



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2021 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Mikrobiota analyser av spontant fermenterte surdeiger av moderne hvete og urkorn**

Microbiota analyzes of spontaneously fermented sourdough starters made from modern and ancient wheats

**Johanne Paulsen**

Bioteknologi - molekylærbiologi



## Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende masteroppgave i bioteknologi ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og er gjennomført våren 2021. Det har vært et utfordrende, spennende og ikke minst lærerikt halvår, og mange fortjener en stor takk for å ha gjort denne oppgaven mulig.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie og biveileder førsteamanuensis Davide Porcellato for et godt samarbeid, god veiledning, tilbakemeldinger og støtte underveis. En ekstra takk til Davide for uvurderlig hjelp med databearbeiding og veiledning i bruk av Rstudio.

Jeg vil også rette en takk til senioringeniør Zhian Salehian og senioringeniør Ahmed Abdelghani for hjelp med molekylærbiologiske teknikker på laboratoriet. I tillegg vil jeg takke senioringeniør Kari Olsen for hjelp med HPLC- og CO<sub>2</sub>-analyser. Jeg vil også takke May, Kari, Zhian og Ahmed på labben for all annen praktisk hjelp og alle hyggelige samtaler og kaffepauser.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste for all støtte og oppmuntrende ord de siste månedene.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap  
Ås, 1. juni 2021

---

Johanne Paulsen

## Sammendrag

Surdeigsmikrobiota har i flere tiår blitt studert på grunn av sin kompleksitet og sine interessante interaksjoner mellom gjær og bakterier. I denne oppgaven ble mikrobiota i fire ulike spontant fermenterte surdeigskulturer studert ved Illumina Miseq totalsekvensering av 16S og ITS rRNA genet hos henholdsvis bakterier og gjær. Renkulturer fra surdeigene ble isolert og identifisert ved Sanger sekvensering. Surdeigskulturene ble laget på mel av moderne hvete, og urkornene spelt, emmer og einkorn og ble etablert under hjemmekjøkkenbetingelser. For å undersøke den mikrobielle sammensetningen og stabiliteten i surdeigene ble det gjennomført undersøkelser på åtte uttak gjort ukentlig over en periode på åtte uker og seks uttak tatt ut i et tidsintervall på 24 timer etter mating av surdeigskulturene.

De mikrobiologiske analysene viste ingen tydelig forskjell i mikrofloraen mellom de fire surdeigene, med unntak av svært lav forekomst av gjær i surdeigene av hvete og spelt. Illumina-sekvenseringen viste at den dominerende arten i de seks første ukentlige uttakene var *Furfurilactobacillus rossiae* i samtlige uttak, men at andelen *Lactilactobacillus graminis/curvatus* og *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus/paraplantarum/fabifermentas* var høyere etter uke seks, og utgjorde majoriteten av bakteriene i uttakene over 24 timer. *Wickerhamomyces anomalus* var den eneste gjærarten som ble identifisert i betydelig grad. Analysene som ble gjort i dette forsøket viste ingen indikasjon på at melet påvirket hvilke mikroorganismer som var til stede i mikrobiotaen i de ulike surdeigskulturene, men at de kan ha hatt innvirkning på fordelingen av artene.

Vekst- og metabolismestudier av de fire surdeigene ble gjennomført, og produksjon av organiske syrer og forekomst og omdannelse av karbohydrater ble undersøkt ved HPLC-analyser av surdeigskulturene ved mating og etter 24 timers fermentering i romtemperatur. Resultatene fra disse undersøkelsene viste at *F. rossiae* var sterkt positivt korrelert med melkesyre, eddiksyre og CO<sub>2</sub> i surdeigene. Alle surdeigskulturene produserte en betydelig mengde melkesyre, med høyest produksjon i emmersurdeigen (9323 ppm) og lavest produksjon i hvetesurdeigen (5844 ppm). Emmersurdeigen hadde også høyest produksjon av eddiksyre (1161 ppm) og CO<sub>2</sub> (3143 ppm), mens hvetesurdeigen hadde lavest produksjon med henholdsvis 112 ppm og 1985 ppm.

Denne oppgaven viser at surdeigskulturer etablert fra ulike typer mel under like betingelser etablerer en mikrobiota som inneholder samme taxa. Konsentrasjonen av de ulike artene til stede i surdeigene varierte imidlertid, noe som påvirket forekomsten av metabolitter i surdeigene.

## Abstract

The Sourdough microbiota has been studied for several decades due to its complexity and its interesting interaction between yeast and bacteria. In this thesis the microbiota of four different spontaneously fermented sourdoughs were studied with Illumina Miseq sequencing of the 16S- and ITS-rRNA genes of bacteria and yeast respectively. Pure cultures of bacteria and yeast were isolated from the sourdoughs and identified by Sanger sequencing. The sourdoughs were established in a home-kitchen environment, and four different types of flour were used: modern bread wheat, and the ancient wheat types spelt, emmer and einkorn. To investigate the stability in the sourdoughs over time, samples were taken from the sourdoughs once a week over the course of eight weeks, and six samples were later taken from the sourdough cultures over the course of 24 hours after feeding the cultures.

The microbiological analyses showed little difference in the microbiota of the sourdoughs, except for a very low occurrence of yeast in wheat and spelt sourdoughs. The results from the Illumina sequencing showed that the dominating species in all samples were *Furfurilactobacillus rossiae* for the first six weeks, but that the proportion of *Lactilactobacillus graminis/curvatus* and *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus/paraplantarum/ fabifermentas* were higher after week six, and that they accounted for the majority in the samples taken over the 24-hour time interval. The only species of yeast that were identified in a considerable amount were *Wickerhamomyces anomalus*. The results from these studies showed no indication that the type of flour used in the sourdough cultures influenced the type of microorganisms present in the microbiota of the sourdough but may have affected the distribution of the different species.

Growth and metabolism in the sourdoughs were investigated in regard to the production of organic acids, CO<sub>2</sub> and the occurrence and conversion of carbohydrates during a fermentation time of 24 hours in room temperature. The results from these analyses showed that *F. rossiae* were strongly correlated with the occurrence of lactic acid, acetic acid and CO<sub>2</sub> in the sourdough cultures. All cultures produced a considerable amount of lactic acid, with the highest production being in the emmer sourdough (9323 ppm) and the lowest in the wheat sourdough (5844 ppm). The emmer sourdough also had the highest production of acetic acid (1161 ppm) and CO<sub>2</sub> (3143 ppm), while this production was lowest in the wheat sourdough with 112 ppm and 1985 ppm, respectively.

This study shows that sourdough cultures made from different types of flour establish a microbiota that contain similar taxa, when established under the same conditions. The concentration of the different species present in the different sourdoughs did however differ, and this also impacted the metabolites present in the sourdough.

# Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Hensikt med oppgaven .....	1
2	Teori .....	2
2.1	Korn.....	2
2.1.1	Kornets generelle oppbygning og kjemiske sammensetning.....	2
2.1.2	Hvete .....	3
2.1.3	Urkorn .....	4
2.2	Surdeig.....	5
2.3	Mikroorganismer i surdeig .....	6
2.3.1	Melkesyrebakterier .....	7
2.3.2	Gjær .....	10
2.3.3	Eddiksyrebakterier.....	11
2.4	Fenotypisk identifisering av melkesyrebakterier.....	11
2.4.1	Gram-farging .....	11
2.4.2	Katalase-test .....	12
2.5	Genotypisk identifisering ved sekvensering.....	12
2.5.1	Polymerase-kjedereaksjon (PCR).....	12
2.5.2	Sanger sekvensering .....	13
2.5.3	Illumina sekvensering.....	14
2.6	Metoder for å studere mikrobiota .....	15
2.6.1	$\alpha$ -diversitet.....	15
2.6.2	$\beta$ -diversitet.....	16
3	Materialer og metoder .....	17
3.1	Etablering og oppbevaring av surdeigskulturer.....	17
3.2	Isolering av melkesyrebakterier og gjær .....	17
3.2.1	Vekstmedier.....	17
3.2.2	Isolering.....	18
3.3	Fenotypisk identifisering av MSB og Gjær.....	18
3.3.1	Gram-farging og Katalase-test .....	19
3.4	Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering .....	19
3.4.1	Lysis og DNA ekstraksjon.....	19
3.4.2	PCR .....	19
3.4.3	Rensing av PCR-produkt.....	20
3.4.4	Sanger sekvensering .....	21
3.5	Genotypisk identifisering av surdeigskulturenes mikrobielle sammensetning ved Illumina MiSeq sekvensering .....	21

3.5.1	DNA ekstraksjon .....	22
3.5.2	PCR for 16S og ITS rRNA amplifisering.....	23
3.5.3	Illumina Index PCR.....	24
3.5.4	Rensing og normalisering av PCR-produkt.....	25
3.5.5	Agarose gelelektroforese .....	25
3.5.6	Illumina Sekvensering .....	25
3.5.7	Bioinformatisk analyse.....	25
3.5.8	Statistisk analyse .....	26
3.6	Vekst- og Metabolismeforsøk .....	26
3.6.1	HPLC.....	26
3.6.2	Måling av CO <sub>2</sub> -produksjon.....	27
4	Resultater.....	28
4.1	Mikrobiologisk analyse av surdeigene .....	28
4.1.1	Fenotypisk identifisering av renkulturer.....	28
4.1.2	Sanger sekvensering av renkulturer.....	29
4.2	Mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering .....	29
4.2.1	Identifisering av bakterielle samfunn .....	30
4.2.2	Identifisering av sopp-samfunn .....	32
4.2.3	Diversitetsanalyser hos bakterier og sopp .....	35
4.3	Vekst- og metabolismeforsøk.....	38
4.4	Korrelasjonsanalyser .....	40
5	Diskusjon.....	42
5.1	Mikrobiologisk analyse av surdeiger.....	42
5.1.1	Bakteriell sammensetning i surdeigene .....	42
5.1.2	Sopp og gjær i surdeigene .....	43
5.1.3	Mikrobielle forskjeller i surdeigene .....	44
5.1.4	Metabolismestudier av surdeigene .....	46
6	Oppsummering og videre arbeid .....	48
7	Referanser.....	50
	Vedlegg .....	55
I.	Rådata kulturavhengige mikrobiologiske analyser.....	55
II.	Rådata Illumina sekvensering.....	61
III.	Rådata vekst- og metabolismeforsøk.....	62

# 1 Innledning

Brød har blitt produsert helt siden jordbrukets begynnelse, da mennesket begynte å dyrke landet og slo seg ned på faste bopeler. De første brødene var ugjærede flatbrød, men kunsten å bake gjæret brød ved å blande inn surdeig i ugjæret deig ble etter hvert oppdaget slik at brødet hevet og ble høyere og lettere en flatbrødene. Denne praksisen ble sannsynligvis oppdaget av egypterne og senere spredt til andre deler av verden, fra Hellas til resten av Europa (Arora et al., 2021; Cappelle et al., 2013). I løpet av siste halvdel av 1800-tallet ble det vanlig å benytte renkulturer av industriell bakergjær (*Saccharomyces cerevisiae*), og baking med surdeig ble i stor grad byttet ut til fordel for den enklere og mindre tidkrevende prosessen med industriell gjær (Lahue et al., 2020). I de seneste tiårene har derimot praksisen med baking av surdeigsbrød fått en renessanse, og det blir flere av både hobbybakere og profesjonelle bakerier som benytter surdeig.

Surdeig er oftest laget på hvetemel, rugmel eller speltmel, men også mel av en rekke andre korntyper eller belgvekster kan benyttes til å fremstille en surdeigsstarter. De seneste årene har interessen for gamle kornslag, kalt urkorn, som einkorn, emmer og spelt økt betraktelig. Dette har sammenheng med en økt interesse for kulturarv og tradisjonelle dyrkningsmetoder, men også på grunn av urkornenes smaksegenskaper og helsemessige fordeler.

## 1.1 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke og sammenligne surdeigskulturer laget på økologisk mel av tradisjonell hvete og urkornene einkorn, emmer og spelt. Surdeigskulturene ble etablert under hjemmekjøkkenbetingelser ved spontan fermentering av mel og vann. De mikrobielle samfunnene i surdeigskulturene ble studert ved både dyrkningsavhengige og dyrkningsuavhengige metoder. Stabiliteten i surdeigene ble undersøkt ved totalsekvensering av uttak tatt ukentlig over en periode på åtte uker, samt seks uttak tatt ut i et tidsintervall på 24 timer etter mating. Vekst- og metabolismestudier av surdeigskulturene ble utført for å undersøke vekst av melkesyre bakterier og gjær, samt omsetning og produksjon av karbohydrater og organiske syrer.



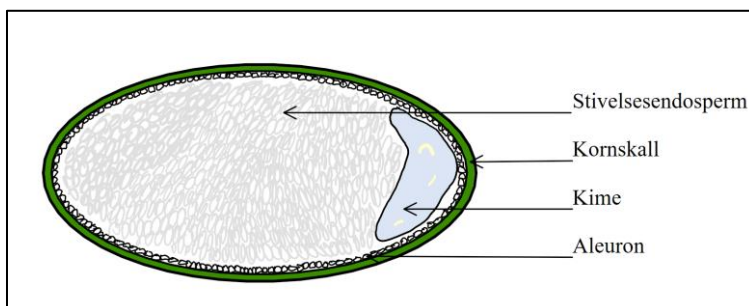
## 2 Teori

### 2.1 Korn

I tusenvis av år har korn blitt dyrket av mennesker og har vært, og er fortsatt, en svært viktig kilde til næring for både mennesker og husdyr. Korn tilhører gressfamilien (*Poaceae*) som er inndelt i flere subfamilier der *Oryzoideae* og *Pooideae* fra BOP-kladen, samt *Panicoideae* fra PACMAD-kladen inneholder de viktigste matkornene. Hvor de ulike kornartene dyrkes avhenger av vekstforhold som temperatur, nedbørsmengde og næringsinnhold i jorda. I tempererte soner, som i Nord- og Øst-Europa, er det hvete (*Triticum*), bygg (*Hordeum vulgare*), rug (*Secale cereale*) og havre (*Avena sativa*) tilhørende *Pooideae*-familien som er de viktigste matkornene. I subtropiske soner er det mais (*Zea mays* subsp. *mays*) som er den dominerende kornarten, mens det i tropiske soner er ris (*Oryza*), *Sorghum* og ulike typer hirse som er de viktigste kornartene (Belderok, 2000).

#### 2.1.1 Kornets generelle oppbygning og kjemiske sammensetning

Korn produserer tørre enfrøede frukter kalt karyopsis. Kornets oppbygning varierer mellom arter og stammer, men består i hovedsak av et skallag ytterst, aleuronlaget, stivelsesendosperm og kime (Figur 2.1). Kornskallet består av flere ulike cellelag og utgjør ca. 5-6 % av kornet. Innenfor kornskallet ligger aleuronlaget, som er det ytterste laget av endospermen og utgjør 6-9 % av kornet. Aleuronlaget består av både løselig og uløselig kostfiber, proteiner, antioksidanter, vitaminer (B og E) og mineraler, fytinsyre og enzymer. Innenfor aleuronlaget er stivelsesendospermen, som utgjør majoriteten av kornet (80-85 %), og kimen (~3 %). Stivelsesendospermen inneholder lagringsproteiner og stivelse. Kimen inneholder anlegget til en ny plante og har høyt innhold av proteiner og lipider sammenlignet med stivelsesendospermen (Delcour & Hosney, 2010; Fardet, 2010)

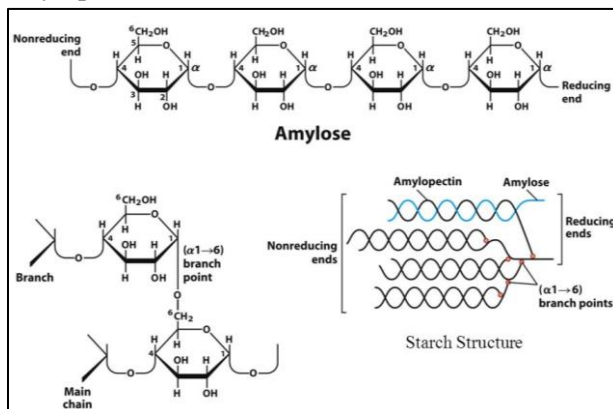


Figur 2.1: Svært forenklet generell struktur hos korn (basert på hvete). Adaptert fra Fardet (2010) og Delcour og Hosney (2010).

Korn inneholder 66-76 % karbohydrater, og majoriteten av dette er stivelse (55-70 %) i tillegg til andre bestanddeler som arbinoksyler (1,5-8 %),  $\beta$ -glukaner (0,5-7 %), ulike sukker (~3 %), cellulose (~2,5%) og glukofruktaner (~1 %). Det gjennomsnittlige proteininnholdet i korn er 8-11 %, men det er store variasjoner mellom ulike sorter, og hvete kan variere så mye som fra 6 % til 20 % avhengig av

gener og vekstvilkår. Kimen og aleuronlaget inneholder mesteparten av proteinene i kornet (Koehler & Wieser, 2013).

Stivelse, det viktigste karbohydratet i korn, består av de to vannuløselige glukosepolymerene amylose og amylopektin (typisk 25–28 % amylose og 72–75 % amylopektin). Amylose består av lange, uforgreinede kjeder av D-glukose-enheter som henger sammen via  $\alpha$ -(1-4)-glykosidbindinger. Amylopektin er en forgrenet glukosepolymer der  $\alpha$ -(1-4)-kjedene henger sammen via  $\alpha$ -(1-6)-glykosidbindinger og danner forgreninger (Koehler & Wieser, 2013; Nelson et al., 2017). Figur 2.2 viser den kjemiske oppbygningen av stivelse. Stivelse i korn brytes ned av endogene og mikrobielle enzymer, som angriper glykosidbindinger inne i polysakkaridet (endohydrolaser), eller ved enden av kjeden (eksohydrolaser).  $\alpha$ -amylase er den viktigste eksohydrolasen, og denne hydrolyserer  $\alpha$ -(1-4)-bindinger i både amylose og amylopektin og danner dekstriner, i tillegg til noe maltose og oligosakkarider.  $\beta$ -amylase er den viktigste eksohydrolasen, og hydrolyserer  $\alpha$ -(1-4)-glukosidbindinger fra den ikke-reduserende enden på polysakkaridene og produserer maltose fra både amylose og amylopektin. Amylasene har et pH-optimum rundt pH 5. I tillegg bidrar også deforgreningsenzymmer (*debranching enzymes*) til å bryte  $\alpha$ -(1-6)-glukosidbindingene mellom kjedene i amylopektin (Koehler & Wieser, 2013).



Figur 2.2: Oppbygning av amylose og amylopektin i stivelse. Figur hentet fra Nelson et al. (2017).

### 2.1.2 Hvete

Hvete er et enormt viktig matkorn som produseres over hele verden og er en viktig del av kostholdet til en stor del av verdens befolkning. Kultivert hvete omfatter fem arter: hexaploid «vanlig brødhvete» og spelthvete (AABBDD genom), tetraploid durumhvete og emmer (AABB), og einkorn som er diploid (AA). Innenfor hver av disse artene finnes det mange variasjoner i egenskaper som har oppstått som resultat av avl, i tillegg til at blant annet dyrkingssted og næringstilgang vil påvirke kornets næringsinnhold og egenskaper (Arendt & Zannini, 2013; Geisslitz et al., 2019; Koehler & Wieser, 2013).

Vanlig brødhvete (*Triticum aestivum* spp. *aestivum*) er allohexaploid, og har oppstått via en lang evolusjonær prosess der kultiverte arter gradvis har utviklet seg fra ville arter. *Triticum*-slekten oppstod i Asia og deler av Afrika, i området vi i dag kjenner som Midtøsten. Den første kultiveringen

av hvete skjedde for rundt 10 000 år siden, og de første kultiverte artene var einkorn og emmer. Moderne brødhvete har sannsynligvis oppstått ved spontan hybridisering av kultivert emmerhvete og en vill gress-art (*Triticum tauschii*) som så ble videre kultivert på grunn av sine gunstige egenskaper (Shewry, 2009).

I motsetning til andre kornarter innehar hvete glutenproteiner, noe som gir den unike bakeegenskaper. Når hvetemel blandes med vann og deigen eltes danner glutenproteinene et glutennettverk som gir en sammenhengende, viskoelastisk deig. Dette gjør at deigen kan holde på gassen som produseres, slik at heveegenskapene til deigen blir gode. Glutenproteiner består av gluteniner, som er store proteiner bestående av flere polypeptider bundet sammen av interne disulfidbindinger, og små monomere gliadiner. På grunn av strukturelle forskjeller mellom disse to glutenprotein-fraksjonene påvirker disse deigens egenskaper på ulik måte. Glutenin-fraksjonen bidrar til å bygge opp det polymere proteinnettverket som gjør deigen sammenhengende og gir den elastisitet, mens gliadinene bidrar til strekkbarhet og viskositet og gjør nettverket av gluteniner mer formbart (Koehler & Wieser, 2013; Ooms & Delcour, 2019). Gode bakeegenskaper kjennetegnes av et høyt innhold av glutenin og en lav andel av gliadin i forhold til glutenin (Geisslitz et al., 2018).

### 2.1.3 Urkorn

Urkorn, einkorn (*T. monococcum*), emmer (*T. dicoccum*) og spelt (*T. aestivum*) er eldre hvetearter som har blitt dyrket i langt mindre omfang enn vanlig brødhvete (*T. aestivum*) og durumhvete (*T. durum*) det siste århundret. Omtrent 95 % av all hvete som dyrkes globalt er hexaploid brødhvete, og tetraploid durumhvete utgjør mesteparten av de resterende 5 % (Arendt & Zannini, 2013). Dette skyldes at avlingen for urkornene er betydelig lavere enn for brødhvete, at kornene har fastsittende agner og at disse har dårligere bakeegenskaper sammenlignet med vanlig hvete (Geisslitz et al., 2019). De tre urkornene har generelt sett høyere protein- og gluteninnhold enn vanlig brødhvete, selv om proteininnhold påvirkes av dyrkningssted, gjødsling og sort. På grunn av dårligere glutenkvalitet, det vil si lavere gluteninnhold og høyere gliadin/glutenin-ratio, har disse likevel mindre tilfredsstillende bakeegenskaper og danner deig med lav elastisitet og høy ekstensibilitet (Geisslitz et al., 2018).

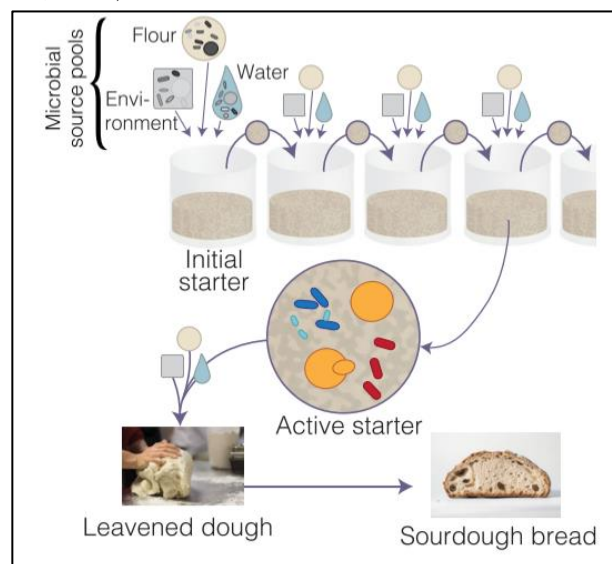
I løpet av de siste 20 årene har likevel urkornene blitt delvis gjenoppdaget, både på grunn av sine smaksegenskaper, men også som følge av helsemessige årsaker som høyere innhold av blant annet ferulsyre, vitaminer, alkylresorcinoler og lutein sammenlignet med vanlig hvete (Geisslitz et al., 2019; Shewry, 2009). Høyt innhold av lutein, sterylferulater, vitamin E og mineralsalter gir for eksempel produkter av einkorn en dypere aroma og farge (Longin & Würschum, 2016). I tillegg er de eldre sortene mer resistente mot soppsykdomer, bedre tilpasset ulike klimatiske forhold og krever lavere mengde gjødsel enn moderne brødhvete (Longin et al., 2016).

Asledottir et al. (2020) fant også at urkornene ved fordøyelse frigjør færre peptider med T-celle epitoper som trigger den autoimmune sykdommen cøliaki sammenlignet med vanlig hvete. Studier på

mennesker har indikert at inntak av urkorn kan forbedre pro-inflammatoriske/antioksidant parametere, men fordi man enda ikke forstår mekanismene for disse effektene kan man enda ikke konkludere sikkert med hensyn til hvilke positive helseeffekter urkornene kan tillegges (Dinu et al., 2018).

## 2.2 Surdeig

En surdeig, også kalt surdeigstarter, er en blanding av mel og vann som fermenteres av melkesyrebakterier (MSB) og gjær som naturlig er til stede på melet, i vannet, luften og i miljøet generelt. En surdeig dannes og opprettholdes ved at en tykk røre eller deig av mel og vann gjennomgår en spontan fermentering, for så å benyttes som inokulum for å starte fermenteringen av en ny blanding av mel og vann (Figur 2.3). På denne måten vil det etter hvert dannes en stabil starterkultur som har en relativt konstant og repeterbar evne til syring og heving, avhengig av mikroorganismene som har etablert seg i miljøet. Prosessen der etablert starter podes i ny, ufermentert røre eller deig kalles ofte «backslopping» (Corsetti, 2013).



Figur 2.3: Oversikt over etableringsprosessen og kilder til mikroorganismer i en surdeig. Surdeigen blir etablert og opprettholdt ved gjentatt mating med tilførsel av vann og mel og dette, samt mikroorganismer i miljøet, er kilde til mikrobiotaen man finner i den aktive starteren. Figur fra Landis et al. (2021).

Surdeigsfermentering forbedrer reologiske egenskaper i et bredt utvalg av bakervarer, i tillegg til at egenskaper som form, volum, farge på skorpe og krumme, bevaring av fuktighet og struktur på krummen forbedres (Arora et al., 2021). Mikroorganismene som introduseres til deigen via en surdeigsstarter produserer  $\text{CO}_2$  som hever brødet, i tillegg til at de danner en rekke organiske syrer, smak- og aromakomponenter og ekstracellulære enzymer som påvirker brødets smak, tekstur, holdbarhet og næringsverdi (Gobbetti et al., 2014). Lang fermenteringstid gir surdeigsbrød en dypere og mer aromatisk smak enn brød gjæret med bakergjær, og de viktigste komponentene som bidrar

positivt til smak er blant annet acetaldehyd, isosmørsyre, isovalerinsyre, 2/3-metyl-1-butanol, isopentanal, benzyletanol, 2,3-butandion og Dimetylsulfid (Salim et al., 2006).

Sammenlignet med brød som er fermentert med industriell bakergjær, kan surdeigsbrød også ha en rekke fordelaktige næringsmessige forandringer, i tillegg til endret og forbedret smak og tekstur. Brød og kornprodukter har generelt høy glykemisk indeks (GI), noe som innebærer at blodsukkernivået stiger raskt etter inntak av matvaren. Review artikler av Arora et al. (2021); Gobbetti et al. (2014) forklarer at surdeigsfermentering har en positiv innvirkning på produktets glykemiske indeks ved at GI reduseres som følge av at biologisk syrning øker forekomsten av resistent stivelse, frigjørelse av peptider, frie aminosyrer, polyfenoler og vannløselige kostfiber. En annen positiv effekt ved surdeigsfermentert brød er at hydrolyse av proteiner ved surdeigsfermentering kan gi redusert allergisk respons sammenlignet med brød bakt med industriell bakergjær ved at forekomsten av IgE-bindende proteiner reduseres (Rizzello et al., 2006).

Surdeigsfermentering kan også påvirke biotilgjengeligheten av ulike mineraler og vitaminer i brød. Fullkornsprodukter er en viktig kilde til mineraler som kalsium, magnesium, kalium, jern, sink og fosfor. I tillegg til å inneholde viktige næringsstoffer og mineraler inneholder korn også fytinsyre, som består av fosforsyre og inositol, og som har chelaterende evne og som binder til og danner uløselige forbindelser med blant annet kalsium, jern og sink. Dette gjør at biotilgjengeligheten av mineraler i brød er lav. Fytinsyre defosforyles av enzymet fytase som finnes naturlig i kornet. Syrningen ved surdeigsfermentering fører til at aktiviteten til fytase, som har et pH optimum rundt 5.0 (Peers, 1953), stimuleres slik at en større andel av fytinsyren brytes ned til fosfat og inositol-fosfater (Türk et al., 1996). Disse forbindelsene har lavere chelaterende kapasitet slik at en større andel av mineralene i kornet blir tilgjengelig for opptak (Gobbetti et al., 2014). Surdeigsfermentert brød gir dermed økt forekomst av biotilgjengelige mineraler, sammenlignet med brød fremstilt ved hurtig gjæring med industriell bakergjær.

### 2.3 Mikroorganismer i surdeig

De viktigste metabolske aktivitetene i surdeigsstarteren er syrning, som utføres av melkesyrebakterier (MSB) og heving som følge av CO<sub>2</sub>-produksjon, som utføres av både heterofermentative MSB og gjær. En surdeigskultur er, sett fra et mikrobielt ståsted, et svært spesifikt og stressende økosystem med lav pH, høy konsentrasjon av karbohydrater og begrenset tilgang på oksygen (De Vuyst et al., 2014). Surdeigsstartere er heterogene, dynamiske miljøer som gjennomgår kontinuerlige endringer i tilgjengeligheten av næringsstoffer i løpet av fermenteringsprosessen (Guerzoni et al., 2013). Hvilke mikroorganismer som finnes i en spesifikk starter påvirkes av flere faktorer, blant annet hvilke mikroorganismer som er til stede i ingrediensene som benyttes, pH i starteren og temperaturen den oppbevares i. Det er generelt 10 til 100 ganger flere melkesyrebakterier enn gjær i en surdeigsstarter. Selv om det har blitt isolert over 90 ulike arter av MSB og over 40 ulike arter av gjær fra

surdeigskulturer, inneholder en gitt «backsloppet» surdeig få arter av MSB og gjær. Dette understreker det svært kompetitive økosystemet en surdeigskultur er, og synliggjør at arter som inngår i mutualistiske relasjoner har fordeler i konkurranse med andre arter. Surdeigskulturer som opprettholdes ved «backslopping» innehar gjerne stabile relasjoner mellom spesifikke gjær- og MSB-arter og/eller stabile relasjoner mellom ulike arter av melkesyrebakterier. Disse relasjonene reflekterer de metabolske egenskapene til de involverte artene og peker på trofiske relasjoner som er viktige i surdeigøkosystemet (Comasio et al., 2020; De Vuyst et al., 2014).

### 2.3.1 Melkesyrebakterier

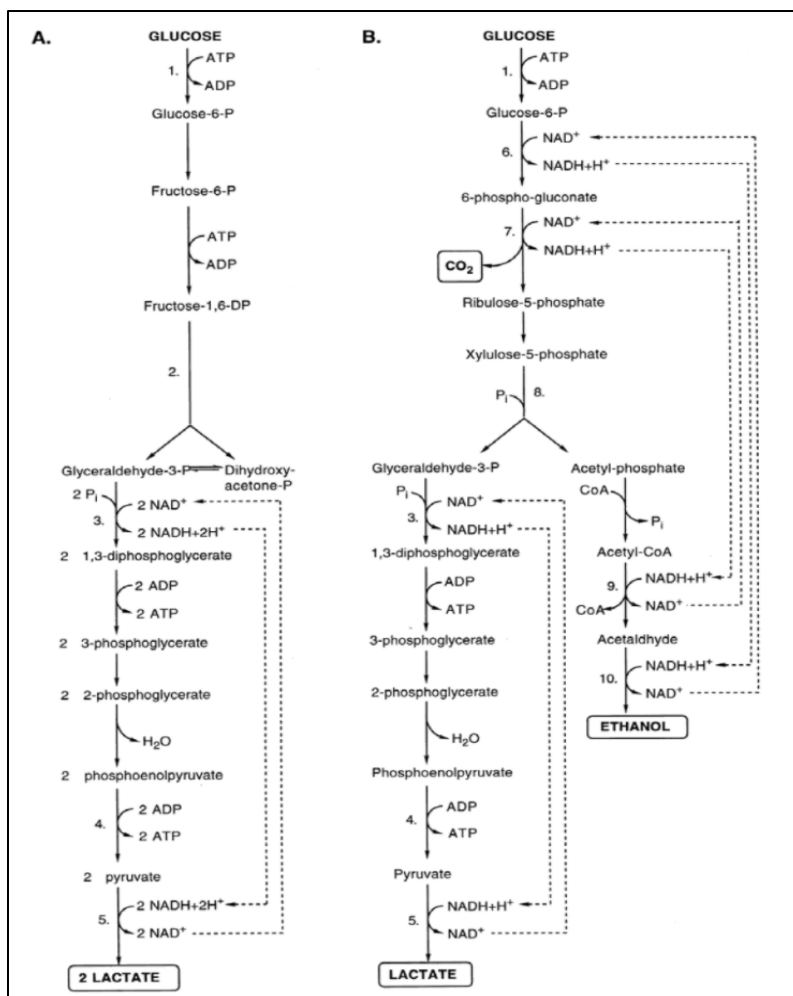
Melkesyrebakterier er svært betydningsfulle i næringsmiddelindustrien, og er viktige i produksjon av en rekke fermenterte matvarer. Bruken av melkesyrebakterier i fermentering av mat er en svært gammel konserveringsmetode, og benyttes blant annet i fermenterte melkeprodukter, frukt- og grønnsaksprodukter, så vel som kornprodukter. Selv om noen arter av melkesyrebakterier kan være patogene, er de i all hovedsak regnet for å være gunstige og trygge bakterier (GRAS-status), og noen stammer regnes også for å være probiotiske (Bintsis, 2018).

Melkesyrebakteriene tilhører rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og ordenen *Lactobacillales*, og de deles inn i familiene *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae* (von Wright & Axelsson, 2011). *Lactobacillaceae*-familien inneholder slektene *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* og *Pediococcus*. Slekten *Lactobacillus* ble først beskrevet i 1901, og taksonomisk klassifisering baserte seg da på fenotypiske trekk. De siste tiårene har utviklingen av genetiske sekvenseringsmetoder ført til at antallet arter i *Lactobacillus*-slekten har økt voldsomt til 261 arter i mars 2020. I tillegg har dette vist at artene i denne familien er svært heterogene, noe som førte til et behov for revidert og spesifisert taksonomisk klassifisering. I 2020 ble derfor taksonomien til familiene *Lactobacillaceae* og *Leuconostocaceae* revidert av Zheng et al. (2020), og slekten *Lactobacillus* ble reklassifisert til 25 slekter inkludert den korrigerede slekten *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* samt 23 nye slekter. I denne oppgaven vil i hovedsak ny taksonomisk klassifisering benyttes, men da det meste av litteratur naturligvis benytter gammel klassifisering vil denne refereres til samtidig for å minimere forvirring. Tabell 2.1 viser en oversikt over nåværende og tidligere navn på arter som omtales i denne oppgaven, og det henvises til Zheng et al. (2020) for ytterligere informasjon.

Tabell 2.1: oversikt over tidligere og nåværende navn på arter i den forhenværende slekten *Lactobacillus* som omtales i denne oppgaven.

<b>Tidligere navn</b>	<b>Nåværende navn</b>
<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>
<i>Lactobacillus siliginis</i>	<i>Furfurilactobacillus siliginis</i>
<i>Lactobacillus graminis</i>	<i>Latilactobacillus graminis</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus fabifermentas</i>	<i>Lactiplantibacillus fabifermentas</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>

Melkesyrebakterier er Gram positive, katalase-negative, ikke-sporulerende bakterier med et GC-innhold under 50 %. MSB skaffer seg energi ved fermentering av karbohydrater, og er dermed avhengige av en fermenterbar karbohydratkilde for å kunne vokse. Denne fermenteringsreaksjonen kan være heterofermentativ eller homofermentativ (Narvhus & Axelsson, 2003). Homofermentative MSB benytter Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsveien, der melkesyre er tilnærmet det eneste produktet fra glukose-fermenteringen. Heterofermentative MSB benytter fosfoketolase-reaksjonsveien der det i tillegg til melkesyre også produseres CO<sub>2</sub> i tillegg til etanol eller acetat. Utbyttet av ATP er lavere for den heterofermentative reaksjonsveien enn ved homofermentering (von Wright & Axelsson, 2011). Reaksjonsveier for homo- og heterofermentering av glukose er vist i Figur 2.4. Man skiller mellom obligat homofermentative, obligat heterofermentative og fakultativt heterofermentative arter. Fakultativt heterofermentative arter produserer CO<sub>2</sub> og andre biprodukter bare under spesifikke forhold eller fra spesifikke substrater. (Narvhus & Axelsson, 2003; Willey et al., 2014b).



Figur 2.4: Reaksjonsveier for fermentering av glukose hos MSB. A) homolaktisk fermentering (glykolyse, Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsveien og B) Heterolaktisk fermentering (6-fosfogluconat/ fosfoketolase reaksjonsveien). Figur hentet fra Axelsson (2004).

I mel er tilgangen på fermenterbare sukker relativt lav, og det er enzymatisk nedbrytning av stivelse som frigjør maltodextriner, maltose og glukose som melkesyrebakteriene kan nyttiggjøre seg av (Gänzle, 2014). Maltose er den viktigste energikilden i deig, og blir metabolisert via maltose fosforylase reaksjonsveien og pentose fosfat reaksjonsveien av heterofermentative arter av melkesyrebakterier (Huys et al., 2013). Maltose-positive MSB-arter danner ofte stabile relasjoner med maltose-negative arter av gjær, slik at konkurranse om karbohydrater minimeres. Hos maltose-positive bakterier blir maltose tatt opp via et H<sup>+</sup>-maltose symport-system som gjør at opptaket av maltose øker ved lavere pH. Maltosen bli videre konvertert til glukose og glukose-1-fosfat intracellulært ved hjelp av enzymet maltose fosforylase (von Wright & Axelsson, 2011; Vrancken et al., 2011).

Melkesyrebakteriene er svært syretolerante, og mange kan derfor trives i det sure miljøet i en surdeigsstarter (pH rundt 4). Det er i hovedsak heterofermentative MSB som finnes i stabile surdeigsøkosystemer, spesielt obligat heterofermentative arter, mens fakultativt heterofermentative og obligat homofermatative arter er mindre dominerende. Én surdeigsstarter inneholder vanligvis flere ulike arter av MSB, og kompleksiteten og sammensetningen i det mikrobielle samfunnet kan variere

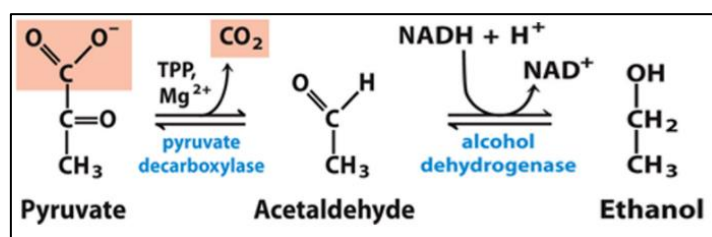


mye (De Vuyst & Neysens, 2005). I en gjennomgang av 1230 artikler om surdeig fra de siste 30 årene fant Arora et al. (2021) at det har blitt identifisert 59 ulike bakterieslekter i surdeig, der 10 av disse tilhørte melkesyrebakterier. Det har på ulike måter blitt påvist 82 arter av den tidligere slekten *Lactobacillus* i surdeig, som med det er den mest tallrike slekten. *Lactiplantibacillus plantarum* (tidligere *Lactobacillus plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (tidligere *Lactobacillus brevis*), *Fructilactobacillus sanfranciscensis* (tidligere *Lactobacillus sanfranciscensis*) og *Limosilactobacillus fermentum* (tidligere *Lactobacillus fermentum*) var de hyppigst rapporterte artene.

### 2.3.2 Gjær

Gjær er unicellulær sopp som har en enkel cellekjerne og som kan reproducere enten aseksuelt ved knoppskyting, eller seksuelt ved sporedanning. Gjærceller er generelt større en bakterier og vanligvis sfæriske til egg-formet (Willey et al., 2014b). Gjær kan være ikke-fermentative, det vil si kun ha respiratorisk metabolisme, eller være fakultativt eller obligat fermentative. De fleste identifiserte gjærarter er fakultativt fermentative, og kan utføre enten respiratorisk eller fermentativ metabolisme, eller begge i en blandet respiratorisk-fermentativ metabolisme. Hvilken form for metabolisme som utføres avhenger da av vekstforhold, type og konsentrasjon av tilgjengelige sukker og/eller tilgjengelighet av oksygen (Rodrigues & Ludovico, 2006).

Fermentative gjær kan utføre alkoholfermentering og fermenterer glukose til etanol og CO<sub>2</sub>. Ved alkoholfermentering blir glukose omdannet til pyruvat via glykolysen, og pyruvat blir deretter videre omdannet til etanol og CO<sub>2</sub> i en to-steps prosess via acetaldehyd (Figur 2.5) (Nelson et al., 2017). Produksjon av ethanol og karbondioksid bidrar til heving av brøddeigen, men gjæren kan også produsere andre metabolitter som påvirker smak, slik som organiske syrer, diacetyl, høyverdige alkoholer og estere.



Figur 2.5: Pyruvat omdannes av gjær til etanol via acetaldehyd ved hjelp av enzymene pyruvat dekarboxylase og alkohol dehydrogenase. Figur hentet fra Nelson et al. (2017)

Gjærarter som er tilpasset miljøet i en surdeig er i stand til å tåle stressende forhold som næringsmangel samt påvirkning av syre-, oksidativt, termisk og osmotisk stress (De Vuyst et al., 2016). Kun gjær fra rekken *Ascomycota* er til stede i surdeig da disse, i motsetning til *Basidiomycota*-gjær, har fermentative egenskaper. En rekke ulike gjærarter kan dominere i en spontan surdeig, avhengig av meltype, prosessbetingelser og miljø. De viktigste gjærartene i surdeig tilhører familien *Saccharomycetaceae*. En surdeig inneholder vanligvis kun en til to gjær-arter på et gitt tidspunkt, og de vanligste artene er *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Pichia*

*kudriavzevii*, *Torulaspota delbrueckii* og *Wickerhamomyces anomalus* (De Vuyst et al., 2014; Vrancken et al., 2010).

### 2.3.3 Eddiksyrebakterier

Eddiksyrebakterier (AAB) har ikke tradisjonelt vært regnet som en del av surdeigsmikrobiotaen, men i løpet av det siste tiåret har deres tilstedeværelse og betydning i det mikrobielle samfunnet i surdeigskulturer fått noe mer oppmerksomhet (Comasio et al., 2020; Landis et al., 2021).

Eddiksyrebakterier er obligat aerobe bakterier som tilhører familien *Acetobacteraceae*. De er i stand til å delvis oksidere en rekke ulike karbohydrater, og frigjøre korresponderende metabolitter som aldehyder, ketoner og organiske syrer (Mamlouk & Gullo, 2013). AAB oksiderer etanol til eddiksyre via to suksessive reaksjoner, der etanol først blir oksidert til acetaldehyd, som så umiddelbart oksideres videre til eddiksyre. Mange andre bakteriearter er også i stand til å oksidere etanol under aerobe forhold, men i motsetning til AAB kan disse ikke gjennomføre dette under svært sure forhold (Gomes et al., 2018). Rapporterte arter av AAB i surdeig inkluderer arter fra slektene *Acetobacter*, *Gluconobacter* og *Komagataeibacter* (Comasio et al., 2020; Landis et al., 2021)

## 2.4 Fenotypisk identifisering av melkesyre bakterier

Fenotypiske identifiseringsmetoder baserer seg på å studere synlige eller biokjemiske egenskaper hos mikroorganismene. Fenotypiske identifiseringsmetoder er ofte enkle og krever relativt lite utstyr og kompetanse, men er dårlig egnet til taksonomisk klassifisering på artsnivå. Allikevel kan fenotypisk identifisering være nyttig for å enkelt skille større grupper fra hverandre. To mye brukte fenotypiske identifiseringsmetoder for å identifisere melkesyre bakterier er Gram-farging og katalase-test. Melkesyre bakterier er Gram-positive og katalase-negative.

### 2.4.1 Gram-farging

Gram-farging er en differensiell fargemetode for å skille mellom organismer basert på hvordan de blir farget av prosedyren. Metoden deler bakteriene inn i to grupper: Gram-positive og Gram-negative bakterier. Prosedyren for Gram-farging går ut på at et fiksert preparat farges med krystallfiolett som farger alle cellene lilla. Deretter blir cellene behandlet med en jod-løsning som danner store uløselige komplekser når den reagerer med krystallfiolett og gjør at fargen binder til cellene. Etter dette blir preparatene vasket i etanol, noe som fører til at fargen vaskes bort fra celleveggen hos Gram-negative bakterier, mens fargen beholdes av Gram-positive bakterier. Dette er fordi de Gram-positive bakteriene har en cellevegg bestående av et tykt lag med peptidoglykan, og alkoholen krymper porene i peptidoglykanlaget slik at fargestoffet ikke vaskes ut. Gram-negative bakterier har kun et tynt lag med peptidoglykan i celleveggen og har større porer, slik at fargestoffet vaskes ut og de Gram-negative cellene blir fargeløse. Til slutt blir preparatene kontrastfarget med safranin, som gjør at de Gram-negative cellene farges rosa, mens de Gram-positive cellene forblir lilla (Willey et al., 2014a).

## 2.4.2 Katalase-test

Hydrogenperoksid er et reaktivt oksygen-intermediat, som er giftig for anaerobe organismer som ikke har enzymet katalase som spaltes hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) til  $H_2O$  og  $O_2$ . For aerobe og fakultativt aerobe organismer som har katalase er dermed oksygen ikke giftig fordi de er i stand til å spalte hydrogenperoksid, mens for anaerobe organismer er oksygen giftig. Melkesyrebakterier er anaerobe, oksygentolerende mikroorganismer som ikke har katalase, men som er i stand til å beskytte seg mot oksidativt stress (Willey et al., 2014b; Zotta et al., 2017). En katalase-test gjennomføres ved at en cellekultur løses i hydrogenperoksid, og eventuell gassdannelse observeres. Katalase-positive organismer har enzymet katalase og vil spalte  $H_2O_2$  slik at  $O_2$ -produksjon kan observeres.

## 2.5 Genotypisk identifisering ved sekvensering

Tidligere ble taksonomisk klassifisering tilegnet ved fenotypiske metoder, men i dag benyttes hovedsakelig genotypiske metoder for å bestemme taksonomi. De siste tiårene har sekvenseringsteknologi vokst frem i stor fart, noe som har gjort det mulig å bestemme taksonomisk tilhørighet langt mer nøyaktig enn tidligere. Sekvensering kan gjennomføres ved hjelp av en rekke ulike sekvenseringsplattformer og ved flere ulike metoder. For eksempel ved helgenomsekvensering, eller ved å sekvensere kortere DNA-sekvenser som inneholder tilstrekkelig informasjon til at taksonomi kan tilegnes.

For å identifisere og tilegne taksonomisk klassifisering hos bakterier sekvenseres ofte 16S rRNA-genet. 16S rRNA-genet koder for den lille ribosomale subenheten hos bakterier og er svært konservert mellom ulike bakteriearter. Den består av 9 hypervariable områder (V1-V9) som ligger mellom områder som er konserverte mellom arter (Petrosino et al., 2009). De konserverte områdene gjør at man kan lage primere som kan binde til DNA fra svært mange ulike bakterier, mens de variable regionene gjør det mulig å skille mellom bakterier på slektsnivå. 18S rRNA-genet er 16S rRNA-genets homolog hos sopp, men dette har færre hypervariable regioner, og dermed benyttes ofte andre fylogenetiske markører som er mer nøyaktige. Det eukaryote rRNA genet består av 18S, 5.8S og 28S rRNA gener, og disse blir transkribert som en enhet, med Interne Transkriberte Spacer (ITS)-regioner som blir fjernet posttranskripsjonelt. ITS-regionen benyttes ofte som en universell fylogenetisk markør hos sopp, og også 28S rRNA-genet hos sopp kan benyttes som fylogenetisk markør (Schoch et al., 2012).

### 2.5.1 Polymerase-kjedereaksjon (PCR)

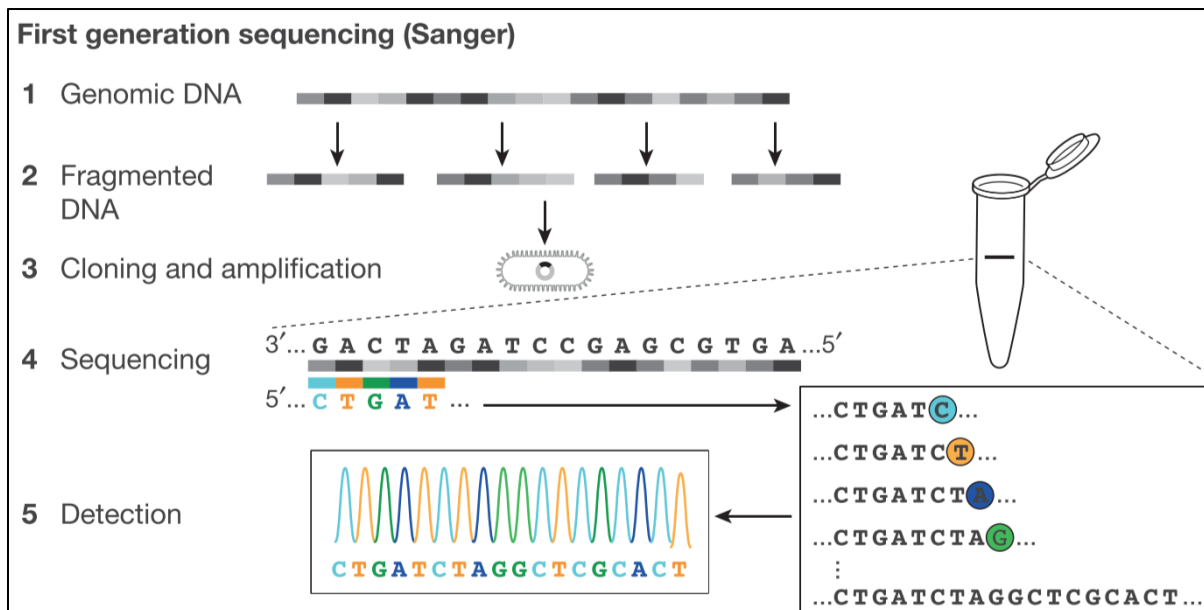
Polymerase-kjedereaksjon (PCR) er en svært viktig molekylærbiologisk metode, som gjør det mulig å detektere og amplifisere spesifikke DNA-segmenter. PCR reaksjonen krever tilstedeværelse av enzymet DNA polymerase, primere, deoxynukleotidtrifosfater (dNTPer) og DNA-templat. DNA polymerase er et enzym som syntetiserer DNA ved å sette på dNTPer på 3'-enden på et oligonukleotid (primer) som er bundet til et lengre DNA-templat. Primerne er korte DNA-fragmenter med en definert

sekvens som er komplementær til en målsekvens på templat-DNAet, og det er primerne som bestemmer hvilken sekvens som skal amplifiseres (Watson et al., 2014). PCR-Reaksjonen foregår i tre steg; 1) denaturering, 2) annealing og 3) elongering. DNA-templatet blir først denaturert ved varme slik at de to komplementære DNA-trådene separeres. Deretter senkes temperaturen slik at primerne kan binde til komplementære sekvenser på templat-DNAet, noe som kalles hybridisering eller annealing. Temperaturen økes så igjen og DNA polymerasen kan binde til primerne og forlenge disse slik at det dannes en kopi av en spesifikk sekvens av det opprinnelige DNA-templatet (Garibyan & Avashia, 2013). Denne syklusen blir deretter repetert 20-30 ganger for tilstrekkelig amplifisering.

PCR-teknologien kan også benyttes kvantitativt (qPCR) for å bestemme mengde DNA i en prøve. Ved qPCR blir mengde DNA målt etter hver PCR-syklus via et fluoriserende fargestoff som binder til DNA, slik at det dannes et sterkere fluoriserende signal jo mer DNA som er til stede. Når det fluoriserende signalet når en terskelverdi som overstiger bakgrunnssignalet kan man så regne ut mengde DNA i den opprinnelige prøven ved å se på antall sykluser som måtte til før terskelnivået ble nådd (ThermoFisher).

### 2.5.2 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering tilhører første generasjon sekvenseringsteknologi og ble først utviklet av Frederick Sanger i 1976 (Shendure et al., 2017). Prinsippet for Sanger sekvensering er det samme som for PCR, men det inngår ekstra trinn i syntesen som gjør at sekvensens identitet kan bestemmes, som vist i Figur 2.6. I tillegg til dNTPer inngår det i reaksjonen også dideoxynukleosidtrifosfater (ddNTPer) som mangler en reaktiv 3'-ende, slik at når disse inkorporeres i den voksende sekvensen vil elongeringen termineres (Lesk, 2017). Fordi det både er dNTPer og ddNTPer til stede vil det være tilfeldig når reaksjonen termineres og resultatet vil være fragmenter av ulik lengde. Hver av ddNTPene har også en fluoriserende markør med ulik farge for hver base. Når en ddNTP settes på den elongerende sekvensen vil den gi fra seg et fluoriserende signal som gjør at nukleotidets posisjon kan bestemmes basert på fragmentets lengde. Fragmentene separeres basert på størrelse via gelelektroforese, og dermed kan ddNTPenes posisjon på sekvensen bestemmes (Merck KGaA, 2021). Ved Sanger sekvensering kan sekvenser med en lengde på 1000-1200 basepar sekvenseres (Zhang et al., 2011).

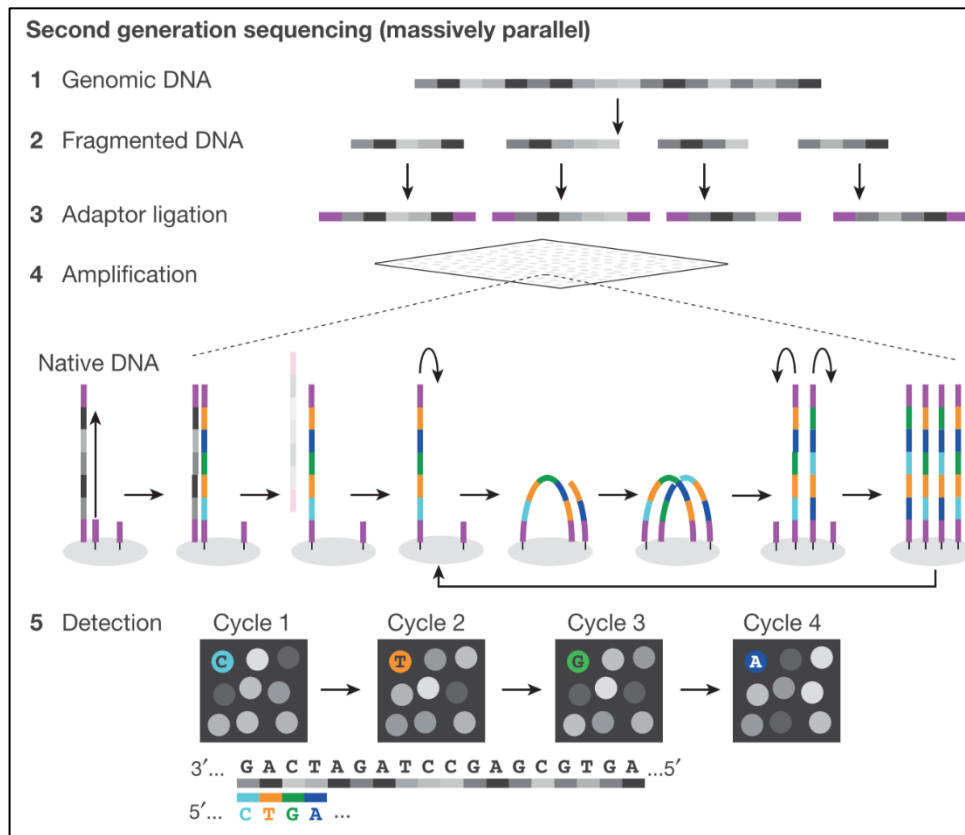


Figur 2.6: oversikt over gangen i Sanger sekvenseringsreaksjonen. Genomisk DNA fragmenteres og amplifiseres i en PCR-reaksjon med ddNTPer med en fluoriserende markør i tillegg til vanlige dNTPer. ddNTPene mangler en reaktiv 3'-ende og vil terminere elongeringsreaksjonen samt sende ut et fluoriserende signal som gjør at basens identitet kan detekteres. Figur hentet fra Shendure et al. (2017).

### 2.5.3 Illumina sekvensering

Illuminasekvensering baserer seg på sekvensering ved syntese («sequencing by synthesis», SBS), der DNA først fragmenteres til 300-800bp og adaptere liggeres til endene av fragmentene. Adapterne binder til komplementære oligonukleotider som er immobilisert på en flow-celle, og broamplifisering generer klynger av replikerte fragmenter rundt hvert originale fragment. Deretter blir klyngene sekvensert ved at de eksponeres for nukleosidtrifosfater (NTPer) som er modifisert med fluoriserende molekyler som blokkerer 3'-OH gruppen og hindrer elongering. Fluorescenssignalet kan så detekteres i kolonien og basens identitet bestemmes. Etter deteksjon av fluorescenssignalet, blir fargen kjemisk fjernet og syklusen gjentas med inkorporering av den neste revers-terminerende basen (Lesk, 2017). En oversikt over sekvenseringsprosessen vises i Figur 2.7. Én Flow-celle kan ha milliarder av brønner med oligonukleotider, og dermed kan svært mange fragmenter sekvenseres samtidig. Denne typen

teknologi kalles derfor massiv parallellsekvensering, eller Next Generation Sequencing (NGS), og skiller seg fra Sanger sekvensering der hver reaksjon foregår i et eget rør (Shendure et al., 2017).



Figur 2.7: Skjematisk oversikt over massiv parallellsekvensering. Genomisk DNA fragmenteres og adaptere liggeres til endene av fragmentene. Adapterne binder til immobiliserte oligonukleotider på en flow-celle og amplifiseres ved broamplifisering slik at det dannes klynger av replikerte fragmenter rundt hvert originale fragment. Klyngene blir sekvensert ved at de eksponeres for fluoriserende nukleosidfosfater (NTPer) som hindrer elongering. Fluoriscenssignalet detekteres, fjernes og en ny fluoriserende NTP settes på slik at neste base kan identifiseres. Figuren er hentet fra (Shendure et al., 2017)

## 2.6 Metoder for å studere mikrobiota

### 2.6.1 $\alpha$ -diversitet

$\alpha$ -diversitet er et mål på diversitet i ett økosystem eller i en prøve.  $\alpha$ -diversitetsutregninger oppsummerer et økologisk samfunn med tanke på dets rikhet (*richness*), jevnhet (*evenness*) eller begge. Rikhet er en betegnelse på antall taksonomiske grupper i prøven eller økosystemet, mens jevnhet handler om hvordan antallet observasjoner innenfor hver taksonomisk gruppe er fordelt. Er det mange taksonomiske grupper er prøvens rikhet høy, og er det en lik fordeling av antall observasjoner fra hver gruppe er jevnheten høy, og vice versa. For å kunne sammenligne  $\alpha$ -diversitet i ulike prøver blir prøvene normalisert (*rarefaction*) for å kompensere for ulikheter i antall reads mellom de ulike prøvene (Willis, 2019). Flere ulike indekser benyttes for å estimere  $\alpha$ -diversiteten i en prøve, blant annet Chao1 og Shannon. Chao1 indeksen beskriver rikheten i en prøve basert på antall arter i prøven som opptrer en eller to ganger. Shannon-indeksen beskriver diversiteten i en prøve både med tanke på rikhet og jevnhet. Høye verdier av Shannon-indeksen indikerer høyere artsrikhet og artsjevnhet, mens

lavere verdier indikerer lavere artsrikhet og/eller en ujevn fordeling mellom artene (Hollister et al., 2015).

### 2.6.2 $\beta$ -diversitet

$\beta$ -diversitet er et mål på diversitet mellom økosystemer eller prøver. For å beskrive  $\beta$ -diversitet blir ofte graden av likhet mellom samfunn regnet ut med tanke på artssammensetning, artsdistribusjon eller begge. Begrepene likhet og avstand benyttes ofte for å beskrive til hvilken grad to samfunn ligner hverandre. Utrekning av avstand kan gjøres ved hjelp av flere ulike indekser, som vektlegger ulike aspekter ved samfunnene. Bray-Curtis indeksen, som har blitt benyttet i denne oppgaven, tar i betraktning tilstedeværelse av arter i tillegg til relative tallrikhet av de ulike artene (Hollister et al., 2015).

### 3 Materialer og metoder

#### 3.1 Etablering og oppbevaring av surdeigskulturer

Det ble etablert spontane surdeigskulturer av mel av fire ulike kornslag: hvete (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*), spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*), emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*) og einkorn (*Triticum monococcum*) under hjemmekjøkken-betingelser. Mel av einkorn, emmer og spelt var av typen sammalt fin, mens mel av hvete var siktet. Surdeigskulturene ble opparbeidet ved at 50 g av de respektive melsortene ble blandet med 50 g springvann og inkubert i romtemperatur i 24 timer. Videre ble kulturene opprettholdt ved «backslopping» av 100 g kultur i 50 g mel og 50 g springvann hver 24. time i 12 dager til pH hadde stabilisert seg i alle deigene (pH rundt 4 etter 8-9 timer). Videre ble surdeigene oppbevart ved 4 °C og «matet» en gang i uken ved backslopping av 50 g kultur i 75 g mel og 75 g springvann og inkubering overnatt.

#### 3.2 Isolering av melkesyrebakterier og gjær

##### 3.2.1 Vekstmedier

Vekstmediene ble laget i samsvar med produsentens anbefalinger og ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter, bortsett fra Rose-Bengal-agar (RB-agar) som ble autoklavert ved samme temperatur i 5 minutter. Alle mediene ble oppbevart mørkt ved 4 °C i tiden fra tillaging til de ble benyttet. Tabell 3.1 viser en oversikt over de ulike agarer og buljonger som ble benyttet i forsøket.

Tabell 3.1: Medier benyttet i forsøket. Aerob inkubering dersom annet ikke er oppgitt.

Agar/buljong	Produsent	Vekst	Inkubasjons-temperatur (°C)	Inkubasjonstid (dager)
Plate Count Agar (PCA)	Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland)	Totalt antall mesofile bakterier	30	2-4
De Man, Rogosa, Sharp (MRS) agar*	Merck KGaA & VWR International BVBA (Leuven, Belgia)	Melkesyrebakterier	30	2-4
<i>Lactobacillus</i> ssp.-selektiv (LBS) agar	Becton, Dickinson Microbiology Systems (Sparks, MD, USA)	<i>Lactobacillus</i> ssp.	30, anaerobt	3-4
Rose-Bengal Chloramphenicol (RB) agar	Merck KGaA	Mugg og gjær	22	5



Yeast and Mould (YM) agar**	Oxoid Ltd. (Hampshire, England)	Mugg og gjær	30	4
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck KGaA	Gjær	30	2-4
MRS buljong	Merck KGaA	Melkesyrebakterier	30	1
Glucose Yeast Extrakt Peptone (GYP) buljong***	Oxoid Ltd & Merck KGaA	Gjær	30	1-3

\*MRS agar: MRS buljong (Merck KGaA) ble tilsatt 15 g/L Agar pulver (VWR).

\*\* YM: pH 4 ved tilsetning av melkesyre (ca. 1mL 20 % løsnings/200 mL agar).

\*\*\* GYP buljong: 20 g/L anhydrous D(+)-Glucose (Merck KGaA), 1,5 g/L yeast extract (Oxoid LTD) og 10 g/L pepton (Merck KGaA)

### 3.2.2 Isolering

Det ble veid ut 10,0 g av de ulike surdeigskulturene som så ble tilsatt 90 mL Ringers løsning. Prøvene ble homogenisert (Stomacher 400, Seward Ltd., West Sussex, Storbritannia) og videre fortynnet i Ringers løsning før de ble støpt inn i ulike agarer (PCA, MRS, LBS, RB og YM). Agarskålene ble inkubert i henhold til informasjon gitt i Tabell 3.1. Det ble videre isolert kolonier fra de ulike skålene. Det ble plukket fem kolonier fra hver agar bortsett fra PCA, totalt 80 kolonier (n= 80). Koloniene fra MRS og LBS agarene ble overført til 5 mL MRS-medium og koloniene fra YM- og RB-agarene ble overført 10 mL GYP-medium og inkubert ved 30 C° til vekst var synlig, 24 t – 3 døgn. For de fleste prøvene var det tilstrekkelig med inkubering i 24 timer, men noen av prøvene ble inkubert i tre døgn uten at de viste god vekst. Kulturer (fire stk. YM/RB isolat) med svak vekst etter tre døgn ble oppkonsentrert ved sentrifugering ved 3500 rpm i 10 minutter (Kubota 2010, Kubota Corporation, Tokyo, Japan) og resuspending av pellet i 1 mL MRS medium med 15 % (v/v) glycerol. Koloniene fra MRS og LBS-agar ble frosset ned i cryorør ved -80 C° i MRS inneholdende 15 % glycerol, mens koloniene fra RB og YM-agaren ble nedfrosset i GYP tilsatt 15 % glycerol.

### 3.3 Fenotypisk identifisering av MSB og Gjær

De nedfrosne isolatene ble strøket ut på MRS- eller PDA-agar, avhengig av om de var forventet å være melkesyrebakterier (isolert fra MRS- eller LBS-agar) eller gjær (isolert fra YM- eller RB-agar). Kulturenes renhet ble bedømt ved visuell inspeksjon av skål, samt mikroskopering av kolonier ved bruk av et Leica DM750 mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Tyskland). Kulturene som ikke fremsto som renkulturer ble strøket ut og inokulert på nytt i respektive medier til de fremstod som rene, før de igjen ble frosset ned ved -80 °C i medium med 15 % glycerol. For de forventede melkesyrebakteriene ble det gjennomført videre testing for å verifisere at de var melkesyrebakterier.

### 3.3.1 Gram-farging og Katalase-test

Renkulturene av de forventede melkesyrebakteriene ble Gram-farget og katalase-testet. Gram-fargingen ble gjennomført ved at en koloni fra hver av MRS-skålene ble rørt ut i en dråpe Ringers løsning på et objektglass. Preparatet ble så lufttørket før det ble varmfiksert og farget med krystallfiolett etterfulgt av jod-jodkalium, vasking med etanol og til slutt kontrastfarging med safranin. De Gramfargede preparatene ble studert ved lysfeltmikroskopi (Leica DM750) ved 400 og 1000 ganger forstørring, og resultat av Gram-fargingen, samt morfologi hos cellene ble observert.

For å undersøke om kulturene bestod av bakterier som produserte enzymet katalase ble det gjennomført en katalase-test. Testen ble gjennomført ved at en koloni ble plukket og rørt ut i en dråpe 3 % hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) på et objektglass og eventuell gassdannelse ble observert.

## 3.4 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering

### 3.4.1 Lysis og DNA ekstraksjon

Genomisk DNA fra 32 av 80 isolater ble ekstrahert. For hver surdeigskultur ble åtte isolater valgt ut, to isolater fra hvert medium, og isolatene som ble valgt var de som viste størst morfologisk variasjon ved mikroskopering. En podeskje av de utvalgte, nedfryste renkulturene ble podet i 5 mL MRS- eller GYP-buljong og inkubert over natt ved 30 °C. Etter påvist vekst ble 1 mL av kulturen overført til 1,5 mL eppendorfrør og sentrifugert ved 16100 RCF i 1 min i en Eppendorf 5415D sentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble så dekantert og pelleten ble løst i 1 mL Ringers løsning før suspensjonen på nytt ble sentrifugert ved 16100 x g i 1 min. Vaskesteget ble gjentatt én gang til før pelleten ble løst i 500 µL elueringsløsning (Elution Solution (10 mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA, pH 9,0), Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) og inkubert ved 99 °C i 10 minutter på en varmeblokk (block heater SBH130DC, Stuart Equipment, Storbritannia). Ved ufullstendig lysering ble bakteriekulturer og gjærkulturene overført til 2 mL Micro Tubes (Starstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Tyskland) med syrevaskete glassperler ( $\leq 106 \mu\text{m}$ ) (Sigma-Aldrich Co.) og vortexet horisontalt i 10 minutter. Alle rørene ble så sentrifugert i 1 min ved 16100 RCF, og supernatanten overført til nytt eppendorfrør.

Konsentrasjon av DNA i prøvene ble bestemt ved hjelp av et Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA), og prøvene ble fortynnet slik at det ble tilsatt <10 ng/µL DNA i hver PCR-reaksjon.

### 3.4.2 PCR

For å amplifisere isolert DNA fra de ulike kulturene ble det gjennomført en PCR-reaksjon. En oversikt over reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i reaksjonsblandingen er gitt i Tabell 3.2.

Tabell 3.2: Reagenser og konsentrasjoner i reaksjonsblanding for PCR.

Reagens	Initialkonsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon ( $\mu\text{L}$ )
Q5 master mix	2x	1x	10
Primer 1	5 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	1
Primer 2	5 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$	1
Evagreen	20x	1x	1
BSA			0,5
PCR grade H <sub>2</sub> O		totalt 18 $\mu\text{L}$	4,5

Primerne som ble benyttet var 5R og 11F for amplifisering av hele 16S rRNA-genet hos bakterier og NL1 og NL4 for amplifisering av 28S rRNA-genet hos gjær (Tabell 3.3). Kun fire av de totalt 16 isolatene som ble isolert fra YM- eller RB-agar ble identifisert som gjær ved mikroskopering, og de resterende isolatene ble derfor amplifisert med primere for 16S rRNA-amplifisering.

Tabell 3.3: Primere benyttet for amplifisering av 16S rRNA og 26S rRNA genet hos hhv. bakterier og gjær.

Primer	Mål	Sekvens (5' $\rightarrow$ 3')
5R	16S rDNA	ATG AAG AAT AGG GCG AAG GG
11F	16S rDNA	CTC CTC AAA GCA ATA CAC TG
NL1	28S rDNA	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
NL4	28S rDNA	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G

18  $\mu\text{L}$  av PCR-reaksjonsblandingen ble overført til en PCR-plate og tilsatt 2  $\mu\text{L}$  templat-DNA til et totalvolum på 20  $\mu\text{L}$  i hver brønn. Amplifiseringen ble utført i en LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Sveits), og PCR-programmet er gitt i Tabell 3.4. Identisk PCR-program ble benyttet for bakterier og gjær.

Tabell 3.4: PCR-program benyttet i amplifisering av DNA hos bakterier og gjær.

PCR steg	Tid (minutter)	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Repetisjoner
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:15	98	35
«Annealing»	00:30	55	
Elongering	01:00	72	
Endelig elongering	10:00	72	1

### 3.4.3 Rensing av PCR-produkt

Etter PCR-reaksjonen ble PCR-produktet renset med GenElute PCR cleanup kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) eller med Agencourt AMPure XP kuler (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA). Prøvene som hadde en tilfredsstillende DNA-konsentrasjon etter første runde med lysis og PCR ble

renset med GenElute PCR cleanup kit, mens prøvene som ble lysert og amplifisert en gang til ble rensset med AMPure PCR-rensing.

PCR-rensing med GenElute PCR cleanup kit ble gjennomført i henhold til produsentens anbefalinger, med unntak av at det ble benyttet 30 µL elueringsbuffer i stedet for 50 µL. AMPure PCR-rensing ble gjennomført ved at 0,7x volumet av PCR-produktet, dvs 14 µL AMPure XP kuler til 20 µL PCR-produkt, ble blandet ved pipettering og overført til en ny PCR-plate. Platen ble inkubert i 5 minutter før den ble overført til en magnet og videre inkubert i 2 minutter. Supernatanten ble deretter fjernet og prøvene ble tilsatt 100 µL 80 % EtOH og inkubert i 30 sekunder før dette igjen ble fjernet. Dette vaskesteget ble gjentatt én gang før prøvene ble lufttørket i 7 minutter for å fjerne rester av EtOH. Platen ble så fjernet fra magneten og tilsatt 30 µL elueringsbuffer og inkubert i 2 minutter før den ble satt tilbake på magneten og videre inkubert i 5 minutter. Eluatet ble så overført til nye Eppendorfrør og de rensede PCR-produktet ble oppbevart ved -20 °C.

#### 3.4.4 Sanger sekvensering

Etter rensing av PCR-produktet ble DNA konsentrasjonen i prøvene bestemt ved Qubit 2.0 Fluorometer, og avhengig av DNA-konsentrasjon ble 5-7 µL av det rensede PCR produktet overført til to separate eppendorfrør og tilsatt 5 µM primer (et rør med F-primer og et rør med R-primer, samme primere som nevnt i Tabell 3.1) til et totalvolum på 10 µL i hvert rør. Rørene ble deretter sendt til GATC Biotech AG i Tyskland for Sanger sekvensering. De resulterende sekvensene ble bearbeidet ved bruk av BioEdit (Hall, 1999) ved at områder på sekvensene med lav kvalitet ble fjernet og de to sekvensene fra samme prøve ble montert sammen. Deretter ble GenBank og BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (Zhang et al., 2000)) benyttet til å finne sekvensenes identitet.

### 3.5 Genotypisk identifisering av surdeigskulturenes mikrobielle sammensetning ved Illumina MiSeq sekvensering

For å identifisere hvilke mikroorganismer som var til stede i de ulike surdeigskulturene ble det gjennomført neste generasjon sekvensering (NGS) av 16rRNA genet og «Internal Transcribed Spacer» (ITS) regionen av totalt 68 prøver. Prøvene som ble sekvensert ble innhentet over en lengre tidsperiode for å undersøke mikrobiotaens stabilitet i de ulike surdeigskulturene. Det ble tatt ut omtrent 20 g prøve i Falcon rør som ble frosset ned ved -20 °C hver uke i 8 uker fra pH hadde stabilisert seg i deigene etter initial etablering. Prøvene ble tatt ut ca 8 timer etter poding/mating ved første uttak da kulturene ble oppbevart i romtemperatur, og etter 24 timer ved kjøleskapsoppbevaring. Mellom uttak 5 og 6 var det et opphold på 16 dager i stedet for 1 uke. Før dette oppholdet ble starterne matet med en høyere andel mel enn ved de andre matingene.

Etter de første åtte uttakene ble det i tillegg tatt ut seks uttak til sekvensering over en periode på 24 timer etter mating av surdeigene, ved T0, T2, T4, T8, T12 og T24. Før mating ved T0 ble surdeigskulturene matet ca. 8 timer tidligere og inkubert i romtemperatur, slik at inokulasjon ved T0 ble gjort med aktiv starter. Det ble også gjort uttak til sekvensering samtidig som det ble gjort uttak til metabolismestudier av surdeigskulturene. Disse ble også oppbevart ved -20 °C frem til videre bearbeidelse av prøvene. DNA ble også isolert og sekvensert fra ufermentert mel. De ulike uttakene ble tilegnet en prøve-ID og Tabell 3.5 viser en enkel forklaring av forkortelsene benyttet til dette formålet. En fullstendig oversikt over prøvenes meltype, uttak og prøve-ID finnes i Vedlegg 4.

Tabell 3.5: Oversikt over forkortelser benyttet i prøve-ID for de ulike uttakene.

<b>Forkortelse</b>	<b>Betydning</b>
EK	Einkorn
EM	Emmer
H	Hvete
S	Spelt
U	Uke
T	Time
F	Ufermentert mel («Flour»)
M	Metabolisme

### 3.5.1 DNA ekstraksjon

Surdeigsprøvene ble forberedt ved at prøvene ble tint i romtemperatur og 1,0 g prøve ble veid ut, tilsatt 9,0 mL Ringers løsning og homogenisert ved risting for hånd. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 400 rpm (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i 5 minutter for å fjerne partikler fra melet. 1 mL av supernatanten ble så overført til 1,5 mL eppendorfrør og sentrifugert ved 16100 RCF i en Eppendorf Microcentrifuge 5415D i 1 minutt. Supernatanten ble så helt av og pelleten ble resuspendert i 1 mL sitratvann, sentrifugert i 1 minutt og supernatanten dekantert av. Dette vaskesteget ble gjentatt én gang før all supernatanten ble pipettert vekk og pelleten ble frosset ned ved -20 °C inntil DNA ekstraksjon. Mikrobielle pellerer fra ufermentert mel ble preparert ved at 10 g mel ble løst i 90 mL Ringers løsning og 40 mL av denne løsningen ble overført til et 50-mL Falconrør. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 400 rpm i 5 minutter (Heraeus Multifuge XR3), supernatanten overført til nye Falcon-rør og deretter sentrifugert ved 8000 rpm i 10 min. Pelleten ble deretter løst i 1 mL sitratvann, overført til eppendorfrør og vasket i sitratvann igjen som beskrevet over, før nedfrysing ved -20 °C.

DNA fra de ulike prøvene ble ekstrahert ved hjelp av DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland). Ekstraksjonene ble utført etter metoden beskrevet av produsenten, med noen modifikasjoner. Pelletene ble resuspendert i 450 µL MBL-løsning som hadde blitt varmet ved 55 °C i 10 minutter. Resuspensjonen ble deretter overført til PowerBead Tube, og varmet ved 70 °C i 10

minutter på en varmeblokk (block heater SBH130DC) for å effektivisere lysis av cellene. Det ble deretter tilsatt 10 µL CTAB for å fjerne PCR-inhibitoriske polysakkarider. Videre ble prøvene behandlet i samsvar med produsentens anbefalte fremgangsmåte, med unntak av at det ble tilsatt 50 µL elueringsbuffer i stedet for 100 µL. DNA ble frosset ned ved – 20 °C før videre analyser.

### 3.5.2 PCR for 16S og ITS rRNA amplifisering

V3 og V4 regionene av 16S rRNA genet ble amplifisert ved PCR med en LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Reagenser, konsentrasjoner og volum som ble benyttet i PCR-reaksjonsblandingen er vist i Tabell 3.6.

Tabell 3.6: Oversikt over reagenser, konsentrasjon og volum benyttet i PCR for amplifisering av 16S og ITS rRNA for Illumina sekvensering (MiSeq)

Reagens	Initialkonsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µL)
<b>Q5 master mix</b>	2x	1x	10
<b>Primer 1</b>	5 µM	0,2 µM	1
<b>Primer 2</b>	5 µM	0,2 µM	1
<b>Evagreen</b>	20x	1x	1
<b>Template DNA</b>			2
<b>PCR grade H<sub>2</sub>O</b>		totalt 20 µL	4,5

Alle prøvene ble amplifisert både med 16S og ITS primere. Primere benyttet for amplifisering av deler av 16S og ITS regionen hos bakterier og gjær er vist i Tabell 3.7

Tabell 3.7: primere benyttet for qPCR amplifisering av 16S- og ITS-regioner hos henholdsvis bakterier og gjær for Illumina sekvensering av surdeigsprøvene samt ufermentert mel.

Primer	Mål	Sekvens (5' → 3')
Uni340F	16S rDNA	CCTACGGGRBGCASCAG
Bac806R	16S rDNA	GGACTACYVGGGTATCTAAT
BITS	ITS rDNA	ACCTGCGGARGGATCA
B58S3	ITS rDNA	GAGATCCRTTGYTRAAAGTT

Amplifiseringen ble utført i en LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Sveits), og PCR-programmet er gitt i Tabell 3.8

Tabell 3.8: PCR-program for første qPCR-reaksjon for amplifisering av 16S- og ITS-regioner hos bakterier og gjær for Illumina-sekvensering av surdeigsprøvene og ufermentert mel.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Repetisjoner
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:10	98	35
«Annealing»	00:30	53	
Elongering	00:20	72	

Endelig elongering	05:00	72	1
Smeltekurve	∞		-

PCR produktet ble rensert med Agencourt AMPure XP kuler som beskrevet i kapittel 3.4.3, med unntak av at det ble benyttet 20 µL elueringsbuffer. Eluatet ble overført til en ny, ren plate og fryst ned ved -20 °C inntil videre bearbeiding.

### 3.5.3 Illumina Index PCR

Illumina Indexing PCR ble utført med unike kombinasjoner av i5 og i7 Nextera index primere (Illumina, CA, USA). PCR ble utført i et totalvolum på 25 µL som bestod av 1,25 U of HotFirePol® DNA polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), HotFirePol® buffer B2 (Solis BioDyne), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs og 0,25 mM av hver primer, som vist i Tabell 3.9. Det ble laget en reaksjonsblanding med polymerase, buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPer, Evagreen og vann og 19 µL av denne ble tilsatt hver brønn på en PCR-plate før 1 µL av hver primer og 4 µL rensert DNA fra ble tilsatt.

Tabell 3.9: Oversikt over reagenser, konsentrasjon og volum benyttet i Illumina indexing PCR med unike kombinasjoner av i5 og i7 Nextera index primere.

Reagens	Initial konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µL)
<b>HotFirePol® DNA polymerase</b>	5 U/µL	1,25 U	0,25
<b>HotFirePol® buffer B2</b>	10x	1x	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	2,5 mM	2,5
<b>dNTPs</b>	10 mM	200 µM	0,5
<b>Evagreen</b>	20x	1x	1
<b>Index forward primer</b>	5 µM	0,25 µM	1
<b>Index reverse primer</b>	5 µM	0,25 µM	1
<b>Template DNA</b>	5 – 100 ng/µL	7,5 – 150 ng	4
<b>PCR grade H<sub>2</sub>O</b>		<b>total 25 µL</b>	12,25

Indexing-PCR ble utført i en LightCycler® 480, og PCR-programmet er gitt i Tabell 3.10.

Tabell 3.10: PCR-program for Illumina Indexing PCR med unike kombinasjoner av i5 og i7 Nextera index primere..

Program	Temperatur (°C)	Tid (min)	Repetisjoner
Innledende denaturering	95	15:00	1
Denaturering	95	00:30	15
«Annealing»	55	01:00	
Elongering	72	00:45	
Endelig elongering	72	07:00	1

#### 3.5.4 Rensing og normalisering av PCR-produkt

PCR-produktet ble rensert og normalisert SequalPrep™ Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). 20 µL PCR-produkt ble overført til a SequalPrep™ Normalization Plate well, og ble videre behandlet i samsvar med produsentens anbefalinger. De rensede DNA-eluatene ble så samlet til et bibliotek i hvert sitt eppendorfrør, ett for 16S og ett for ITS. DNA konsentrasjon i bibliotekene ble målt ved Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), og ble deretter oppkonsentrert 10x på grunn av lav DNA-konsentrasjon. Konsentreringen ble gjennomført med GenElute PCR cleanup kit (Sigma-Aldrich), ved at 300 µL av biblioteket ble satt på kolonnen, rensert etter produsentens anbefalinger og eluert med 30 µL elueringsbuffer.

#### 3.5.5 Agarose gelelektroforese

Det ble gjennomført en agarose gelelektroforese av bibliotekene. En 1 % agarosegel ble laget ved at 0,5 g agarose (Sea Kem LE agarose, Lonza, Rockland, USA) ble løst i 50 mL 1x TAE (Tris Acetate EDTA, Merck) ved koking i mikrobølgeovn. Løsningen ble deretter delvis nedkjølt og tilsatt 2,5 µL GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA), før den ble overført til en elektroforese-form for å stivne. Hver brønn ble tilsatt 10 µL av en løsning bestående av 4 µL prøve, 2 µL Gel loading dye (New England Biolabs), og 5 µL PCR-grade water. Det ble benyttet en 100 bp ladder. Elektroforesen ble kjørt ved 80 V i omtrent 45 minutter ved hjelp av en Power Pac 300 (Bio Rad, Hercules, USA).

#### 3.5.6 Illumina Sekvensering

Bibliotekene ble kvantifisert ved hjelp av KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Cape Town, Sør-Afrika) og fortynnet i PCR-vann til 4 nM. 5 µL av de ulike bibliotekene ble blandet sammen og 5 µL av denne ble deretter denaturert med 5 µL 0,2 N NaOH. Bibliotekene ble sekvensert ved hjelp av en Illumina Miseq platform (Illumina, San Diego, CA USA) med 300 bp paired-end sequencing kit.

#### 3.5.7 Bioinformatisk analyse

Analyse av data fra Illumina totalsekvensering ble gjort i R (R Core Team, 2021). Reads ble kvalitetsfiltrert ved hjelp av R-pakken «dada2» (Callahan et al., 2016). Feilmodellen i Dada2 ble laget ved å bruke 1 million tilfeldig filtrerte reads. Sekvensvarianter (SV) ble utledet ved hjelp av DADA2 algoritmen med fjerning av kimerer. Sekvensvarianter som var kortere enn 375 og 200 basepar for henholdsvis 16S og ITS ble fjernet fra den endelige tabellen. Taksonomi på slektsnivå ble tildelt ved hjelp av R-pakken «Decipher» mot SILVA SSU databasen (Quast et al., 2013; Wright, 2016). SV-tabellen ble normalisert ved å benytte samme antall reads per prøve. Hos sekvensvariantene (SV-ene) for bakterier som utgjorde mer enn 0,05 % av det totale antall sekvensvarianter, eller 1 % av sekvensvariantene innad i en prøve ble videre taksonomi bestemt på artsnivå ved hjelp av BLAST (Zhang et al., 2000). R-pakken «ggplot2» ble benyttet for fremstilling av figurer (Wickham, 2009).



### 3.5.8 Statistisk analyse

$\alpha$ -diversitet hos både bakterier og gjær ble bestemt ved å benytte Shannon og Chao1 indekser.  $\alpha$ -diversitets plot ble fremstilt ved hjelp av R-pakken «ggplot2». En «Principal Coordinates Analysis» (PCoA) ble utført på kvantitativt normalisert data fra 16S og ITS Illumina-sekvenseringen, ved hjelp av R-pakkene «vegan» (Oksanen et al., 2020) og «ape» (Paradis & Schliep, 2019), og plott fremstilt ved bruk av «ggplot2».

«Regularized Canonical Correlation Analysis» (RCC) og produksjon av korrelasjonsplot («*heat map*») for å vise korrelasjon mellom arter og metabolitter i prøven ble utført ved hjelp av R-pakken «MixOmics» (Rohart et al., 2017).

## 3.6 Vekst- og Metabolismeforsøk

For å undersøke produksjon av organiske syrer og forekomst og omdannelse av karbohydrater ble det gjennomført «high performance liquid chromatography» (HPLC) av surdeigskulturene ved mating (T0) og etter 24 timers inkubasjon i romtemperatur (T24). Ved uttakene til HPLC ble celletall av gjær og bakterier i kulturene undersøkt ved innstøping i henholdsvis RB- og MRS-agar både ved T0 og T24. I tillegg ble det utført pH-målinger ved de samme tidspunktene.

### 3.6.1 HPLC

HPLC-analysen ble gjennomført etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner. Det ble gjort tre gjentak med en ukes opphold mellom hvert gjentak. Uttakene til metabolismestudier ble foretatt etter uttakene fra de første åtte ukene (U1-U8), og ved andre gjentak ble det tatt ut prøver til Illumina sekvensering av mikrobiota i prøvene ved T0 og T24.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid inn i et 10 mL-rør. Prøvene ble tilsatt 2,5 mL ionebyttet vann, ristet godt for å løse opp klumper og så tilsatt 200  $\mu$ L 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Tyskland) og 8 mL acetonitril (Merck). Etter tilsetning av acetonitril ble prøvene ristet for hånd, deretter satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min. Prøvene ble sentrifugert i romtemperatur, 15 minutter ved 1470 x g (3500 rpm) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Supernatanten ble deretter filtrert med 0,2  $\mu$ m PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør. Analysen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). 25  $\mu$ l av prøven ble injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories).

Kolonnetemperatur var satt til 32 °C. Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), med en hastighet på 0,4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck) og av organiske syrer ble sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

### 3.6.2 Måling av CO<sub>2</sub>-produksjon

Det ble utført en kvantitativ analyse av CO<sub>2</sub>-produksjon i prøvene ved hjelp av en CO<sub>2</sub>analysator (ADC 225 Mk3, Analytical Development, Hoddson, England) etter en metode beskrevet av Narvhus et al. (1993) med noen modifikasjoner. 10,0 g av surdeigskulturene ble overført til sterile «headspace» prøveglass (Machery Nagel, Dueren, Tyskland) og forseglet med septa med aluminiumring (20-CBT3 septa, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble så inkubert i 24 timer før analyse av CO<sub>2</sub>-produksjon. Prøvene ble vortexet til mesteparten av synlige gassbobler i deigen hadde kollapset og 0,1 mL av gassfasen ble injisert i CO<sub>2</sub>-analysatoren ved å benytte en engangssprøyte, og alle målingene ble gjort i to paralleller. Standardkurven gitt i Vedlegg 5 ble benyttet for omregning til ppm.

## 4 Resultater

### 4.1 Mikrobiologisk analyse av surdeigene

Fire ulike surdeigskulturer av ulikt mel ble undersøkt for å bestemme antall og fordeling av ulike mikroorganismer i de ulike surdeigskulturene, samt å identifisere og isolere renkulturer fra surdeigene. Kulturene ble etablert *ab initio*, under «hjemmekjøkkenbetingelser» med springvann og mel av hvete (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*), spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*), emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*) og einkorn (*Triticum monococcum*). Etter etableringsfasen ble surdeigene dyrket på ulike medier (PCA-, LBS-, MRS-, YM-, og RB-agar) for å bestemme celletall i de ulike surdeigene. Celletall i de ulike kulturene ved første utplating er vist i Tabell 4.1. Tabellen viser at det totale antallet mesofile bakterier for surdeigene lå mellom 6,97 og 8,51 log kde/g, med høyest celletall i einkorn-surdeigen og lavest celletall i speltsurdeigen. På både LBS- og MRS- agarskålene var celletallet rundt 9,4 log kde/g for spelt-, emmer- og einkornsurdeigene, og 9,19 og 9,27 log kde/g på henholdsvis LBS og MRS-skålene for hvetesurdeigen. Celletallet på YM- og RB-agarskålene lå mellom 5,65 og 7,10 log kde/g og 5,71 og 7,08 log kde/g med høyest celletall i hvete-surdeigen og lavest celletall i einkorn-surdeigen på begge agarene.

Tabell 4.1: Celletall (log kde/g) i de ulike surdeigene laget på spelt, hvete, einkorn og emmer ved første uttak etter etableringsfasen bestemt ved innstøpning og dyrking på ulike medier. Dyrking på PCA-agar ble foretatt for å anslå totalt antall aerobe, mesofile bakterier, LBS-agar for å anslå presumptive melkesyrebakterier, MRS-agar for melkesyrebakterier og YM- og RB-agar for å anslå antall gjær.

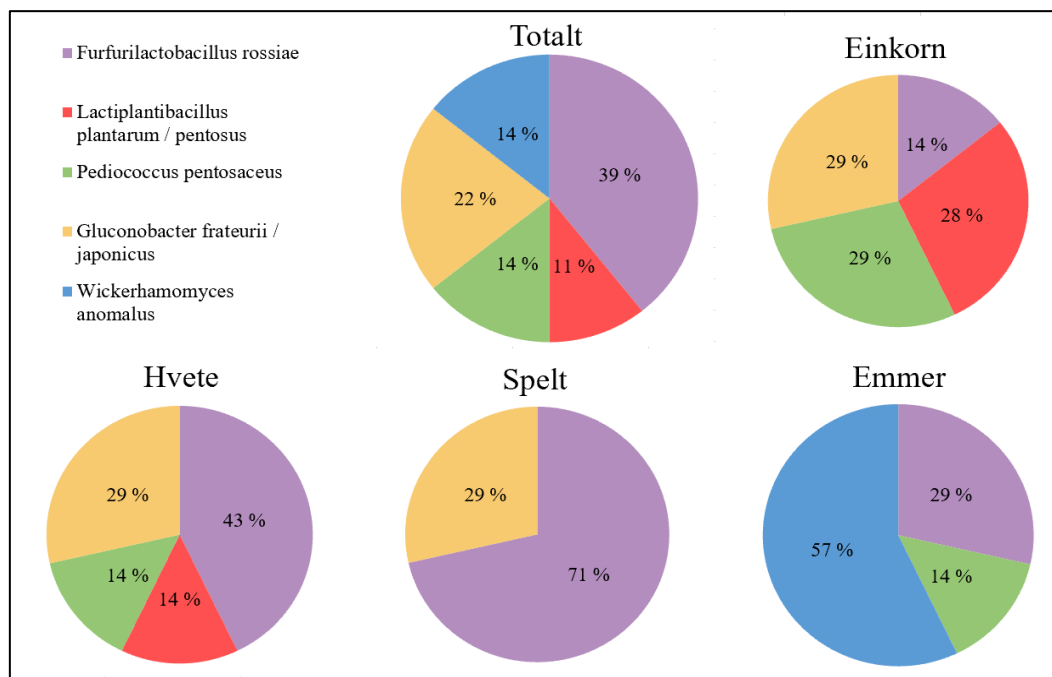
Surdeig	Celletall (log kde/g)				
	PCA	LBS	MRS	YM	RB
Hvete	7,78	9,19	9,27	7,10	7,08
Spelt	6,97	9,41	9,40	6,11	6,72
Einkorn	8,51	9,38	9,40	5,65	5,71
Emmer	8,35	9,41	9,42	6,04	5,92

#### 4.1.1 Fenotypisk identifisering av renkulturer

Fra kulturene som hadde blitt plattet ut på LBS-, MRS-, YM- og RB-agarene ved uke 1 etter etableringsfasen ble det plukket 80 kolonier (20 fra hver agar), som så ble rendyrket. Det ble gjennomført Gram-farging og katalase-test av alle renkulturene isolert fra MRS- og LBS-agar og samtlige var Gram-positive og katalase-negative i samsvar med forventningen om at dette skulle være melkesyrebakterier. Ved mikroskopering viste alle isolatene fra disse agarene svært liknende morfologi, med ovoide celler som hovedsakelig opptrådte unicellulært, men også i noen grad i par og korte kjeder. Hos isolatene hentet fra RB- og YM-agar var det kun isolatene fra emmer-kulturen som morfologisk lignet gjær og der knopp skyting kunne observeres. De øvrige isolatene lignet bakterier med svært lik morfologi som beskrevet for isolatene fra MRS- og LBS-agar.

#### 4.1.2 Sanger sekvensering av renkulturer

Fra hver surdeigskultur ble 20 bakterie- eller gjærkulturer isolert, og åtte av disse ble valgt ut til videre identifisering ved Sanger sekvensering; to fra hvert medium. Totalt ble 32 isolater sendt til Sanger sekvensering, og av disse ble taksonomi vellykket bestemt hos 28 isolater (syv fra hver surdeig). Der taksonomi ikke med sikkerhet kunne bestemmes til én art, er dette angitt ved «/» mellom de mulige artene. Majoriteten av isolatene (18) ble identifisert som MSB, der *Furfurilactobacillus rossiae* (tidligere *Lactobacillus rossii/Lactobacillus rossiae*) var den dominerende arten med 11 isolater, mens tre av isolatene ble identifisert som *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* (tidligere *Lactobacillus plantarum/pentosus*) og fire som *Pediococcus pentosaceus*. Seks isolater ble identifisert som eddiksyrebakterier av arten *Gluconobacter frateurii/japonicus*, og kun fire isolater ble identifisert som gjæren *Wickerhamomyces anomalus*. Figur 4.1 viser fordelingen av identifiserte isolater totalt, samt fra de ulike surdeigskulturene. Det ble kun isolert gjær-kulturer fra emmer-surdeigen, og disse ble isolert fra RB- og YM-agar. Fra de andre surdeigskulturene var samtlige av isolatene hentet fra RB-agar eddiksyrebakterier, mens isolatene plukket fra YM-agar var melkesyrebakterier. Se Vedlegg 3 for fullstendig oversikt over alle sekvenserte isolater.



Figur 4.1: Oversikt over isolater fra de ulike surdeigskulturene identifisert ved hjelp av Sanger sekvensering av 16S og 28S rRNA-genet hos bakterier og gjær. Totalt ble 32 isolater sekvensert, 8 fra hver surdeig, og av disse ble 7 isolater fra hver surdeig identifisert.

#### 4.2 Mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering

Mikroorganismer til stede i surdeigskulturene ble undersøkt ved amplicon-sekvensering av 16S og ITS rRNA-genene. Sekvensene ble delt inn i 105 og 574 sekvensvarianter (SV-er) for henholdsvis bakterier og sopp. Taksonomisk klassifisering av SV-ene ble videre bestemt og SV-ene identifisert som samme art ble slått sammen. Dette viste at melkesyrebakterier utgjorde over 99 % av alle identifiserte bakterier i prøvene. De mest fremtredende artene av MSB var *Furfurilactobacillus*

*rossiae* (50,5 %), *Lactilactobacillus graminis/curvatus* (27,9 %, tidligere *Lactobacillus graminis/curvatus*), samt *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus/paraplantarum/fabifermentas* (10,9 %). *Pediococcus* utgjorde kun litt over 1,5 % av det totale antallet bakterier identifisert med Illumina-sekvensering.

Gjær utgjorde kun i overkant av 33 % av totalt antall sopp i alle prøvene, men det var store variasjoner mellom de ulike surdeigene. I einkorn- og emmer-surdeigene var andelen gjær høy, med henholdsvis 36 % og 85 %, mens andelen var svært lav i surdeigsprøvene av hvete og spelt. Andelen gjær i disse var henholdsvis 0,7 % og 8,7 %. Taksonomisk klassifisering av sopp ble bestemt på slektsnivå, og gjær fra slekten *Wickerhamomyces* utgjorde 30,7 % av identifisert sopp i alle prøvene, og 90,1 % av all gjær. Majoriteten av annen sopp som ble detektert i prøvene var *Alternaria* (42,1 %), *Mucor* (9,8 %, kun til stede i surdeig av hvete), samt uklassifisert sopp fra familien *Pleosporaceae* (10,7 %). Fordi filamentøs sopp spiller liten rolle i surdeigsfermenteringen, er derfor disse ikke inkludert i de videre analysene om ikke annet er spesifisert.

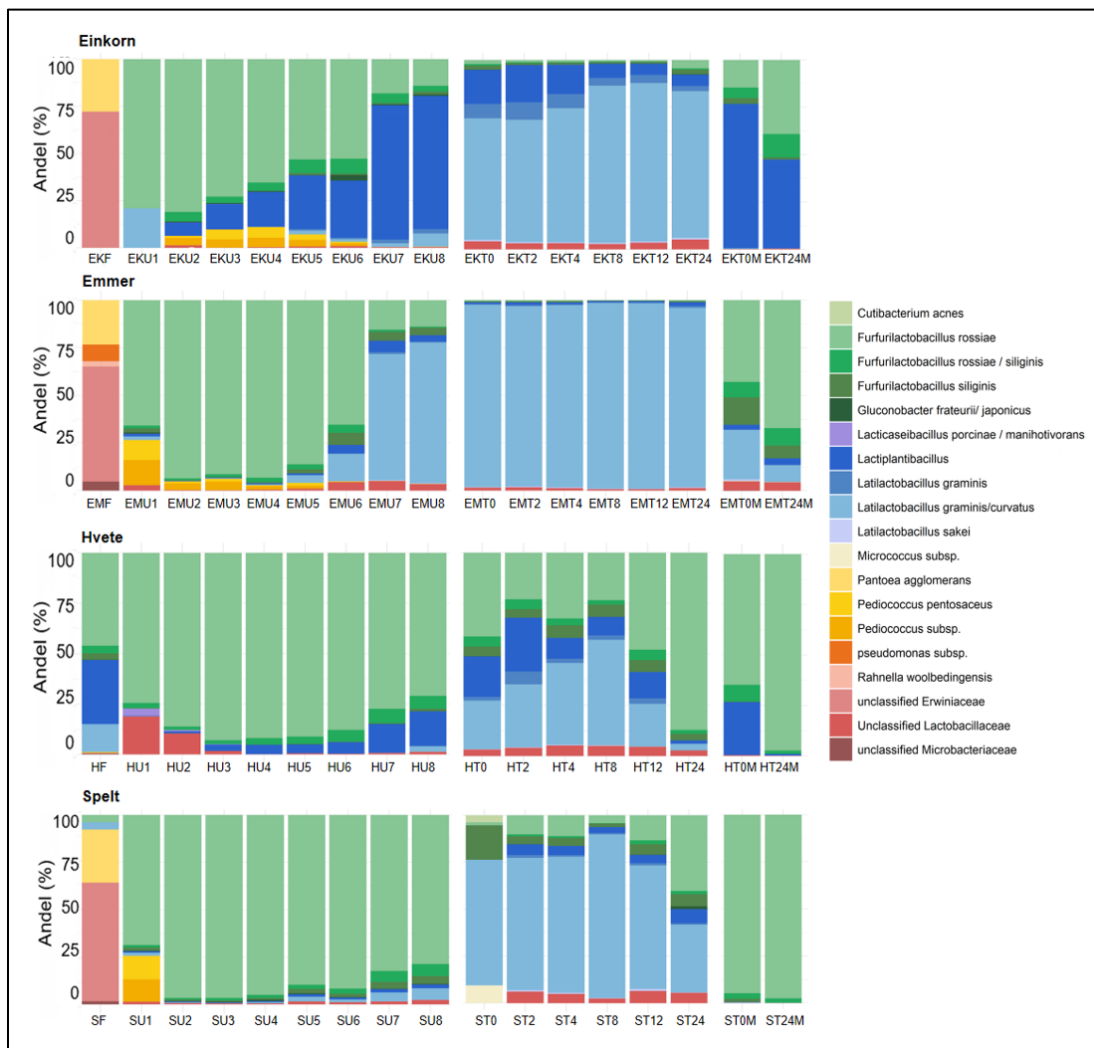
#### 4.2.1 Identifisering av bakterielle samfunn

For å undersøke den mikrobielle sammensetningen og stabiliteten i surdeigene over tid ble det gjennomført sekvensering av ukentlige uttak tatt ut over en periode på åtte uker. Det ble også tatt seks uttak over en periode på 24 timer etter mating, for å undersøke endringer og utvikling i det mikrobielle samfunnet som respons på mating. I tillegg ble mikroorganismer til stede i ufermentert mel undersøkt ved sekvensering. Til fremstillingen av plot ble ikke-normaliserte filer benyttet fordi normaliseringen førte til at noen av uttakene ble fjernet.

16S-sekvenseringen av uttakene over åtte uker viste at *Furfurilactobacillus rossiae* var den dominerende arten i alle surdeigene de første seks ukene. Andelen *Furfurilactobacillus* sank derimot i varierende grad i alle de fire surdeigene i løpet av de åtte ukene, og ble erstattet med *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus/paraplantarum/fabifermentas* (heretter kalt *Lactiplantibacillus* gruppen) og *Lactilactobacillus graminis/curvatus*, som vist i Figur 4.2. I einkorn- og emmersurdeigene ble andelen *F. rossiae* betydelig redusert i løpet av åtteukersperioden, mens denne reduksjonen var langt mindre fremtredende i hvete- og speltsurdeigene. I surdeigen av einkorn var det *Lactiplantibacillus* gruppen som var den dominerende arten i uke syv og åtte, mens i emmersurdeigen var det *L. graminis/curvatus* som dominerte ved disse uttakene.

I uttakene tatt ut over 24 timer etter mating var det *L. graminis/curvatus* som utgjorde majoriteten av bakteriene i alle uttak i einkorn, emmer og spelt, mens andelen var lavere i hvete, med en større andel av *F. rossiae*. *Lactiplantibacillus* gruppen var også tydelig til stede ved disse uttakene i surdeigene av einkorn og hvete. I surdeigene av hvete og spelt økte andelen *Furfurilactobacillus* i løpet av fermenteringsperioden, noe som også var tydelig i de to uttakene ved 0 og 24 timer (T0M og T24M) i surdeigene av einkorn, emmer og hvete.

For ufermentert mel hadde hvetemelet høyest antall mesofile bakterier (4,61 log kde/g), og einkorn lavest (3,46 log kde/g). Tabell 4.2 viser en oversikt over celletall (log kde/g) i ufermentert mel. Det var kun speltmelet som fikk bakterievekst ved innstøping i MRS-agar (1,78 log kde/g), mens det hos de andre meltypene kun vokste filamentøs sopp på denne agaren. 16S-sekvensering viste at det i mel av einkorn, emmer og spelt er bakterier fra familien Erwiniaceae som er dominerende, inkludert arten *Pantoea agglomerans*. Hvetemelet var det eneste melet hvor det var melkesyrebakterier til stede i en stor andel, der både *F. rossiae*, *L. graminis* / *curvatus* og *Lactiplantibacillus* gruppen var til stede.



Figur 4.2: Relativ fordeling av bakterier ved 16S rRNA-sekvensering i prøver fra surdeig laget på mel av einkorn, emmer, hvete og spelt, samt i ufermentert mel fra disse kornslagene. Taksonomi er bestemt på artsnivå, og *Lactiplantibacillus*-artene er *L. plantarum*/*pentosus*/*paraplantarum*/*fabifermentas*. Prøvene ble tatt ukentlig over 8 uker (U1-U8, venstre), over en periode på 24 timer etter mating (T0-T24, midten), samt to uttak ved 0 og 24 timer etter mating for sammenligning med uttak til metabolismestudier (T0M, T24M, høyre). Til fremstilling av plot ble ikke-normaliserte filer benyttet. EK= einkorn, EM= emmer, H= hvete, S= spelt, F= «flour».

Tabell 4.2: Celletall (log kde/g) i ufermentert mel.

Mel	Celletall (log kde/g)	
	PCA	MRS
Hvete	4,61 *	**
Spelt	3,65	1,78
Emmer	4,34	**
Einkorn	3,46	**

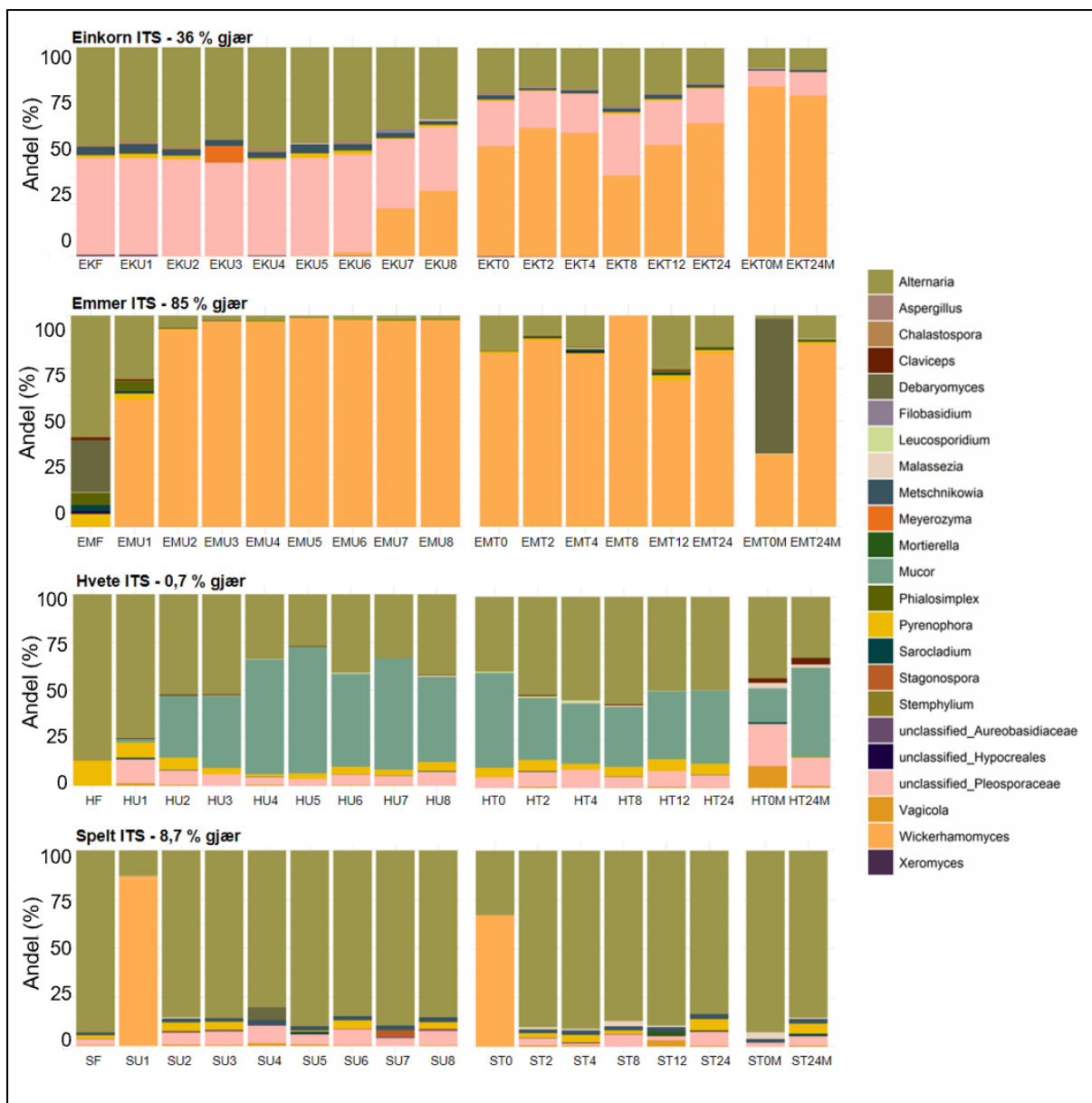
\* Mugg til stede på skålen

\*\* Kun muggvekst på skålen

#### 4.2.2 Identifisering av soppfunn

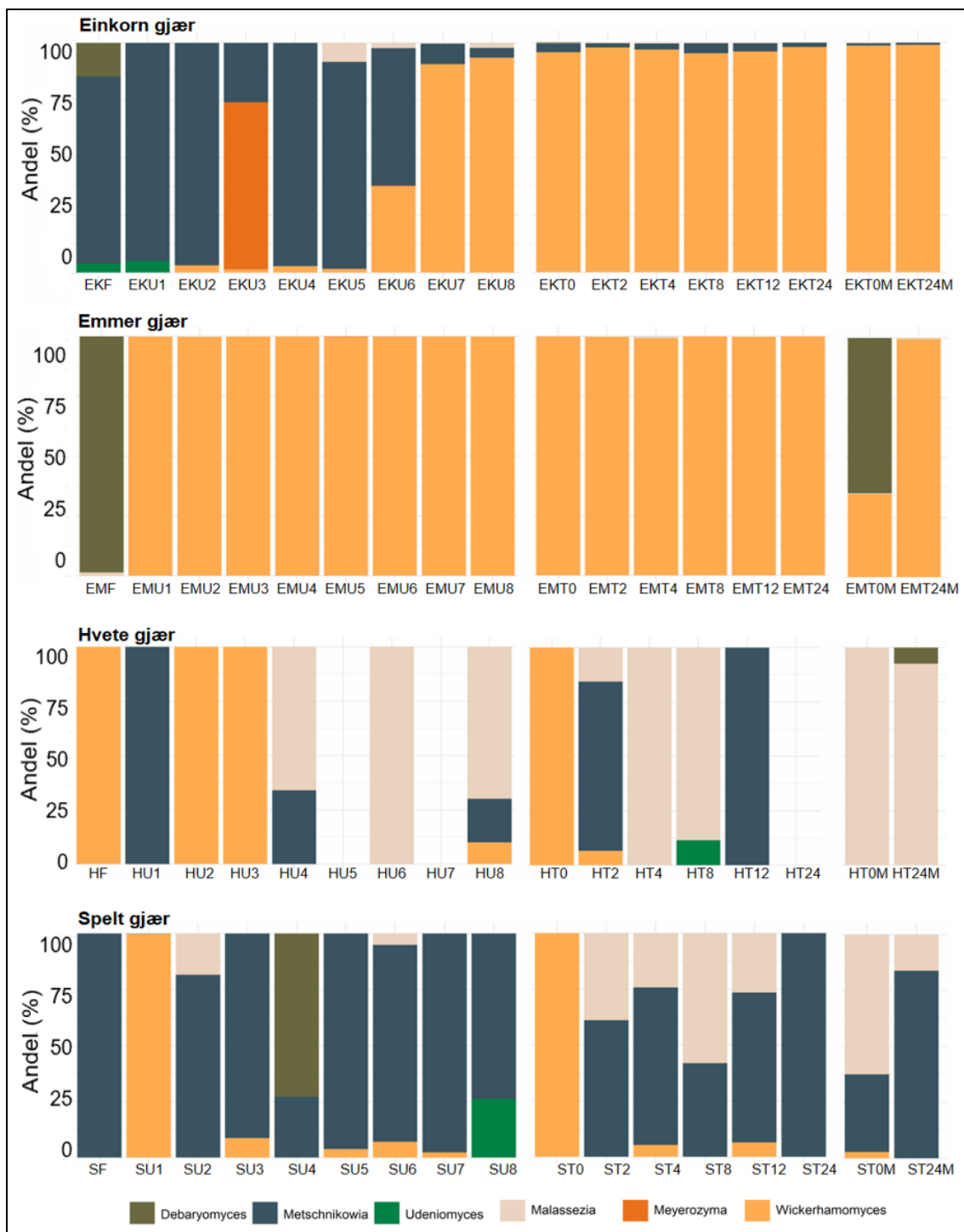
Det ble utført ITS rRNA-sekvensering av uttakene fra de fire surdeigene for å identifisere forekomsten og sammensetningen av sopp og gjær i de ulike surdeigene. I alle surdeigene bortsett fra emmer ble majoriteten av sopp identifisert som mugg, med *Alternaria*, *Pyrenophora* og *Mucor*, som de mest fremtredende av disse (Figur 4.3). I surdeigen av emmer utgjorde gjær hele 86 % av total soppforekomst, nesten utelukkende bestående av *Wickerhamomyces* (Figur 4.3). I Figur 4.4 vises en relativ fordeling av kun gjær i surdeigene, og i surdeigen av einkorn ser det ut til at andelen *Wickerhamomyces* økte i løpet av de 8 ukene uttakene ble gjort. De første fem ukene utgjør *Metschnikowia* majoriteten av gjæren i denne surdeigen (med unntak av i uke 3 der *Meyerozyma* dominerer), før andelen *Wickerhamomyces* stiger raskt i løpet av de siste tre ukene (Figur 4.4). I surdeigene av hvete og spelt ble svært lite gjær identifisert (0,7 % og 8,6 %).

*Wickerhamomyces* ble kun identifisert i mel av emmer (0,18 % av identifisert gjær) og hvete, men den overveldende majoriteten av gjær identifisert i emmermelet var *Debaryomyces*. I mel av einkorn og spelt var det en overvekt av *Metschnikowia* blant identifisert gjær.



Figur 4.3 Relativ fordeling av sopp ved ITS rRNA-sekvensering i prøver fra surdeig av einkorn, emmer hvete og spelt, inkludert filamentøs muggsoppt. Taksonomi er bestemt på slektsnivå. Prøvene ble tatt ukentlig over 8 uker (U1-U8, venstre), over en periode på 24 timer etter mating (T0-T24, midten), samt to uttak ved 0 og 24 timer etter mating for sammenligning med uttak til metabolismestudier (T0M, T24M, høyre). Til fremstilling av plot ble ikke-normaliserte filer benyttet. EK= einkorn, EM= emmer, H= hvete, S= spelt, F= «flour».



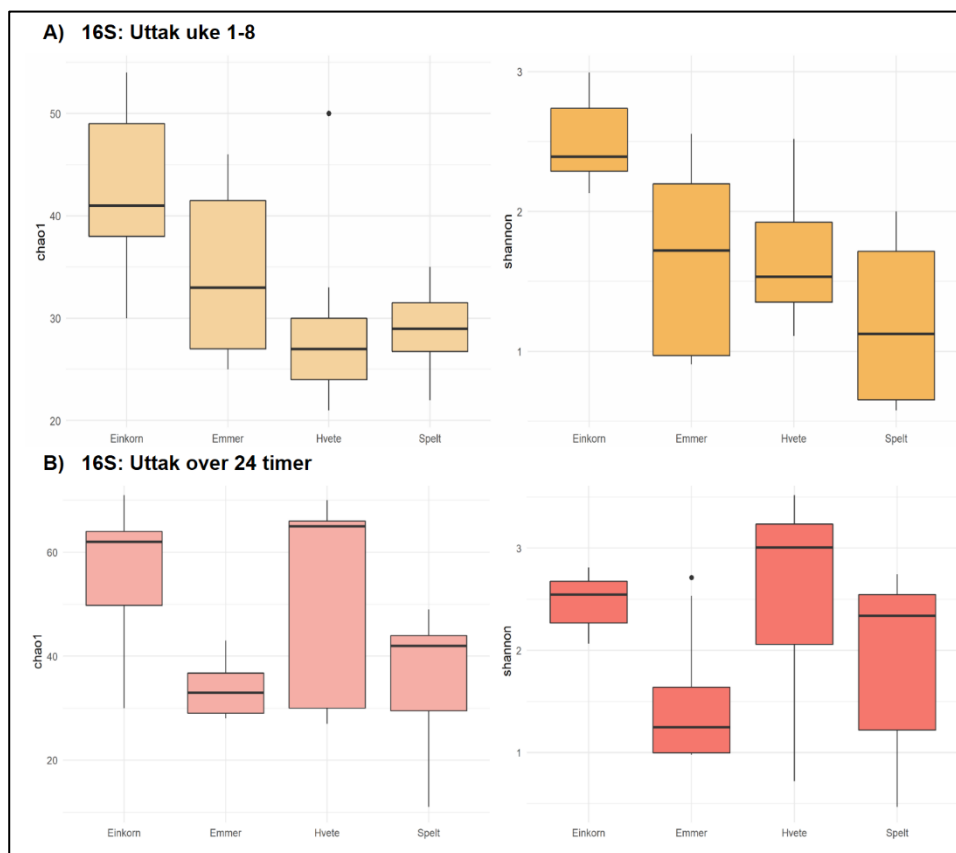


Figur 4.4: Relativ fordeling av kun gjær i de ulike uttakene av surdeig av einkorn, emmer, hvete og spelt undersøkt ved sekvensering av ITS rRNA-genet. Prøvene ble tatt ukentlig over 8 uker (U1-U8, venstre), over en periode på 24 timer etter mating (T0-T24, midten), samt to uttak ved 0 og 24 timer etter mating for sammenligning med uttak til metabolismestudier (T0M, T24M, høyre). Til fremstilling av plot ble ikke-normaliserte filer benyttet. EK= einkorn, EM= emmer, H= hvete, S= spelt, F= «flour».

### 4.2.3 Diversitetsanalyser hos bakterier og sopp

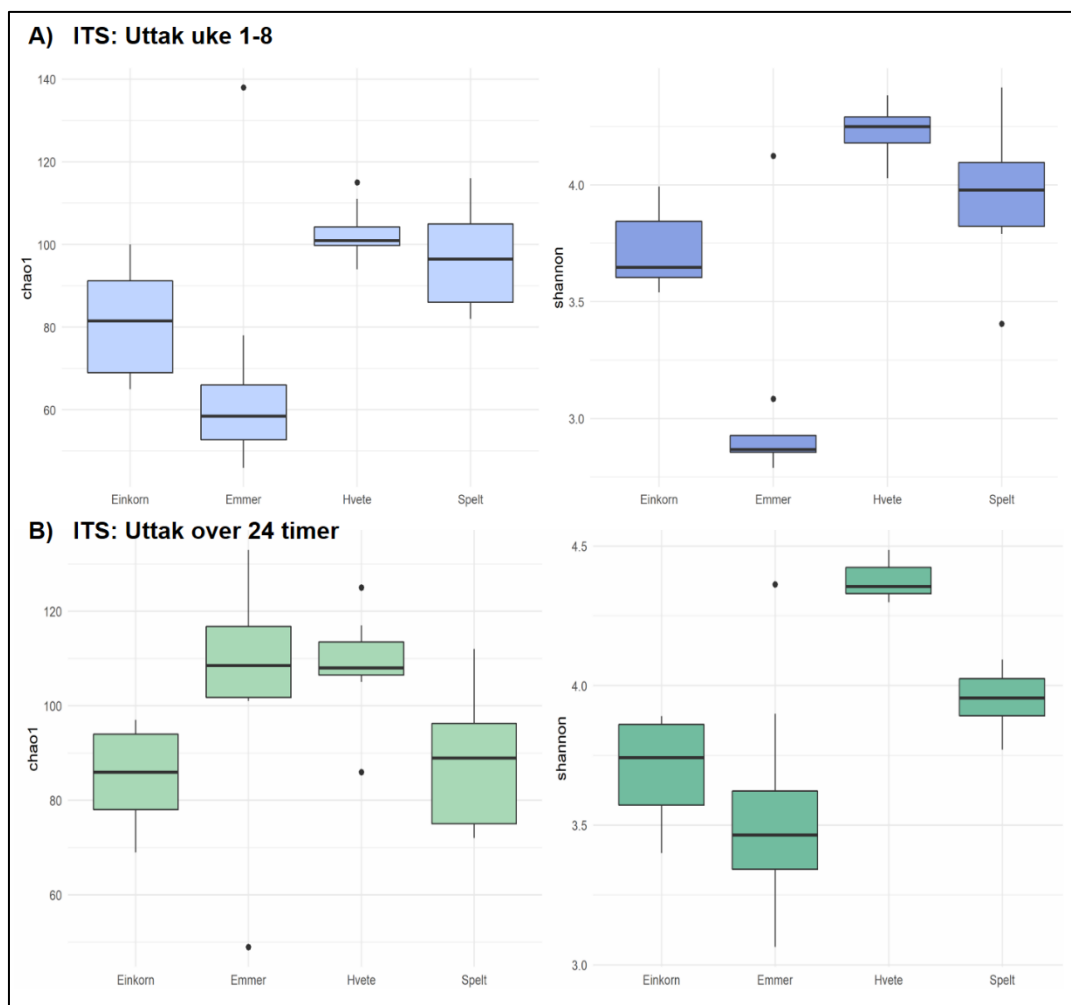
$\alpha$ -diversitet i surdeigskulturene ble regnet ut ved bruk av Chao1- og Shannon-diversitetsindekser. For diversitetsutregninger og fremstilling av plot ble alle SV-er, også tilhørende filamentøs sopp, benyttet, og uttakene fra uke 1-8 og over 24 timer etter mating ble plottet hver for seg.

Diversitetsanalysene viste at artsrikheten av bakterier var høyest i surdeigen av einkorn og lavest i hvetesurdeigen for uttakene over åtte uker (Figur 4.5A). For 24-timersuttakene var artsrikheten høyest i hvetesurdeigen, og lavest surdeigen av emmer (Figur 4.5B). Den bakterielle sammensetningen var jevnest fordelt i surdeigen av einkorn for uttakene tatt over åtte uker, og minst jevn i speltsurdeigen. For uttakene over 24 timer var jevnheten høyest i surdeigen av hvete, og lavest i emmer.



Figur 4.5:  $\alpha$ -diversitet i bakteriesamfunn i surdeiger laget på mel av einkorn, emmer, hvete og spelt representert ved chao1- (venstre) og Shannon-diversitetsindekser (høyre) for A) ukentlige uttak over åtte uker og B) seks uttak over 24 timer etter mating. Den fargede boksen representerer interkvartilavstanden (IQR), altså de midterste 50 % av verdiene i dataene når de ordnes fra lavest til høyest, og den horisontale linjen representerer medianen i datasettet. Vertikale linjer representerer verdier utenfor de midterste 50 %, og sirkler representerer avvik.

For sopp viste diversitetsanalysene at det var høyest artsrikhet i hvete- og speltsurdeigen for uttakene over åtte uker, og i emmer- og hvetesurdeigene for uttakene over 24 timer, som vist i Figur 4.6. I alle surdeigene var artsrikheten av sopp høyere enn for bakterier. Fordelingen av artene var jevnest i hvetesurdeigen og minst jevn i emmersurdeigen for begge utvalgene.



Figur 4.6:  $\alpha$ -diversitet i soppsamfunn i surdeiger laget på mel av einkorn, emmer, hvete og spelt representert ved *chaol*- (venstre) og Shannon-diversitetsindekser (høyre) for A) ukentlige uttak over åtte uker og B) seks uttak over 24 timer etter mating. Den fargede boksen representerer interkvartilavstanden (IQR), altså de midterste 50 % av verdiene i dataene når de ordnes fra lavest til høyest, og den horisontale linjen representerer medianen i datasettet. Vertikale linjer representerer verdier utenfor de midterste 50 %, og sirkler representerer avvik. For diversitetsutregninger og fremstilling av plot ble alle sekvensvarianter, også tilhørende filamentøs sopp, benyttet.

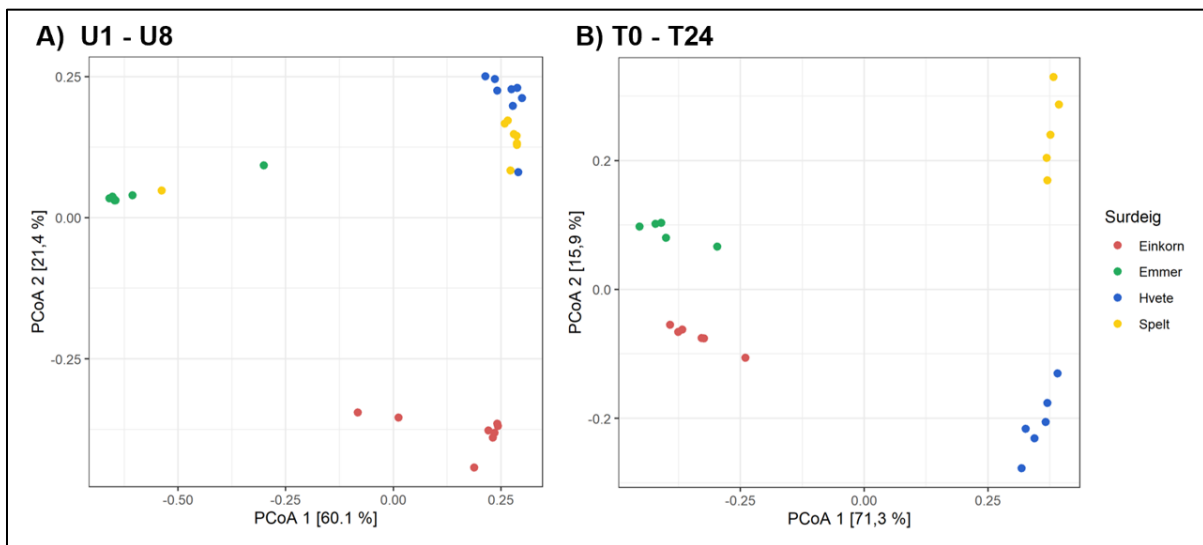
For å evaluere strukturelle likheter mellom samfunn av sopp og bakterier i de ulike surdeigene ble det gjennomført en «Principal Coordinates Analysis» (PCoA) basert på Bray-Curtis avstander. Bray-Curtis gir et mål på ulikheter i sammensetningen i de mikrobielle samfunnene mellom prøvene basert på antall sekvensvarianter, uavhengig av sekvensvariantenes taksonomi. Uttakene som ble tatt over åtte uker, og uttakene tatt ut over 24 timer etter mating ble analysert hver for seg for både bakterier og sopp, og alle sekvensvarianter, også for filamentøs sopp ble benyttet for utregning av Bray-Curtis avstander.

PCoA-plottene for sopp viser at hver de fire ulike surdeigene klart danner klynger som er separate fra klyngene til de andre surdeigene, både for uttakene over åtte uker og over 24 timer (Figur 4.7). Dette indikerer at sammensetningen i soppsamfunnene innad i de ulike surdeigene likner hverandre uavhengig av tidspunkt for uttak, og at de ulike surdeigene har klart ulike sammensetninger.

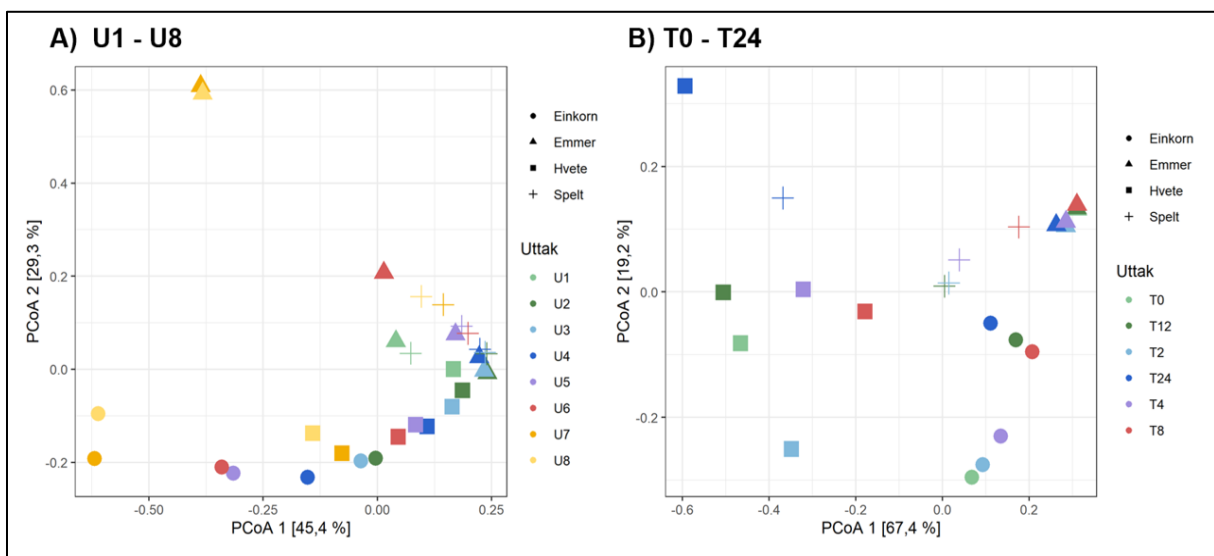
Majoriteten av variasjonen i datasettene kan forklares fra PCoA 1 (60,1 % for U1-U8 og 71,3 % for

T0-T24), noe som viser at for ukesusuttakene skiller emmersurdeigen seg klart fra de andre tre surdeigene, mens hvete og spelt har mindre variasjon mellom seg (Figur 4.7A). For uttakene tatt ut over 24 timer etter mating viser plottet at samfunnene i surdeigene av emmer og einkorn skiller seg fra hvete og spelt.

For de bakterielle samfunnene i surdeigene var det ingen tydelig dannelse av klynger i PCoA-plottene for ukesusuttakene verken med hensyn til type surdeig eller tidspunkt for uttak (Figur 4.8A). For uttakene over 24 timer viser PCoA-plottet en viss tendens til å danne klynger basert på type surdeig, men i langt mindre grad enn i ITS-plottene, og tidspunkt for uttak viser ingen tendens til klynging (Figur 4.8B).



Figur 4.7 Principal Coordinate Analysis (PCoA)-plott, basert på Bray-Curtis avstander, for sopp. A) viser avstanden mellom uttakene over åtte uker (U1-U8), mens B) viser avstanden mellom uttakene i løpet av 24 timer (T0-T24).



Figur 4.8: Principal Coordinate Analysis (PCoA)-plott, basert på Bray-Curtis avstander, for bakterier. A) viser avstanden mellom uttakene over åtte uker (U1-U8), mens B) viser avstanden mellom uttakene i løpet av 24 timer (T0-T24). Tidspunkt for uttak er forklart med farge, mens formen på punktene forklar hvilken surdeig uttakene er hentet fra.

### 4.3 Vekst- og metabolismeforsøk

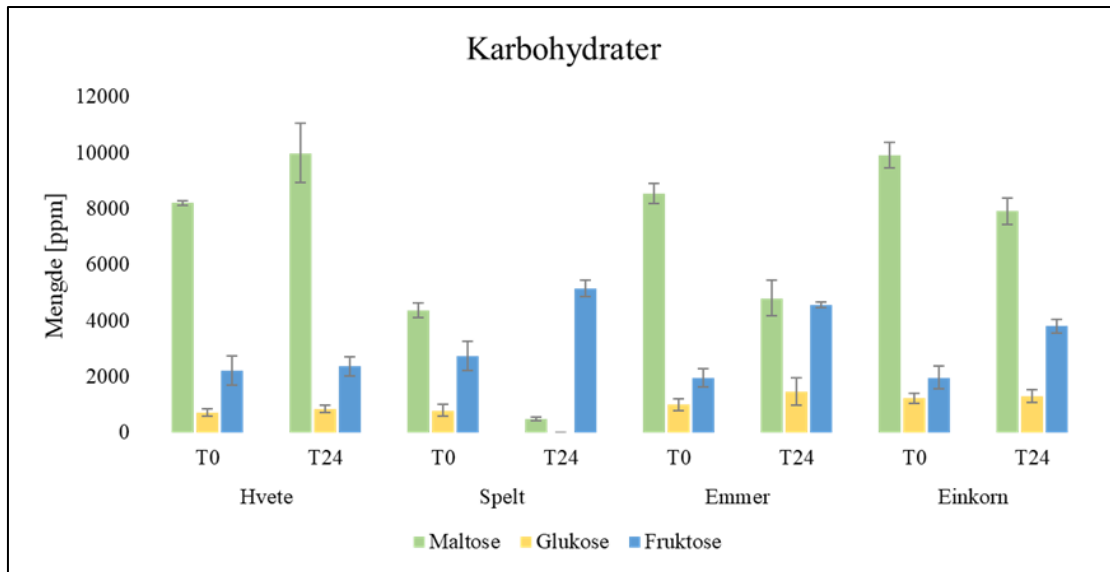
For å undersøke produksjon av organiske syrer og forekomst og omdannelse av karbohydrater ble det gjennomført HPLC-analyse av surdeigskulturene ved mating og etter 24 timer, i tillegg til kvantitativ analyse av CO<sub>2</sub>-produksjon i de ulike surdeigene etter 24 timers fermentering i romtemperatur.

Resultatene fra HPLC er presentert som gjennomsnitt av tre gjentak. Ved uttak til HPLC ble surdeigene også støpt inn i RB- og MRS-agar for å bestemme celletall av henholdsvis gjær og bakterier (Tabell 4.3). Konsentrasjonen av gjær var < 4 log kde/g ved både null og 24 timer for både hvete- og speltsurdeigene, mens konsentrasjonen var 6,5 og 67 log kde/g ved mating for emmer og einkorn og med en økning på 0,5 log kde/g i løpet av 24 timer. Konsentrasjonen av bakterier i surdeigene var langt høyere med 8,8 og 8,7 log kde/g for henholdsvis hvete og emmer, og spelt og einkorn. Økningen i celletall i løpet av 24 timer var mellom 0,8 log kde/g (hvete) og 1,2 log kde/g (spelt).

Tabell 4.3: Gjennomsnittlig celletall (log kde/g) av gjær (Rose Bengal (RB)-agar) og bakterier (MRS-agar) i de fire surdeigene ved tid null (T0) og 24 timer (T24) etter mating. Tallene er basert på to gjentak.

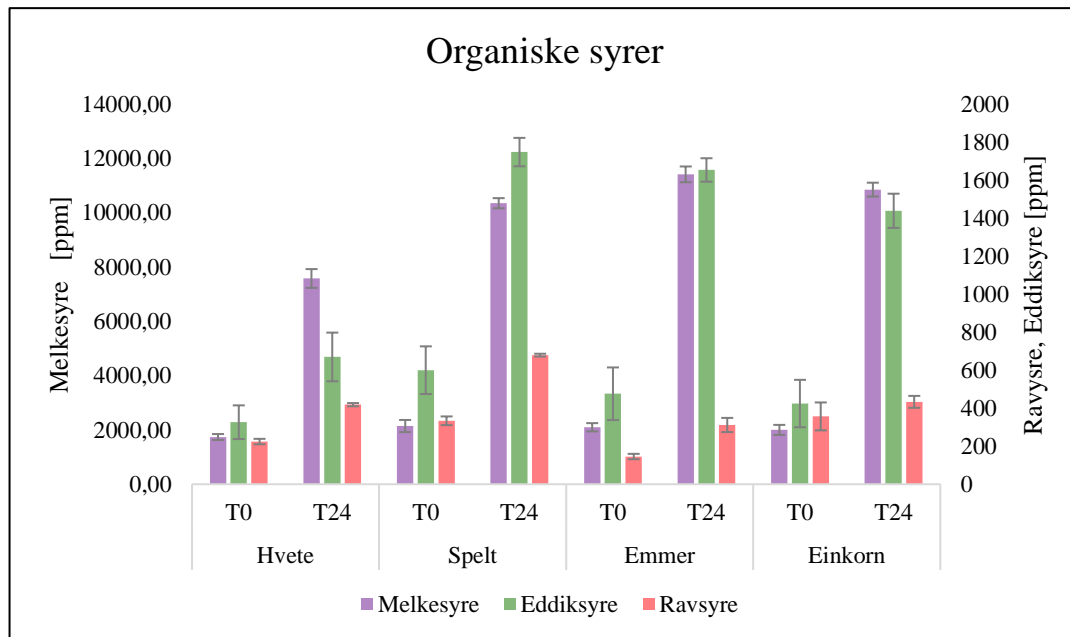
Surdeig	Celletall (log kde/g)			
	RB		MRS	
	T0	T24	T0	T24
Hvete	<4	<4	8,8	9,6
Spelt	<4	<4	8,7	9,9
Emmer	6,5	7,0	8,8	9,8
Einkorn	6,7	7,2	8,7	9,7

Konsentrasjon av maltose, glukose og fruktose ved mating og etter fermentering i 24 timer i romtemperatur er vist i Figur 4.9. Ved mating var konsentrasjonen av maltose høyest i alle kulturene. I hvete-kulturen økte konsentrasjonen av maltose fra 8221 til 9993 ppm i løpet av 24 timer, mens konsentrasjonen ble redusert i de andre kulturene. Spelt-kulturen hadde lavest initialkonsentrasjon av maltose (4370 ppm), og i denne ble nesten all maltose brutt ned i løpet av 24 timer. I emmer- og einkorn-kulturene ble konsentrasjonen av maltose redusert fra hhv. 8547 til 4811 ppm og fra 9917 til 7921 ppm. Produksjonen glukose og fruktose var høyere enn nedbrytingen i løpet av 24 timer i alle surdeigene bortsett fra i speltsurdeigen der all glukose ble brutt ned under fermenteringen. I hvete kulturen var akkumuleringen av fruktose langt lavere enn i de øvrige surdeigskulturene, mens den var høyest i speltsurdeigen.



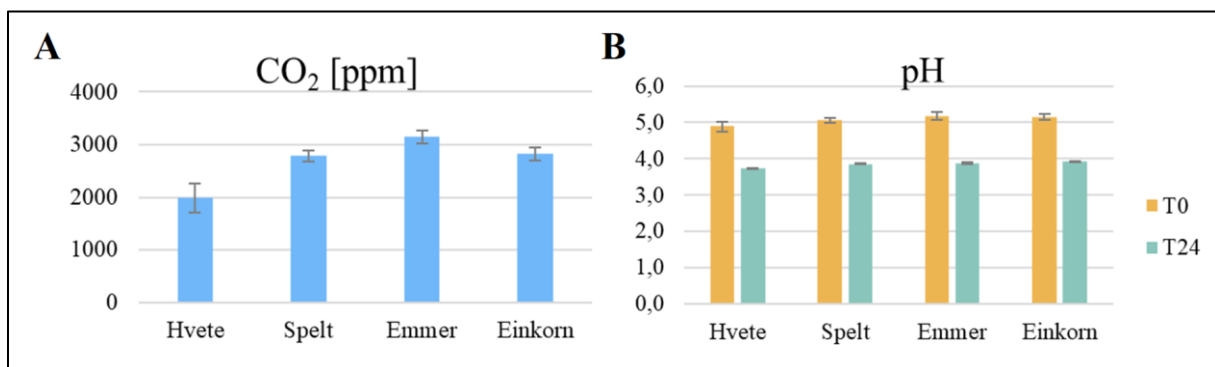
Figur 4.9: Mengde karbohydrater (maltose, glukose og fruktose) i surdeigene ved mating og etter inkubasjon i romtemperatur i 24 timer. Vertikale linjer representerer standardavvik.

Konsentrasjonen av melkesyre, eddiksyre og ravsyre i surdeigskulturene er presentert i Figur 4.10. I alle surdeigene ble det produsert en betydelig mengde melkesyre, fra 5844 ppm i hvetesurdeigen, til 9323 ppm i emmersurdeigen. Emmersurdeigen hadde også den høyeste produksjonen av eddiksyre med 1161ppm eddiksyre, men det var nesten like høy økning av melkesyre og eddiksyre i surdeigene av spelt og einkorn med henholdsvis 8353 ppm og 1035 pmm for spelt og 9149 pmm og 1161 ppm for einkorn. Produksjonen av både melkesyre og eddiksyre var betydelig lavere i hvetesurdeigen enn i de øvrige surdeigene (112 ppm eddiksyre). Produksjon av ravsyre var høyest i speltsurdeigen, med en økning på 346 ppm i løpet av inkubasjonsperioden.



Figur 4.10: Mengde melkesyre, eddiksyre og ravsyre i surdeigene ved mating og etter inkubasjon i romtemperatur i 24 timer. Vertikale linjer representerer standardavvik.

CO<sub>2</sub> og pH ble målt samtidig som uttak til HPLC ble utført, og resultatene er vist i Figur 4.9. CO<sub>2</sub> produksjon ble målt etter 24 timers inkubasjon i romtemperatur etter mating, og det ble produsert mest CO<sub>2</sub> i emmersurdeigen (3143 ± 124 ppm) mens det ble produsert minst CO<sub>2</sub> i hvetesurdeigen (1985 ± 267 ppm) (Figur 4.11A). Gjennomsnittlig pH var noe lavere i hvetesurdeigen både ved mating (T0) med pH 4,89 ± 0,14 og etter 24 timer (T24) med pH 3,74 ± 0,01 (Figur 4.11B).

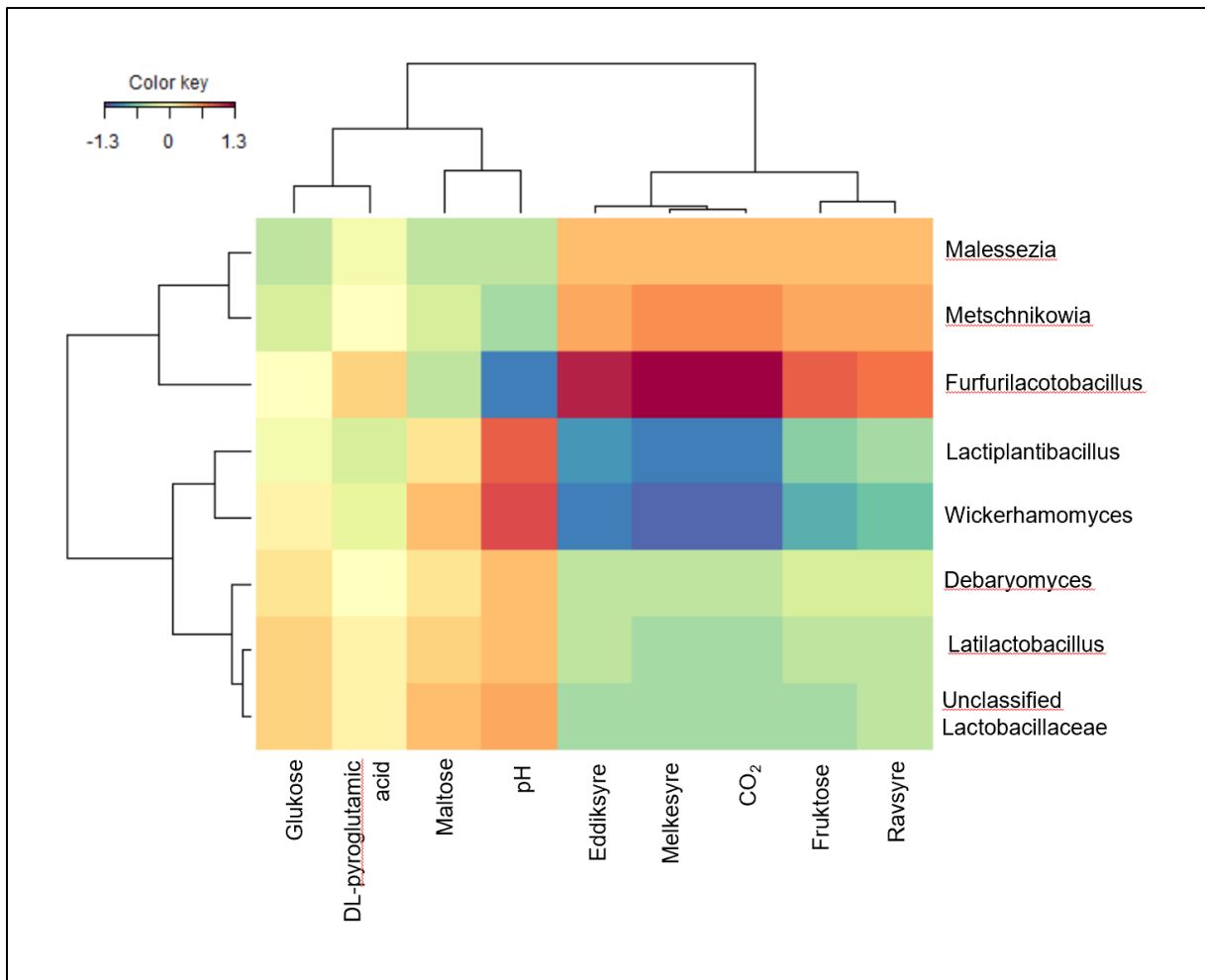


Figur 4.11: A) Produksjon av CO<sub>2</sub> etter 24 timer fermentering og B) pH ved mating og etter fermentering i surdeiger. Vertikale linjer representerer standardavvik.

#### 4.4 Korrelasjonsanalyser

Et korrelasjonsplott (*heat map*) basert på “Regularized Canonical Correlation Analysis” (RCCA) ble fremstilt for å finne korrelasjon mellom to datasett med informasjon om henholdsvis forekomst og fordeling av bakterier og gjær i de ulike prøvene, og organiske syrer og karbohydrater til stede i prøvene, samt produksjon av CO<sub>2</sub> og pH-utvikling. Til dette ble sekvenseringsdata fra prøver tatt ut ved T<sub>0</sub> og T<sub>24</sub>, samtidig som uttakene til metabolismestudier, benyttet.

Korrelasjonsplottet (Figur 4.12) viser at det er en sterk positiv korrelasjon mellom *Furfurlicatobacillus* og tilstedeværelse av eddiksyre, melkesyre og CO<sub>2</sub> i surdeigene, mens det er en negativ korrelasjon med pH. Fra plottet ser det også ut til at *Wickerhamomyces* er sterkt negativt korrelert med eddiksyre og melkesyre, samt med CO<sub>2</sub>, men positivt korrelert med pH. Tilstedeværelse av *Lactiplantibacillus* gruppen i surdeig ser ut til å også være negativt korrelert med eddiksyre, melkesyre og CO<sub>2</sub>, og positivt korrelert med pH.



Figur 4.12: Korrelasjonsplot (heat map) basert på "Regularized Canonical Correlation Analysis" (RCCA) mellom bakterier og sopp og metabolitter til stede i prøver hentet fra fire surdeiger på einkorn, emmer, spelt eller hvete ved mating og etter 24 timers fermentering i romtemperatur. Positive og negative korrelasjoner er representert ved henholdsvis rødt og blått.



## 5 Diskusjon

### 5.1 Mikrobiologisk analyse av surdeiger

#### 5.1.1 Bakteriell sammensetning i surdeigene

Ved 16S-totalsekvensering av de bakterielle samfunnene dominerte følgende bakteriene i de fire surdeigene: *Furfurilactobacillus rossiae*, *Latilactobacillus graminis/curvatus*, samt bakterier fra *Lactiplantibacillus* gruppen (*L. plantarum/pentosus/paraplantarum/fabifermentas*). Isolatene som ble sekvensert ved Sanger sekvensering ble isolert fra surdeigene på samme tidspunkt som uttak 1 (U1). Resultatene fra både Sanger og Illumina-sekvensering viste at *F. rossiae* var den dominerende arten ved første uttak, med totalt 39 % av isolatene identifisert som *F. rossiae* ved Sanger sekvensering. Totalsekvensering viste videre at andelen *F. rossiae* sank i løpet av de neste uttakene, og ble erstattet av *Lactiplantibacillus* gruppen i einkornsurdeigen og hvetesurdeigen og med *L. graminis/curvatus* i emmersurdeigen. Nedgangen var tydeligst i einkorn- og emmersurdeigene, men samme tendenser kunne også observeres i surdeigene av hvete og spelt. *F. rossiae* ble først isolert fra hvetesurdeig og beskrevet av Corsetti et al. (2005), og er obligat heterofermentativ, produserer syrer fra både D-glukose, F-fruktose og maltose. Den har et relativt stort genom og er en allsidig art som er i stand til å kolonisere flere ulike miljøer, og har vist at den er svært tilpasningsdyktig til forholdene i surdeig (De Angelis et al., 2014). Resultatene fra dette forsøket bekreftet at *F. rossiae* er i stand til å overleve og dominere i og surdeigskulturer av ulikt mel over lengre tid.

I flere av surdeigene var det et tydelig skille i den bakterielle sammensetningen i surdeigene mellom uttakene gjort i løpet av de åtte første ukene (U1-U8), og uttakene tatt ut over 24 timer etter mating (T0-T24). Sammenlignet med U1-U8 dominerer *Latilactobacillus graminis/curvatus* i T0-T24 i alle surdeigene med unntak av hvetesurdeigen, men også i denne er andelen *L. graminis/curvatus* høyere enn i U1-U8. Skillet mellom disse kan muligens tilskrives ulike prosessbetingelser før uttak. Før uttak T0-T24 ble surdeigskulturene aktivert ved mating 8 timer før og inkubering ved romtemperatur, slik at inokulasjon ved T0 ble gjort med aktiv starter. Det kan tenkes at dette har påvirket sammensetningen i mikrobiotaen ved å favorisere vekst av *L. graminis/curvatus*, mens lengre fermenteringstid (24 t) og oppbevaring ved 4 °C har favorisert *F. rossiae*. Det kan for eksempel være at *L. graminis/curvatus* vokser raskere enn *F. rossiae* etter mating og i romtemperatur, men at *F. rossiae* er mer syretolerant eller vokser bedre ved lavere temperaturer og derfor vil dominere ved disse betingelsene. Videre studier på renkulturer av disse artene vil kunne undersøke artenes toleranse for ulike vekstbetingelser i surdeigskulturene, og dermed finne svar på dette.

*Pediococcus* utgjorde 14 % av artene identifisert med Sanger sekvensering, men utgjorde kun litt over 1,5 % av det totale antallet bakterier identifisert med Illumina-sekvensering. Fra Illumina-sekvenseringen er det likevel tydelig at det er en langt høyere andel *Pediococcus* i første uttak i emmer- og speltsurdeigene (ca. 24 %), enn i uttakene fra uke 2 og de senere ukene der andelen

*Pediococcus* var tydelig lavere, noe som forklarer det lave totalantallet. Dette kan tyde på at *Pediococcus* ikke var i stand til å konkurrere med andre arter i miljøet i surdeigskulturen.

Ved Sanger sekvensering ble andel eddiksyrebakterier (*Gluconobacter frateurii/japonicus*) tydelig overestimert i U1-uttakene fra surdeigene sammenlignet med andelen som ble detektert ved totalsekvensering (22 % mot <0,1 %). *Gluconobacter frateurii/japonicus* ble kun isolert fra RB-agar, som er tilsatt kloramfenikol, og overestimeringen av *G. frateurii/japonicus* kan skyldes at denne arten har blitt selektert for på grunn av resistens mot kloramfenikol. Fordi mikroskopering av isolatene viste en relativt lik morfologi, ble kun et utvalg isolater sekvensert ved Sanger sekvensering. På grunn av det lave antallet sekvenserte isolater var det heller ikke forventet at resultatene fra dette skulle vise en korrekt fordeling av bakteriene i prøvene.

### 5.1.2 Sopp og gjær i surdeigene

Forekomsten av sopp i surdeigene ble undersøkt ved Illumina MiSeq totalsekvensering av ITS rRNA-regionen. I alle surdeigene bortsett fra emmer var majoriteten av sopp som ble identifisert ved sekvensering filamentøs muggsopp, hovedsakelig tilhørende slektene *Alternaria* (42,1 %), *Mucor* (9,8 %, kun til stede i surdeig av hvete), samt uklassifisert sopp fra familien *Pleosporaceae* (10,7 %). Den høye forekomsten av filamentøs sopp skyldes sannsynligvis at melet inneholdt store mengder sporer fra sopp introdusert i åkeren eller ved håndtering eller lagring. Flere arter fra *Alternaria*-slekten er kjente plantepatogene arter og vanlige feltsopp, og *Mucor* er en kjent lagringssopp, og forekomsten av disse var derfor å forvente (Adams et al., 2016).

Et påfallende funn fra Illumina totalsekvenseringen var at det i surdeigene av hvete og spelt var en svært lav andel gjær i samtlige av de 16 uttakene som ble tatt fra hver surdeig, med unntak av to av uttakene i speltsurdeigen. Ved dyrking på RB agar ved uttak til HPLC ble det også funnet at celletallet av gjær i hvete- og speltsurdeigene var under 4 log kdeg/g både ved mating og etter 24 timers fermentering i romtemperatur. Ved dyrking på YM- og RB-agar ved første uttak av hvete- og speltsurdeig, var celletallet langt høyere (fra 6,11 til 7,10 log kdeg/g), men både mikroskopering av isolater fra disse agarene, og senere Sanger sekvensering, viste at også bakterier vokste på disse agarene. Det er derfor sannsynlig at celletallet for gjær her er overestimert. Også isolatene fra U1 fra einkorn-surdeigen ble identifisert som bakterier ved mikroskopering og Sanger sekvensering, og det er derfor sannsynlig at et celletall på ca 6,0 log kdeg/g er en overestimert for dette uttaket. Allikevel viste totalsekvenseringen at andelen gjær (*Wickerhamomyces*) økte i løpet av de åtte ukene de ukentlige uttakene ble gjennomført, og at andelen var betydelig høyere ved uttak til metabolismestudier. Celletall beregnet ved uttak til HPLC er derfor sannsynligvis mer representativt, selv om celletallet kan være noe overestimert da det her ikke ble foretatt mikroskopering av kolonier for å verifisere at det faktisk var gjær til stede. Isolatene fra emmersurdeigen var de eneste som ble

identifisert som gjær ved mikroskopering og Sanger sekvensering, noe som samsvarte med funnene fra Illumina totalsekvenseringen av U1.

I følge Arora et al. (2021) blir heveegenskapene til en surdeig dårligere når celletettheten av gjær er  $<5,0 \log \text{ kde/g}$ . I dette forsøket ble surdeigsstarterenes heve- og bakeegenskaper ikke testet ved baking, og det er derfor vanskelig å si noe om de ulike surdeigenes faktiske egenskaper i bakeprosessen, og i hvilken grad den lave andelen av gjær i hvete- og speltsurdeigene ville påvirket hevingen av en brøddeig. Fra CO<sub>2</sub>-analysen var det dog tydelig at minst CO<sub>2</sub> ble produsert i surdeigen av hvete, men det ikke var noen betydelig forskjell i CO<sub>2</sub>-produksjon mellom spelt- og einkornsurdeigene. Den lave forekomsten av gjær i hvete- og speltsurdeigene tyder på at et eller flere forhold i disse surdeigene som har gjort at gjær ikke har vært konkurransedyktige i disse kulturene. Da det kun ble gjort begrensede analyser av metabolitter til stede er det ikke mulig å si noe videre om hvilke næringsmessige eller andre forhold som kan ha begrenset veksten av gjær i hvete- og speltsurdeigene, men ikke i de to andre.

Majoriteten av gjær identifisert fra Illumina totalsekvensering ble identifisert som *Wickerhamomyces*. Flere sekvensvarianter som ble taksonomisk klassifisert som *Wickerhamomyces* ble videre artsbestemt ved hjelp av BLAST, og klassifisert som *Wickerhamomyces anomalus*, i likhet med gjær-isolatene sekvensert med Sanger sekvensering. *W. anomalus* er en svært allsidig art, som er i stand til å overleve og trives i ugunstige og stressende miljøer, og som har en bred geografisk spredning, og som ofte har blitt isolert fra surdeig. Dette kan forklares med dens fysiologiske allsidighet, ved at den blant annet kan metabolisere et bredt spekter av karbon- og nitrogenkilder (Daniel et al., 2011). Coda et al. (2011) fant at *W. anomalus* har en betydelig sopphemmerende effekt på grunn av høy produksjon av etylacetat, samt produksjon av «killer toxins», som er proteiner som binder til spesifikke reseptorer på overflaten til mikroorganismer og dreper disse via en handlingsmetode spesifikk for målorganismen (Mannazzu et al., 2019). På grunn av artens sopphemmerende egenskaper ble det også registrert økt holdbarhet for brød bakt med startere som inneholder *W. anomalus* (Coda et al., 2011). Dersom bakeforsøk hadde blitt gjennomført kunne eventuelt sopphemmerende effekt av høy forekomst av *W. anomalus* blitt undersøkt i brød bakt med emmersurdeig.

### 5.1.3 Mikrobielle forskjeller i surdeigene

Etableringen og opprettholdelse av surdeigskulturene ble i dette forsøket ikke utført sterilt, men alle parametere (som vann, tidspunkt for mating, % inokulasjon osv.) var like for de fire surdeigskulturene, med unntak av hvilket mel som ble benyttet. Totalsekvensering av surdeigskulturene viste at selv om fordelingen av de ulike artene var ulik i surdeigskulturene var hvilke mikroorganismer som var til stede i surdeigene i hovedsak lik, med unntak av svært lav forekomst av *Wickerhamomyces* i hvete- og speltsurdeigene.

PCoA-plot basert på Bray-Curtis avstander for sopp viste tydelig at de ulike surdeigene dannet klynger både for U1-U8 og T0-T24 uttakene. Dette tyder på at de ulike surdeigene skiller seg klart fra hverandre med henblikk på soppfunnene i surdeigene. For diversitetsanalysene ble sekvensvarianter tilhørende filamentøs sopp også benyttet, noe som vil ha påvirket diversitetsanalysene for sopp da en stor andel av sopp ble identifisert som filamentøs muggsopp. Dersom kun gjær var blitt benyttet er det ikke sikkert samme klyngedannelse ville blitt observert. Sett i sammenheng med fordelingen av gjærarter i de ulike uttakene, vist i ved ITS rRNA sekvensering, kan de likevel se ut til at samme tendenser ville gjort seg gjeldene dersom kun gjær ble vurdert. Hvete- og speltsurdeigene er de surdeigene med minst variasjon mellom seg, både for U1-U8 og T0-T24 uttakene, og det er i disse surdeigene det også er svært lav forekomst av gjær.

Når det gjelder den bakterielle sammensetningen i uttakene fra de ulike surdeigene ble det ikke observert noen klare klynger blant de ulike surdeigene, verken for U1-U8 eller T0-T24 uttakene. Dette tyder på at det ikke er noe tydelig skille mellom bakteriesammfunnene som kan forklares ut fra hverken type mel i surdeigen eller tidspunkt for prøveuttak.

Vrancken et al. (2010) undersøkte og sammenlignet surdeiger fra håndverksbakerier med surdeiger av hvete, rug og hvete etablert under laboratoriebetingelser der eneste ikke-sterile komponent var melet som ble benyttet. De fant at *W. anomalus* ble funnet mye hyppigere i laboratoriesurdeiger enn i de allerede etablerte surdeigene fra bakeriene, noe som tyder på at *W. anomalus* er til stede i og introduseres til surdeigmiljøet via melet som benyttes. Harth et al. (2016) gjennomførte derimot et lignende eksperiment med byggmel, der eneste art av gjær som ble identifisert var *Saccharomyces cerevisiae* både i laboratoriesurdeiger og i surdeiger fermentert under «hjemmebetingelser». Det er altså stor variasjon i resultater fra ulike undersøkelser, og hvorvidt det er type mel som er den viktigste kilden til og styrer veksten av mikroorganismene i surdeig er det fortsatt ikke bakgrunn for å konkludere med (Huys et al., 2013). Uten en grundigere analyse av melets næringsstoffer og biokjemiske komponenter er det vanskelig å si i hvilken grad dette var med på å styre den mikrobielle veksten i de ulike surdeigene i dette forsøket.

I denne oppgaven ble heller ikke sekvensering av melet eller prøvene gjennomført med paralleller eller gjentak, noe som er en svakhet med tanke på å fange opp eventuelle avvik eller feil i analysene. Det ble heller ikke gjennomført mikrobiologiske analyser av vannet som ble benyttet eller fra miljøet rundt, noe som gjør det vanskelig å si om mikroorganismene til stede i surdeigen kan ha hatt opphav fra disse kildene og i hvilken grad den mikrobielle sammensetningen er blitt påvirket av dette.

De Vuyst et al. (2014) argumenterer, i likhet med Minervini et al. (2018) for at hvilket mel som benyttes er svært viktig for den mikrobielle sammensetningen på grunn av at melet er kilde til næringsstoffer (aminosyrer, fettsyrer, mineraler, vitaminer og andre vekstfaktorer) og endogene enzymer, i tillegg til å være en kilde til melkesyrebakterier og gjær. Da mikroorganismenes aktivitet i

surdeigen påvirkes av melets næringsinnhold og hvilke næringsstoffer og vekstfaktorer som tilføres surdeigen via melet, argumenteres det for at dette vil bestemme den mikrobielle stabiliteten i en moden surdeigsstarter.

Resultatene fra dette forsøket kan tyde på at hvilke mikroorganismer som er til stede i surdeigene i større grad har blitt påvirket av husmikrobiota enn av melet som har blitt benyttet, da samme mikroorganismer ble observert på tvers av de fire surdeigene, mens forskjellene i fordelingen av artene muligens kan tilskrives betydningen av melets næringsinnhold. Dette er dog svært usikkert og videre forsøk ville være nødvendig for å verifisere dette. For å undersøke om forskjellene mellom de ulike surdeigene skyldes mel eller andre faktorer kunne det for eksempel være interessant å etablere surdeigene under sterile forhold der mel er eneste variabel, for å sammenligne dette med resultatene fra surdeigskulturene etablert og oppbevart under ikke-sterile forhold. Dette ville kunne gi en indikasjon på i hvor stor grad de ulike meltypene benyttet i dette forsøket påvirker mikrobiotaen i surdeigskulturene, og om mikroorganismene stammer fra melet eller miljøet.

#### 5.1.4 Metabolismestudier av surdeigene

For å undersøke produksjon av organiske syrer og forekomst og omdannelse av karbohydrater ble det gjennomført HPLC-analyse av surdeigskulturene ved mating og etter 24 timer. I tillegg ble kvantitativ analyse av CO<sub>2</sub>-produksjon gjennomført i de ulike surdeigene etter 24 timers fermentering i romtemperatur, samt måling av pH før og etter fermentering.

Hvetesurdeigen var den eneste surdeigen der maltose ble akkumulert i løpet av fermenteringsperioden, og det ble i denne også produsert mindre melkesyre og eddiksyre enn i de øvrige surdeigene. Allikevel var pH i hvetesurdeigen (marginalt) lavest. Dette kan skyldes at hvetesurdeigen har lavere bufferkapasitet, ha sammenheng med at det i hvetesurdeigen ble benyttet siktet, finmalt mel, mens det i de øvrige surdeigene ble benyttet sammalt mel, eller at den opprinnelige pH-en i melet er forskjellig i de ulike kornartene. Dette samsvarer med funn fra Rodríguez et al. (2012) som fant at gjennomsnittlig pH var lavere i hvete (*Triticum aestivum*) enn i emmer/durum (*Triticum turgidum*). Den høye produksjonen av maltose kan skyldes høyere andel av eller mer tilgjengelig stivelse i siktet hvetemel, eller høyere forekomst av amylaser som bryter ned stivelsen.

Andelen eddiksyrebakterier (*Gluconobacter*) var <0,01 % i alle uttakene som ble tatt ut samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC). Produksjon av eddiksyre var likevel høy i alle surdeigene, noe som tyder på at andre mikroorganismer produserte betydelige mengder eddiksyre. Ifølge korrelasjonsanalyse ved RCCA var det en sterk positiv korrelasjon mellom *Furfurilactobacillus* og eddiksyre. Dette skyldes av *F. rossiae* er en obligat heterofermentativ bakterie. Dette stemmer overens med tidligere undersøkelser av Di Cagno et al. (2007) som viste at *F. rossiae* stammer isolert fra surdeig har høy evne til å produsere eddiksyre. Korrelasjonsanalysene viste også at *F. rossiae* var sterkt positivt korrelert med melkesyre og CO<sub>2</sub>, noe som også stemmer overens med at dette er en

obligat heterofermentativ art som derfor vil produsere betydelige mengder CO<sub>2</sub>, melkesyre og eddiksyre.

*Lactiplantibacillus graminis/curvatus* var ifølge korrelasjonsanalysene negativt korrelert med melkesyre, eddiksyre og CO<sub>2</sub>, og det samme var *Wickerhamomyces*. Selv om *Lactiplantibacillus* er fakultativ heterofermentativ, og derfor i stand til å produsere både eddiksyre og CO<sub>2</sub>, kan den negative korrelasjonen mellom disse muligens skyldes at produksjonen er lavere enn hos *F. rossiae*, noe som vil føre til lavere produksjon dersom *Lactiplantibacillus* erstatter *F. rossiae* i det mikrobielle samfunnet. En svakhet ved korrelasjonsanalysene er at de ikke tar hensyn til at prøvene er hentet fra surdeiger laget med ulike typer mel, og at disse dermed kan ha ulike utgangspunkt med hensyn til konsentrasjon av syrer, og ulike utgangspunkt for produksjon av de ulike metabolittene. For å verifisere hvorvidt de mulige korrelasjonene presentert her stemmer vil ytterligere studier som tar høyde for flere av disse faktorene måtte gjennomføres.

## 6 Oppsummering og videre arbeid

I denne oppgaven ble den mikrobielle sammensetningen i surdeiger laget på mel av einkorn, emmer, spelt og hvete undersøkt ved Illumina Miseq totalsekvensering, og bakterier og gjær fra surdeigene ble isolert og identifisert ved Sanger sekvensering. Den mikrobielle stabiliteten og utviklingen i surdeigene ble undersøkt i uttak tatt ukentlig i åtte uker (U1-U8) og seks uttak tatt ut i et tidsintervall på 24 timer etter mating (T0-T24). I tillegg ble det gjennomført analyser av metabolitter (karbohydrater og organiske syrer) produsert og konsumert i løpet av 24 timers fermentering i romtemperatur etter mating av surdeigskulturene.

Resultatene fra Illumina totalsekvensering av de mikrobielle samfunnene i surdeigene viste at den dominerende bakteriearten i samtlige uttak de seks første ukene var *Furfurilactobacillus rossiae*, men at *Latilactobacillus graminis/curvatus* og *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus/paraplantarum/fabifermentas* utgjorde en større andel etter uke seks, og majoriteten i T0-T24-uttakene. Den eneste arten av gjær som ble identifisert i betydelig andel var *Wickerhamomyces anomalus*, men det var svært lav forekomst av denne i hvete- og spelturdeigene. Den lave forekomsten av gjær tyder på at et eller flere forhold i disse surdeigene har gjort at gjær ikke har vært konkurransedyktige i surdeigskulturen. Da det kun ble gjort begrensede analyser av metabolitter til stede er det ikke mulig å si noe videre om hvilke næringsmessige eller andre forhold som kan ha begrenset veksten av gjær i hvete- og speltsurdeigene, men ikke i de to andre.

Selv om fordelingen av artene i surdeigene var ulik ved ulike tidspunkt var de artene som var til stede i hovedsak lik, med unntak av den lave forekomsten av *Wickerhamomyces* i hvete- og speltsurdeigene. Dette kan tyde på at hvilke mikroorganismer som er til stede i mindre grad påvirkes av type mel, og at det heller er husmikrobiota som har størst innvirkning på dette. Allikevel kan det virke som at type mel virker inn på fordelingen av artene, men videre studier trengs for å underbygge og undersøke dette videre. For å videre undersøke melets innvirkning på surdeigenes mikrobiota hadde det vært interessant utføre forsøket med mel som eneste ikke-sterile komponent og i tillegg å følge de første dagene av etableringsprosessen for å se om dette ville føre til tydeligere forskjeller mellom surdeigskulturene.

En svakhet ved dette forsøket var at surdeigskulturene kun ble matet en gang per uke og oppbevart i kjøleskap mellom matingene, mens «aktiv» starter som benyttes i bakeri og av aktive hjemmebakere ofte vil mates hver dag. Surdeigskulturene er svært komplekse økosystemer med kontinuerlige endringer i næringstilgang og konkurransebetingelser, og det hadde derfor vært nyttig å studere surdeigsstarterne under betingelser som ligner mer på de som benyttes av aktive surdeigsbakere. For å ytterligere studere eventuelle forskjeller mellom de ulike surdeigene ville det også være interessant å benytte «Head Space» gass kromatografi (HSGC) for å se videre på hvilke flyktige aromakomponenter som alkoholer, aldehyder etc. som blir produsert i de ulike surdeigene. Kombinert

med bakeforsøk samt analyser av hevet deig og ferdig brød ville dette gi et bedre bilde av om og hvordan de ulike surdeigsstarterenes egenskaper ville påvirke et ferdig produkt.

*F. rossiae* er også en av få bakterier som innehar en fullstendig *de novo* biosyntetisk reaksjonsvei for vitamin B12. (De Angelis et al., 2014). I fremtidige studier ville det vært interessant å se på produksjon av vitamin B12 ved bruk av *F. rossiae* i surdeig for å se om denne kan benyttes som starterkultur for surdeig industrielt for å bedre vitamininnholdet i brød. Dette er spesielt spennende i kontekst av å utvikle vegetariske kilder til vitamin B12.



## 7 Referanser

- Adams, M. R., Moss, M. O. & McClure, P. (2016). Microbiology of Primary Food Commodities. I: *Food Microbiology: The Royal Society of Chemistry*.
- Arendt, E. K. & Zannini, E. (2013). Wheat and Other Triticum Grains. I: Arendt, E. K. & Zannini, E. (red.) *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*, s. 1-67e: Woodhead Publishing.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G. & Gobbetti, M. (2021). Thirty Years of Knowledge on Sourdough Fermentation: A Systematic Review. *Trends in Food Science & Technology*, 108: 71-83. doi: 10.1016/j.tifs.2020.12.008.
- Asledottir, T., Rehman, R., Mamone, G., Picariello, G., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Røseth, A., Lea, T. E., Halstensen, T. S., Ferranti, P., et al. (2020). Ancestral Wheat Types Release Fewer Celiac Disease Related T Cell Epitopes than Common Wheat upon Ex Vivo Human Gastrointestinal Digestion. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9 (9): 1173. doi: 10.3390/foods9091173.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. I: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, s. 1-66.
- Belderok, B. (2000). Developments in Bread-Making Processes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55 (1): 1-14. doi: 10.1023/A:1008199314267.
- Bintsis, T. (2018). Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures: An Update in their Metabolism and Genetics. *AIMS microbiology*, 4 (4): 665-684. doi: 10.3934/microbiol.2018.4.665.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nature methods*, 13 (7): 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M. & Gobbetti, M. (2013). History and Social Aspects of Sourdough. I: Gobbetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*, s. 1-10. Boston, MA: Springer US.
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G. & Gobbetti, M. (2011). Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* During Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect During Storage of Wheat Bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (10): 3484-92. doi: 10.1128/AEM.02669-10.
- Comasio, A., Verce, M., Van Kerrebroeck, S. & De Vuyst, L. (2020). Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1212. doi: 10.3389/fmicb.2020.01212.
- Corsetti, A., Settanni, L., van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F. & Gobbetti, M. (2005). *Lactobacillus rossii* sp. nov., Isolated from Wheat Sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (Pt 1): 35-40. doi: 10.1099/ijs.0.63075-0.
- Corsetti, A. (2013). Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications. I: Gobbetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*, s. 85-103. Boston, MA: Springer US.
- Daniel, H.-M., Moons, M.-C., Huret, S., Vrancken, G. & De Vuyst, L. (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the Sourdough Microbial Ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99 (1): 63-73. doi: 10.1007/s10482-010-9517-2.
- De Angelis, M., Bottacini, F., Fosso, B., Kelleher, P., Di Cagno, R., Ventura, M., Picardi, E., Van Sinderen, D. & Gobbetti, M. (2014). *Lactobacillus rossiae*, a Vitamin B-12 Producer, Represents a Metabolically Versatile Species within the Genus *Lactobacillus*. *PLoS one*, 9: e107232. doi: 10.1371/journal.pone.0107232.
- De Vuyst, L. & Neysens, P. (2005). The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1): 43-56. doi: doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M. & Weckx, S. (2014). Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or Uniform? *Food Microbiology*, 37: 11-29. doi: doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002.

- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S. & Leroy, F. (2016). Yeast Diversity of Sourdoughs and Associated Metabolic Properties and Functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239: 26-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018.
- Delcour, J. & Hoseney, R. (2010). Principles of Cereal Science and Technology. *AACC Int.*: 229-289.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Gallo, G., Settanni, L., Berloco, M. G., Siragusa, S., Parente, E., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2007). Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus rossiae* Strains Isolated from Sourdough. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (4): 821-835. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03389.x.
- Dinu, M., Whittaker, A., Pagliai, G., Benedettelli, S. & Sofi, F. (2018). Ancient Wheat Species and Human Health: Biochemical and Clinical Implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 52: 1-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.09.001.
- Fardet, A. (2010). New Hypotheses for the Health-Protective Mechanisms of Whole-Grain Cereals: What is Beyond Fibre? *Nutrition Research Reviews*, 23 (1): 65-134. doi: 10.1017/s0954422410000041.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Geisslitz, S., Wieser, H., Scherf, K. A. & Koehler, P. (2018). Gluten Protein Composition and Aggregation Properties as Predictors for Bread Volume of Common Wheat, Spelt, Durum Wheat, Emmer and Einkorn. *Journal of Cereal Science*, 83: 204-212. doi: 10.1016/j.jcs.2018.08.012.
- Geisslitz, S., Longin, C. F. H., Scherf, K. A. & Koehler, P. (2019). Comparative Study on Gluten Protein Composition of Ancient (Einkorn, Emmer and Spelt) and Modern Wheat Species (Durum and Common Wheat). *Foods*, 8 (9). doi: 10.3390/foods8090409.
- Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R. & De Angelis, M. (2014). How the Sourdough may Affect the Functional Features of Leavened Baked Goods. *Food Microbiology*, 37: 30-40. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.012.
- Gomes, R. J., Borges, M. d. F., Rosa, M. d. F., Castro-Gómez, R. J. H. & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (2): 139-151. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5593.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and Chemical Properties of Norwegian Kefir During Storage. *International Dairy Journal*, 21 (9): 601-606. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.01.001.
- Guerzoni, E., Serrazanetti, D., Vernocchi, P. & Gianotti, A. (2013). Physiology and Biochemistry of Sourdough Yeasts. I: Gobbetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook of Sourdough Biotechnology*, s. 155-181. Boston, MA: Springer US.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and Bacterial Conversions During Sourdough Fermentation. *Food Microbiology*, 37: 2-10. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.007.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *nucleic acids symposium series*, 41 (2): 95-98. doi: 10.14601/PHYTOPATHOL\_MEDITERR-14998U1.29.
- Harth, H., Van Kerrebroeck, S. & De Vuyst, L. (2016). Community Dynamics and Metabolite Target Analysis of Spontaneous, Backslopped Barley Sourdough Fermentations Under Laboratory and Bakery Conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 228: 22-32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.011.
- Hollister, E. B., Brooks, J. P. & Gentry, T. J. (2015). Bioinformation and 'Omic Approaches for Characterization of Environmental Microorganisms. I: Pepper, I. L., Gerba, C. P. & Gentry, T. J. (red.) *Environmental Microbiology (Third Edition)*, s. 483-505. San Diego: Academic Press.
- Huys, G., Daniel, H.-M. & De Vuyst, L. (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. I: *Handbook of Sourdough Biotechnology*, s. 105-154. Boston, MA: Springer US.
- Koehler, P. & Wieser, H. (2013). Chemistry of Cereal Grains. I: Gobbetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*, s. 11-45. Boston, MA: Springer US.
- Lahue, C., Madden, A. A., Dunn, R. R. & Smukowski Heil, C. (2020). History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Frontiers in genetics*, 11: 584718-584718. doi: 10.3389/fgene.2020.584718.

- Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., Shell, L. K., Madden, A. A., Shapiro, L., Sakunala, S., et al. (2021). The diversity and Function of Sourdough Starter Microbiomes. *eLife*, 10: e61644. doi: 10.7554/eLife.61644.
- Lesk, A. M. (2017). Mapping, Sequencing, Annotation and Databases. I: *Introduction to genomics*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press
- Longin, C. F. H. & Würschum, T. (2016). Back to the Future – Tapping into Ancient Grains for Food Diversity. *Trends in Plant Science*, 21 (9): 731-737. doi: 10.1016/j.tplants.2016.05.005.
- Longin, C. F. H., Ziegler, J., Schweiggert, R., Koehler, P., Carle, R. & Würschum, T. (2016). Comparative Study of Hulled (Einkorn, Emmer, and Spelt) and Naked Wheats (Durum and Bread Wheat): Agronomic Performance and Quality Traits. *Crop Science*, 56 (1): 302-311. doi: 10.2135/cropsci2015.04.0242.
- Mamlouk, D. & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53 (4): 377-384. doi: 10.1007/s12088-013-0414-z.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M. & Ciani, M. (2019). Yeast Killer Toxins: from Ecological Significance to Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (5): 603-617. doi: 10.1080/07388551.2019.1601679.
- Merck KGaA. (2021). *Sanger DNA Sequencing Steps and Methods*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html> (lest 04.05).
- Minervini, F., Dinardo, F. R., Celano, G., De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2018). Lactic Acid Bacterium Population Dynamics in Artisan Sourdoughs Over One Year of Daily Propagations Is Mainly Driven by Flour Microbiota and Nutrients. *Frontiers in microbiology*, 9: 1984-1984. doi: 10.3389/fmicb.2018.01984.
- Narvhus, J. A., Thorvaldsen, K. R. & Abrahamsen, R. K. (1993). A Method for the Quantitative Analysis of Carbon Dioxide Produced by Dairy Starters Growing in Milk.
- Narvhus, J. A. & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. I: B., C. (red.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, s. 3465-3472. Amsterdam, the Netherlands: Academic press.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., et al. (2020). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-7.
- Ooms, N. & Delcour, J. A. (2019). How to Impact Gluten Protein Network Formation During Wheat Flour Dough Making. *Current Opinion in Food Science*, 25: 88-97. doi: 10.1016/j.cofs.2019.04.001.
- Paradis, E. & Schliep, K. (2019). ape 5.0: an Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in {R}. *Bioinformatics*, 35: 526-528.
- Peers, F. G. (1953). The Phytase of Wheat. *The Biochemical journal*, 53 (1): 102-110. doi: 10.1042/bj0530102.
- Petrosino, J., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. & Versalovic, J. (2009). Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical chemistry*, 55: 856-66. doi: 10.1373/clinchem.2008.107565.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Research*, 41 (D1): D590-D596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Tilgjengelig fra: <https://www.R-project.org/>.
- Rizzello, C. G., De Angelis, M., Coda, R. & Gobbetti, M. (2006). Use of Selected Sourdough Lactic Acid Bacteria to Hydrolyze Wheat and Rye Proteins Responsible for Cereal Allergy. *European Food Research and Technology*, 223 (3): 405-411. doi: 10.1007/s00217-005-0220-x.
- Rodrigues, F. & Ludovico, P. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. I: Péter, G. & Rosa, C. (red.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*, s. 101-121. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Rodríguez, L. H., Morales, D. A., Romero, C. D. & Rodríguez, E. R. (2012). The Organic Acid Profile in Wheat Cultivar Grains. *International Journal of Food Science & Technology*, 47 (3): 627-632. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02886.x.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics Feature Selection and Multiple Data Integration. *PLOS Computational Biology*, 13 (11): e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752.
- Salim ur, R., Paterson, A. & Piggott, J. R. (2006). Flavour in Sourdough Breads: a Review. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (10): 557-566. doi: 10.1016/j.tifs.2006.03.006.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Chen, W. (2012). Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (16): 6241-6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109.
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A. & Waterston, R. H. (2017). DNA Sequencing at 40: Past, Present and Future. *Nature*, 550 (7676): 345-353. doi: 10.1038/nature24286.
- Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6): 1537-1553. doi: 10.1093/jxb/erp058.
- ThermoFisher. *Real-Time PCR Handbook*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> (lest 2021).
- Türk, M., Carlsson, N.-G. & Sandberg, A.-S. (1996). Reduction in the Levels of Phytate During Wholemeal Bread Making; Effect of Yeast and Wheat Phytases. *Journal of Cereal Science*, 23 (3): 257-264. doi: 10.1006/jcrs.1996.0026.
- von Wright, A. & Axelsson, L. (2011). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. I: S. Lahtinen, AC. Ouwehand, S. Salminen & Wright, A. v. (red.) *Lactic Acid Bacteria, Microbial and Functional Aspects*, s. 1-16. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P. & Daniel, H. M. (2010). Yeast Species Composition Differs Between Artisan Bakery and Spontaneous Laboratory Sourdoughs. *FEMS Yeast Research*, 10 (4): 471-81. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Rimaux, T., Allemeersch, J. & Weckx, S. (2011). Adaptation of *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (10): 3406-3412. doi: 10.1128/aem.02668-10.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). Techniques of Molecular Biology. I: Wilbur, B. (red.) *Molecular Biology of the Gene*: Pearson/CSH Press.
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*: Springer-Verlag New York. Tilgjengelig fra: <http://ggplot2.org>.
- Willey, J. E., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2014a). Bacterial Cell Structure. I: *Prescott's Microbiology*, s. 42-80. 2 Penn Plaza, New York: McGraw-Hill Education.
- Willey, J. E., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2014b). *Prescott's Microbiology*. 9th utg. 2 Penn Plaza, New York: McGraw-Hill Education.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2407). doi: 10.3389/fmicb.2019.02407.
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal*, 8: 352-359.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. (2011). The Impact of Next-Generation Sequencing on Genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, 38 (3): 95-109. doi: 10.1016/j.jgg.2011.02.003.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7 (1-2): 203-14. doi: 10.1089/10665270050081478.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., et al. (2020). A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

Zotta, T., Parente, E. & Ricciardi, A. (2017). Aerobic Metabolism in the Genus *Lactobacillus*: Impact on Stress Response and Potential Applications in the Food Industry. *Journal of Applied Microbiology*, 122 (4): 857-869. doi: 10.1111/jam.13399.

## Vedlegg

### I. Rådata kulturavhengige mikrobiologiske analyser

Vedlegg 1 antall kolonier som ble observert på de ulike agarene ved de ulike fortynnningene av surdeigene, samt log av antall kolonidannende enheter per gram (kde/g).

Agar	Surdeig	Fortynning						Log kde/g
		10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-7</sup>		
		skål A	skål B	skål A	skål B	skål A	skål B	
<b>PCA</b>	Spelt	96	91	-	-	-	-	6,97
	Hvete	-	-	32	93	-	-	7,78
	Einkorn	-	-	-	-	30	34	8,51
	Emmer	-	-	-	-	24	25	8,35
<b>LBS</b>	Spelt	-	-	-	-	266	253	9,41
	Hvete	-	-	-	-	158	149	9,19
	Einkorn	-	-	-	-	193	284	9,38
	Emmer	-	-	-	-	268	246	9,41
<b>MRS</b>	Spelt	-	-	-	-	246	257	9,4
	Hvete	-	-	-	-	214	157	9,27
	Einkorn	-	-	-	-	233	270	9,40
	Emmer	-	-	-	-	270	262	9,42
<b>YM</b>				10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		
	Spelt	-	-	93	163	-	-	6,11
	Hvete	-	-	-	-	132	120	7,1
	Einkorn	-	-	-	-	4	5	5,65
	Emmer	-	-	103	115	-	-	6,04
<b>RB</b>	Spelt	-	-	29	50	54	50	6,72
	Hvete	-	-	-	-	115	125	7,08
	Einkorn	-	-	38	65	-	-	5,71
	Emmer	-	-	80	85	-	-	5,92

Vedlegg 2: Resultater fenotypisk testing og mikroskopering av isolater

Isolatnr	surdeig	Agar	Gram-farging	Katalase-test	Mikroskopering
1	Hvete	MRS	positiv	negativ	Ovoide "egg-forma" celler som hovedsakelig opptrådte unicellulært, men som også fantes i par og korte kjeder.
2	Hvete	MRS	positiv	negativ	-
3	Hvete	MRS	positiv	negativ	-
4	Hvete	MRS	positiv	negativ	-
5	Hvete	MRS	positiv	negativ	-
6	Hvete	LBS	positiv	negativ	-
7	Hvete	LBS	positiv	negativ	-
8	Hvete	LBS	positiv	negativ	Litt "kortere" enn de andre?
9	Hvete	LBS	positiv	negativ	-
10	Hvete	LBS	positiv	negativ	-
11	Hvete	YM	X	X	bakterier? Korte staver
12	Hvete	YM	X	X	bakterier? Ovoide
13	Hvete	YM	X	X	
14	Hvete	YM	X	X	bakterier? Korte staver
15	Hvete	YM	X	X	
16	Hvete	Rose Bengal	X	X	bakterier? ovoide celler i par og single
17	Hvete	Rose Bengal	X	X	som 16
18	Hvete	Rose Bengal	X	X	
19	Hvete	Rose Bengal	X	X	som 16
20	Hvete	LBS	positiv	negativ	-
21	Spelt	MRS	positiv	negativ	-
22	Spelt	MRS	positiv	negativ	-
23	Spelt	MRS	positiv	negativ	-
24	Spelt	MRS	positiv	negativ	litt kortere/buttere? En del "firer-grupper", par og korte kjeder
25	Spelt	MRS	positiv	negativ	-
26	Spelt	LBS	positiv	negativ	likt som 24

27	Spelt	LBS	positiv	negativ	likt som 24, men ikke fult så mange "firere"
28	Spelt	LBS	positiv	negativ	-
29	Spelt	LBS	positiv	negativ	likt som 24, men ikke fult så mange "firere"
30	Spelt	LBS	positiv	negativ	Noen kjeder så lange som 10 celler
31	Spelt	YM	X	X	veldig like som 16. ovoide celler i par og enkeltceller.
32	Spelt	YM	X	X	som over
33	Spelt	YM	X	X	som over
34	Spelt	YM	X	X	som over
35	Spelt	YM	X	X	som over
36	Spelt	Rose Bengal	X	X	som over
37	Spelt	Rose Bengal	X	X	som over
38	Spelt	Rose Bengal	X	X	som over
39	Spelt	Rose Bengal	X	X	som over
40	Spelt	Rose Bengal	X	X	som over
41	Enkorn	MRS	positiv	negativ	-
42	Enkorn	MRS	positiv	negativ	-
43	Enkorn	MRS	positiv	negativ	ingen lange kjeder
44	Enkorn	MRS	positiv	negativ	-
45	Enkorn	MRS	positiv	negativ	Rundere, mindre avlange
46	Enkorn	LBS	positiv	negativ	-
47	Enkorn	LBS	positiv	negativ	litt tykkere/minde avlange
48	Enkorn	LBS	positiv	negativ	som 47
49	Enkorn	LBS	positiv	negativ	mindre avlange, som 45
50	Enkorn	LBS	positiv	negativ	Nesten helt runde, i klynger, og kun noen kjeder på 3-4 celler



51	Enkorn	YM	X	X	bakt? korte staver, hovedsakelig i par og enkeltceller, men noen kjeder på 3-4-5 celler.
52	Enkorn	YM	X	X	som over
53	Enkorn	YM	X	X	som over
54	Enkorn	YM	X	X	som over
55	Enkorn	YM	X	X	som over
56	Enkorn	Rose Bengal	X	X	bakt? Nesten helt runde, men litt avlange, hovedsakelig i par.
57	Enkorn	Rose Bengal	X	X	Bakterier? Ovoide, litt mer avlange enn 56. par og enkeltceller.
58	Enkorn	Rose Bengal	X	X	som 57
59	Enkorn	Rose Bengal	X	X	som 57
60	Enkorn	Rose Bengal	X	X	litt kortere enn over, emn ikke helt sirkulære. Enkeltceller og par.
61	Emmer	MRS	positiv	negativ	svakt avlange, tykke ovoide celler i klumper, par og korte kjeder
62	Emmer	MRS	positiv	negativ	som over
63	Emmer	MRS	positiv	negativ	som over
64	Emmer	MRS	positiv	negativ	som over
65	Emmer	MRS	positiv	negativ	som over
66	Emmer	LBS	positiv	negativ	som over
67	Emmer	LBS	positiv	negativ	som over
68	Emmer	LBS	positiv	negativ	som over
69	Emmer	LBS	positiv	negativ	som over
70	Emmer	LBS	positiv	negativ	som over

71	Emmer	YM	X	X	Gjær! Svak avlange/eggeforma celler. Kan se knoppskyting
72	Emmer	YM	X	X	Gjær! Svak avlange/eggeforma celler. Kan se knoppskyting
73	Emmer	YM	X	X	Gjær! Svak avlange/eggeforma celler. Kan se knoppskyting
74	Emmer	YM	X	X	som over
75	Emmer	YM	X	X	som over
76	Emmer	Rose Bengal	X	X	som over
77	Emmer	Rose Bengal	X	X	som over
78	Emmer	Rose Bengal	X	X	som over
79	Emmer	Rose Bengal	X	X	som over
80	Emmer	Rose Bengal	X	X	som over

Vedlegg 3: Resultater Sanger sekvensering av isolater

<b>Kilde</b>	<b>Agar</b>	<b>Identifisert art</b>	<b>Type organisme</b>	<b>% Identitet</b>
<b>Hvete</b>	MRS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,49 / 99,85
	MRS	N.A.		
	LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,49 / 99,85
	LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,49 / 99,85
	YM	Lactiplantibacillus plantarum / pentosus	LAB	> 99
	YM	Pediococcus pentosaceus	LAB	99,92 / 98,56
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100/100
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100/100
<b>Spelt</b>	MRS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85/99,48
	MRS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85/99,48
	LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85/99,48
	LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,68 / 99,29
	YM	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85/99,48
	YM	N.A.		
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100 / 100
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100 / 100
<b>Einkorn</b>	MRS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85
	MRS	Pediococcus pentosaceus	LAB	99,77
	LBS	Pediococcus pentosaceus	LAB	99,78
	LBS	N.A.		
	YM	Lactiplantibacillus paraplantarum / plantarum / pentosus	LAB	100 / 99,92 /99,92
	YM	Lactiplantibacillus paraplantarum / plantarum / pentosus	LAB	100 / 99,92 /99,92
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100 / 100
	RB	Gluconobacter frateurii / japonicus	AAB	100 / 100
<b>Emmer</b>	MRS	Pediococcus pentosaceus	LAB	99,78
	MRS	N.A.		
	LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85 / 99,49

LBS	Furfurilactobacillus rossiae	LAB	99,85 / 99,41
YM	Wickerhamomyces anomalus	Gjær	99,62
YM	Wickerhamomyces anomalus	Gjær	99,81
RB	Wickerhamomyces anomalus / lynferdii	Gjær	99,8 / 99,0
RB	Wickerhamomyces anomalus	Gjær	99,83

## II. Rådata Illumina sekvensering

Vedlegg 4: Prøve-ID for uttakene sekvensert med Illumina Miseq sekvensering.

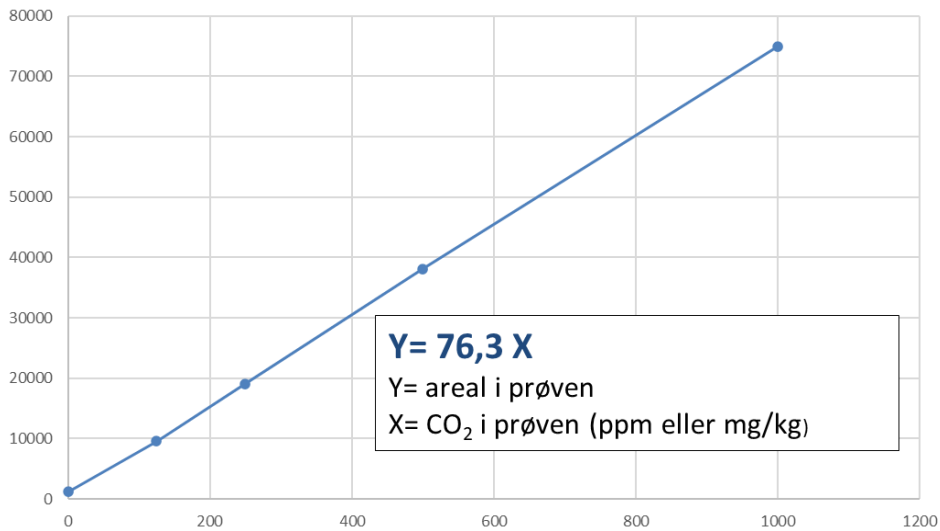
<b>SAMPLE ID</b>	<b>Source</b>	<b>Uttak</b>	<b>Kommentar</b>
<b>HU1</b>	Hvete	Uke 1	
<b>SU1</b>	Spelt	Uke 1	
<b>EMU1</b>	Emmer	Uke 1	
<b>EKU1</b>	Einkorn	Uke 1	
<b>HU2</b>	Hvete	Uke 2	
<b>SU2</b>	Spelt	Uke 2	
<b>EMU2</b>	Emmer	Uke 2	
<b>EKU2</b>	Einkorn	Uke 2	
<b>HU3</b>	Hvete	Uke 3	
<b>SU3</b>	Spelt	Uke 3	
<b>EMU3</b>	Emmer	Uke 3	
<b>EKU3</b>	Einkorn	Uke 3	
<b>HU4</b>	Hvete	Uke 4	
<b>SU4</b>	Spelt	Uke 4	
<b>EMU4</b>	Emmer	Uke 4	
<b>EKU4</b>	Einkorn	Uke 4	
<b>HU5</b>	Hvete	Uke 5	
<b>SU5</b>	Spelt	Uke 5	
<b>EMU5</b>	Emmer	Uke 5	
<b>EKU5</b>	Einkorn	Uke 5	
<b>HU6</b>	Hvete	Uke 6	
<b>SU6</b>	Spelt	Uke 6	
<b>EMU6</b>	Emmer	Uke 6	
<b>EKU6</b>	Einkorn	Uke 6	
<b>HU7</b>	Hvete	Uke 7	
<b>SU7</b>	Spelt	Uke 7	
<b>EMU7</b>	Emmer	Uke 7	
<b>EKU7</b>	Einkorn	Uke 7	
<b>HU8</b>	Hvete	Uke 8	
<b>SU8</b>	Spelt	Uke 8	
<b>EMU8</b>	Emmer	Uke 8	
<b>EKU8</b>	Einkorn	Uke 8	
<b>HT0</b>	Hvete	0 Timer etter mating	

<b>ST0</b>	Spelt	0 Timer etter mating	
<b>EMT0</b>	Emmer	0 Timer etter mating	
<b>EKT0</b>	Einkorn	0 Timer etter mating	
<b>HT2</b>	Hvete	2 Timer etter mating	
<b>ST2</b>	Spelt	2 Timer etter mating	
<b>EMT2</b>	Emmer	2 Timer etter mating	
<b>EKT2</b>	Einkorn	2 Timer etter mating	
<b>HT4</b>	Hvete	4 Timer etter mating	
<b>ST4</b>	Spelt	4 Timer etter mating	
<b>EMT4</b>	Emmer	4 Timer etter mating	
<b>EKT4</b>	Einkorn	4 Timer etter mating	
<b>HT8</b>	Hvete	8 Timer etter mating	
<b>ST8</b>	Spelt	8 Timer etter mating	
<b>EMT8</b>	Emmer	8 Timer etter mating	
<b>EKT8</b>	Einkorn	8 Timer etter mating	
<b>HT12</b>	Hvete	12 Timer etter mating	
<b>ST12</b>	Spelt	12 Timer etter mating	
<b>EMT12</b>	Emmer	12 Timer etter mating	
<b>EKT12</b>	Einkorn	12 Timer etter mating	
<b>HT24</b>	Hvete	24 Timer etter mating	
<b>ST24</b>	Spelt	24 Timer etter mating	
<b>EMT24</b>	Emmer	24 Timer etter mating	
<b>EKT24</b>	Einkorn	24 Timer etter mating	
<b>HF</b>	Hvete	Ufermentert mel	
<b>SF</b>	Spelt	Ufermentert mel	
<b>EMF</b>	Emmer	Ufermentert mel	
<b>EKF</b>	Einkorn	Ufermentert mel	
<b>HT0M</b>	Hvete	0 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>ST0M</b>	Spelt	0 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>EMT0M</b>	Emmer	0 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>EKT0M</b>	Einkorn	0 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>HT24M</b>	Hvete	24 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>ST24M</b>	Spelt	24 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>EMT24M</b>	Emmer	24 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)
<b>EKT24M</b>	Einkorn	24 Timer etter mating	Samtidig som uttak til metabolismestudier (HPLC)

### III. Rådata vekst- og metabolismeforsøk

Vedlegg 5: Kalibreringskurve for beregning av CO<sub>2</sub>-innhold.

## Calibration of CO<sub>2</sub> in milk



Vedlegg 6: Areal i prøvene ved CO<sub>2</sub>-analyser og utregnet mengde CO<sub>2</sub> (ppm)

	Gjentak	Areal			CO <sub>2</sub> ppm
		A	B	gj.snitt	
<b>Hvete</b>	1	106012	140695	123354	1617
	2	174795	167275	171035	2242
	3	164145	155625	159885	2095
<b>Spelt</b>	1	46988	42384	44686	2928
	2	42445	41867	42156	2763
	3	40846	40415	40631	2663
<b>Emmer</b>	1,00	44113	47181	45647	2991
	2,00	49771	50827	50299	3296
	3	49484	46374	47929	3141
<b>Einkorn</b>	1	43163	46607	44885	2941
	2	44479	43428	43954	2880
	3	41182	39462	40322	2642

Vedlegg 7: Rådata HPLC-analyser. Mengde (ppm) organiske syrer, karbohydrater og CO<sub>2</sub> i surdeigene ved mating (T0) og etter fermentering i 24 timer (T24) ved romtemperatur.

	Gjentak	Mengde (ppm)							
		Hvete		Spelt		Emmer		Einkorn	
		T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24
Melkesyre	1	1755,6	7901,5	1851,0	10427,2	1903,24	11180,98	1751,5	10620,0
	2	1597,71	7102,6	2194,04	10546,58	2119,77	11831,69	2065,0	11213,6
	3	1866,3	7748,2	2391,7	10103,5	2275,1	11253,6	2191,3	10747,1
	gj.snitt	1739,9	7584,1	2145,6	10359,0	2099,4	11422,1	2002,6	10860,2
	St.avvik	110,2	346,2	223,37	187,30	152,49	291,15	184,9	255,2
Eddiksyre	1	201,7	775,9	427,37	1836,91	281,32	1571,39	249,4	1343,4
	2	377,9	489,8	721,45	1756,50	557,49	1718,95	529,1	1560,0
	3	399,9	744,9	652,68	1653,92	590,62	1674,46	496,3	1416,2
	gj.snitt	326,5	670,2	600,50	1749,11	476,48	1654,93	424,9	1439,9
	St.avvik	88,7	128,2	125,60	74,89	138,66	61,80	124,8	89,98
Ravsyre	1	227,5	416,2	315,22	688,16	139,71	265,79	449,8	390,5
	2	240,6	410,4	366,34	680,91	165,33	312,79	270,0	463,7
	3	205,6	430,3	320,47	670,29	132,27	357,27	351,7	447,1
	gj.snitt	224,6	418,9	334,01	679,79	145,77	311,95	357,2	433,8
	St.avvik	14,5	8,4	22,96	7,34	14,16	37,35	73,5	31,4
DL-pyro-glutamic acid	1	10,1	5,6	10,79	9,95	8,35	11,69	57,6	53,4
	2	20,4	2,4	15,30	16,70	18,57	22,35	41,3	34,97
	3	8,4	5,8	7,01	4,06	7,49	3,12	21,5	17,5
	gj.snitt	12,9	4,6	11,04	10,24	11,47	12,39	40,2	35,3
	St.avvik	5,2	1,6	3,39	5,16	5,03	7,87	14,7	14,7
Maltose	1	8317,5	11221,3	4626,1	537,87	8398,25	5703,11	10523,9	8396,0
	2	8111,1	10132,9	4488,15	516,04	9050,47	4369,45	9780,54	8093,6
	3	8234,8	8624,4	3995,25	397,42	8192,63	4360,55	9445,34	7274,3
	gj.snitt	8221,1	9992,9	4369,8	483,77	8547,12	4811,04	9916,61	7921,3
	St.avvik	84,8	1064,8	270,78	61,71	365,69	630,80	450,74	473,9
Glukose	1	658,5	991,8	697,76	n.d.	833,25	2141,22	1141,72	1586,0
	2	888,8	854,9	1088,08	n.d.	1291,55	1293,13	1472,88	1287,9
	3	581,2	689,6	593,41	n.d.	889,38	984,87	1073,60	1028,0
	gj.snitt	709,5	845,4	793,08	0,00	1004,73	1473,07	1229,4	1300,6
	St.avvik	130,6	123,6	212,9	0,00	204,1	488,9	174,4	228,0
Fruktose	1	2030,9	2464,7	2265,5	5378,9	1622,7	4648,5	1680,4	4024,0
	2	2951,6	2737,5	3450,8	5360,1	2398,6	4634,7	2566,3	3904,2
	3	1708,5	1918,6	2498,2	4748,6	1855,1	4438,9	1685,3	3484,5
	gj.snitt	2230,3	2373,6	2738,2	5162,5	1958,8	4574,1	1977,3	3804,3
	St.avvik	526,7	340,5	512,8	292,8	325,2	95,7	416,4	231,3

Vedlegg 8: pH i surdeigene ved mating (T0) og etter fermentering i 24 timer (T24) ved romtemperatur.

		Menge (ppm)							
pH	Gjentak	Hvete		Spelt		Emmer		Einkorn	
		T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24
	1	5,00	3,73	5,13	3,87	5,24	3,92	5,23	3,95
	2*	4,70	3,75	4,96	3,84	5,03	3,85	5,04	3,93
	3	4,98	3,74	5,09	3,86	5,29	3,88	5,19	3,91
	gj.snitt	4,89	3,74	5,06	3,86	5,19	3,88	5,15	3,93
	St.avvik	0,14	0,01	0,07	0,01	0,11	0,03	0,08	0,02

\* pH- måling ved T0 ble gjort ca 3 timer etter mating







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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway