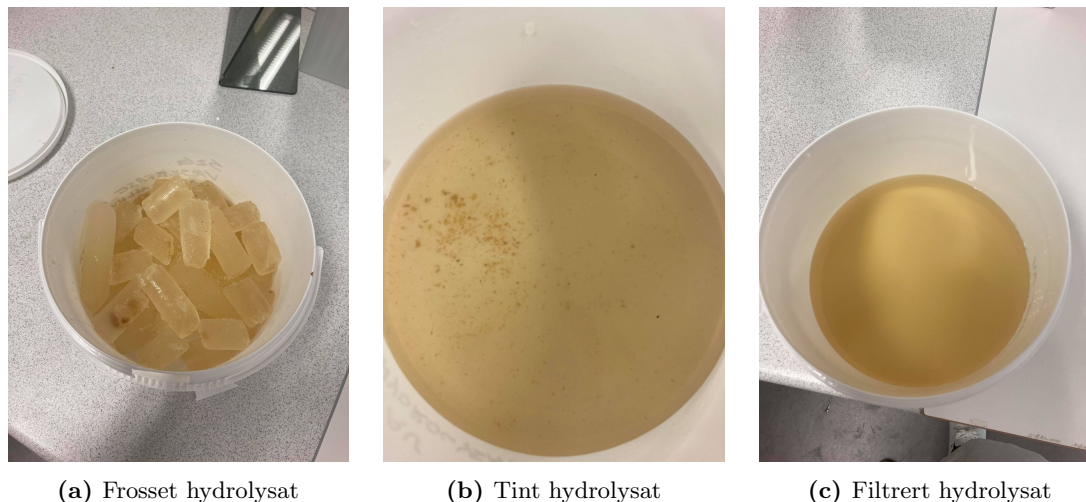
Neste dag ble bananskallene tatt ut av kjøleskapet. De var allerede blitt brune rundt kuttflatene. Bananskallene ble ført over i en homogenisator (Foss HM 297 Homogeniser) og hakket på full hastighet i 15 min med systematisk nedskraping av veggene med en silikonslikkepott. Konsistensen gikk over til en viskøs masse med få synlige små klumper. Denne massen ble fort mørkebrun under selve prosesseringen, som vist i **figur 4a**. Videre ble 800,15g av massen veid opp og ført over i en bolle. Den resterende mengden ble overført i en lynlåspose og fryst ned ved -20°C for senere bruk.

Den oppveide mengden ble tilsatt 801,31 gram avionisert vann og rørt rundt før det hele ble ført over i en bioreaktor. Bioreaktoren hadde kapasitet på to liter og var koblet til en ekstern termostat som kontrollerte temperaturen på vannet i en ytre vannkappe som omsluttet reaksjonskammeret. I tillegg var reaktoren utstyrt med termometer, pH-meter og rørverk. Vannkappen ble stilt inn på 50°C og rørverket på 300 rpm. pH ble målt fortløpende og lå stabilt på pH= 5,2-5,3. Under oppvarmingen gikk massen gjennom en fargeendring fra mørkebrun til en oransje farge, se **figur 4b**. Etter ca. 90 minutter nådde massen ønsket temperatur på 50± 0,2°C. Deretter ble det målt opp 2,67ml av Celluclast®, Pectinex® XXL og Sachzyme® Yield hver i en 10ml målesylinder. Mengden enzym tilsvarer ca. 1% av råvaren og ble brukt i den mengden etter anbefaling fra veileder. Videre ble enzymene tilsatt og nedtellingen av en time begynte. I løpet av timen ble konsistensen synlig mindre viskøs og fargen ble mørkere, pH gikk ned til 5. Når timen var omme, ble hydrolysatet tømt over i to 1l plastspann.

Spannene ble deretter satt i mikrobølgeovn ved 900W ved 30 sekunders intervaller frem til koking forekom. Dette steget var nødvendig for å inaktivere enzymene og det tok ca. 15 min før massen begynte å koke. Videre ble massen traktet opp i sentrifugerør på 50 ml og disse ble deretter sentrifugert på 9000rpm ved 20°C i 10 minutter. Den tykke mørkebrune massen skilte seg i to veldig klare faser etter sentrifugeringen, se **figur 4c**. Disse ble de satt i stativ og fryst oppreist ved -20°C.

De nedfrosne sentrifugerørene ble tatt ut etter å ha vært fryst i 12 timer. Det frosne hydrolysatet satt fast på innsiden av rørene og for å få det ut ble rørene kjapt nedsunket i varmt vann. Den solide fasen ble litt mindre definert etter nedfrysningen og det var derfor vanskelig å presist skille fasene. De ble likevel skilt ved å skjære fasene fra hverandre med skalpell. Det var ikke en synlig oljefase og dermed ble den ikke adskilt. Mange av rørene hadde små bananskallbiter som fløt på det øverste laget og måtte fjernes i tillegg, som vist i **figur 4d**. Den rengjorte og frosne væskefasen ble overført i ett plastspann se **figur 5a**, mens den solide fasen havnet i søpla som resultat av

en misforståelse. Da alle rørene var blitt tømt, fremstod innholdet fortsatt urent, se **figur 5b**, og derfor ble det filtrert gjennom glassull. Hydrolysatet var helt klart og uten synlig forurensning etter filtreringen, **figur 5c** viser det klart. Mengden ble deretter veid (755,21g) og en prøve på 10 ml ble tatt til siden mens resten ble fryst ned for senere bruk.



Figur 5 Frosset, tint og filtrert hydrolysat

4.2 Sammenligning av *E. coli* K12 sin vekst på hydrolysatet med vekst på et optimalt substrat

I dette forsøket ble brain heart infusion (BHI) valgt til å representere det optimale mediet for *E.coli* K12. For tillagingen av agar ble det brukt BHI agar fra Oxoid (CM1136). Dette mediet krever 4,7g per 100ml avionisert vann. Derfor ble 4,703g BHI agar og 100ml avionisert vann ført over i en 200ml glassflaske.

1g av BHI agaren er ren agar og resten er næringsstoffer. På grunnlag av dette ble det antatt at det måtte tilsettes 3,7g med kvernet banan, og for å oppnå ønsket gelering av mediet ble det brukt bakteriologisk agar fra Oxiod (LP0011). Produktbeskrivelsen tilsa at det var nødvendig med 1,5g agar/100ml og dermed ble det brukt 1,5g. Det ble veid opp 3,710g bananskall, 1,602g agar og 100ml avionisert vann, alt ble ført over i en 200ml glassflaske.

Tillagingen av petriskålene startet med klargjøringen av råvarene. En grov bit av den frosne og bananskallmassen ble knekt av og ført over i et 50ml målebeger. Deretter ble massen tint i et vannbad ved 50°C under manuell omrøring med et glassrør til massen var helt tint. Videre skulle massen kvernes ved bruk av en finere homogenisator, men det ble frarådet av labansvarlig på grunn av viskositeten på massen. Det ble derfor forsøkt å finmale massen med en stavmikser, men massen var for viskøs og den ble ført tilbake oppi begerglasset. Hydrolysatet som ble tatt til siden for frysingen ble benyttet i stegene videre ved tillagingen av agarplatene.

Den samme metoden ble fulgt for hydrolysat agaren, men siden det ble tilsatt en lik mengde vann som bananskall, var hydrolysatet fortynnet med 50% og derfor ble mengden hydrolysat doblet. 7,401g hydrolysat ble målt opp og ført over i en 200ml glassflaske med 92,6ml avionisert vann og til slutt tilsatt 1,506g agar.

Flaskene ble deretter ristet og autoklavert ved 121°C i 20min ved 100 kPa. Mens agaren var i autoklaven ble ni petriskåler gjort klar og markert. Etter autoklaveringen var flaskene avkjølt nok til at de var håndterlig og ble tømt over i 3 petriskåler for hver agartype, totalt 6. Dette ble gjort aseptisk ved bruk av sikkerhetsskap. Prøvene ble avkjølt i skapet uten lokk for å unngå kondens. Deretter ble agarplatene emballert og oppbevart i et inkuberingskap ved 12°C i seks døgn før de ble inokulert.

4.3 Illustrasjon av *E.coli* sin vekst på hydrolysatet

Substratet for forkulturen var flytende BHI medium (CM1135) fra Oxoid. Det samme substratet ble også brukt til den ene parallellen for måling av OD. Tillagingen av mediet fulgte produktspesifikasjonene, altså 3,7g agar per 100ml. Det ble derfor målt opp 2,22g BHI og 60ml avionisert vann som videre ble ført over i en 200ml glassflaske. Deretter ble spannet med det frosne hydrolysatet satt i vannbad på 50°C. Når hydrolysatet var delvis tint ble 100ml målt opp og fylt over på glassflaske og spannet med hydrolysatet ble fryst for senere bruk. Flasken med BHI-mediet ble ristet og autoklavert sammen med det oppmålte hydrolysatet. Fargen på hydrolysatet ble mye mørkere etter autoklaveringen, se **figur 6**.



(a) Hydrolysat før autoklavering



(b) Hydrolysat etter autoklavering

Figur 6 Hydrolysat før og etter autoklavering

Alt av inokulering ble gjort i et sikkerhetsskap klasse 2. 25ml av det autoklaverte BHI-mediet ble målt opp og ført over i et sterilt sentrifugerør. Deretter ble en ampulle med dypfrost *E.coli* K12 i glyserol åpnet og skrapet med en steril pøse frem til en synlig mengde av massen befant seg på øsen. Det ble videre rørt rundt i BHI-mediet frem til det ikke var igjen noe på øsen. Deretter ble sentrifugerøret skrudd igjen, ristet, delvis skrudd av igjen, satt i stativ og inkubert ved 37°C og 230rpm. Siden stativet og røret veide så lite, ble det slengt frem og tilbake i inkuberingsskapet. For å forhindre dette ble det brukt en vanlig brun teip, men denne mistet effekten etter ca. 20 min. Deretter ble det brukt en flaskevekt i bunnen av stativet og denne løsningen viste seg å funke bra. Forkulturen ble inkubert i 12 timer før den ble brukt i senere deler av forsøket. Når forkulturen var ferdig inkubert ble det lagt merke til at korken som tidligere var løs, da var godt skrudd på. Dette kan skyldes omrøringen.

4.3.1 Måling av OD

Videre ble 30ml av det autoklaverte hydrolysatet målt opp i en 100ml målesylinder, hvor mesteparten ble tømt inn rett fra flasken og finmålingen ble gjort ved bruk av en steril engangspipette. Dette ble gjort tre ganger og hver prøve ble markert for å holde styr på resultatene. 30 ml av det autoklaverte BHI-mediet ble også målt opp på samme måte, men ved bruk av ny engangspipette. Videre ble hver prøve tilført 0,3ml av forkulturen. Rørene ble skrudd igjen, ristet, halvveis skrudd

opp og satt i stativ i inkuberinsskap ved 37°C og 230rpm. En alarm på en time ble satt på. I mellomtiden ble 2 microkyvetter fylt med det autoklaverte hydrolysate og 2 microkyvetter ble fylt med det autoklaverte BHI-mediet for kalibrering av spektrofotometeret. Det ble også gjort klart en kyvette til hver av parallellene. Etter en time ble prøvene kjøpt tatt ut av inkuberinsskapet, hver kyvette ble fylt med tilsvarende kultur i sikkerhetsskap og kulturene ble satt tilbake i varmeskapet. Deretter ble spektrofotometeret kalibrert med tilsvarende medie før måling av OD. Resultatene for det inokulerte hydrolysate ga negative absorbansverdier, og for å sikre at de negative resultatene ikke var feil ble hydrolysateprøvene også målt etter kalibrering med avionisert vann. Dette ble gjort for 10min etter de andre prøvene i første omgang. Videre ble prosessen gjentatt hver time i totalt 8 fortløpende timer med en siste prøve etter totalt 24 timer.

4.3.2 Inokulering av agarplater og platespredning

Før inokuleringen tok sted, ble OD av forkulturen målt ved bølgelengde på 600nm for å bestemme den nødvendige fortynningsgraden for platespredningen. Ved den første målingen var OD over 1 og forkulturen ble derfor fortynnet ved å pipetere 100ul forkultur i microkyvetten sammen med 900ul avionisert vann. Væskene ble blandet ved å suge væsken inn og ut av pipetten noen ganger. Etter fortynningen var OD = 0,102 og etter omregning av konsentrasjon ble verdien OD = 1,02. OD verdien ble videre omregnet til celler/ ml på grunnlag av:

$$OD_{600}1 = 8 * 10^8 \text{celler/ml}$$

ble $8,16 \times 10^8$ celler/ ml estimer. Dette estimatet la grunnlaget for antallet fortynninger i fortynningsrekke. Det ble bestemt å fortynne opp mot 10^{-7} siden den siste fortynningen på platene vil trekke fortynningen ned mot 10^{-8} . Det ble dermed målt opp 7 reagensrør. Disse ble fylt med 9ml avionisert vann og det ble utført en fortynningsrekke. 1ml av forkulturen ble tilsatt til det første reagensrøret, lokket ble skrudd på, røret ble ristet og videre ble det målt 1ml av den nye prøven og ført over i det neste prøverøret frem til det siste røret ble nådd. De 3 siste rørene ble brukt til å inokulere agarplatene som ble tillaget tidligere. Hver plate ble inokulert med 0,1ml og hver substrat fikk en parallell av hver fortynningsgrad. Platene ble videre inkubert aerobt i 24h ved 37°C. Etter 24 timers inkuberingsstid ble platene tatt ut for analyse av vekst.

4.4 Måling og utregning av tørrstoffet til substratet

For denne analysen ble Shipley og Vu (2002) sin metode for måling av tørrstoff (TS) benyttet, men med endrede parametre etter anbefaling fra veileder. Temperaturen som ble benyttet var 105°C og tørketiden varte 24 timer. Hydrolysate og den kvernedede bananskallmassen ble først tatt ut av fryseren. Det ble også klargjort seks keramikkbeger, plastfjøl og en kniv. Deretter ble keramikkbegrene merket, veid og loggført. Videre ble bananskallmassen kuttet opp i tynne flak og 5g ble veid opp i hvert beger og vekten ble notert. Det var vanskelig å føre bananskallet i begeret og en del ble derfor skrapet av på kanten av begeret. Hydrolysate ble smeltet ved å sette hele hydrolysatspannet i vannbad på ca. 50 °C med omrøring som kom av at spannet manuelt ble ristet frem og tilbake. Når hydrolysate var fullstendig smeltet ble tre paralleller på 5g av hydrolysate veid opp. Engangspipetter ble brukt for presis oppveing. Videre ble prøvene satt i tørkeskap på 105°C over 24 timer og avkjølt i en eksikator. En time senere etter begrene og innholdet hadde blitt avkjølt ble de veid og loggført. Videre ble differansen mellom prøven før og etter utregnet og resultatet ble videre delt på startmassen.

Denne formelen ble brukt til utregningen av TS:

$$TS = \frac{M_t}{M_t + M_v} \quad (1)$$

(M_t beskriver massen av det tørre stoffet og M_v beskriver massen av vann)

4.5 Gjentaelse av inokulering og måling av OD

Denne gjentaelsen av forsøket hadde som formål å fornye resultatene for bakteriell vekst på hydrolysatet som ble mistenkt for å være feilaktige. Det ble i tillegg tenkt å gi et bedre grunnlag til sammenligning og derfor ble det tillaget to sett med paralleller av BHI med fortynnede konsentrasjoner til $TS=1,5\%$ og $TS=0,075\%$. Det ble tillaget tre paralleller på 30ml av hver BHI konsentrasjon og av hydrolysatet. Tillagingen av mediene brukte samme råvarer og fulgte samme prosess som det tidligere forsøket (se kapittel 4.3). Ved tillagingen av $1,5\%$ BHI ble 1,498g BHI veid opp, ført over i en 200ml flaske, tilført 100ml avionisert vann og ristet godt før autoklaveringen. Den samme prosedyren ble fulgt for $0,75\%$ BHI konsentrasjonen. Det ble veid opp 0,751g og målt opp 100ml avionisert vann. Videre ble det brukt samme metode for inokulering og OD måling, med unntak av den siste målingen etter 24 timer.

4.6 Gjentaelse av platespredning

Den samme metoden ble benyttet som ved forrige gjennomførelse, men bananskall agaren ble erstattet med en agar av ikke autoklavert hydrolysat. Hydrolysatet ble oppvarmet til 100°C over 10 minutter for å smelte agaren. Det autoklaverte hydrolysatet ble tillaget av 100ml hydrolysat og 1,498g bakteriologisk agar, mens det ikke autoklaverte hydrolysatet bestod av 100ml hydrolysat og 1,501g agar. I denne omgangen ble BHI agaren fortynt til å ha samme TS konsentrasjon som hydrolysatet. Denne utregningen ble fulgt for å finne riktig mengde:

$$TS_H = 3,022$$

$$C_B = \frac{3,7}{4,7}$$

$$M_B = TS_B * TS_H = 2,377g$$

$$M_{AB} = \frac{1}{4,7} * M_B = 0,506g$$

$$M_{AA} = 1 - M_{AB} = 0,494g$$

(TS_H Beskriver tørrstoffet i hydrolysatet, C_B beskriver konsentrasjonen av næring i BHI, M_B beskriver mengden BHI som er nødvendig for å få ønsket konsentrasjon, M_{AB} beskriver mengden agar i M_B og M_{AA} beskriver mengden agar som må tilføres.)

Det ble målt opp 100ml avionisert vann, 2,379g BHI og 0,495g agar. Autoklaveringen, platespredningen, lagringen og inokuleringen ble gjennomført på lik måte som ved første gjennomgangen. Ved denne prøven ble også fortynningsrekke bestemt på grunnlag av OD måling. Målingen viste $OD=1,321$ og ved omregning viste cellekonsentrasjonen seg å være $1,57 * 10^9$ celler/ml. En fortynningsrekke ble gjennomført opp til 10^{-8} .

5 Resultat

5.1 Hydrolyseforsøket

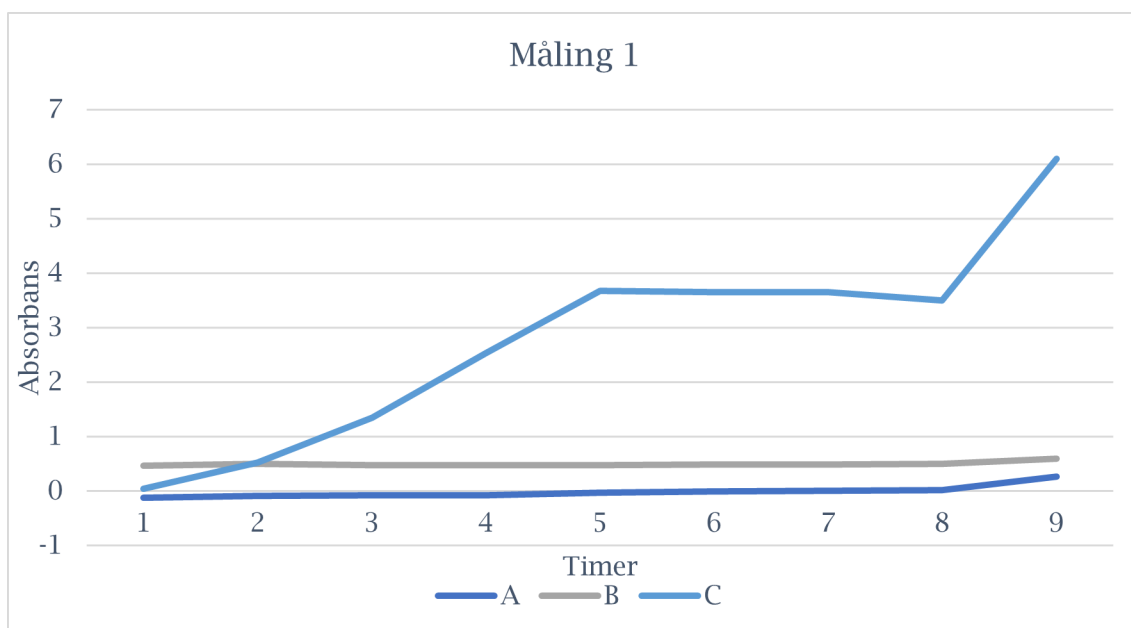
Hydrolysen ga et utbytte på 755,21g hydrolysat og en ukjent mengde solid fase av 800,15g bananskall og 801,31 avionisert vann. Hydrolysatmengden utgjorde ca. 47% av den totale massen og den solide fasen utgjorde resten.

5.2 Første målingen av OD

Tabell 4 Absorbans for prøvene ved første måling

Timer	Hydrolysat	Avionisert vann	BHI
1	0,125 ± 0,056	0,465 ± 0,058	0,038
2	0,089 ± 0,062	0,493 ± 0,049	0,522
3	0,081 ± 0,056	0,476 ± 0,061	1,341
4	0,078 ± 0,070	0,467 ± 0,069	2,530
5	0,037 ± 0,076	0,471 ± 0,068	3,670
6	0,012 ± 0,065	0,480 ± 0,069	3,650
7	0,005 ± 0,058	0,488 ± 0,065	3,650
8	0,015 ± 0,067	0,491 ± 0,067	3,500
24	0,260 ± 0,063	0,589 ± 0,061	6,100

Mange av resultatene som forekom ved den første spektrofotometriske målingen viste seg å være negative. Disse målingene er satt opp i **tabell 4**. Negative OD resultat tilsier at det kommer mer lys ut av prøven enn det opprinnelig ble sendt inn, eller at det kommer mer lys gjennom prøven enn det gjør gjennom referanseprøven som benyttes ved kalibrering og måling. En mulig feilkilde kan være klarheten av hydrolysatet. Kolloide suspensjoner eller partikler i løsningen, absorberer ikke bare lys, men kan også spenne og eksitere det fra og forvrengte målresultatet (Szkola Letnia STC - Łódź 2013). Dersom det var partikler i bunnen av flasken ville mesteparten blitt pipettert ut og fylt i referansekyvettene, men i så fall var partiklene såpass små at de ikke var synlig for det blotte øyet. Enda en mulig feilkilde kan være manglende risting før pipettering av hydrolysatet i kyvettene. De gjennomsnittlige absorbansene ble brukt i **figur 7**. Den viser godt hvor dårlig *E. coli* vokser på hydrolysatet sammenlignet med det optimale mediet.



Figur 7 Absorbans etter inokulering med *E.coli K12*. Gjennomsnittet av hydrolysat med hydrolysat som referanseprøve (A), gjennomsnittet av hydrolysat med avionisert vann som referanseprøve (B) og BHI med BHI som referanseprøve (C).

5.3 Kintall og vekst

Kimtallet var ikke tellbart på bananskallagaren. Som illustrert i **figur 8a, b og c**, kan man se at koloniene er vanskelig å se med det blotte øyet. Små kolonier lot seg se i noen områder, men ikke nok til å kunne telles. På den andre siden var hydrolysat-agaren veldig klar og ved første øyekast syntes ikke koloniene som forekom som små prikker jevnt fordelt utover overflaten. Resultatene i dette forsøket ble gjort på grunnlag av feil beregning og gir derfor ikke en god indikasjon på hvor godt *E. coli K12* vokser på hydrolysatet. Mengden som ble tilført 7,4013g hydrolysat med TS= 3,022%, det gjør ca. 5,7% av det tørrstoffet som ble tilført til referanseagaren (BHI). Utregningen ble fulgt for å finne mengden:

$$TS_H = 0,030$$

$$TS_B = 0,787$$

$$M_H = 7,041g$$

$$M_B = 4,703g$$

$$TTS_H = M_H * TS_H = 0,211(0,2\%)$$

$$TTS_B = M_B * TS_B = 3,701(3,7\%)$$

$$\%TTS_H \text{ av } TTS_B = \frac{TTS_H}{TTS_B} * 100 = 5,701(5,7\%)$$

(TS_H Beskriver tørrstoffet i hydrolysatet, TS_B beskriver TS av næring i BHI, M_H beskriver mengden hydrolysat som ble veid opp, M_B beskriver mengden BHI som ble veid opp, TTS_H beskriver totalt TS i hydrolysatet, TTS_B beskriver totalt TS i BHI og $\%TTS_H \text{ av } TTS_B$ beskriver hvor stor prosentandel TTS_H tilsvarer av TTS_B .)

Resultatene for kintall viste seg å være veldig misledende på grunn av feil beregning og i tillegg var kintallet relativt likt mellom substratene, men størrelsen på koloniene viste en klar preferanse for det optimale BHI-substratet. Som illustrert i **figur 8** kan man klart se veksten på BHI-mediet hvor

fortynningsgraden -6 og -7 er overgrodd og -8 hadde et kimtall på 73 CFU. Det samme var tilfellet for hydrolysatet. Både -6 og -7 var overgrodd, mens -8 hadde kimtall på 76 CFU. Resultatene for denne metoden hadde kun som formål å illustrere bakteriens vekst på substratene, men på grunn av feilaktig beregning og dårlig kverning av bananskallet, sier ikke resultatene så mye utover at veksten på hydrolysatet kan forekomme med ved TS =0,2%.

5.4 Tørrstoff og utbytte

TS og tallene brukt for beregningen er satt opp i **tabell 5** hvor man kan se at det grovt sett ble utvinnet en tredjedel av det totale TS. En stor andel av det gjenværende TS kan være lignin som er vanskelig å bryte ned uten en basisk forbehandling (Fatmawati et al., 2017).

Tabell 5 Resultat for måling av tørrstoff

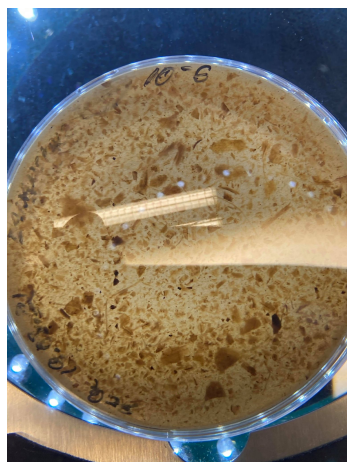
	Bananskall	Hydrolysat
Tørrstoff (g/100g)	9,1 ± 0,0	3,0 ± 0,0
Råvare (g)	800,150	755,210
Totalt tørrstoff (g)	73,123	22,823
Utbytte TS (g/100g)		31,2

5.5 Den andre OD målingen

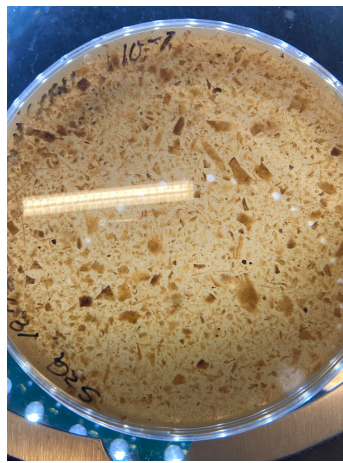
Resultatene for den andre OD målingen er illustrert i **figur 9**. Vekstkurven A viser *E. coli* K12 sin vekst på hydrolysatet, B viser BHI (0,75% TS) og C viser BHI (1,5% TS). I denne omgangen ble det brukt fortynnete konsentrasjoner av BHI som gir et bedre sammenligningsgrunnlag, men hydrolysatet har fortsatt for dårlig vekst til å konkurrere med et optimalt substrat.

5.6 Gjentakelse av platespredning

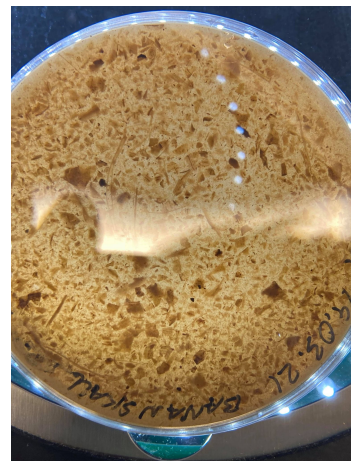
Ved denne gjennomgangen var omregningen fra OD til celler/ml ble den samme formelen brukt, men bestemmelsen for antall fortynninger var ikke helt korrekt. Dermed ble konsentrasjonen i de fortynnete løsningene høyere enn forventet, platene som hadde vekst var overgrodd. I tillegg ble forkulturen ikke spredt godt nok på overflaten av agaren, det var synlig på merkene som ble igjen på agaren. Resultatene for denne platespredningen varierte litt fra første gjennomførelse. Platene med det autoklaverte hydrolysatet viste ingen tegn på vekst uavhengig av inokuleringskonsentrasjonen. Det ikke autoklaverte hydrolysatet viste vekst ved -6 og -7, men ikke ved -8. Sammenlignet med den fortynnete BHI agaren, var koloniene mye mindre. Det som forekom av vekst fremstilte et tynt lag med bakteriell vekst i stedet for synlige kolonier. Som forventet var koloniene på den fortynnete BHI agaren mindre enn på agaren med høyere BHI-konsentrasjonen ved forrige gjennomgang. Bildene av agarskålene etter inkubering er satt opp i **figur 10**, men resultatene er lite synlige på grunn av kondens.



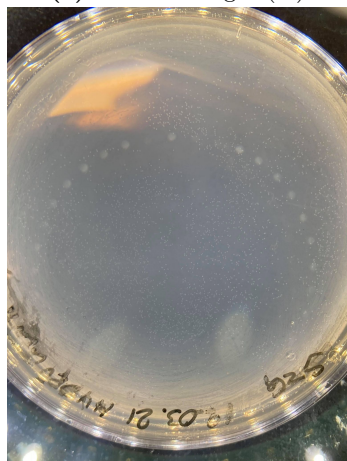
(a) Bananskallagar (-6)



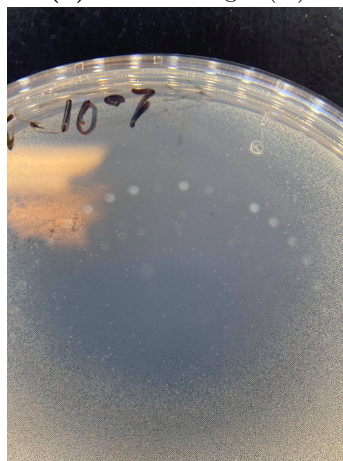
(b) Bananskallagar (-7)



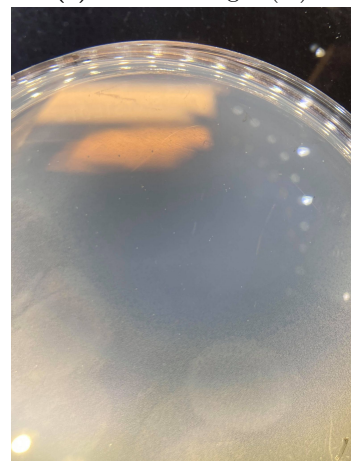
(c) Bananskallagar (-8)



(d) Hydrolysataagar (-6)



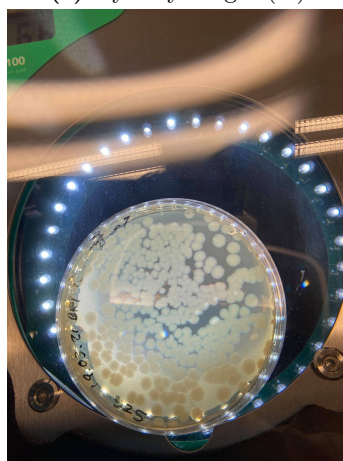
(e) Hydrolysataagar (-7)



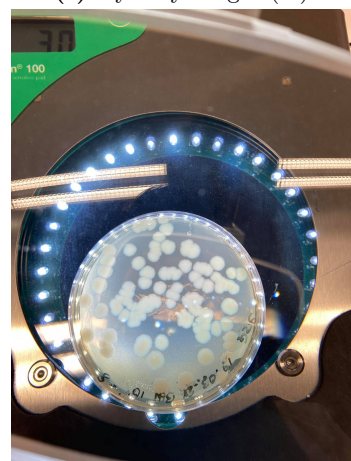
(f) Hydrolysataagar (-8)



(g) BHIagar (-6)

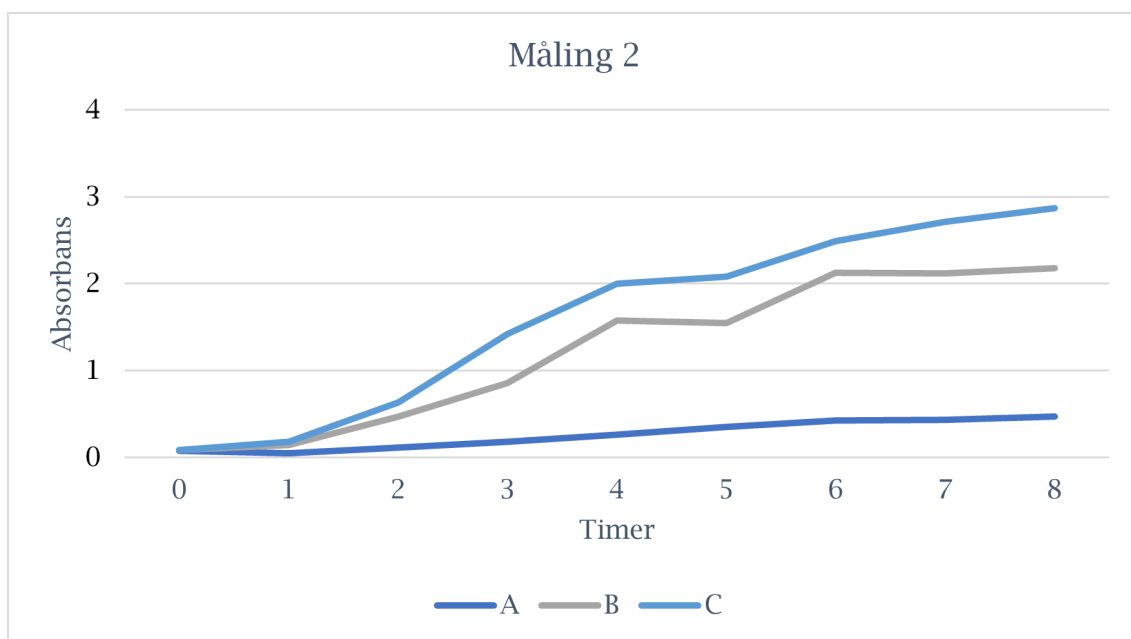


(h) BHIagar (-7)



(i) BHIagar (-8)

Figur 8 Første platespredning: agarskålene etter inkubering



Figur 9 Absorbans etter inokulering med *E.coli* K12. A, gjennomsnittet av hydrolysat parallellene med hydrolysat som referanse; B, gjennomsnittet av BHI (0,75% TS) med BHI (0,75% TS) som referanse; C, gjennomsnittet av BHI (1,5% TS) parallellene med BHI (1,5% TS) som referanse

6 Diskusjon

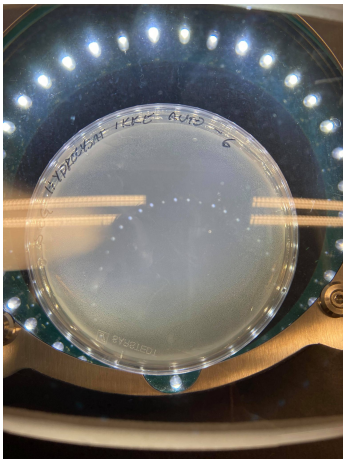
6.1 Problemer med foredling av bananskall til et substrat

Ved gjennomføringen av den enzymatiske hydrolysen av bananskallet, ble det utvinnet 755,21g hydrolysat av 800,15g bananskall og 801,31g avionisert vann. Hydrolysatmengden utgjorde ca. 47% av den totale massen og den solide fasen stod for resten. Den solide fasen ble lagt til side og kastet fordi den ble ansett som uviktig for resten av forsøket, men den kunne blitt brukt til å måle hvor mye TS som var igjen i den solide fasen i tillegg til å måle det totale utbyttet. Det var vanskelig å kverne bananskallet til en fullstendig homogen masse og synlige biter av bananskallet kom frem etter at bananskallmassen ble blandet med avionisert vann. I tillegg gikk en liten mengde av massen tapt under overføring over til bioreaktoren. Dårlig kverning gir enzymene verre tilgang og senker effektiviteten av spaltingen og vil også redusere utbyttet.

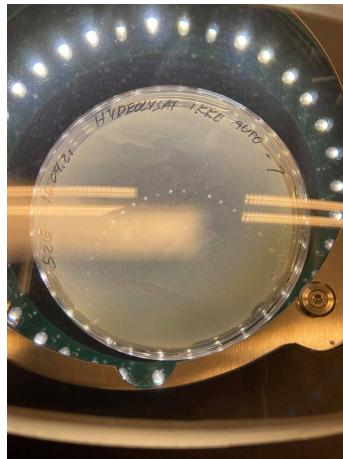
Pocan et al. (2018); Fatmawati et al. (2017) anbefalte en basisk forbehandling av bananskallet før hydrolysen for å bedre spalte lignin og for å bedre utbyttet. En slik forbehandling ble ikke benyttet i dette forsøket, men det er et mulig forbedringspunkt. I tillegg kunne det vært gunstig å gjennomføre en bedre kverneprosess eller å tørke, kverne og sile bananskallene for å oppnå et uniformt pulver. Den sistnevnte metoden ble benyttet av Fatmawati et al. (2017) og virker også enklere å gjennomføre enn kverning av ferske bananskall. I tillegg kunne det gitt et bedre utbytte å filtrere hydrolysatet før sentrifugeringen siden fasene gikk over hverandre under frysingen. Det er mulig at en stor mengde gikk hydrolysat ble med den solide fasen på grunn av akkurat dette.

6.2 Tørrstoffet av hydrolysatet

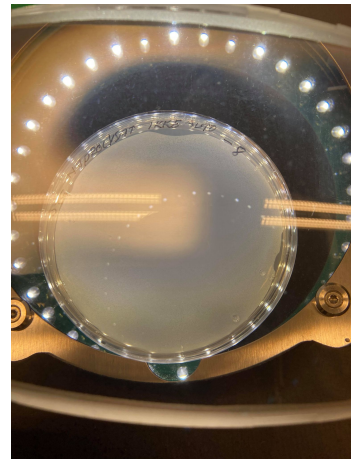
Tørrstoffet av hydrolysatet viste seg å være ca. 3%, mens selve bananskallet hadde tørrstoff på ca. 9%. Basert på resultatene i tabell 5 ble ca. 23g av 73g TS i bananskallet utvinnet. Det vil si at hydrolysen klarte å utvinne 31,2% av TS i bananskallet. Sammenlignet med resultatene til Tewari et al. (1986) som fikk utbytte på 28,3% , kan det anses som et godt resultat. Det må likevel tolkes



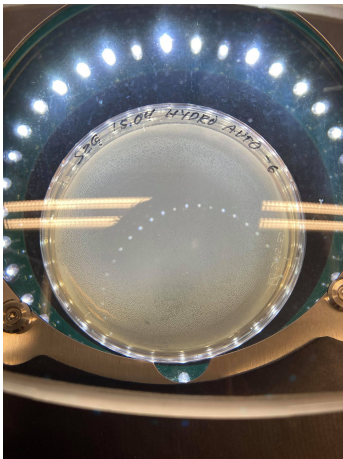
(a) Varmebehandlet hydrolysatagar (-6)



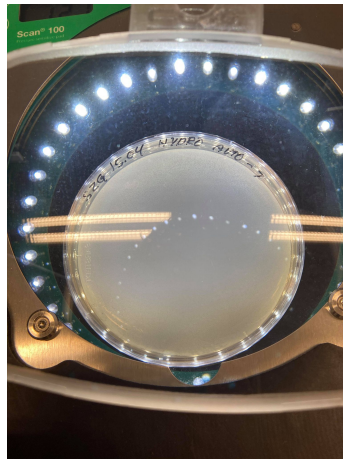
(b) Varmebehandlet hydrolysatagar (-7)



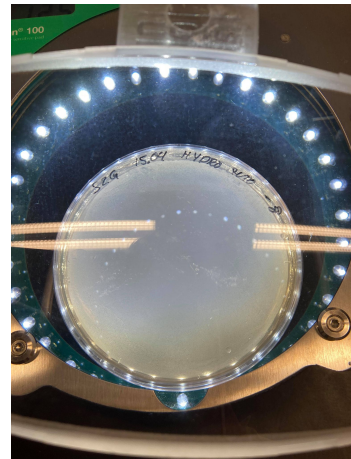
(c) Varmebehandlet hydrolysatagar (-8)



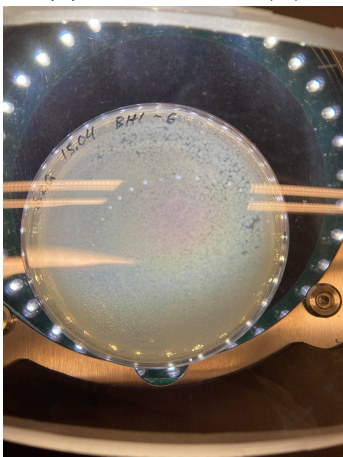
(d) Hydrolysatagar (-6)



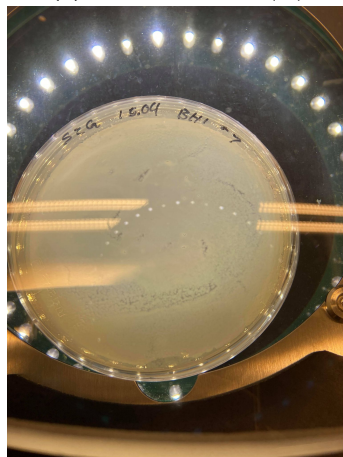
(e) Hydrolysatagar (-7)



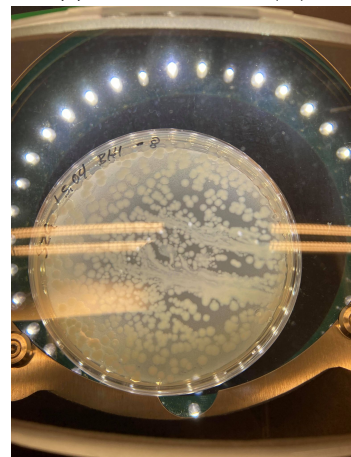
(f) Hydrolysatagar (-8)



(g) Fortynnet BHI-agar (-6)



(h) Fortynnet BHI-agar (-7)



(i) Fortynnet BHI-agar (-8)

Figur 10 Andre platespredning: agarskålene etter inkubering

kritisk med tanke på metoden som ble brukt i artikkelen. Tewari et al. (1986) dyrket opp egen cellulase i stedet for å benytte kommersielle enzym. I tillegg ble det kun brukt cellulase i motsetning til de tre enzymblandningene som ble benyttet i forsøket for denne oppgaven. Nyere kilder omtaler mer avanserte målingsmetoder som mengde reduserende sukker per liter og gjenværende cellulose, lignin og hemicellulose i massen (Pocan et al., 2018; Palacios et al., 2017). Ved planleggingen av forsøket ble målingen av sukkerinnholdet i hydrolysatet vurdert, men etter mange samtaler med flere veiledere ble det konkludert med at det ville være for dyrt og tidskrevende til å gjennomføre på enmannshånd. Ved en ny gjennomføring kunne det vært ønskelig å gjennomføre mer omfattende analyser av ikke bare sukkerinnholdet, men også næringsinnholdet i hydrolysatet.

Ved gjennomførelsen av forsøkene ble hydrolysatet fryselagret i et stort plastspann. Dette spannet ble satt i vannbad når det var behov for hydrolysat. Ofte ble det kun delvis smeltet før den smeltede massen ble tappet av. Det er en mulighet for at en form for frysedestillering oppstod ved gjentakelse av delvis tining og avtapping av det smeltede hydrolysatet. Ved gjentakelse av forsøket er det viktig å la hydrolysatet smelte fullstendig før det tappes for å gi mer sikkerhet rundt innholdet i hydrolysatet. I tillegg kan det være fornuftig å fordele det utover flere små beholdere som for eksempel sentrifugerør for å unngå oppvarming og nedkjøling av hele hydrolysat mengden hver gang det skal tappes. Dersom en form for frysedestillering oppstod er det likevel ukjent hva som ble oppkonsentrert eller fortynnet siden komposisjonen til hydrolysatet er ukjent.

6.3 Resultatene for platespredning

Ved den første platespredningen var det forventet at *E. coli* kom til å vokse godt på alle mediene. Resultatene var veldig uforventet siden *E. coli* vokste mye bedre på BHI-mediet enn på hydrolysatet. I tillegg var det ikke mulig å lese resultatene på bananskallagaren som var veldig mørkt med mange bananskallbiter. Det viste seg like etter inkuberingen at utregningene som ble brukt for tillagingen av agaren ikke var korrekt. Det ble ikke betraktet at bananskall består av ca. 80% vann og at hydrolysatet hadde et tørrstoff på ca. 3%. Derfor tilsier ikke resultatene noe annet enn at *E. coli* k12 vokste bedre på BHI agar (3,7% TS) enn på hydrolysat agar (0,02% TS). For å komme med et bedre resultat ble det konkludert med at en ny gjennomføring av forsøket var nødvendig. Gjentakelsen av forsøket benyttet agar med BHI, autoklavert hydrolysat og kun varmebehandlet hydrolysat, alle med TS på 3%. Grunnen til at bananskallagaren ble erstattet med varmebehandlet hydrolysatagar er at maillardreaksjonen var tenkt å ha en innvirkning på resultatene. Ved den nye platespredningen ble agarplatene med vekst overgrodd. Det skyldes mest sannsynlig for lav fortynningsgrad av forkulturen som ble brukt til inokuleringen. I dette forsøket ble det kun sett på grad av vekst og ikke kimtall så det hadde ikke en stor innvirkning, men gjorde det vanskeligere å se eventuell vekst. Denne gangen var det null synlig vekst på det autoklaverte hydrolysatet, mens det varmebehandlede hydrolysatet viste vekst, men i mye mindre grad enn på BHI.

6.4 Resultatene for OD

Ved den første OD målingen var mange av resultatene negative. Det betyr at referanseprøven absorberer mer lys enn hoved prøven. Grunnen til et slikt utfall er vanskelig å presisere, men det er mulig at referanseprøven til hydrolysatet var forurenset. Det er også mulig at filtreringen av hydrolysatet gjennom glassull ikke var tilstrekkelig og at kontaminanter slapp gjennom. Hydrolysatet var klart uten synlige partikler, men det er likevel en mulighet. En annen årsak til forurensning kan være denaturering og utfelling av proteiner i løsningen. Dette kan forekomme ved varmebehandling av løste proteiner (UIO, 2011). Utfelte proteiner vil sedimentere og kan derfor lett pipetteres fra bunnen. Siden referanseprøvene ble pipettert opp først, er det sannsynlig at eventuell forurensning i hydrolysatet ble overført i de i høyere konsentrasjon enn resten av prøvene som ble tatt i etterkant. Denatureringen kunne ha skjedd under autoklaveringen av hydrolysatet. Dersom en stor andel utfelte proteiner havnet i referanseprøven, kunne det medført negative verdier. I tillegg vil kolloidale løsninger absorbere lys, spenne og forvrengte det (Lisik og Sidziako, 2013). Slike feilkilder

kan gi veldig ujevne resultater. Uavhengig av de negative verdiene viste hydrolysatprøvene svært lav økning i absorbanse utover målingene. Absorbansen var også veldig lav med avionisert vann som referanse og verdiene ble bare forflyttet, men lå for det meste parallelt med de som benyttet hydrolysatet som referanse. BHI (3,7% TS) ble brukt som sammenligningsgrunnlag, men absorbansen på hydrolysatet var så lav at den nesten var flatet ut i sammenligning. TS til hydrolysatet var enda ikke kjent ved denne målingen og derfor ble veksten sammenlignet med den anbefalte TS konsentrasjonen til BHI. Det eneste som kan konkluderes på grunnlag av disse resultatene er at *E. coli* K12 vokser mye verre på bananskallhydrolysat (3% TS) enn på BHI (3,7% TS)

Etter uforutsette resultat ble oppnådd ved første målingen, ble en gjentakelse av målingene gjennomført. Denne gang med to fortynnede referanseprøver for bedre sammenligningsverdier. Resultatene var positive ved denne omgangen og høyere enn den første gjennomføringen, men fortsatt veldig lave. Veksten av *E. coli* K12 på hydrolysatet (3% TS) var opp mot fire ganger lavere etter åtte timer enn BHI (0,75% TS). Det indikerer at hydrolysatet ikke tilfredsstillende *E. coli* K12 sine vekstkrav eller at det inneholder noe som inhiberer veksten. Ved en repetisjon av forsøket kunne det vært spennende å sett vekst på ikke autoklavert hydrolysat.

6.5 Mulige årsaker for den dårlige veksten

Den dårlige veksten på hydrolysatet kan skyldes mange faktorer. Den første mulige årsaken er at hydrolysatet mangler noen makro- og/eller mikronæringsstoffer som i retur ville begrenset veksten. Som beskrevet i 3.5.1 har MO behovet for en rekke makronæringsstoffer og ved underskudd av en eller flere av disse vil veksten hemmes og til og med inhiberes. Siden det ikke ble gjort ytterligere målinger av hydrolysatets innhold, ble det ikke utført analyser som gir nok grunnlag til å konkludere nærmere.

I tillegg kunne frysdestillering hatt en påvirkning på de senere forsøkene som inkluderer måling av TS, gjentakelse av OD og gjentakelse av platespredning. Resultatene fra disse forsøkene avviker litt fra de første gjennomgangene og det underbygger sannsynligheten for at hydrolysatet endret seg fra forsøk til forsøk. Det er svært mulig at konsentrasjon eller fortykning av enkelte stoffer som for eksempel: sukker, tanniner, fenoler og proteiner forekom etter prinsippet beskrevet i 3.8. Det er vanskelig å konkludere noe, men forskjellige oppløste stoffer vil endre frysepunktet i forskjellig grad. På grunnlag av dette er det veldig usikkert hvor mye av tørrstoffet som opprinnelig var i hydrolysatet. Det er heller ikke mulig å si noe om komposisjonen av tørrstoffet etter hydrolysen eller ved siste forsøk. Resultatene for den siste OD målingen samsvarer ikke helt med den siste platespredningen da OD målingene viste bedre vekst ved ny gjennomføring, men platespredningen viste verre vekst enn ved det første forsøket. Det er derfor usikkert om frysdestillering spilte en stor rolle i resultatene.

En annen årsak kan være maillardreaksjonen. Mesteparten av TS i hydrolysatet var tenkelig sukker, med spor av oppløste proteiner/ aminosyrer. Som beskrevet i 3.9 kan reduserende sukker binde seg med aminosyrer, proteiner og peptider. Dette vil medføre reduksjon av tilgjengelige næringsstoffer, men også danne MRP. Einarsson et al. (1983) beskriver at MRP har en antimikrobiell effekt, noe som samsvarer godt med resultatene fra gjentakelsen av platespredningen hvor veksten av *E. coli* ikke var merkbar på det autoklaverte hydrolysatet, men var veldig synlig på hydrolysatet som kun har blitt varmebehandlet. Det er ukjent om maillardreaksjonen forekom under varmebehandling av hydrolysatet til 100°C, men det kan være spennende å undersøke. Hydrolysatet måtte varmebehandles siden det var nødvendig for å smelte agaren, men det kunne ha vært interessant å måle OD av hydrolysat uten noen form for varmebehandling. En utfordring ville vært å finne en steriliseringsmetode som ikke ville påvirket næringsinnholdet.

I følge litteraturen kan tannin- og fenolinnholdet også være årsaken til den dårlige veksten av *E. coli* på hydrolysatet. Chabuck et al. (2013) beskriver at bananskallekstrakt har en antimikrobiell effekt som påvirker veksten til en rekke MO, men ikke *E. coli*. Det var opprinnelig en av de avgjørende

grunnene for valget av *E. coli* til forsøket. Mot slutten av oppgaveskrivingen ble det oppdaget at Aboul-Enein et al. (2016) omtaler et lignende forsøk, men kommer til en annen konklusjon, altså at tannin- og fenolinnholdet i bananskallet har en antimikrobiell effekt mot *E. coli*. Metoden til Aboul-Enein et al. (2016) benyttet etanol og aceton til å utvinne bananskallekstraktet, mens Chabuck et al. (2013) benyttet koking i vann som metode for utvinningen av bananskallekstraktet. Det kan derfor være mulig at metoden til Aboul-Enein et al. (2016) er mer effektiv til å utvinne de vekstinhiberende stoffene. Det medfølger også en del usikkerhet siden det ble benyttet en enzymatisk hydrolyse til å danne hydrolysatet og det ble ikke benyttet etanol eller aceton til å utvinne tanninene eller fenolene. Det er likevel mulig at hydrolysen ekstraherte nok av de vekstinhiberende stoffene til å ha effekt på *E. coli* sin vekst. Det kan ikke sies noe om innholdet av disse stoffene i hydrolysatet siden det ikke ble utført flere analyser av disse, men det kunne vært spennende å utføre slike målinger ved en ny gjennomgang. Måling av antimikrobiell effekt av hydrolysatet kan være den billigste og enkleste måten å finne ut om bananskallet inhiberer vekst av *E. coli*.

En annen mulighet kan være forurensning av skallene. Den mest sannsynlige forurensningen er sprøytemidler. Først ble det tenkt at chlorpyrifos som brukes på bananen kunne være årsaken Wilson og Otsuki (2002); Diepens et al. (2014). Det beskytter plantene ved å angripe nervesystemet til insekter ved å inhibere acetylkolinesterase enzymet (Wilson og Otsuki, 2002). Siden det ikke ble funnet noe litteratur som beskriver chlorpyrifos sin effekt på MO og heller ikke bruken av bakteriedrepende midler på bananen, kan det ikke antas at det var årsaken for den dårlige veksten av *E. coli*. I følge MacLachlan (2006) er det i overkant av 50 forskjellige sprøytemidler som brukes på bananplanten. Sprøytemidlene benyttes i all hovedsak for å beskytte planten mot insekter og dyr, men det kan også være mulig at rester av disse sprøytemidlene kan inhibere *E. coli* sin vekst. Bananskallene ble ikke vasket i forkant av hydrolysen, så det er en mulig årsak, men trenger videre undersøkelse.

Den siste grunnen er også den som byr på lettest løsning, altså valg av MO. Det er mulig at det er rett og slett *E. coli* som er problemet. Deler av Tewari et al. (1986) sin metode ble benyttet for hydrolysen i dette forsøket og veldig mye er likt. I stedet for å dyrke *E. coli* dyrker han gjær for alkoholfermentasjon. Det nevnes ingenting om problemer med vekst i artikkelen og det kan derfor tenkes at gjær er mer resistent til de vekstinhiberende stoffene/ mangelen på makrostoffet *E. coli* virker å reagere på. Ved en ny gjennomføring kunne det vært spennende å benytte andre bakterier og gjær. Som nevnt i 3.3 er det mulig å benytte celler av de fleste mikroorganismene til matproduksjon så lenge de ikke forårsaker skade eller ubehag ved konsum.

6.6 Kan bananskall og *E. coli* K12 brukes til produksjon av ECP?

Basert på resultatene funnet i denne oppgaven, kan bananskall og *E. coli* K12 brukes til produksjon av ECP. Ved gjennomføringen av forsøkene forekom det vekst av *E. coli* K12 på bananskallhydrolysatet under alle forsøkene. Selv om det er mulig, betyr det ikke nødvendigvis at det er lønnsomt eller gjennomførbart med tanke på utbytte, da veksten som forekom var veldig lav. For å gjøre produksjon av ECP på bananskall til en virkelighet må produksjonsprosessen vise mye høyere utbytte enn det som har blitt vist i dette forsøket. Det var opprinnelig planlagt å måle utbytte av ECP fra 100ml hydrolysat, men etter resultatene for den første OD målingen kom var det klart at det ikke kom til å være mulig å produsere en målbar mengde ECP. Det er nødvendig å gjennomføre flere undersøkelser før bananskallet kan forkastes som substrat, men det er klart at veksten, slik den forekom i denne oppgaven, ikke tilfredsstillende produksjonsbehovet for en oppskalering.

7 Konklusjon

Utførelsen av hydrolyseforsøket hadde noen mangler og en rekke med mulige forbedringsområder, men det ble likevel utvunnet 755,21g hydrolysat med TS på ca. 3% (ca. 23g) av 800,15g bananskall som hadde TS på ca. 9% (ca. 73g). Det tilsvarer et totalt utbytte på 31,2%. Utbyttet til hydrolysen kan forbedres ved å benytte basisk forbehandling og bedre kverning eller bruk av bananskallpulver. I tillegg kan filtrering av hydrolysatet før sentrifugeringen være gunstig.

Den først platespredningen ble gjort på grunnlag av feil beregning. Så det eneste som kan konkluderes ut i fra det er at *E. coli* K12 vokser dårligere på bananskallhydrolysatagar (0,02% TS) enn på BHI-agar (3%). Det var ikke mulig å se kolonier på bananskallagaren. Ved den andre gjennomføringen var veksten på ikke autoklavert hydrolysatagar høyere enn på den autoklaverte bananskallagaren, som ikke viste noe synlig vekst. På grunnlag av disse resultatene kan det konkluderes at varmebehandling av hydrolysatet har en negativ effekt på vekst av *E. coli* K12. Maillardreaksjonen er en mulig forklaring, men nøyere analyser er nødvendig for å konkludere nærmere.

Ved den første OD målingen ble resultatene for *E. coli* K12 sin absorbans på hydrolysatet negative. Dette skal egentlig ikke skje og dermed kan det tenkes at referanseprøven var forurenset og at den absorberte mer lys enn den inokulerte prøven. Selv om resultatene var negative for det meste av forsøket ble det likevel en økning i absorbans som tyder på vekst, men denne veksten var så lav at det eneste som kan konkluderes er at *E. coli* K12 sin vekst på bananskallhydrolysat (3% TS) var betraktelig lavere enn på BHI (3,7% TS). Det er mulig at filtreringen ikke fjernet alle partiklene eller at det oppstod utfelling av proteiner under autoklaveringen og at disse ble med i referanseprøven. Det er selvfølgelig ukjent og kan ikke sies med sikkerhet.

Den andre OD målingen viste bedre resultat, men veksten til *E. coli* K12 viste seg å være ca. 4 ganger høyere etter 8 timer på fortynnet BHI (0,75% TS) enn på ufortynnet hydrolysat (3% TS). Dette tyder på at hydrolysatet ikke tilfredstiller *E. coli* K12 sine vekstkrav. På grunnlag av resultatene kan det konkluderes med at *E. coli* K12 vokser mye dårligere på bananskallhydrolysat (3% TS) enn på fortynnet BHI (0,75% TS). Den ledende årsaken for den dårlige veksten er autoklavering som ga negativ effekt på vekst, men veksten på det agaren som kun var varmebehandlet var også mye verre enn på BHI av samme konsentrasjon. Derfor tenkes det at det er andre faktorer som bidrar. Tannin og fenolinnholdet i bananskallet kan inhibere vekst av *E. coli* og mulige kontaminasjoner på bananskallet som sprøytemidler kan være skyldige i den lave veksten, men ingenting kan sies med sikkerhet før ytterligere analyser utføres.

8 Videre arbeid

Fremtidig arbeid i denne retningen vil behøve en grundigere gjennomføring av hydrolysen og flere analyser. Det kan også være fornuftig å benytte flere forskjellige mikroorganismer til forsøkene, da det kan hende at gjær egner seg bedre enn bakterier. Videre kan hydrolysatets antimikrobielle effekt testes på de valgte mikroorganismene, både varmebehandlet og autoklavert. Dette vil gi en indikasjon på om den dårlige veksten skyldes vekstinhiberende stoffer eller manglende næring og hvilke mikroorganismer som påvirkes av disse stoffene/ manglende næringen. I tillegg vil det si noe om varmebehandlingen utilgjengeliggjør næring eller om det danner vekstinhiberende stoffer.

Dersom varmebehandlingen viser seg å binde næring eller å danne vekstinhiberende stoffer kan en alternativ steriliseringsmetode benyttes før veksten måles på nytt på hydrolysatet. Om varmebehandlingen ikke gir noe særlig utslag kan det være spennende å måle tannin og fenolinnholdet i hydrolysatet og se effekten den mengden har på MO. Forskjellen mellom hydrolysat av vaskede og uvaskede bananskall kan også testes for å se om kontaminasjon av kjemikalier eller sprøytemidler er årsaken for den lave veksten.

Bibliografi

- Aarnes, H. (2018). pektin – Store norske leksikon. <https://snl.no/pektin>. Hentet 16. Mars 2021.
- Aboul-Enein, A. M., Salama, Z. A., Gaafar, A. A., Aly, H. F., Abou-Elella, F., og Ahmed, H. (2016). Identification of phenolic compounds from banana peel (*musa paradaisica* l.) as antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(4):46–55.
- Adedayo, M., Ajiboye, E., Akintunde, J., Odaibo, A., et al. (2011). Single cell proteins: as nutritional enhancer. *Adv Appl Sci Res*, 2(5):396–409.
- Adjei, A. A., Yamamoto, S., og Kulkarni, A. (1995). Nucleic acids and/or their components: a possible role in immune function. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 41(1):1–16.
- Ahmad, T. og Danish, M. (2018). Prospects of banana waste utilization in wastewater treatment: A review. *Journal of environmental management*, 206:330–348.
- Badger, P. et al. (2002). Ethanol from cellulose: a general review. *Trends in new crops and new uses*, 14:17–21. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Belafi-Bako, K. (2015). *Pectin Hydrolysis and Membrane Operations*, sider 1–2. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bhatia, R. og Ichhpujani, R. (2008). Nutrition and Growth of Bacteria. I *Essentials of Medical Microbiology*, sider 22–22.
- Bøhmer, E. (2019). cellulose – Store norske leksikon. <https://snl.no/cellulose>. Hentet 16. Mars 2021.
- Bokulich, N. A. og Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2):157–172.
- Browning, D. F., Wells, T. J., França, F. L. S., Morris, F. C., Sevastyanovich, Y. R., Bryant, J. A., Johnson, M. D., Lund, P. A., Cunningham, A. F., Hobman, J. L., May, R. C., Webber, M. A., og Henderson, I. R. (2013). Laboratory adapted escherichia coli k-12 becomes a pathogen of caenorhabditis elegans upon restoration of o antigen biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 87(5):939–950.
- Chabuck, Z. A. G., Al-Charrakh, A. H., Hindi, N. K. K., og Hindi, S. K. K. (2013). Antimicrobial effect of aqueous banana peel extract, iraq. *Res. Gate. Pharm. Sci*, 1:73–5.
- Cooney, C., Rha, C., og Tannenbaum, S. (1980). Single-cell protein: engineering, economics, and utilization in foods. I *Advances in food research*, volume 26, sider 1–52. Elsevier.
- Da Silva, G. J. og Domingues, S. (2017). We are never alone: living with the human microbiota. *Front Young Minds*, 5:35.
- Des Gachons, C. P. og Breslin, P. A. (2016). Salivary amylase: digestion and metabolic syndrome. *Current diabetes reports*, 16(10):1–7.
- Diepens, N. J., Pfennig, S., Van den Brink, P. J., Gunnarsson, J. S., Ruepert, C., og Castillo, L. (2014). Effect of pesticides used in banana and pineapple plantations on aquatic ecosystems in costa rica. *Journal of environmental biology*, 35(sp. issue):73–84.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., og Hemicellulose, T. (2005). Polysaccharides i. *Adv Polym Sci*, 186(1):67.
- Einarsson, H., Snygg, B. G., og Eriksson, C. (1983). Inhibition of bacterial growth by maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(5):1043–1047.
- El-Din, G. A., Amer, A., Malsh, G., og Hussein, M. (2018). Study on the use of banana peels for oil spill removal. *Alexandria engineering journal*, 57(3):2061–2068.
- Every Crumb Counts (2018). Joint food wastage declaration ‘every crumb counts’. <http://www.everycrumbcounts.eu>. Hentet 25. April 2021.
-

-
- Fatmawati, A., Gunawan, K. Y., og Hadiwijaya, F. A. (2017). Hydrolysis of alkaline pretreated banana peel. I *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, volume 273, side 012011. IOP Publishing.
- Fernandes, P. (2018). Enzymatic processing in the food industry. I *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- FN-sambandet (2021). Utrydde sult. <https://www.fn.no/om-fn/fns-baerekraftsmaal/utrydde-sult>. hentet 17. Mars 2021.
- Frazier, R. (2005). Capillary electrophoresis — food chemistry applications. I Worsfold, P., Townshend, A., og Poole, C., editors, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, sider 374–381. Elsevier, Oxford, second edition edition.
- Germer, T. A., Zwinkels, J. C., og Tsai, B. K. (2014). Chapter 2 - theoretical concepts in spectrophotometric measurements. I Germer, T. A., Zwinkels, J. C., og Tsai, B. K., editors, *Spectrophotometry*, volume 46 of *Experimental Methods in the Physical Sciences*, sider 11–66. Academic Press.
- Giri, S. S., Jun, J. W., Sukumaran, V., og Park, S. C. (2016). Dietary administration of banana (*musa acuminata*) peel flour affects the growth, antioxidant status, cytokine responses, and disease susceptibility of rohu, *labeo rohita*. *Journal of immunology research*, 2016.
- Glazer, A. N. og Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press.
- Granum, P. E., Rørvik, L. M., Aspholm, M., og Wasteson, Y. (2015). *Matforgiftning: smitte gjennom mat og vann*. Capellen damm akademisk.
- Hildén, K. og Mäkelä, M. R. (2018). Role of fungi in wood decay. I *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.
- Holban, A. M. og Grumezescu, A. M. (2018). *Microbial Contamination and Food Degradation*. Academic Press London, United Kingdom.
- Hurrell, R. (1990). Influence of the maillard reaction on the nutritional value of foods. *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*, sider 245–258.
- Kendall, C. W., Esfahani, A., og Jenkins, D. J. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, 24(1):42–48.
- Kim, I. J., Lee, H. J., Choi, I.-G., og Kim, K. H. (2014). Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20):8469–8480.
- Kirk, O., Borchert, T. V., og Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4):345–351.
- Lapo, B., Bou, J. J., Hoyo, J., Carrillo, M., Peña, K., Tzanov, T., og Sastre, A. M. (2020). A potential lignocellulosic biomass based on banana waste for critical rare earths recovery from aqueous solutions. *Environmental Pollution*, 264:114409.
- Lebo Jr., S. E., Gargulak, J. D., og McNally, T. J. (2001). *Lignin*, side 1. American Cancer Society.
- Lisik, K. og Sidziako, M. (2013). Oznaczenie zabarwienia cukru białego, cukrow surowych i specjalnych w roztworze wodnym i metoda MOPS. http://www.stc.pl/dhttp.php?co=2013_06_25_lisik.pdf. Hentet 20. April 2021.
- Liu, B., Li, Y., Song, J., Zhang, L., Dong, J., og Yang, Q. (2014). Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose*, 21(5):3637–3645.
- Lyte, M. (1997). Induction of gram-negative bacterial growth by neurochemical containing banana (*musa x paradisiaca*) extracts. *FEMS microbiology letters*, 154(2):245–250.
-

-
- MacLachlan, D. (2006). Pesticide risk profile for the feeding of banana fruit and stalks to cattle and sheep. *Chemical Residues Unit, Market Maintenance. Australian Quarantine and Instruction Service, Canberra.*
- Manum, S. B. (2018). lignin – Store norske leksikon. <https://snl.no/lignin>. Hentet 11. Mars 2021.
- Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., og Verstraete, W. (2016). Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial biotechnology*, 9(5):568–575.
- Matassa, S., Boon, N., og Verstraete, W. (2015). Resource recovery from used water: The manufacturing abilities of hydrogen-oxidizing bacteria. *water research*, 68:467–478.
- Matstart. Hva er matsvinn? - MatStart. <https://www.matstart.no/artikler/h/hva-er-matsvinn/>. Hentet 3. Mai 2021.
- Mattsson, L., Williams, H., og Berghel, J. (2018). Waste of fresh fruit and vegetables at retailers in sweden – measuring and calculation of mass, economic cost and climate impact. *Resources, Conservation and Recycling*, 130:118–126.
- Mehta, C. M., Khunjar, W. O., Nguyen, V., Tait, S., og Batstone, D. J. (2015). Technologies to recover nutrients from waste streams: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(4):385–427.
- Merchant, S. S. og Helmann, J. D. (2012). Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances in microbial physiology*, 60:91–210.
- Mohapatra, D., Mishra, S., og Sutar, N. (2010). Banana and its by-product utilisation: an overview. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 69(5):323–329.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3):266–277.
- Mukherjee, P. (2019). Bioactive phytochemicals and their analysis. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs; Mukherjee, PK, Ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, Netherlands*, sider 237–328.
- Nawab, A., Tang, S., Gao, W., Li, G., Xiao, M., An, L., Wu, J., og Liu, W. (2020). Tannin supplementation in animal feeding; mitigation strategies to overcome the toxic effects of tannins on animal health: A review. *J. Agric. Sci*, 12:217.
- Nursten, H. (2002). Maillard reactions. I Roginski, H., editor, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, sider 1657–1672. Elsevier, Oxford.
- Palacios, S., Ruiz, H. A., Ramos-Gonzalez, R., Martínez, J., Segura, E., Aguilar, M., Aguilera, A., Michelena, G., Aguilar, C., og Ilyina, A. (2017). Comparison of physicochemical pretreatments of banana peels for bioethanol production. *Food science and biotechnology*, 26(4):993–1001.
- Parmar, H. S. og Kar, A. (2008). Medicinal values of fruit peels from citrus sinensis, punica granatum, and musa paradisiaca with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *Journal of Medicinal Food*, 11(2):376–381.
- Pasotti, L., Zucca, S., Casanova, M., Micoli, G., De Angelis, M. G. C., og Magni, P. (2017). Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered escherichia coli. *BMC biotechnology*, 17(1):1–12.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., og Vyvyan, J. A. (2014). *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning.
- Peng, L.-H., Yin, J., Zhou, L., Liu, M.-X., og Zhao, Y. (2018). Human microbe-disease association prediction based on adaptive boosting. *Frontiers in microbiology*, 9:2440.
- Phiom-on, K. og Apiraksakorn, J. (2021). Development of cellulose-based prebiotic fiber from banana peel by enzymatic hydrolysis. *Food Bioscience*, side 101083.
-

-
- Pocan, P., Bahcegul, E., Oztop, M. H., og Hamamci, H. (2018). Enzymatic hydrolysis of fruit peels and other lignocellulosic biomass as a source of sugar. *Waste and Biomass Valorization*, 9(6):929–937.
- Raventós, M., Hernández, E., Auleda, J., og Ibarz, A. (2007). Concentration of aqueous sugar solutions in a multi-plate cryoconcentrator. *Journal of Food Engineering*, 79(2):577–585.
- Ravindra, P. et al. (2000). Value-added food:: Single cell protein. *Biotechnology advances*, 18(6):459–479.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., et al. (2006). Escherichia coli k-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic acids research*, 34(1):1–9.
- Robbins, C., Hanley, T., Hagerman, A., Hjeljord, O., Baker, D., Schwartz, C., og Mautz, W. (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology*, 68(1):98–107.
- Rychlik, M., Kanawati, B., Roullier-Gall, C., Hemmler, D., Liu, Y., Alexandre, H., Gougeon, R. D., Gmelch, L., Gotthardt, M., og Schmitt-Kopplin, P. (2019). Chapter 21 - foodomics assessed by fourier transform mass spectrometry. I Kanawati, B. og Schmitt-Kopplin, P., editors, *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry*, sider 651–677. Elsevier.
- Sampieri, R. H. (2020). *Matsvinn i Norge - Rapportering av nøkkeltall 2015-2019*. Norsus.
- Sánchez, J., Ruiz, Y., Auleda, J., Hernández, E., og Raventós, M. (2009). Freeze concentration in the fruit juices industry. *Food Science and Technology International*, 15(4):303–315.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12):3875–3883.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., og d'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in luria-bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23):8746–8749.
- Shiple, B. og Vu, T.-T. (2002). Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytologist*, 153(2):359–364.
- Shlaes, D. M. (2010). The perfect storm. I *Antibiotics*, sider 1–7. Springer.
- Souza, P. M. d. et al. (2010). Application of microbial α -amylase in industry—a review. *Brazilian journal of microbiology*, 41(4):850–861.
- Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., og Pradeep, B. (2015). Single cell protein production: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(9):251–262.
- Svihus, B. (2021). kostfiber – Store medisinske leksikon. <https://sml.snl.no/kostfiber>. Hentet 11. Mars 2021.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., og Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17):4998–5006.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., og Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, 8(3):207–217.
- Tewari, H., Marwaha, S., og Rupal, K. (1986). Ethanol from banana peels. *Agricultural wastes*, 16(2):135–146.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., og Case, C. L. (2010). Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- UIO (2011). Protein - Institutt for biovitenskap. <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/protein.html>. Hentet 20. April 2021.
- van Oort, M. (2010). Enzymes in food technology—introduction. *Enzymes in food technology*, 2.
-

-
- Weimer, P. J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *Journal of dairy science*, 79(8):1496–1502.
- Wenk, C. (2001). The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Animal Feed Science and Technology*, 90(1-2):21–33.
- Whistler, R. L. og Daniel, J. R. (2000). Starch. *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology*.
- Wilson, J. og Otsuki, T. (2002). *To spray or not to spray? Pesticides, Banana Exports, and Food Safety*. The World Bank.
- Yahia, E. M., Carrillo-López, A., og Bello-Perez, L. A. (2019). Chapter 9 - carbohydrates. I Yahia, E. M., editor, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, sider 175–205. Woodhead Publishing.
- Yin, X., Wu, P., Li, Y., og Yan, X. (2012). 3.22 - mercury speciation and binding to biomacromolecules. I Pawliszyn, J., editor, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, sider 435–460. Academic Press, Oxford.
-