



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2022 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

## **Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av spontanfermenterte surdeiger av havre, bokhvete og quinoa**

Microbiota, growth and metabolism studies of  
spontaneously fermented oats, buckwheat and  
quinoa sourdoughs

Vibeke Leirvik

Matvitenskap



# Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet som en avslutning på min mastergrad i matvitenskap retning produksjon og utvikling av næringsmidler (PUN) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Våren 2020 bestemte jeg meg for å avslutte min 16 år lange karriere i oljebransjen for å starte på en mastergrad i matvitenskap. Det krevde en del omstilling, og det har til tider vært tøft å kombinere familie- og mammarollen med studier. Samtidig har det gitt meg så utrolig mye glede i form av ny kunnskap, inspirasjon og motivasjon til å skape en ny karriere innen et spennende fagområde.

Tidlig i studieløpet fattet jeg spesielt interesse og nysgjerrighet for fermentering og de mulighetene og positive bidragene det kan gi innen matproduksjon. Derfor var det naturlig å velge en oppgave som gav meg muligheten til å fordype meg mer i dette temaet. Arbeidet med denne oppgaven har gitt meg anledning til å lære mer om mikrobiologiske samspill og prosesser som utspiller seg i et surdeigsmiljø av ulike meltyper. Siden jeg også lever sammen med en som har cøliaki, ble det naturlig å velge melsorter som kan brukes i glutenfri bakst.

Det har vært svært inspirerende og lærerikt å jobbe med denne oppgaven, og jeg er veldig takknemlig for at mine veiledere ga meg muligheten til å jobbe med dette temaet, og at dere har hjulpet meg og delt av deres kunnskap, slik at jeg kom i mål med oppgaven. Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder førsteamanuensis Hilde M. Østlie for gode samtaler om temaet og konstruktive tilbakemeldinger på mitt arbeid. Du har alltid vært tilgjengelig når jeg har hatt spørsmål, trengt noen å diskutere resultat med eller hatt behov for hjelp på laben. Jeg vil også takke min biveileder professor Davide Porcellato for hjelp til de bioinformatiske analysene og tolkning av PCA-plott. Sender også en stor takk til senioringeniør Kari Olsen for hjelp med det praktiske rundt metabolismeforsøkene, HPLC, HSGC, GC-MS og CO<sub>2</sub>-analyser, senioringeniør Ahmed Abdelghani for å alltid ha vært tilgjengelig når jeg har trengt hjelp med metoder og det praktiske på laben, forsker Misti Dawn Finton for hjelp med Illumina sekvenseringen, stipendiat Charlotte Bauer Munch-Andersen for hjelp under Sanger sekvenseringen og for mange hyggelige samtaler på laben og til slutt senioringeniør Zhian Salehian for hjelp med DNA-ekstrahering ved Sanger sekvenseringen. Jeg vil også rette en stor takk til May, som alltid stod klar med kaffe og et varmt smil. Jeg vet ikke hvor mange ganger jeg har startet en setning med «kan du vise meg hvor jeg finner...», og med et smil var du like rask til å vise hver gang. Tusen takk for alle de hyggelige samtalene vi har hatt, og for at du skaper et så godt, varmt og inkluderende miljø på laben. Og så må jeg ikke glemme mine medstudenter på Sol og Glede. Tusen takk for gode samtaler, som ga nødvendige og etterlengtede avbrekk innimellom skrivingen og labarbeidet.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til min familie for støtte og oppmuntring underveis i arbeidet med oppgaven. Stor takk til samboer for gjennomlesning, tilrettelegging for at jeg til tider kunne bruke ekstra tid på oppgaven og for dine støttende ord. Du har alltid hatt troen på at jeg skulle komme i mål med oppgaven. Takk til mine barn for at dere får meg ned på jorda etter lange dager med skriving, og for tålmodighet med en til tider sliten mamma.

Det har vært inspirerende og meningsfullt å få anledning til å ta en ny utdanning etter mange år i arbeidslivet. Jeg ser fram til å ta i bruk kunnskapen jeg har lært og fordype meg enda mer i mat-temaer i tiden fremover.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås 14. juni 2022

---

Vibeke Leirvik

## Sammendrag

De siste tiårene er det gjort utallige studier på tradisjonelle surdeiger av hvete og rug. Det er godt dokumentert at surdeigsfermentering blant annet øker holdbarheten, bedrer tekstur, senker den glykemiske indeksen, gir mer aroma og bedrer biotilgjengeligheten av næringsstoffene i melet. De senere årene har studier også vist at mange av disse fordelene kan overføres til produksjon av glutenfrie brød. Å bake med glutenfrie meltyper er svært utfordrende da disse blant annet mangler de viskoelastiske egenskapene til glutenproteinene. Lav sensorisk kvalitet og kort holdbarhet har vært en utfordring, men flere studier har vist at surdeigsfermentering kan være en metode for å øke kvaliteten på glutenfrie brød.

I denne oppgaven ble surdeigskulturer laget, undersøkt og sammenlignet av de glutenfrie melsortene bokhvete, quinoa og to ulike havresorter. Dyrkningsavhengige og dyrkningsuavhengige metoder viste store forskjeller i den mikrobielle sammensetningen i de fire surdeigene. I surdeigene av havre ble det i den ene ikke funnet tilstedeværelse av gjær. Den var nesten helt dominert av bakterier fra *Leuconostoc*-slekten. Den andre havre-surdeigen etablerte en mikrobiota som er svært uvanlig for surdeig, da den var dominert av eddiksyrebakterier (*Gluconobacter frauterii* og *Gluconobacter oxydans/roseus*) og to gjærarter, som vanligvis ikke blir isolert fra tradisjonelle surdeiger (*Clavispora lusitaniae* og *Cyberlindnera fabianii*). Surdeigene av bokhvete og quinoa hadde en mikrobiota som ligner mer på tradisjonelle surdeiger av hvete og rug. Surdeigen av bokhvete var dominert av gjærarten *Wickerhamomyces anomalus* og melkesyre bakterien *Pediococcus pentosaceus*, mens quinoa-surdeigen var dominert av gjæren *Torulaspora delbrueckii* og melkesyre bakterien *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*).

Metabolismeforsøk viste også store forskjeller i konsentrasjoner og hvilke komponenter som ble produsert i de ulike surdeigene. Havre-surdeigene hadde lavest metabolsk aktivitet (lavest innhold av organiske syrer, CO<sub>2</sub> og en del flyktige komponenter), mest sannsynlig på grunn av lavere tilgang på karbohydrater, mens quinoa-surdeigen etterfulgt av bokhvete-surdeigen, hadde høyest tilgang på maltose og glukose, og dermed høyest produksjon av organiske syrer, CO<sub>2</sub> og flere flyktige komponenter.

Ulikheter i den mikrobielle sammensetningen i de fire surdeigene, viser at substratet har stor påvirkning på hvilket økosystem som etableres i en surdeig, som igjen påvirker produksjonen av metabolitter. Forhold i melet som opprinnelige mikroorganismer til stede, næringsstoffer, antimikrobielle komponenter og endogene enzymer i melet er mest sannsynlig viktige faktorer til utviklingen av det mikrobielle økosystemet i en surdeig.

## Abstract

In recent decades, countless studies have been made on traditional sourdoughs of wheat and rye. It is well documented that sourdough fermentation, among other things, increases shelf life, improves texture, lowers the glycemic index, gives more aroma and improves the bioavailability of the nutrients in the flour. In recent years, studies have also shown that many of these benefits can be transferred to the production of gluten-free bread. Baking with gluten-free flour types is very challenging as these, among other things, lack the viscoelastic properties of the gluten proteins. Low sensory quality and short shelf life have been a challenge, but several studies have shown that sourdough fermentation can be a method to increase the quality of gluten-free bread.

In this thesis, sourdough cultures made from the gluten-free flour varieties buckwheat, quinoa and two different oat varieties were examined and compared. Culture-dependent and culture-independent methods showed large differences in the microbial composition of the four sourdoughs. In the sourdoughs of oats, the presence of yeast was not found in one. It was almost completely dominated by bacteria from the genus *Leuconostoc*. The second oat sourdough established a microbiota that is very unusual for sourdough, as it was dominated by acetic acid bacteria (*Gluconobacter frauterii* and *Gluconobacter oxydans/roseus*) and two yeast species, which are not usually isolated from traditional sourdoughs (*Clavispora lusitaniae* and *Cyberlindnera fabianii*). The sourdoughs of buckwheat and quinoa had a microbiota that is more similar to traditional sourdoughs of wheat and rye. The buckwheat sourdough was dominated by the yeast species *Wickerhamomyces anomalus* and the lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus*, while the quinoa sourdough was dominated by the yeast *Torulasporea delbrueckii* and the lactic acid bacterium *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*).

Studies of the metabolism in the sourdoughs also showed large differences in concentrations and components produced. The oat sourdoughs had the lowest metabolic activity (lowest content of organic acids, CO<sub>2</sub> and some volatile components), most likely due to lower supply of carbohydrates, while the quinoa sourdough followed by the buckwheat sourdough, had the highest access to maltose and glucose, and thus the highest production of organic acids, CO<sub>2</sub> and several volatile components.

Differences in the microbial composition of the four sourdoughs show that the substrate has a great influence on which ecosystems are established in a sourdough, which in turn affects the production of metabolites. Conditions from the flour such as original microorganisms present, nutrients, antimicrobial components and endogenous enzymes in the flour are most likely important factors in the development of the microbial ecosystem in the sourdough.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hensikten med oppgaven.....	2
<b>2. Teori.....</b>	<b>3</b>
2.1 Korn og pseudokorn - generell oppbygning og kjemiske bestanddeler .....	3
2.1.1 Havre.....	3
2.1.3 Bokhvete .....	6
2.1.2 Quinoa.....	9
2.2 Surdeigsbrød .....	11
2.2.1 Surdeigsbrød av glutenfrie melsorter.....	12
2.2.2 Mikroorganismer i surdeig.....	14
2.2.2.1 Melkesyre bakterier .....	14
2.2.2.2 Gjær.....	18
2.2.2.3 Eddiksyrebakterier .....	19
2.3 Fenotypisk identifisering av melkesyrebakterier.....	20
2.3.1 Gramfarging.....	20
2.3.2 Katalase-test.....	20
2.4 Genotypisk identifisering ved sekvensering .....	21
2.4.1 DNA-ekstraksjon .....	22
2.4.2 Polymerase-kjedereaksjon (PCR).....	23
2.4.3 Sanger sekvensering.....	24
2.4.4 Illumina sekvensering .....	25
<b>3. Materialer og metoder.....</b>	<b>27</b>
3.1 Forsøksoppsett.....	27
3.2 Etablering og vedlikehold av surdeigskulturer .....	29
3.3 Isolering og identifisering av melkesyrebakterier og gjær i surdeigene.....	30
3.3.1 Vekstmedier .....	31
3.3.2 Isolering av melkesyrebakterier og gjær.....	33
3.3.3 Fenotypisk identifisering av MSB og gjær ved Gram-farging og katalasetest.....	33
3.3.4 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering .....	34
3.3.4.1 DNA ekstraksjon .....	34
3.3.4.2 PRC, agarose gelelektroforese og rensing av PCR-produkt.....	35
3.3.4.3 Sanger sekvensering, bearbeiding og database-søk.....	36
3.4 Mikrobiell sammensetning i surdeigene ved Illumina NovaSeq 6000 sekvensering.....	37
3.4.1 DNA-ekstraksjon .....	37

3.4.2 qPCR for 16S og ITS rRNA amplifisering .....	38
3.4.3 Illumina Index PCR .....	39
3.4.4 Bioinformatisk analyse .....	40
3.5 <i>Vekst- og metabolismeforsøk</i> .....	41
3.5.1 HPLC .....	42
3.5.2 HSGC.....	43
3.5.3 TD-GC-MS .....	44
3.5.4 Måling av CO <sub>2</sub> -produksjon .....	45
3.5.5 Principal Component Analysis (PCA).....	45
3.6 <i>Bakeforsøk</i> .....	45
3.7 <i>Sensorisk analyse</i> .....	47
<b>4. Resultater</b> .....	<b>48</b>
4.1 <i>Isolering og identifisering av melkesyrebakterier og gjær i surdeigene</i> .....	48
4.1.1 Fenotypisk identifisering av renkulturer .....	49
4.1.2 Genotypisk identifisering av renkulturer .....	50
4.2 <i>Mikrobiota-analyse ved Illumina sekvensering</i> .....	51
4.2.1 Identifisering av bakterielle samfunn i surdeigene .....	52
4.2.2 Identifisering av soppsamfunn i surdeigene .....	55
4.3 <i>Vekst- og metabolismeforsøk</i> .....	57
4.3.1 Celletall, pH og CO <sub>2</sub> -produksjon .....	57
4.3.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer .....	58
4.3.3 Produksjon av flyktige komponenter .....	60
4.3.3.1 Principal component analysis (PCA).....	64
4.4 <i>Sensorisk evaluering</i> .....	65
<b>5.0 Diskusjon</b> .....	<b>68</b>
5.1 <i>Mikrobiell sammensetning i surdeigene</i> .....	68
5.1.1 Bakteriesammensetning .....	68
5.1.2 Gjærsammensetningen .....	71
5.1.3 De mikrobielle forskjellene mellom surdeigene .....	73
5.2 <i>Vekst og metabolismestudier av surdeigene</i> .....	74
5.3 <i>Bakeforsøk og sensorisk evaluering</i> .....	78
<b>6. Oppsummering og videre arbeid</b> .....	<b>80</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>83</b>



Vedlegg.....	91
--------------	----

# 1. Innledning

Bruk av surdeig er en metode som har røtter helt tilbake til oldtiden. Det var den første metoden som ble brukt for å få brød til å bli luftige og heve. Fordeler som forlenget holdbarhet og dannelse av flere aromakomponenter, i tillegg til heving, var positive bidrag fra de metabolske prosessene til melkesyrebakteriene.

I dag bakes de fleste brød ved tilsetning av bakegjær, som er en enkel og effektiv metode. De fleste kommersielle bakeprodukt produseres på denne måten, og selv om surdeigsbaking har mange fordeler som gjærbakst ikke har, er det en prosess som er vanskelig å tilpasse en industriell bakeprosess. Likevel har surdeigsbaking blitt mer og mer populært blant hjemmebakerne de siste årene. Bakere som Morten Schakenda med «Bakeriet i Lom» og «Ille brød» i Oslo har satt surdeigsbaking på dagsordenen. Surdeigsbaking er en omstendelig og tidkrevende prosess, men hos mange veier de mange fordelene opp for tidsbruken og tålmodigheten surdeigsbakst er. På begynnelsen av 2000-tallet ble det foretatt flere studier som så på de positive ringvirkningene til det mikrobielle samfunnet som etablerer seg i en surdeig. De metabolske prosessene i en surdeig har vist seg å kunne bidra med både sensoriske, teknologiske og helsemessige fordeler (Arendt et al., 2007; De Vuyst & Neysens, 2005; Decock & Cappelle, 2005; Gobetti et al., 2019; Lau et al., 2021; Moroni et al., 2009; Nout, 2009).

I Norge og resten av verden blir en liten andel av brødprodukter bakt med glutenfrie melsorter. På verdensbasis har ca. 1% av befolkningen sykdommen cøliaki, som betyr en diett som utelukker gluteninntak. Gluten er en svært viktig proteingruppe i bakesammenheng; den bidrar til viskoelastiske egenskaper, som gjør at deigen klarer å holde på CO<sub>2</sub>-en som dannes under fermentering. Dette gir luftige og saftige brød. Å bake med glutenfrie melsorter er derfor svært utfordrende. Utvalget av glutenfrie produkter i butikker har vært preget av lav kvalitet med hensyn til tekstur, holdbarhet, smak og næringsinnhold.

Det er gjort mange forsøk på å finne egnede metoder for å øke kvaliteten på glutenfri bakst. Flere studier er utført, og det kan se ut som oldtidens surdeigsmetode kan være en av mange løsninger på en moderne utfordring, som glutenfri bakst er (Franco et al., 2020; Franco et al., 2021; Moroni et al., 2009). Fordeler som bedring av smak, næringsinnhold, tekstur og holdbarhet er noen av fordelene. Bruk av surdeig er en metode som stort sett baseres på backslopping-metoden der kulturen vedlikeholdes ved tilsetning av mel og vann. Det er gjort utallige studier på tradisjonelle surdeiger. Men hvordan vil det mikrobielle miljøet se ut i surdeig basert på glutenfrie melsorter? Noen studier er utført, men ikke på langt nær så mange som er utført på surdeig av hvete og rug.

## 1.1 Hensikten med oppgaven

Formålet med denne oppgaven var å undersøke og sammenligne surdeigskulturer laget på bokhvete, quinoa og to ulike havresorter. Ved etablering av ulike surdeiger under aseptiske forhold og like betingelser, som fermenteringstid og temperatur, vil de ytre vekstvilkårene være like for mikroorganismene som etableres i surdeigene. Bruk av ulike kornslag vil derimot gi ulik tilgjengelighet av næringsstoffer og forskjellige konkurransebetingelser mellom de ulike mikroorganismene. Det vil derfor kunne forventes at den mikrobielle sammensetningen i de fire surdeigene vil bli ulik.

I denne oppgaven var målet å undersøke hvor lik eller ulik den mikrobielle sammensetningen blir i de ulike surdeigene ved etablering under like fermenteringsbetingelser. Fokus er på melkesyrebakterier og gjær, hvor de isoleres og identifiseres fra de fire ulike surdeigene. Forskjeller i produksjon av metabolitter i de ulike surdeigene vil også bli studert for å undersøke om det er en sammenheng mellom tilstedeværelse av ulike melkesyrebakterier og gjær.

For å finne svar på dette ble surdeigene etablert under aseptiske forhold, og samme fermenteringstid og temperatur ble brukt på alle surdeigene. Den mikrobielle sammensetningen og stabiliteten til de ulike surdeigene ble studert over åtte uker ved dyrkningsavhengige og dyrkningsuavhengige metoder. Det ble utført vekst- og metabolismeforsøk over 3 uker for å se på vekst av melkesyrebakterier og gjær, og produksjon og omsetning av flyktige komponenter, organiske syrer og karbohydrater i surdeigene.

## 2. Teori

### 2.1 Korn og pseudokorn - generell oppbygning og kjemiske bestanddeler

Korn er en svært viktig matplante i alle deler av verden, og brukes både til mat og dyrefôr. Hvete, sammen med mais og ris er de tre mest dominerende kornplantene og har en viktig posisjon i verdensjordbruket i dag (Svihus, 2019).

Kornplanter tilhører gressfamilien (*Poaceae*), også kjent som *Gramineae*-familien, som er en enfrøbladet plante. De fleste er ett- eller flerårige urter, og frøene er rike på stivelse (Seibel et al., 2006). Pseudokorn tilhører ikke gressfamilien, men de har, i likhet med korn, stivelsesrike frø og brukes derfor ofte på samme måte. I motsetning til mange andre korn inneholder ikke pseudokorn glutenproteiner og er derfor en mye brukt ingrediens i glutenfrie produkter (Schoenlechner et al., 2008). Pseudokorn har også fått mye oppmerksomhet de senere årene grunnet høy næringsverdi (Mir et al., 2018).

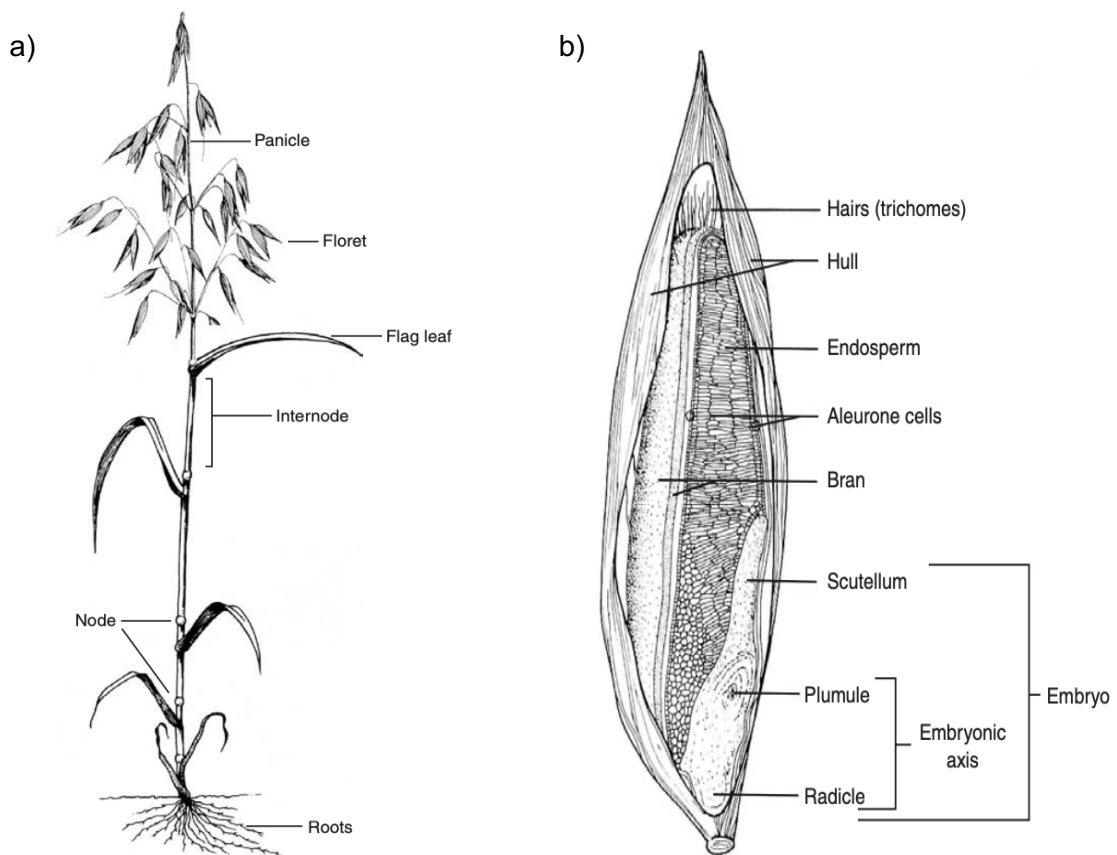
Havre, bokhvete og quinoa er blant korn og pseudokorn som har mange næringsmessige fordeler fremfor hvete, mais og ris. Havre er et tradisjonelt matkorn, som tilhører gressfamilien, mens bokhvete og quinoa er pseudokorn. Alle tre kornsortene brukes ofte i glutenfrie matretter da de ikke inneholder glutenproteiner.

#### 2.1.1 Havre

Havre (*Avena sativa*) tilhører gressfamilien, og er et viktig kornslag i Norge sammen med hvete, bygg og rug. Prognosene for 2021 tilsier at det ble dyrket ca. 252.000 tonn havre i Norge i fjor (Moksnes Weie, 2022), og det er bare hvete og bygg det dyrkes mer av her til lands. Også i resten av verden er havre et viktig fôr- og matkorn. Det dyrkes over 25,5 millioner tonn havre årlig (*World agricultural production*, 2022), som gjør det til det sjette mest dyrkede kornet i verden etter mais, ris, hvete, bygg og sorghum (Arendt & Zannini, 2013; Zwer, 2004). Havre klarer seg godt under skrinne, fuktige og kjølige vekstvilkår og dyrkes derfor hovedsakelig i kaldere klima. Over halvparten av produksjonen foregår på den nordlige halvkulen der Russland, Canada, USA, Finland og Polen har den største produksjonen. Også på den sørlige halvkule dyrkes det havre; Australia er ledende på havreproduksjon etterfulgt av Argentina, Chile og Brazil (Zwer, 2004). Trolig ble havre spredt til Nord-Europa i bronsealderen, og forekom først som ugress i bygg- og hvete-åkrene. Den ble først dyrket som matplante i Europa for ca. 2500 år siden (Holtet et al., 2021).

Opprinnelsen til havre er usikker, men antas å være Asia, Midt-Østen og Middelhavs-området (Murphy & Hoffman, 1992). Blant de kultiverte havretypene er *Avena Sativa* den vanligste arten (Butt et al., 2008). Havre kan være diploid, tetraploid eller heksaploid. Sortene som kultiveres er alloheksaploid og har oppstått gjennom spontane krysninger mellom nærbeslektede, ville arter med påfølgende kromosomfordobling. Diploide og tetraploide arter vokser stort sett vilt og regnes ofte som ugress (Arendt & Zannini, 2013).

I Norden dyrkes sommer-ettårige planter. Høyden kan variere mellom ulike planter og fra sesong til sesong. Blomsterstanden (Figur 2.1a) er en risle som kjennetegnes ved at småaksene henger i sidegrener som er ordnet i 4-6 kranser på hovedstilken. Sidegrenene kan ha ulik lengde, stivhet og være festet til hovedaksen i ulike vinkler. Havre har normalt fastsittende agner, og disse blir fjernet ved avskalling før det brukes til mat. Det finnes også naken havre der agnene sitter løst og faller av i treskeprosessen (Holtet et al., 2021).



**Figur 2.1**

a) De ulike morfologiske delene hos havreplanten. Blomsterstanden er en risle som er ordnet i 4-6 kranser på hovedstilken. b) Komposisjonen til havre-frøet, som består av agner, kli, endosperm og embryo. Figuren er hentet fra Zwer (2004).

Skallet (agnene) utgjør ca. 25-30% av havren som høstes, og består hovedsakelig av uspiselig cellulose, hemicellulose og lignin (Zwer, 2004). Resten av kornet består av tre hoveddeler - kli, endosperm og embryo (Figur 2.1b). Endospermen inneholder opplagsnæringen til en spirende plante og står for 55-80% av kjernen. Den består av stivelse, proteiner, lipider og  $\beta$ -glukaner. Mesteparten av stivelsen befinner seg i de indre delene av endospermen, og er organisert i stivelseskorn som enten foreligger enkeltvis eller gruppevis i kluster, mens proteinene, lipidene og  $\beta$ -glukanene befinner seg i de ytre delene av endospermen. Det ytre laget av kornet, kliet, består blant annet av aleuron-laget og er rikt på vitaminer, mineraler, fytat og antioksidanter, mens embryoet er rikt på lagringsproteiner. Kjemisk består havre av ca. 7,7-14,8% proteiner, 53,0-65,8% karbohydrater, 4,3-7,6% lipider, 6,5-12,8% kostfiber og 2,3-4,2% mineraler. Havre har mye større mengder lipider enn andre korn og disse er hovedsakelig plassert i endospermen, ulikt andre korn typer der lipidene stort sett er lokalisert i embryoet. Noe av lipidene er bundet opp i amylose-lipid kompleks. Høyt innhold av lipid bundet opp i stivelsen gir noen negative teknologiske egenskaper til havre, som blant annet redusert vannbindende og svellende egenskaper og lipidoksidering som kan gi uønsket smak. Av stivelsen i havre består ca. 98-99% av amylose og amylopektin. Havre har veldig lav andel oligosakkarider og sukker. Den største karbohydratkilden utenom stivelse er derfor løselige og uløselige kostfiber. Havre består vanligvis av 10,2-12,1% kostfiber der 4,1-4,9% er løselig fiber og 6,0-7,1% er uløselig fiber (Arendt & Zannini, 2013).

Proteinene i havre har en høy biologisk verdi da de består av flere essensielle aminosyrer enn andre kornsorter (Rines et al., 2006). Proteinene er fordelt i hele kornet, med høyest andel i embryoet (ca. 30%). Hovedandelen av lagringsproteinene er globuliner, men også en liten andel prolaminer er til stede i havre. På grunn av det høye innholdet av globuliner, sammenlignet med andre kornsorter, har havre et høyere innhold av essensielle aminosyrer, deriblant lysin (Arendt & Zannini, 2013). Hvete og andre kornsorter har en mye større andel prolaminer og dermed også gliadin som er hovedtriggeren til cøliaki. Havre inneholder ikke gliadin, men prolaminet avenin. Det har vært debattert mye om havre er trygt å spise for de med cøliaki da avenin inneholder to peptider som kan gi en immunrespons hos cøliakipasienter. Flere studier indikerer imidlertid at havre er trygt å inkludere i en glutenfri kost (Guttormsen et al., 2008; Janatuinen et al., 2002; Kempainen et al., 2007; Srinivasan et al., 1996).

Havre har også påvist gode helseeffekter blant annet grunnet høyt innhold av  $\beta$ -glukaner. Hovedkomponenter (ca. 90%) i  $\beta$ -glukan er  $\beta$ -(1,3)-cellotriosyl og -cellotetraosyl. Denne kjemiske strukturen gir gode teknologiske egenskaper som god vannløselighet og økt viskositet. Flere studier har også vist at  $\beta$ -glukaner har positive helsegevinster. Lavere opptak av glukose i tynntarmen og senkning av blod-kolesterolet hos mennesker, er noen av fordelene med inntak av havre (Butt et al., 2008).

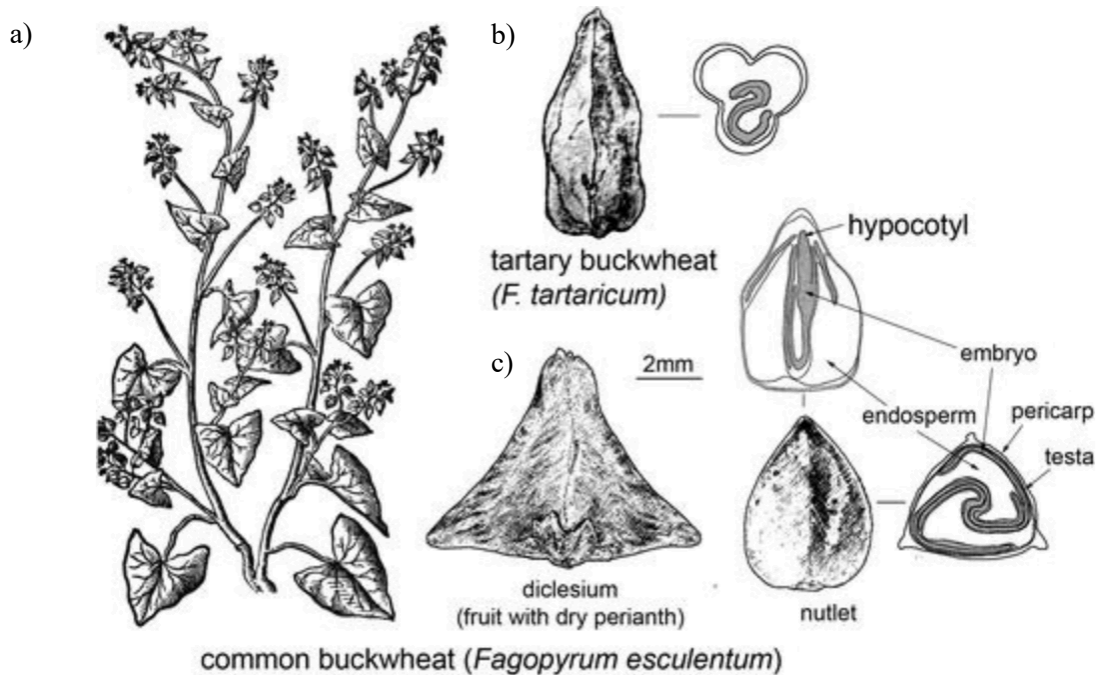
Lipidene i havre kan deles inn i triglyserider (32-85%), fosfolipider (5-26%), glycolipider (7-12%), frie fettsyrer (2-11%) og steroler (0,1-4%). Frie fettsyrer kan være et problem da det gir harsk smak, og må derfor kontrolleres. Havre blir vanligvis varmebehandlet for å inaktivere enzymer som fører til oksidering av lipider under lagring. En-umettede og fler-umettede fettsyrer (18:1, 18:2, 18:3) utgjør opp mot 80% av fettsyrene i havre (Arendt & Zannini, 2013).

*Avena Sativa* (hvit havre) er den havresorten som nesten utelukkende dominerer som matkorn i verden, men det finnes flere andre havresorter, deriblant den diploide arten, *Avena Strigosa* Schreb. (svart havre). Svart havre har opprinnelse fra Middelhavsområdet og har vært i bruk i Europa siden bronsealderen som mat og dyrefôr. Bruken av svarthavre som matkorn ble dramatisk redusert da den mer produktive *Avena Sativa* ble introdusert fra Tyskland på 1950-tallet (Dial, 2014). Svarthavre kan dyrkes i skinn jord og dyrkes en del i Sør-Amerika der den brukes som vinterdekke eller som grøntfôr. Også andre steder som Skottland, Australia, deler av USA dyrkes den, men sjeldent som matkorn. De siste årene har svart havre fått mer interesse som menneskemat. I Norge dyrkes den i Østfold på Tvetter Gård, som den eneste produsenten i landet av svart havre til matkonsum. Svart havre har høyere lipid-innhold enn *Avena Sativa*, og lavere innhold av stivelse. Det gjør at den har dårligere viskositetsegenskaper enn den vanlige varianten, men med opp mot 40% mer umettede fettsyrer er den et interessant alternativ til den vanligere varianten *Avena Sativa* (Ciolek et al., 2007).

### 2.1.3 Bokhvete

Bokhvete (*Fagopyrum esculentum* Moench og *Fagopyrum tataricum* Gaertner) er en ettårig urt som hører til i *Polygonaceae*-familien. Planten er en tofrøbladet plante i motsetning til kornplanter, som er enfrøbladet. Taksonomisk er bokhvete langt fra kornplantene i gressfamilien, men frøene har mange felles kjemiske og funksjonelle egenskaper med korn, og kategoriseres derfor, i likhet med quinoa, som et pseudokorn (Ikeda, 2002). Det finnes to kultiverte arter av bokhvete for matkonsum: *Fagopyrum esculentum*, som ofte kalles vanlig eller søt bokhvete, mens *Fagopyrum tataricum* ofte kalles vill eller bitter bokhvete da denne har en bitrere smak. Sød eller vanlig bokhvete er den sorten som er vanligst å bruke til matkonsum (Wijngaard & Arendt, 2006).

*Fagopyrum esculentum* blir 60-80 cm lang og har en blank, saftig stengel og trekantede blader med hjerteformet grunn (Figur 2.2a). Den har dimorfe blomster som er hvite, rosa eller røde. Kornet/frøet, som egentlig er en karyopse/skallfrukt, er en-frøet, brun og formet som ett tetraeder (Figur 2.2b,c) (Léder, 2009).

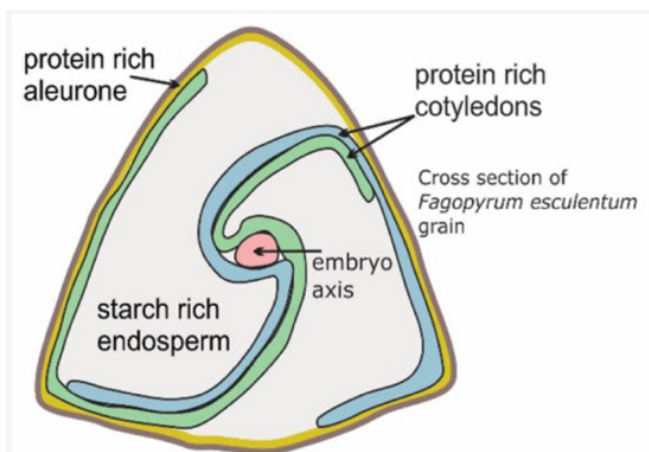


**Figur 2.2**

a) *Fagopyrum esculentum*. med karakteristiske hjerteformede blader og blomster som sitter i skjerm-lignende klaser. Frukten/frøet til b) bitter bokhvete og c) vanlig bokhvete. Figuren er hentet fra Weisskopf og Fuller (2014).

Størrelsen og fargen på frukten/frøet varierer mellom ulike arter og varianter av bokhvete-planten.

Figur 2.3 viser frøet, som er omsluttet av et hardt frøskall med det proteinrike aleuronlaget på innsiden. Embryoet er plassert i midten av frøet omsluttet av stivelsesrik endosperm (Hung et al., 2009).



**Figur 2.3**

Tverrsnittet av skallfrukten/frøet viser den anatomiske oppbygningen til bokhvete med frøskallet som omslutter aleuronlaget og den stivelsesrike endospermen. Embryoet er plassert i midten av frøet og har et høyt innhold av proteiner. Figuren er hentet fra Luthar et al. (2020).



Opprinnelsen til bokhvete er mest sannsynlig Kina. Bokhvete har ikke en like lang forhistorie som quinoa, men nedtegnelser fra 600-tallet tyder på at bokhvete ble en populær matplante i Tang-dynastiet i Kina fra år 618-907 (Ikeda, 2002). I dag dyrkes bokhvete i flere land. I Asia dyrkes den i større mengder i India, Nepal, Bhutan, Kina, Mongolia, Nord-Korea, Øst-Russland og Japan. I Himalaya har bokhvete vært en viktig matplante i mange århundrer, spesielt i høyfjellsområdene fra Pakistan til Myanmar. Kultivering av bokhvete har også spredd seg til Europa, USA, Canada, Australia og Sør-Afrika. Planten ble introdusert til Europa i Middelalderen og har, blant annet, vært dyrket i Tyskland siden 1500-tallet (Léder, 2009).

Næringsmessig har bokhvete høy verdi sammenlignet med mange andre kornprodukt. Den har en godt balansert aminosyresammensetning, og består også av viktige mineraler, vitaminer, flavonoider og kostfiber. Mel fra bokhvete består vanligvis av 12,0% protein, 3,1% lipider, 69,6% karbohydrater, 4,3% kostfiber og 0,8% mineraler (Ikeda, 2002).

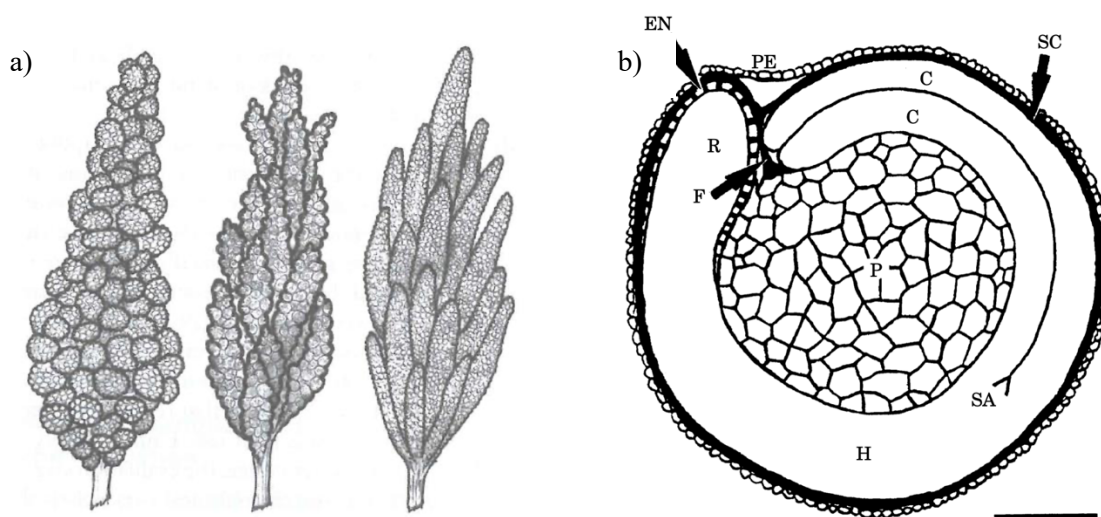
Hovedandelen av protein i bokhvete består av globulin (64,5%), albumin (12,5%) og glutelin (8,0%). Protein i vanlig korn består vanligvis av en stor andel prolaminer, som er lavt på aminosyrene lysin, tryptofan og treonin. På grunn av den høye andelen globuliner i bokhvete, er innholdet av lysin, arginin og asparaginsyre høyt (Wijngaard & Arendt, 2006). Innholdet av lysin og den godt balanserte aminosyre-sammensetningen, gjør at den biologiske verdien til bokhvete er beregnet til 93,1% (Eggum et al., 1980). Til sammenligning er den biologiske verdien til proteinene i hvete, soyabønner og grisekjøtt henholdsvis 62,5%, 68,4% og 84,3% (Luthar et al., 2020). Selv om proteinene i bokhvete har en høy biologisk verdi, har flere studier vist en lav fordøyelighet av bokhvete-protein. Dette har mest sannsynlig sammenheng med variabel proteolytisk aktivitet i de ulike bokhvete-fraksjonene og tilstedeværelse av ulike antinæringsstoffer, som tanniner og inhibitorer (Wijngaard & Arendt, 2006).

Bokhvete har også et høyt innhold av antioksidanter (flavonoider) og mineraler, som magnesium, sink, kopper og mangan. Vitaminer som B1, B2 og niacin er også til stede i relativt høye konsentrasjoner (Ikeda, 2002). Stivelsesinnholdet i bokhvete-frø er ca 54,5-57,4% (Hung et al., 2009). Som de fleste andre korn består stivelsen i bokhvete hovedsakelig av amylose og amylopektin der forholdstallet for vanlig bokhvete (*F. esculentum* Moench) er 21-27% amylose og 73-79% amylopektin (Noda et al., 1998). Amylose/amylopektin-innholdet har innvirkning på de teknologiske egenskapene til bokhvete. Hung et al. (2009) har utført en studie som viste at fint bokhvetemel, som inneholdt mer av den stivelsesrike endospermen, hadde bedre viskositetsegenskaper enn fullkornsmel, som også inneholdt de ytre delene av frøet. Bokhvete inneholder ingen gluten-lignende proteiner og vil derfor ikke kunne danne en viskoelastisk deig, slik som hvete- og speltmel. Tradisjonelt brukes bokhvetemel mye i Japan og Kina for produksjon av ulike typer bokhvete-nudler, ofte da i kombinasjon med andre melsorter,

som hvete (Hung et al., 2009). Også i andre deler av verden som USA, Russland og deler av Europa er det utstrakt bruk av bokhvete, ofte da som mel eller gryn (Ikeda, 2002).

### 2.1.2 Quinoa

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) er en ettårig urt som tilhører Amaranthfamilien (*Amaranthaceae*, tidligere *Chenopodiaceae*), og er i underfamilien med meldearter (Friis Pedersen, 2017). Planten kan bli rundt 100-300 cm høy og er mer eller mindre forgrenet, avhengig av sort. Blomsterkolbene har form som en amarant hvor blomstene og frøene er plassert i kompakte klaser (Figur 2.4 a). Størrelsen på frøene kan variere og bli opp mot 2,6 mm i diameter. Også fargen på frøene kan ha store variasjoner, fra hvit, rød og svart (Friis Pedersen, 2013). Figur 2.4 b) viser tverrsnittet av et frø der den stivelsesrike delen (perisperm) ligger i midten av frøet. Endospermen og embryoet, som omslutter perispermen, er rik på proteiner og lipider.



**Figur 2.4**

a) Blomsterkolbene til quinoa med form som en amarant hvor blomstene og frøene er plassert i kompakte klaser  
b) Tverrsnitt av frøet til planten hvor perispermen (P) befinner seg i midten av frøet. Endospermen (EN) består av 1-2 celledag i mikropylar-området, som sammen med embryoet (H+C), er rikt på proteiner og lipider. Figur er hentet fra Prego et al. (1998).

Planten har sin opprinnelse i Sør-Amerika, i området rundt Andesfjellene hvor den har vært dyrket i flere tusen år, og var en viktig matplante for Inkaene. Plantens evne til å vokse i høyfjellsområder, at den er resistent mot frost og krever lite vann, gjorde den til en særs egnet matplante i høyfjellsområdene. I tillegg er quinoa en næringsrik plante med høyt innhold av protein, fett, vitaminer og mineraler, og var derfor en viktig næringskilde for befolkningen. Arkeologiske funn indikerer at quinoa har vært kultivert i Sør-Amerika i minst 5000 år (opp mot 7000 år i noen områder i

Peru) (Taylor & Parker, 2002). Den var sammen med mais og poteter de viktigste matplantene for Inkaene, men etter den spanske erobringen av Inka-områdene på 1500-tallet ble det en nedgang i dyrking av quinoa, og andre kornplanter, som hvete og bygg, tok mer over. Planten ble etter hvert sett på som mat for de fattige, og den ble hovedsakelig dyrket i fjellområdene (Kozioł, 1992). I senere tid har imidlertid quinoa og andre pseudokorn fått økt interesse grunnet den høye næringsverdien og plantens evne til å vokse under mange ulike klimatiske forhold. I dag er Europa den største importøren av quinoa. Planten dyrkes i mange deler av verden, men fremdeles er det Sør-Amerika som står for den største produksjonen og eksporten (*European market potential for quinoa*, 2020).

Næringsmessig har quinoa svært høy kvalitet. Planten har et høyere proteininnhold enn de fleste korn. Den består av ca 13,8 - 16,8 % protein, og aminosyresammensetningen kan sammenlignes med kaseinene i melk (Kuktaite et al., 2021). Hovedmengden av proteinene er plassert i embryoet, men også resten av bestanddelene av kornet inneholder noe proteiner. De to største proteingruppene er globuliner og albuminer. Som bokhvete har også quinoa et høyt innhold av den essensielle aminosyren lysin. I tillegg har den høyere verdier av metionin og cystein enn det man finner i belgfrukter, og kan derfor være et verdifullt supplement til belgfrukter, som ofte er lave på disse aminosyrene (Jancurová et al., 2009).

Innholdet av polare (19%) og frie fettsyrer (25%) er usedvanlig høyt i quinoafrø, og innholdet av fosfolipider (lecithin) er på ca 1,8% (Valencia-Chamorro, 2003). I tillegg har også quinoa et høyt innhold av enumettede fettsyrer (C18:1, 24%) linolsyre (C18:2, 50%) og linolensyre (C18:3, 4%), som gjør den til en god kilde til sunne fettsyrer. Grunnet det høye innholdet av Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol og  $\gamma$ -Tocopherol) er de umettede fettsyrene godt beskyttet mot oksidering (Kozioł, 1992).

Quinoa er også en god kilde til vitaminer og mineraler. Den inneholder mer kalsium, magnesium, jern og sink enn tradisjonelle matkorn. Blant annet er jerninnholdet vesentlig høyere enn i andre kornsorter, som hvete, bygg og ris, med innhold på 134 mg Fe/kg for quinoa og henholdsvis 38 mg Fe/kg, 32 mg Fe/kg og 7 mg Fe/kg for hvete, bygg og ris (Kozioł, 1992). Quinoa er også en god kilde til tiamin, riboflavin (B<sub>2</sub>), folinsyre og askorbinsyre (C) (Jancurová et al., 2009).

Karbohydratinholdet varierer fra 67-74% av tørrstoffet, avhengig av sort (Valencia-Chamorro, 2003). Mesteparten av karbohydratene i quinoa er i form av stivelse, ca 60% av fersk vekt (Kozioł, 1992). Stivelsen er hovedsakelig lokalisert i persisperm, men også i frøskallet og embryoet finnes noe stivelse. Stivelsen er organisert som små stivelseskorn enten alene eller i større kompleks med andre. Stivelseskornene er mindre i størrelse enn kornene i for eksempel hvete og mais, og har, sammenlignet med andre planter, et lavt innhold av amylose (7,7-25,7%) (Li et al., 2016). De små stivelseskornene tilsier en høy gelatiniseringstemperatur, men siden stivelsen er rik på amylopektin og lav på amylose

er gelatiniseringstemperaturen tilnærmet lik tradisjonelle matkorn, som hvete. Den høye andelen amylopektin gjør at quinoa har gode svulle-egenskaper og danner en høyere plastisk viskositet enn for eksempel hvete (Taylor & Parker, 2002).

Quinoa inneholder antinæringsstoffer, som saponiner og fytinsyre. Også trypsin-inhibitor og tanniner finnes i mindre mengder, men grunnet de lave konsentrasjonene regnes disse som mindre viktige. Saponinene regnes som det viktigste antinæringsstoffet og har potensial til å gi størst negativ effekt ved inntak. Saponinene i quinoa er glykosider av triterpenoider, som består av saponin (triterpenoider) bundet til et suktermolekyl (Jancurová et al., 2009). Saponiner gir en bitter smak og regnes som giftige. Giftigheten avhenger av type og hvordan det inntas i kroppen (Kozioł, 1992). Saponiner sitter hovedsakelig i frøskallet til quinoa-frøet og ved prosessering blir mesteparten av saponinene fjernet, enten ved vasking eller ved mekanisk fjerning av frøskallet. Konsentrasjonen av saponiner varierer en del i ulike sorter av quinoa og det skilles dermed mellom søt quinoa, som inneholder lave mengder saponiner og sorter som har høyere andel saponiner. Fytinsyre finnes i de fleste korn/pseudokorn og belgfrukter i konsentrasjoner fra 1-3% (Jancurová et al., 2009). Rundt 1,18% er vanlig å finne i quinoa, som er litt høyere enn hva som er vanlig i bygg, hvete og mais. Men studier har likevel vist at opptaket av mineraler i kroppen ikke har blitt redusert mer ved inntak av quinoa, sammenlignet med andre korn typer. Fytat kan danne uløselige komplekser med multivalente metallioner, som  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  og  $\text{Zn}^{2+}$  og reduserer dermed biotilgjengeligheten og opptaket av disse mineralene i kroppen (Kozioł, 1992).

## 2.2 Surdeigsbrød

Fermentering av mat, sammen med tørking og salting, er en av de eldste matpreserverings-teknikkene vi kjenner til (Narvhus & Axelsson, 2003). Produksjon av organiske syrer, som melkesyre, og antimikrobielle stoffer gjør at kvalitetsforringende og patogene mikroorganismer trives dårligere i produktet. Dette var effektive metoder, før kjøleoppbevaring og frysing av mat var et alternativ, men er like aktuelt i dag for å forlenge holdbarheten på matprodukter. Ved surdeigsbaking er også mikroorganismenes evne til å produsere  $\text{CO}_2$  svært viktig. I tillegg har surdeigsfermentering sensoriske, teknologiske, helse- og ernæringsmessige fordeler (Gobbetti et al., 2019). Blant annet vil surdeigsfermentering gi bedre mineraltilgjengelighet, redusert innhold av FODMAPs, redusert glykemisk indeks, redusert gluteninnhold og produksjon av flere aromakomponenter.

Brød har en historie som går langt tilbake i tid. Man vet ikke hvem som bakte det første brødet, men arkeologiske funn har antydning at det for minst 23 000 år siden, lenge før jordbruket, fantes systemer blant jegerne for innhøsting og maling av stivelsesholdig kornmateriale i området rundt Galileahavet.

Man vet at brød var en viktig næringskilde og også en viktig del av økonomien langs Middelhavet og den første menneskelige sivilisasjonen i Den Fruktbare Halvmåne i Midtøsten. Også i antikkens Hellas og blant Romerne hadde brød en viktig rolle, og i Europa har brød vært en viktig næringskilde helt inn i det 20. århundre (Rubel, 2011).

Surdeigsfermentering var en vanlig metode for å heve brød før industriell bakegjær ble introdusert på slutten av 1800-tallet (Lahue et al., 2020). I flere tiår har renkulturer av *Saccharomyces cerevisiae* vært brukt ved bakst, men disse stammene er først og fremst foredlet fram på grunnlag av sin evne til hurtig produksjon av CO<sub>2</sub>. Disse gjærkulturene har ikke de samme egenskapene som melkesyrebakterier til senking av pH og produksjon av aromakomponenter. Likevel er det denne metoden som er mest vanlig i dag. Selv om surdeigsbaking har mange fordeler teknologisk, helsemessig og sensorisk, er det en mer tidkrevende prosess, som er vanskeligere å tilpasse en industriell bakeprosess.

### **2.2.1 Surdeigsbrød av glutenfrie melsorter**

De siste årene har behovet og etterspørselen av brød som ikke inneholder gluten økt. Av verdens befolkning har ca. 1% sykdommen cøliaki. Cøliaki er en kronisk betennelsessykdom i tynntarmen, som skyldes en immunreaksjon mot tarmens egne celler. Dette fremprovoseres av glutenproteinene, som finnes i mange kornsorter, og den eneste behandlingen av sykdommen er å leve på en glutenfri diett (Arendt & Bello, 2008). Det betyr en diett hvor kornsorter som hvete, spelt, rug og bygg må ekskluderes.

Å bake brød av mel uten glutenproteiner er svært utfordrende. Prolaminfraksjonen som finnes i endospermen til frøplanten hos mange korn har viktige teknologiske bakeegenskaper (Thompson, 2003). Når melet tilsettes vann og deigen eltes danner disse proteinene et glutennettverk, som har viskoelastiske egenskaper. Dette gjør at massen henger sammen som en deig, og nettverket fanger CO<sub>2</sub> som dannes under fermenteringen, og gjør at brødet hever (Uhlen, 2014).

Baking med glutenfrie meltyper mangler glutenproteiner som glutenin og gliadin. De fleste glutenfrie meltyper har grunnnet høy andel stivelse evnen til å svulle i vann og gi økt viskositet, men de elastiske egenskapene mangler (Arendt & Bello, 2008). Andre utfordringer med glutenfri bakst er rask retrogradering av stivelse, som gir tørr og smuldrete krumme. I tillegg er munnfølelse og smak en utfordring. Det trengs ofte flere tilsetningsstoffer for å etterligne de viskoelastiske egenskapene til hvete, og produktene er også ofte basert på melsorter, som ris, mais og hvetestivelse, med høyt stivelsesinnhold og lavt innhold av proteiner, vitaminer og mineraler. Sammenlignet med brød basert

på vanlige kornsorter har ofte glutenfrie brød dårlig næringsverdi og lavt innhold av B-vitaminer, jern, folat og kostfiber (Thompson, 2000; Yazykina et al., 2008).

De siste 20 årene er det gjort mange forsøk på å finne løsninger og metoder for å øke kvaliteten og næringsinnholdet på glutenfrie brød. Tilsetning av mer næringsrike pseudokorn, som quinoa og bokhvete, vil øke næringsinnholdet i produktene, men disse kornsortene bidrar ikke til noen teknologiske fordeler ved glutenfri bakst.

Flere studier har også sett på bruk av surdeig som en metode for å bedre kvaliteten på glutenfrie bakeprodukt (Arendt & Bello, 2008; Franco et al., 2020; Franco et al., 2021; Moroni et al., 2009). Bedring i tekstur, utvikling av flere aromakomponenter, bedre biotilgjengelighet og fordøyelse av næringsstoffer, og lengre holdbarhet er noen av fordelene som nevnes. Disse fordelene kommer av den komplekse metabolske aktiviteten til mikroorganismene i surdeigen. Blant annet vil produksjon av melkesyre og antimikrobielle stoffer gi bedre holdbarhet, produksjon av ekstracellulære polysakkarider (EPS) kan bidra til en bedre tekstur, og proteolytisk og amylolytisk aktivitet danner flere aromakomponenter. Mer tilgjengelige aminosyrer og redusert sukker bidrar også til Maillard-reaksjoner under steking som gir bedre smak og dypere farge på skorpen. En studie utført av Franco et al. (2021) viste at glutenfritt brød, sammensatt av 70% rismel og 30% quinoamel hadde signifikant høyere aminosyreinnhold, bedre tekstur, volum, farge og smak og lengre holdbarhet, når brødet var fermentert med surdeig sammenlignet med kommersiell gjær. Også en studie utført av Moroni et al. (2009) viste at surdeigsfermentering ved produksjon av glutenfrie brød har positiv innvirkning på brødkvaliteten, både teknologiske og helsemessige kvaliteter.

I mange kommersielle glutenfrie brødprodukt er ofte ingredienslisten lang. Bruk av stivelse, meieriprodukter, proteintilsetninger, prebiotika og hydrokolloider er noen av ingrediensene som brukes for å etterligne tekturen og krummen på tradisjonelle bakeprodukt. Spesielt hydrokolloider er en essensiell ingrediens i glutenfrie brød. Hydrokolloider er høymolekylære langkjeda molekyler som er svært hydrofile. De har evnen til å binde til seg store mengder vann og danner en viskøs løsning. Hydrokolloider har to egenskaper i mat, de stabiliserer produktet og bedrer tekturen. For glutenfrie brød har metylcellulose, xantangummi, pektin, guar gummi og johannesbrød-kjernemel vært mye brukt (Arendt & Bello, 2008).

De siste årene har tilsetningsstoffer i mat vært forbundet med noe negativt, og mange kommersielle næringsmiddelbedrifter streber etter kortere ingredienslister med mindre tilsetningsstoffer. Nedgang i pH under surdeigsfermentering gjør at proteinene folder seg mer ut og kan lettere bidra til et protein-stivelsesnettverk, som på mange måter ligner på ett glutennettverk, og derfor forbedrer tekturen til glutenfrie brød. Også produksjon av EPS av noen melkesyrebakterier, kan erstatte noen av

tilsetningsstoffene. EPS-produksjon vil variere mellom melkesyrebakteriene, som er arts- og stamme-spesifikke egenskaper, og avhenger derfor av sammensetningen av melkesyrebakterier i surdeigen (Franco et al., 2020).

## 2.2.2 Mikroorganismer i surdeig

Surdeig består av en kompleks sammensetning av hovedsakelig melkesyrebakterier og gjær (Salovaara & Gänzle, 2011). Ved spontanfermentering av mel og vann, mikset sammen og oppbevart i stabile omgivelser og ved konstant temperatur, vil det etter hvert etablere seg et stabilt mikrobielt samfunn i surdeigen (Ripari et al., 2016). Surdeigsfermentering ved inokulering av isolerte gjær og melkesyrebakterier er i dag lite tilgjengelig, og det er derfor mest vanlig å bruke spontant fermenterte surdeiger og backlopping-prinsippet der moder-kulturen vedlikeholdes ved jevnlig tilsetning av mel og vann. Denne metoden gjør at det mikrobielle samfunnet i surdeigen formes av substrat, miljø, omgivelsene, konkurransevnen og tilpasningsevnen til de ulike mikroorganismene i surdeigen. Sammensetningen av gjær og melkesyrebakterier i surdeigen vil også være avgjørende for egenskapene og påvirkningen surdeigen har på kvaliteten til brødet (Gänzle, 2014).

### 2.2.2.1 Melkesyrebakterier

Fermentering med melkesyrebakterier er en eldgammel teknikk som er like aktuell i dag. Svært mange matprodukter produseres ved bruk av melkesyrebakterier, og innenfor meieriteknologi er bruk av disse bakteriene en storindustri der udefinerte blandingskulturer (f.eks DL-kulturer) produseres og er designet til å gi helt spesifikke resultat. Også innen annen matproduksjon er melkesyrefermentering vanlig, som ved produksjon av fermenterte pølser, sauerkraut, kimchi, surdeigsbrød, osv. Melkesyrebakterier regnes for å være trygge bakterier og har derfor GRAS-status ('generally recognized as safe'). Noen stammer regnes også å ha probiotisk effekt (Narvhus & Axelsson, 2003).

Melkesyrebakterier er Gram-positive, katalase-negative, ikke-sporulerende bakterier. De er ikke-respirerende men aerotolerante kokker eller staver, som produserer melkesyre som en av hovedfermenteringsproduktene fra karbohydrater. Melkesyrebakteriene tilhører rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og ordenen *Lactobacillales*. De deles videre inn i familiene *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae* (Von Wright & Axelsson, 2011).

Tidligere taksonomisk inndeling var basert på fenotypiske egenskaper hos bakteriene, som optimal veksttemperatur, sukker-metabolisme og produserte metabolitter. Senere ble også genotypiske og

kjemotaksonomiske kriterier, inkludert DNA-DNA hybridisering, mol% G+C innhold og den kjemiske strukturen til peptidoglykanet i celleveggen inkludert i inndelingen av bakterier (Zheng et al., 2020). Siden 1983 har likheten mellom 16S rRNA-genet til bakteriene blitt brukt som ryggraden i den taksonomiske inndelingen, men de siste 15 årene har 2. generasjons helgenomsekvensering ført til flere endringer i den taksonomiske inndelingen av bakterier (Zheng et al., 2020).

I 2020 gjorde Zheng et al. en studie på taksonomien til *Lactobacillaceae* og *Leuconostocaceae* basert på helgenomsekvensering. Basert på denne studien ble det forslått reklassifisering av slekten *Lactobacillus* med oppdeling i 25 slekter der 23 av dem er nye. Det ble også foreslått å inkludere *Leuconostocaceae* i *Lactobacillaceae*-familien. Det førte til en reklassifisering av over 300 arter, og 2 familier slått sammen til en familie. *Lactobacillaceae* består nå av 31 slekter (Qiao et al., 2022). Navnet *Lactobacillus* er fremdeles i bruk for å beskrive de artene som tidligere tilhørte *Lactobacillus*-slekten. I denne oppgaven vil i hovedsak ny taksonomisk klassifisering benyttes, men da mye av litteraturen benytter gammel klassifisering vil denne refereres til samtidig. Tabell 2.1 viser en oversikt over nåværende og tidligere navn på arter som er relevant i denne oppgaven.

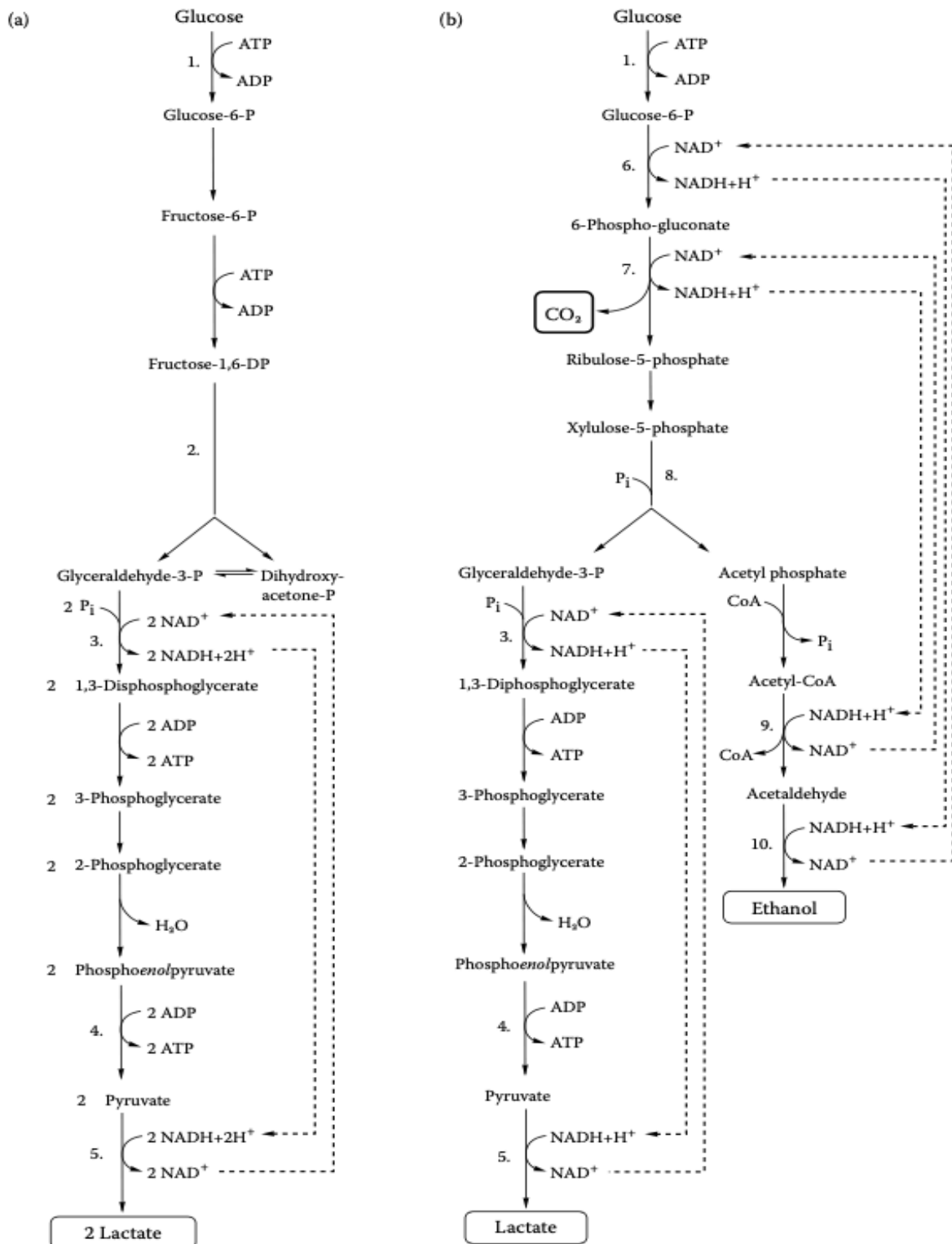
**Tabell 2.1**

Oversikt over noen av de tidligere og nåværende artene i den tidligere *Lactobacillus*-slekten.

<b>Tidligere navn</b>	<b>Nåværende navn</b>
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
<i>Lactobacillus sanfranciensis</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciensis</i>
<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus graminis</i>	<i>Latilactobacillus graminis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>

Siden melkesyrebakterier ikke har et funksjonelt respirasjonssystem, er de avhengige av fermenterbare karbohydrater for å skaffe seg energi (substratnivåfosforlyring). Denne fermenteringsreaksjonen kan være homofermentativ, som er basert på Embden-Meyerhof-Parnas reaksjonsvei eller heterofermentativ, som benytter fosfoketolase-reaksjonsveien (Von Wright & Axelsson, 2011). Figur 2.5 viser de to reaksjonsveiene der den homofermentative reaksjonsveien nesten utelukkende kun produserer melkesyre fra glukose-fermenteringen, mens den heterofermentative reaksjonsveien også produserer CO<sub>2</sub>, etanol og eddiksyre, i tillegg til melkesyre.





**Figur 2.5**

Reaksjoneveier for fermentering av glukose hos melkesyrebakterier a) homofermentativ reaksjonsvei (Embden-Meyerhof-Parnas reaksjonsvei) og b) heterofermentativ reaksjonsvei (fosfoketolase reaksjonsvei). Figur er hentet fra Von Wright og Axelsson (2011).

Slekter som *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* og flere arter i den «opprinnelige» slekten *Lactobacillus* er obligat heterofermentative. I slekten *Lactobacillus* finnes det også arter som er fakultativt heterofermentative eller obligat homofermentative (Von Wright & Axelsson, 2011).

I mel er det vanligvis opp mot  $10^2$ - $10^3$  kde/g melkesyrebakterier, men ved spontanfermentering av mel og vann ved daglige matinger vil etterhvert melkesyrebakteriene dominere og nå celletall rundt  $10^9$  kde/g (Salovaara & Gänzle, 2011). I tradisjonell surdeig av rug eller hvete er vanligvis opp mot 99,9% av melkesyrebakteriene obligat eller fakultativt heterofermentative. Slektene *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* og *Enterococcus* er vanlige å finne i et mikrobielt miljø i surdeig. Surdeig er likevel ofte dominert av en til tre arter fra den «opprinnelige» slekten *Lactobacillus*. *Fructilactobacillus sanfranciensis* (*Lactobacillus sanfranciensis*) er ofte isolert fra surdeig og er kjent for sin raske vekst ved romtemperatur og lav pH, og foretrekker ofte maltose fremfor andre karbohydratkilder. *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), *Latiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *Furfurilactobacillus rossiae* (*Lactobacillus rossiae*), *Weissella confusa* og *Leuconostoc mesenteroides* er også vanlige arter i surdeig av hvete og/eller rug (Salovaara & Gänzle, 2011).

Mel har et høyt innhold av stivelse, og ofte et lavt innhold av fritt sukker (1-3%). Det er som regel nok til at fermenteringsprosessen kan komme i gang, og etter hvert vil endogene planteenzymer i melet bryte ned stivelse som frigjør mer karbohydrater. De fleste melkesyrebakterier produserer ikke extracellulære amylaser som kan bryte ned stivelse, men det har tidligere blitt isolert amylolytiske *Lactobacillus* fra surdeig der kornet har lav endogen amylase-aktivitet (Salovaara & Gänzle, 2011). De fleste melkesyrebakterier er avhengig av nedbrytning av stivelse til maltodextriner, maltose og glukose. I mel er den viktigste karbohydratkilden maltose som spaltes av maltose fosforylase til to glukose-enheter (Stolz et al., 1993).

Det mikrobielle samfunnet i surdeig av glutenfrie meltyper er ofte annerledes enn de tradisjonelle surdeigene av hvete og rug. Annen amylase-aktivitet gir vekstbetingelser for andre bakterier, når ellers like fermenteringsbetingelser brukes (Nout, 2009; Vogelmann et al., 2009). Flere mikrobiotastudier har demonstrert at substratkilden og endogen enzymaktivitet i de ulike meltypene, er en viktig faktor for det mikrobielle miljøet som etableres i en surdeig (Gänzle et al., 1998; Sekwati-Monang et al., 2012; Vogelmann et al., 2009).

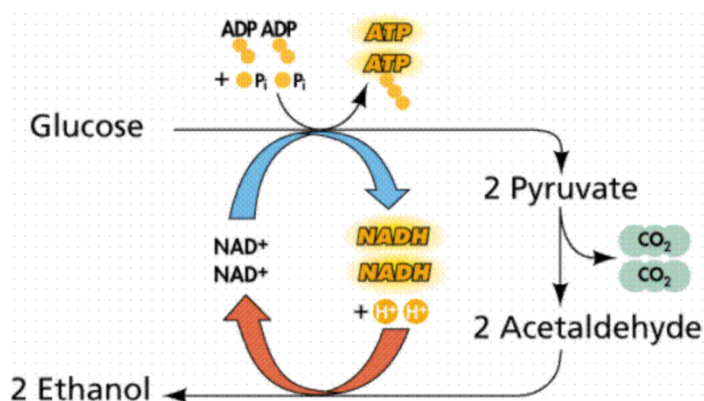
### 2.2.2.2 Gjær

Gjær er unicellulære sopp som reproduseres aseksuelt ved knoppsskyting eller seksuelt ved binær fisjon (De Vuyst et al., 2016). En stor taksonomisk studie av gjær utført av Kreger-van Rij (1984) beskriver om lag 500 arter fordelt på 60 ulike slekter. De fleste gjær kan ha en respiratorisk metabolisme ved oksygen til stede, men noen gjær har også evnen til å vokse anaerobt og skaffer seg energi ved fermentering av karbohydrater, enten ved at de er fakultativt eller obligat fermentative. Selv om det finnes et stort antall ulike arter gjær er det bare et lite antall som er forbundet med fermentering av mat. Disse er enten Ascomycetes eller medlem av *Candida*-slekten (Adams et al., 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* er den gjæren som forekommer oftest i fermentert mat. Alle stammene av *S. cerevisiae* kan fermentere glukose og noen kan også fermentere sukrose, maltose og raffinose. I tropiske klima er *S. pombe* ofte den dominerende arten, spesielt i fermentering av korn som mais og hirse (Adams et al., 2016).

I surdeig eksisterer ofte melkesyrebakterier, eddiksyrebakterier og gjær sammen i et tilpasset dynamisk miljø. Gjær har ofte høyere produksjon av CO<sub>2</sub> enn melkesyrebakterier og bidrar mest til heving av brødet, mens melkesyrebakteriene bidrar i større grad til smakskomponenter som organiske syrer og flyktige aromakomponenter (Pulvirenti et al., 2004). Antall gjærceller og artene som er til stede i en surdeig er avhengig av gjærens toleranse til de organiske syrene som produseres av melkesyrebakteriene og tilgjengelig karbonkilde (Faid et al., 1993; Gobbetti et al., 1994; Lues et al., 1993). I tillegg er også temperatur, mel-sammensetning, vanninnhold, saltinnhold og vedlikehold av deig (tidsintervall ved mating) viktig for sammensetningen av mikroorganismer i surdeigen (Pulvirenti et al., 2004).

Ved anaerob fermentering av glukose til etanol og CO<sub>2</sub> blir glukose omdannet til pyruvat via glykolysen. Ved respirasjon hos gjær vil pyruvat bli fullstendig oksidert til CO<sub>2</sub> via sitronsyresyklusen (Krebsyklusen), mens ved anaerob fermentering blir pyruvat omdannet til acetaldehyd og CO<sub>2</sub>. Acetaldehyd blir videre omdannet til etanol (Figur 2.6) (Voige, 1997). Andre metabolitter produsert av gjær inkluderer høyverdige alkoholer, estere og aldehyder (Pronk et al., 1996).



**Figur 2.6**

Anaerob alkohol-fermentering av glukose til etanol og CO<sub>2</sub>. Glukose blir omdannet til pyruvat via glykolysen. Deretter blir pyruvat videre omdannet til etanol og CO<sub>2</sub>. Figur er hentet fra Orians et al. (1994).

De vanligste gjærtyper som er identifisert i surdeig er *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus* og *Torulaspota delbrueckii* (De Vuyst et al., 2016). Alle disse artene har evnen til anaerob fermentering. Pulvirenti et al. (2004) gjorde en studie på innsamlede surdeiger i Italia der 80% av surdeigene de undersøkte inneholdt en dominant art, og i 91% av tilfellene var denne dominante arten *S. cerevisiae*.

### 2.2.2.3 Eddiksyrebakterier

Eddiksyrebakterier (AAB) er en gruppe av Gram-negative eller Gram-variable, ellipsoidale til stavformede bakterier som har en obligat aerob metabolisme. De tilhører familien *Acetobacteraceae*, som inkluderer 12 slekter (Sengun & Karabiyikli, 2011).

AAB finnes overalt i naturen på ulike planter. De er også viktige for matindustrien på grunn av deres evne til å oksidere mange typer sukker og alkoholer til organiske syrer, hovedsakelig eddiksyre, og brukes derfor i produksjon av eddik. De brukes også i cellulose og sorbose-produksjon.

AAB er også en uønsket bakterie i mange sammenhenger. I vin har den en forringende effekt ved at den omdanner alkoholen i vin til eddik (Sengun & Karabiyikli, 2011).

AAB er ofte svært undertallige i et surdeigmiljø, og har derfor ikke fått like mye oppmerksomhet i litteraturen (Li et al., 2022). De er likevel ofte representert da de har evnen til å oksidere etanol til eddiksyre under svært sure forhold. Ua-Arak et al. (2017) utførte en studie der de fant økt kvalitet på tekstur og bedre sensoriske egenskaper i surdeigsbrød på bokhvete der eddiksyrebakteriene

*Gluconobacter albidus* og *Kozakia balensis* ble tilsatt til deigen. Noen arter av AAB har evnen til å produsere store mengder EPS av høy molekylær vekt, som kan bidra positivt til strukturen i brød. Under fermentering produserte disse eddisyrebakteriene levaner (polymerer av fruktose), i tillegg til eddisyre og glukosyrer. Studien viste at levan-produserende bakterier kan ha en positiv effekt, men ved høy syre-produksjonen kan den positive effekten bli maskert av syrligheten på brødet. Dette må derfor balanseres (Ua-Arak et al., 2017).

## 2.3 Fenotypisk identifisering av melkesyrebakterier

### 2.3.1 Gramfarging

Gramfarging fikk navnet fra den danske bakteriologen Hans Christian Gram som først introduserte metoden i 1882 for å identifisere bakterier som forårsaket lungebetennelse. Gram-positive og Gram-negative bakterier har ulikt innhold av peptidoglykan i celleveggen, og Gram-negative har i tillegg en ytre membran bestående av fosfolipider, lipopolysakkarid og proteiner. Ved Gramfarging vil bakteriene farges ulikt, og det vil være mulig å kunne skille mellom disse to gruppene ved mikroskopering.

Det første steget i Gramfarging er at et fiksert preparat tilsettes krystallfiolett, som farger alle cellene lilla. I neste steg brukes en jod-løsning som danner store uløselige fiolette-jod kompleks som gjør at fargen binder til cellene. Deretter vaskes preparatet med etanol. Gram-positive bakterier har en høy andel peptidoglykaner i celleveggen, som blir dehydrert av etanol og gjør at porene krymper og holder på den fiolette fargen. Gram-negative har ikke så stor andel peptidoglykaner, men en høy andel fosfolipider og lipider i ytre membran som løses opp ved vasking med etanol og gjør at fargen forsvinner. For å kunne detektere Gram-negative bakterier i mikroskop, blir de etter skylling farget med safranin, som farger cellemembranen rosa (Tripathi & Sapra, 2022).

### 2.3.2 Katalase-test

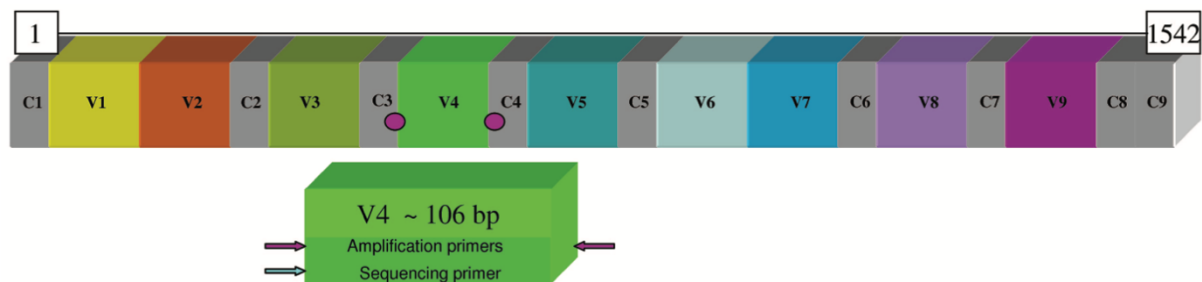
Katalase-test detekterer om bakteriene har enzymet katalase. Hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) fører til oksidativ skade på cellene og de fleste obligat og fakultativt aerobe bakterier har enzymet katalase som bryter ned hydrogenperoksid til  $H_2O$  og  $O_2$ . Obligat anaerobe bakterier hvor oksygen er giftig, mangler vanligvis katalase. Melkesyrebakterier er aerotolerante anaerobe og mangler også katalase, men er likevel oksygentolerante og i stand til å beskytte seg mot oksidativt stress uten enzymatisk nedbrytning av hydrogenperoksid. Ved en katalase-test vil det ved tilsetning av hydrogenperoksid til

en kultur, som er katalase-positiv, dannes bobler på grunn av dannelsen av O<sub>2</sub>. Dersom det ikke dannes bobler er bakteriene som testes katalase-negative (Reiner, 2010).

## 2.4 Genotypisk identifisering ved sekvensering

Genotypiske metoder for identifikasjon av bakterier og sopp kan ha en dyrkningsavhengig eller dyrkningsuavhengig tilnærming. Ved dyrkningsavhengige metoder dyrkes og isoleres mikroorganismene før DNA ekstraheres, mens ved dyrkningsuavhengige metoder ekstraheres DNA direkte fra en prøve, som for eksempel en surdeigsprøve. Det finnes fordeler og ulemper ved begge metodene. Ved dyrkningsavhengige metoder kan man isolere og identifiseres de bakterie- eller sopp-typerne som vokser opp på de dyrkingsbaserte mediene benyttet. Ulempen er at det er tidkrevende å dyrke opp og isolere organismer, og man får ofte kun isolert de mest dominerende slektene/artene i en kultur. Noen organismer er også vanskelige å få til å vokse *in vitro*. Dyrkningsuavhengige metoder er en semikvantitative metoder, som ikke er like bra til kvantifisering. Metodene gjør det derimot mulig å studere den totale diversiteten av bakterie- og/eller sopp-samfunn. Det er en rask metode som gir et bilde av dynamikken og det mikrobielle samfunnet i en prøve (Jany & Barbier, 2008).

For å identifisere og tilegne taksonomisk klassifisering hos bakterier brukes ofte DNA-sekvensering, som betyr å bestemme baserekkefølgen i et gen. Hos bakterier sekvenseres ofte 16S rRNA-genet, som består av ca. 1500 basepar (bp). Genet består av svært konserverte områder (C1-C9), som universelle primere kan feste seg til. I tillegg består genet av ni hypervariable regioner (V1-V9) på 50-100 bp, som varierer mellom ulike bakterietyper. Det gjør det mulig å skille mellom bakterier på slekt- og arts-nivå (Figur 2.7) (Petrosino et al., 2009).

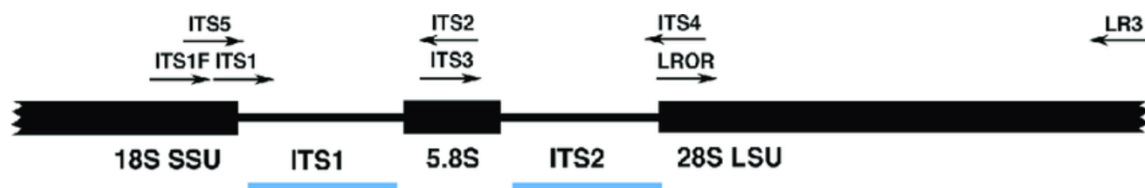


**Figur 2.7**

Det konserverte området (C1-C9) til 16S rRNA-genet vist i grått, og de hypervariable områdene (V1-V9) vist i forskjellige farger. I figuren er primere som amplifiserer V4-regionen i 16S rRNA-genet vist som et eksempel der bindestedet for primerne er V4-subregioner (lilla sirkler). Figuren er hentet fra Petrosino et al. (2009).

18S rRNA-genet hos sopp er tilsvarende 16S rRNA-genet hos bakterier, men i motsetning til denne regionen hos bakterier, er taksonomisk identifisering av sopp ved sekvensering av 18S rRNA mer problematisk ved identifisering som ofte begrenser seg til familie- eller i beste fall slekts-nivå. Dette

kommer av en manglende variasjon i 18S rRNA-genet mellom nært beslektede sopp, grunnet en kortere evolusjonsutvikling enn bakterier har hatt. For bedre taksonomisk identifisering har ITS-regionen (ITS1 og ITS2) mellom 18S rRNA og 28S rRNA-genet blitt brukt, i tillegg til 5.8S rRNA (Figur 2.8). ITS-regionen er et ikke-kodende rDNA spacer område, som har større variasjon mellom ulike slekter og arter og gir derfor en større taksonomisk identifikasjons-oppløsning enn de kodede regionene til sopp (Anderson & Cairney, 2004). For å amplifisere ITS-regionene til sopp brukes primere som amplifiserer hele eller deler av ITS-regionen. For å amplifisere både ITS1, ITS2 og 5.8S rRNA brukes vanligvis primerne ITS1 og ITS4.



**Figur 2.8**

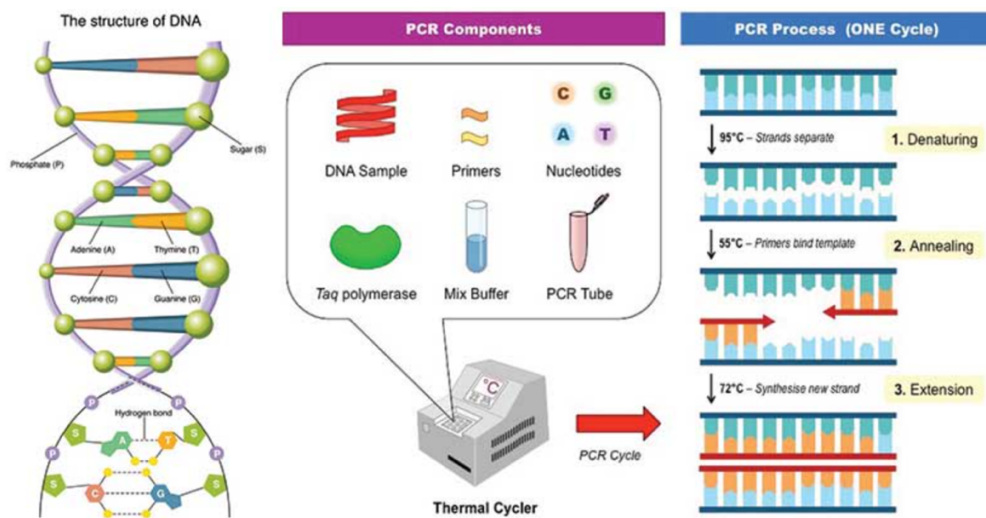
ITS1 og ITS2 hos sopp er ikke-kodende spacer-områder som ligger på hver side av 5.8S rRNA-genet. ITS-primere brukes til å amplifisere deler av ITS-regionen til gjær. Ved å bruke ITS1 og ITS4-primere vil 5.8S rRNA og ITS1 og ITS2-regionene til gjæren bli amplifisert. Figuren er hentet fra Raja et al. (2017).

### 2.4.1 DNA-ekstraksjon

DNA-ekstraksjon er en molekylærbiologisk metode for å hente ut DNA fra mikroorganismer for så å rense det. Først gjøres DNA tilgjengelig ved at bakteriecellen/gjærcellen lyses og/eller knuses. Det finnes ulike metoder for dette. Cellen kan lyses ved å ta i bruk enzymer som bryter ned polypeptidglykanet i celleveggen hos bakterier. Mekaniske (glasskuler) eller termiske metoder (høy temperatur) er også ofte brukt. Etter lysing av cellene må DNAet renses for andre komponenter. Et sentrifugeringssteg fjerner større organeller og cellerester. Det tilsettes deretter en løsning som feller ut uorganiske komponenter, cellemateriale og proteiner. En høykonsentrert saltløsning tilsettes deretter som gjør at DNAet binder til en silikakolonne, eller evt. magnetiske kuler. DNA vaskes med etanol, og deretter løses DNA fra kolonnen ved å tilsette et elueringsmiddel som fjerner salt og gjør at DNA løsner fra kolonnene (Qiagen, 2020).

## 2.4.2 Polymerase-kjedereaksjon (PCR)

PCR er en veldig mye brukt molekylærbiologisk metode for å detektere og amplifisere store mengder DNA *in vitro*. PCR bruker en varme-kjølesyklus som repeteres flere ganger. Reaksjonen krever tilstedeværelse av DNA polymerase, primere («reverse» og «forward»), deoxynukleotidtrifosfater (dNTPer) og DNA-prøve, som tilsettes til reaksjonsløsningen. Reaksjonen skjer i tre trinn som skissert i figur 2.9: Denaturering («denaturing»), hybridisering («annealing») og elongering («extension»).



**Figur 2.9**

PCR bestående av tre steg: 1) Denaturering av DNA-tråden, 2) hybridisering der primerne binder til sine komplementærbaser på DNA-tråden og 3) elongering hvor ny DNA-tråd syntetiseres. Figuren er hentet fra *Stages of PCR* n.d.)

I det første steget varmes DNA opp til ca 94 °C slik at dobbeltrådet DNA denaturerer og separeres til to enkeltråder DNA. Deretter kjøles løsningen ned til 50-65 °C og de to primerne, som er designet til å binde til spesifikke sekvenser, binder til sine komplementære nukleotidbaser i 3'-ende av hver sin tråd. I trinn 3 økes temperaturen til ca 72 °C igjen slik at DNA-polymerase kan syntetisere en ny DNA-tråd komplementær til mål-DNA ved å binde frie nukleotider til 3'-enden av primerne og syntetisere i 5'-3'-retning. De tre trinnene gjentas i flere sykluser, vanligvis 20-35 ganger, og etter hver syklus doubles mengden amplicon (Grace, 1997).

Kvantitativ PCR (qPCR) er en videreutvikling av konvensjonell PCR. Ved qPCR kvantifiseres PCR-produktet etter hver syklus ved at det avgis fluorescens som kan detekteres (Ponchel et al., 2003). Det finnes ulike metoder for å detektere PCR-produkt. Fluoriserende fargestoff som binder uspesifikt til DNA og gir en avlesning for alle sekvensene i prøven eller



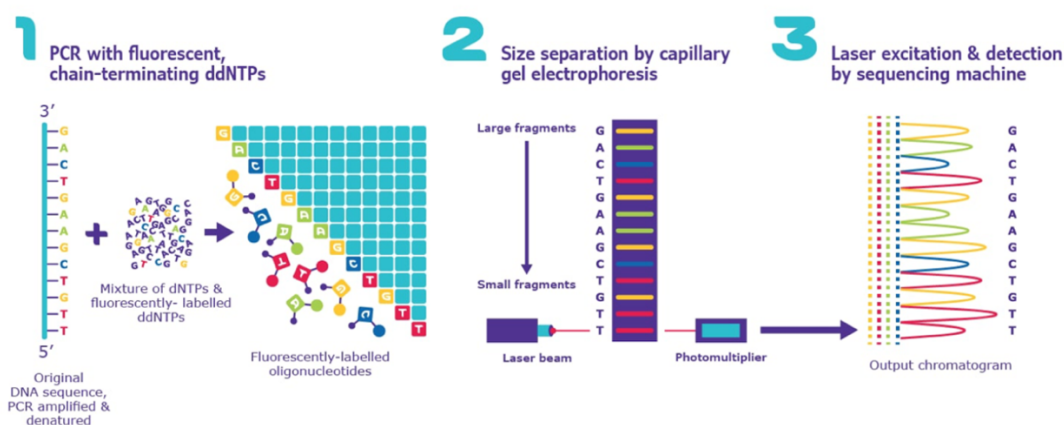
DNA-prober som binder spesifikt til DNA-sekvenser, og kan brukes for å lese ulike sekvenser i PCR-produktet (*What is qPCR?*, 2020).

### 2.4.3 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering tilhører 1. generasjons sekvenseringsteknologi og ble utviklet av Laureate Frederick Sanger og hans kollegaer i 1977 (García-Sancho, 2010).

Prinsippet for Sanger sekvensering er det samme som for PCR, bare at det også tilsettes terminerende baser, dideoxynukleotidtrifosfater (ddNTP), som vil terminere elongeringen av DNA-tråden slik at den ikke blir lengre (Figur 2.10). Disse terminerende basene har også fluoriserende markører som sender ut lys ved en gitt bølgelengde som kan måles, og de fire basene sender ut ulikt lys. ddNTP er til stede i mye mindre konsentrasjoner enn dNTP, og det er tilfeldig når den settes inn i en syntetiseringsprosess. Når en terminerende base settes inn, termineres syntetiseringen, og man får da DNA-tråder som er terminert ved alle de ulike baseposisjonene i DNA-sekvensen. Disse vil bare være en liten andel av hele sekvenseringsproduktet, men på grunn av lyset som de terminerende basene sender ut kan de likevel leses etterpå. En sekvens gir opp til 1100 basepar, men ofte ikke mer enn 800 basepar av god kvalitet. Ved en DNA-sekvens på 1500 basepar som hos 16S rRNA genet må sekvenseringen kjøres to ganger med to ulike primere, en for hver ende av sekvensen, for å dekke hele DNA-sekvensen.

DNA-fragmentene separeres basert på størrelse ved hjelp av kapillær gel-elektroforese. En detektor leser lyssignalet fra hvert bånd, som forteller hvilken terminerende base som tilhører de ulike båndene. Dette gjør at alle basene i sekvensen kan identifiseres (*Sanger sequencing steps & method*, n.d.).



**Figur 2.10**

Sanger sekvensering bestående av 3 steg: 1) PCR med terminerende baser som terminerer syntetiseringen av nye DNA-tråder på ulike steder og gir sekvensbiter med ulik lengde. 2) Størrelsesseparering av sekvensene ved kapillær gelelektroforese, som separerer de ulike sekvenslengdene. 3) Laser eksitasjon og deteksjon av lyssignal fra de ulike terminerende basene i gelen som identifiserer DNA-sekvensen. Figuren er hentet fra *Sanger sequencing steps & method* n.d.).

#### 2.4.4 Illumina sekvensering

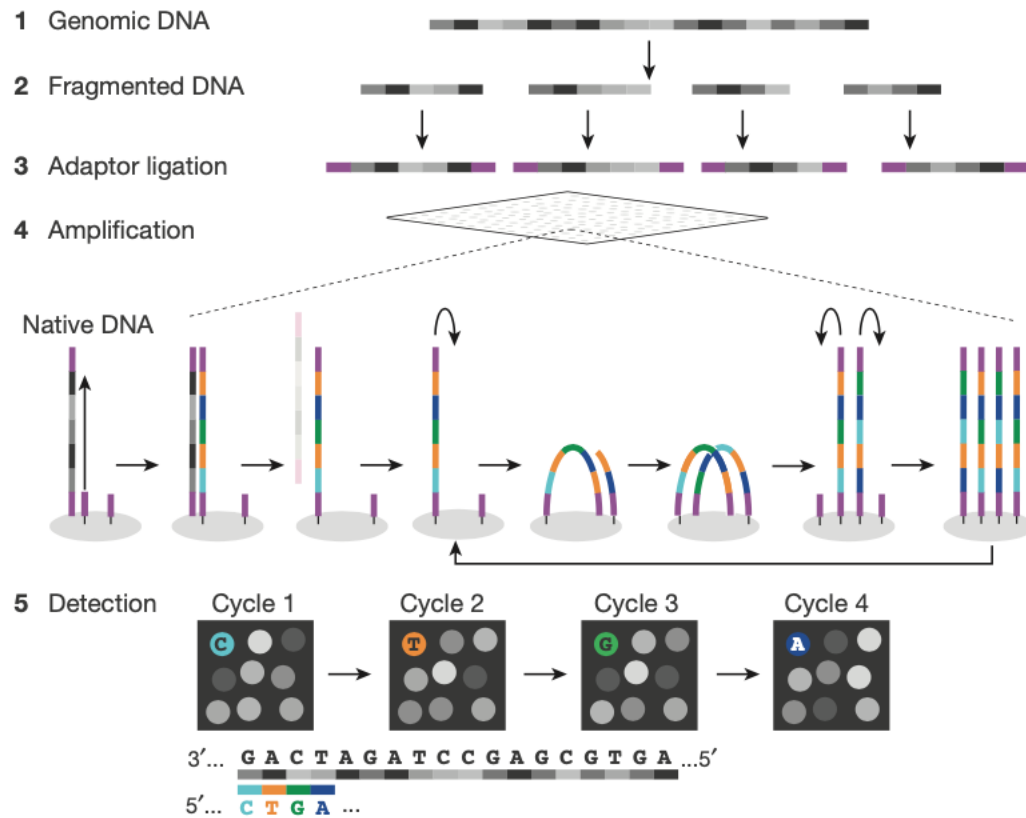
Illumina-sekvensering er neste generasjons sekvenseringsteknologi som kan parallell-sekvensere flere millioner sekvenser samtidig. For bakterier er det først og fremst de hypervariable områdene V3 og V4, som består av ca 469 bp på 16S rRNA-genet, som sekvenseres (Fadrosh et al., 2014), mens for sopp sekvenseres vanligvis ITS-regionen (Chen et al., 2021). Før selve opparbeidelsen av prøvebiblioteket til sekvensering, amplifiseres større mengder mål-DNA ved PCR, kalt PCR1 (*16S Metagenomic sequencing library preparation*, n.d.).

Sekvenseringen beskrives i Figur 2.11 der den utføres på en flow-celle med overflatebundne oligonukleotider. Før sekvensering prepareres et bibliotek der mål-DNA modifiseres av adaptere i 5'- og 3'-enden. Dette foregår ved PCR, kalt PCR2. Ved helgenomsekvensering vil DNA også bli fragmentert før adaptere settes på (Clark et al., 2019). Adapteren er satt sammen av en sekvens ytterst, som vil binde til komplementære oligonukleotider på flow-cellen, index primere (unik for hver DNA) og en primer som binder DNA-polymerase (*Introduction to next-generation sequencing technology*, 2017).

Biblioteket overføres til flow-cellen hvor adapterne på hvert DNA-fragment binder til de overflatebundne oligonukleotidene på flow-cellen. DNA blir broamplifisert og det dannes et kluster med millioner av replikerte DNA-fragmenter. I selve sekvenseringen brukes modifiserte fluoriserende nukleotidtrifosfater (dNTP), som er terminerende ved at 3'-OH gruppen blokkeres og hindrer elongering. Klusterne med DNA-fragmentene sekvenseres ved at hver gang en terminerende base settes inn vil et lyssignal sendes ut fra de forskjellige klusterne, flow-cellen blir avbildet og første base kan detekteres. Fluoroforene på nukleotidene vaskes vekk, som gjør at et nytt modifisert nukleotid kan settes på. Nye modifiserte nukleotider tilsettes, og kan feste til neste posisjon. Fluoriserende lys fra hver celle sendes ut og ny avbilding tas for å identifisere basen på andre posisjon i sekvensene. Dette gjentas n ganger til alle basene i sekvensen er identifisert (Clark et al., 2019).

Flere millioner DNA-sekvenser kan sekvenseres samtidig i en flow-celle. Etter at alle basene og rekkefølgen på dem i en sekvens er identifisert, kan de databehandles ved bruk av bioinformatiske verktøy for taksonomisk identifisering. Sekvensene sammenlignes opp mot en sekvens-database for å finne hvilken bakterieart DNA-sekvensene har likhet med (Altschul et al., 1990).

## Second generation sequencing (massively parallel)



**Figur 2.11**

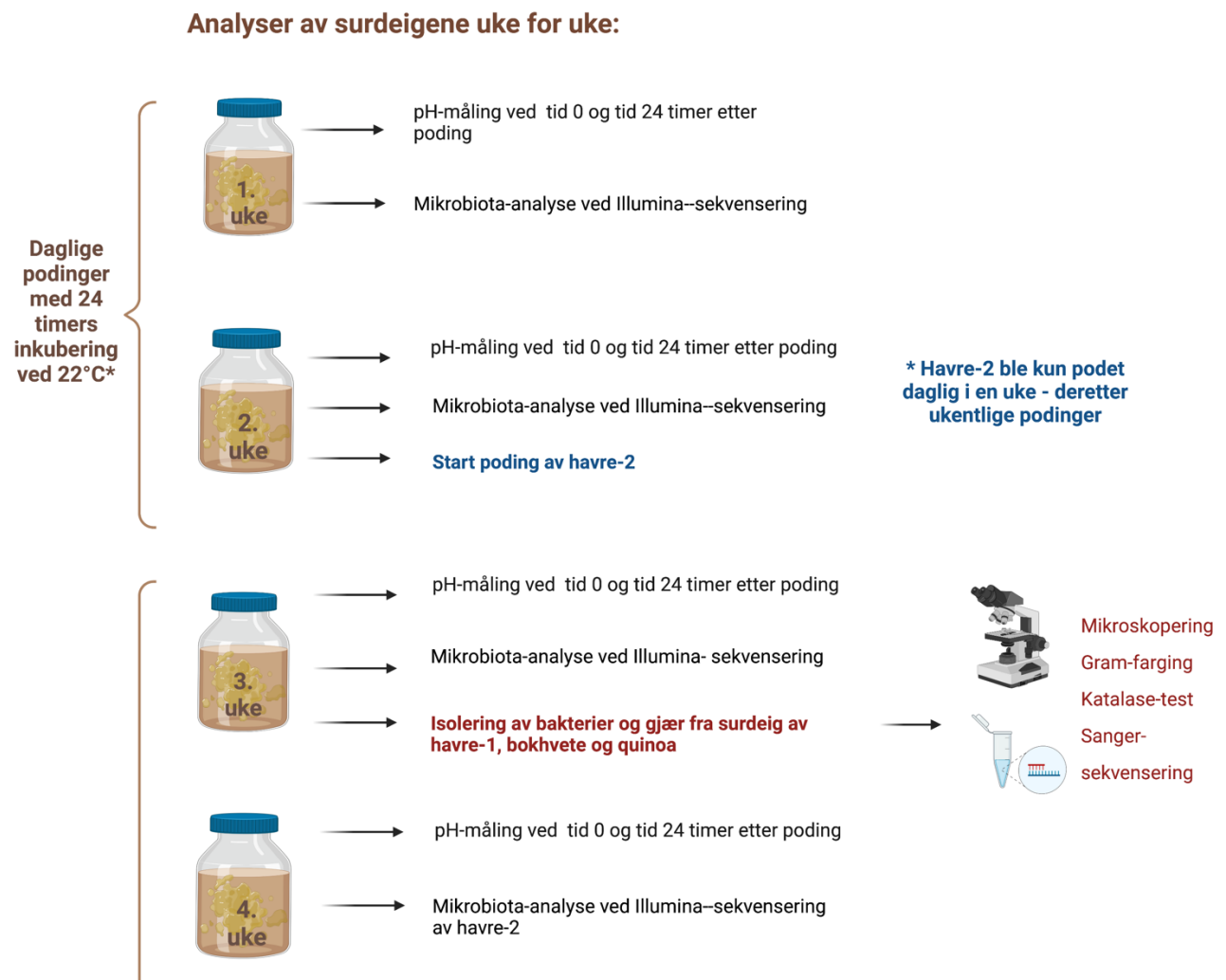
Skjematisk oversikt over neste generasjon sekvensering der flere millioner DNA-fragmenter kan parallell-sekvenseres. Genomisk DNA fragmenteres og adaptere liggeres til hver ende av fragmentene (3- og 5'-enden). Adapterne har komplementære baser med oligonukleotider som er festet til en flow-celle. DNA-fragmentene vil binde til flow-cellen og nye DNA-fragmenter amplifiseres ved broamplifisering og danner et kluster av like DNA. Klusterne blir sekvensert ved at fluoriserende terminerende baser festes til DNA-fragmentene og sender ut signal som kan avbildes og leses. Fluoriscenssignalet fjernes og en ny terminerende base settes på slik at neste base kan identifiseres. Dette gjentas til alle basene på sekvensene er identifisert. Figuren er hentet fra Shendure et al. (2017).

## 3. Materialer og metoder

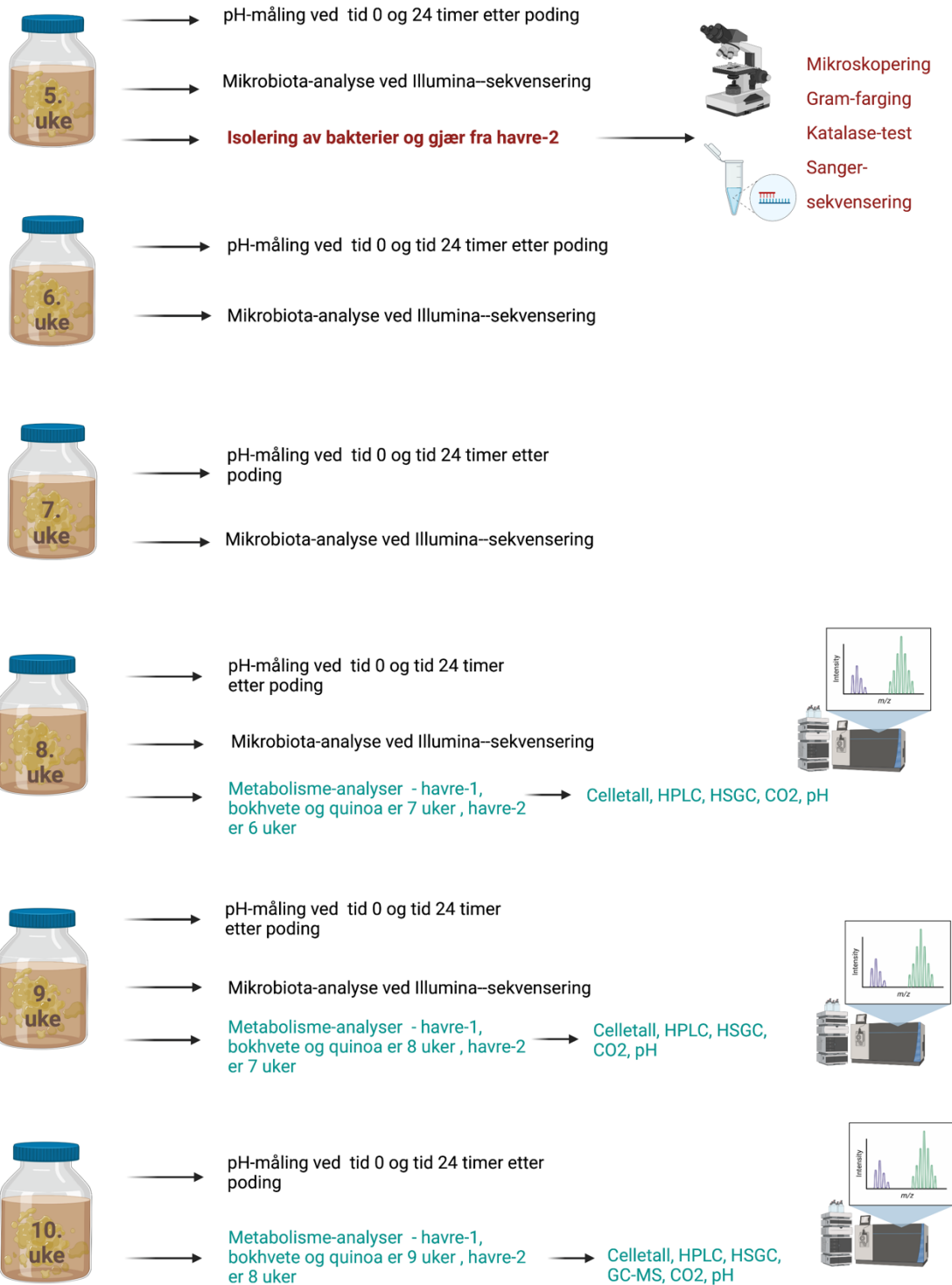
### 3.1 Forsøksoppsett

I denne studien ble fire surdeiger etablert ved spontanfermentering der vann og mel ble blandet og inkubert ved 22°C. Surdeigene ble laget med ulike melsorter der to var havre, en var bokhvete og den siste var quinoa.

De første to ukene ble surdeigene matet daglig med mel og vann. Etter ca. to uker var pH tilnærmet stabil, og surdeigene ble deretter vedlikeholdt ved ukentlige podinger/matinger. I løpet av de første ti ukene fra surdeigene ble etablert, ble ulike analyser og studier utført på surdeigene. Figur 3.1 illustrerer når i livsløpet (uke for uke) og hvilke analyser som er utført i løpet av denne tiden.



Ukentlige podinger med 24 timers inkubering ved 22°C



**Tabell 3.1**

Etablering av surdeig og analyser og studier foretatt over 10 uker. pH-målinger er utført før og etter 24 timers inkubering ved 22°C. Mikrobiota-analyser ved Illumina sekvensering er utført på surdeigene fra dag 0 og hver uke fram til 10. uke. Isolering av bakterier og gjær, i tillegg til fenotypisk identifisering (i rødt), ved mikroskopering, Gram-farging og katalase-test, og genotypisk identifisering ved Sanger sekvensering, ble utført på havre fra Møllerens-, bokhvete- og quinoa-surdeigen etter to ukers etablering, mens det samme ble gjort for surdeigen av havre fra Den Sorte Havre etter fire ukers etablering. Vekst- og metabolismeforsøk (i turkis) ble utført ukentlig i tre uker i 8., 9. og 10. uke. Da var surdeigen av havre-1, bokhvete og quinoa 7, 8 og 9 uker gammel, mens havre-2-surdeigen var 6, 7 og 8 uker gammel. *Illustrasjonene er laget i BioRender.com*

## 3.2 Etablering og vedlikehold av surdeigskulturer

Etablering av fire surdeiger ved spontan fermentering, ble utført på tre ulike kornslag/pseudokorn: havre, bokhvete og quinoa. To ulike surdeiger ble etablert for havre, der den ene varianten ble etablert på havremel fra Møllerens, mens den andre varianten ble etablert på mel av økologisk svarthavre fra Den Sorte Havre. For bokhvete og quinoa ble det etablert en surdeig av hver med mel fra Det Glutenfrie Verksted. Melet som ble brukt i de ulike surdeigskoloniene var kjøpt i butikk, og de respektive meltypene hadde samme produksjonsnummer.

Figur 3.2 illustrerer hvordan de fire surdeigene ble podet ved daglige podinger inntil stabil pH, og deretter ved ukentlige podinger. Surdeigskulturene på havre og quinoa ble opparbeidet ved at 80 g mel ble blandet med 120 g vann. Surdeigen på bokhvete ble opparbeidet med 90 g mel og 110 g vann. Deigene ble inkubert i romtemperatur på 21-22°C i 24 timer. Videre ble kulturene etablert/opprettholdt ved poding der 100 g kultur (surdeig) ble tilsatt 40 g mel og 60 g autoklavert springvann for havre- og quinoa-mel, og 100 g kultur (surdeig) ble tilsatt 45 g mel og 55 g autoklavert springvann for bokhvete (tabell 3.1). For surdeigene av havre-1, bokhvete og quinoa ble dette gjennomført hver 24. time i 11 dager til pH hadde stabilisert seg i alle deigene. For surdeigen av havre-2 ble daglige matinger utført i 5 dager, og deretter ukentlig. pH var ennå ikke stabil på dette tidspunktet. Etablering og daglige matinger ble gjort hjemme under aseptiske forhold. Etterpå ble surdeigene flyttet til laboratoriet på KBM, NMBU, og matet ukentlig. Vannet, som ble brukt i surdeigene, var autoklavert springvann fra laboratoriet på KBM, NMBU.

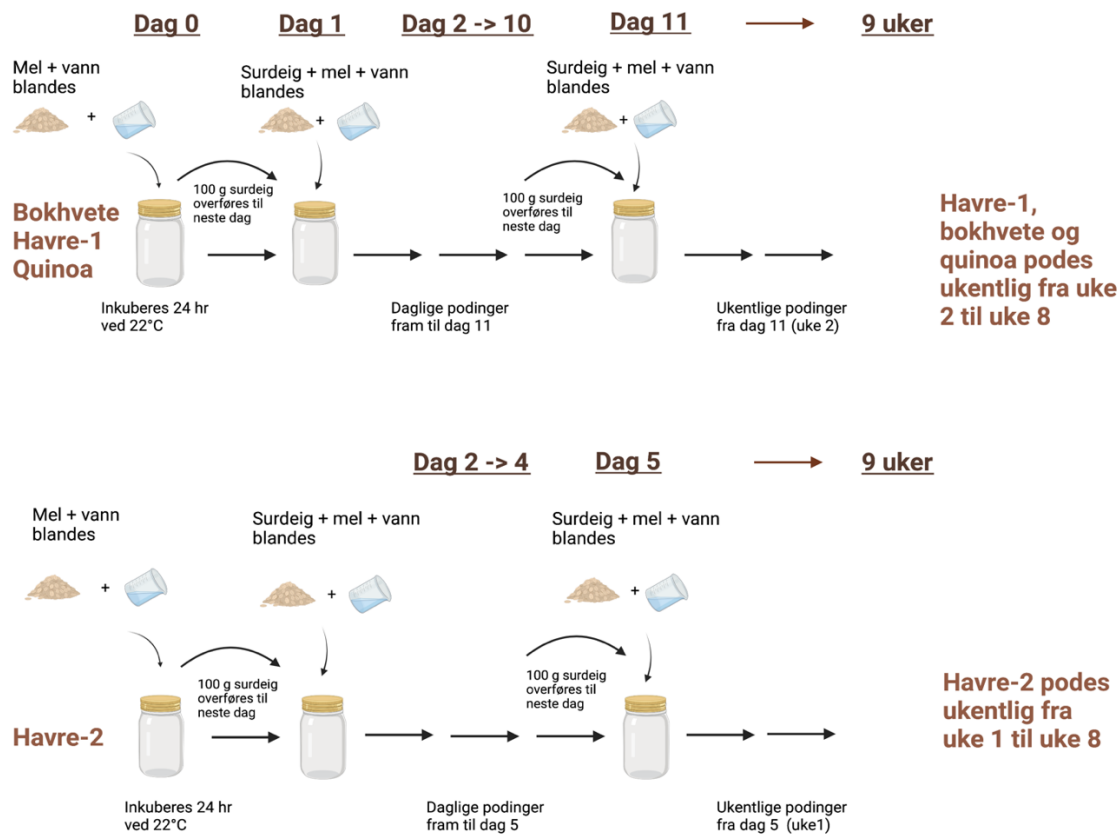
**Tabell 3.1**

Etablering og vedlikehold av surdeig ved poding hver 24. time i 11 dager (5 dager for havre-2), og deretter hver 7. dag, i henhold til oppgitte mengder kultur, mel og springvann.

Prøve	Surdeig/kultur (g)	Mel (g)	Vann (g)	Deigutbytte (DY)*
Havre-1 (Møllerens)	100	40	60	250
Havre-2 (Den Sorte Havre)	100	40	60	250
Bokhvete (Det Glutenfrie Verksted)	100	45	55	222
Quinoa (Det Glutenfrie Verksted)	100	40	60	250

\*Deigutbyttet beregnes ut fra formelen:  $100 + (\text{gram vann} / \text{gram mel}) * 100$

Under etableringen av surdeigene, ble det tatt ut ca. 20 g prøve hver dag fra deigene som var fermentert i 24 timer (T24). Disse ble fryst ned i -20°C. Det ble også målt pH av deigene rett etter poding ved 0 timer (T0) og etter 24 timers inkubering ved 22°C (T24).



**Figur 3.2**

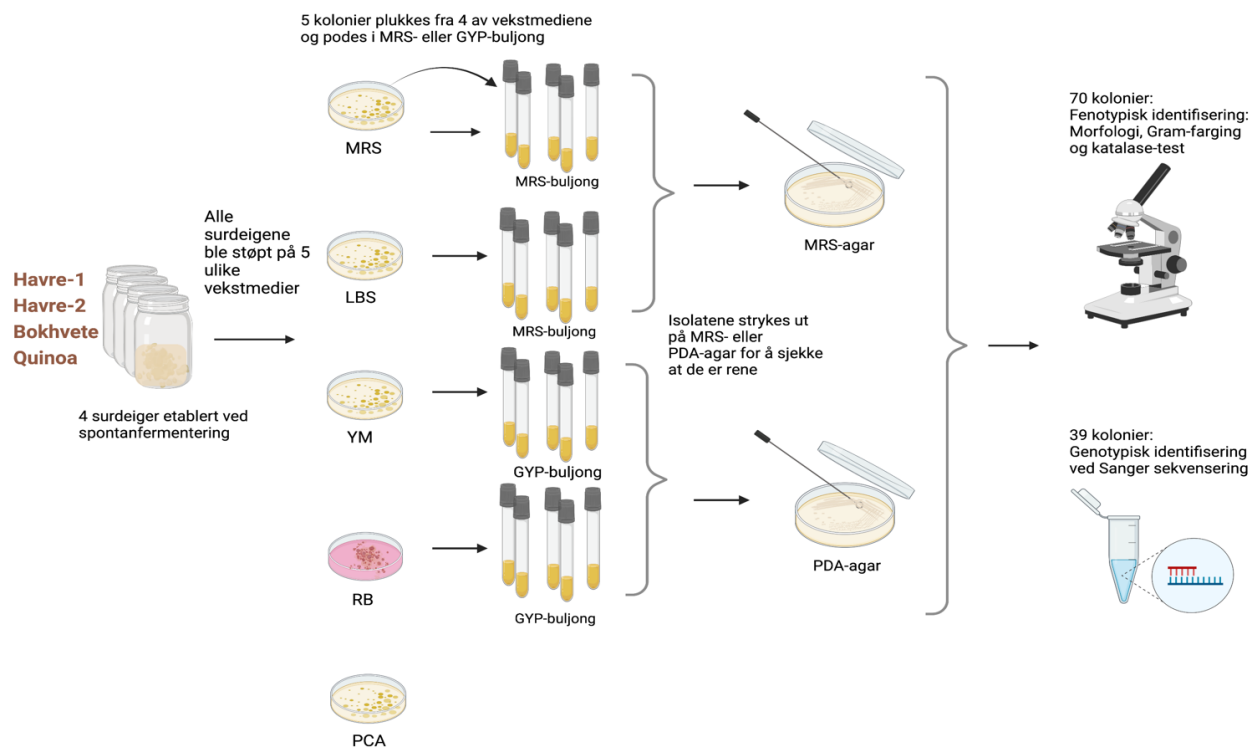
Etablering av surdeig ved daglige ompodinger der surdeig ble overført til nytt glass og tilsatt den respektive melsorten og vann før inkubering i 24 t ved 22°C. Etter 11 dager (havre-1, bokhvete og quinoa) og 5 dager (havre-2) ble surdeigene vedlikeholdt ved ukentlige ompodinger. Mellom hver poding ble surdeigene oppbevart på kjøll ved 4°C. *Illustrasjonen er laget i BioRender.com*

Etter 11 dager (havre-1, bokhvete og quinoa) og 5 dager (havre-2) med daglige podinger av surdeigene, ble surdeigene fraktet til mikrobiologisk laboratorium ved NMBU der resten av podingene foregikk ukentlig under aseptiske forhold. Surdeigene ble oppbevart på kjølerom ved 4°C og podet hver 7. dag. Samme mengder kultur, mel og vann ble brukt ved poding hver 7. dag som ved de daglige podingene (tabell 3.1). Etter poding ble surdeigene inkubert i 24 timer ved 22°C, og deretter satt på kjøll til neste poding. Det ble tatt pH-målinger rett etter poding (T0) og etter 24 timers inkubering (T24), i tillegg til uttak av ca. 20 g prøve ved T24, som ble oppbevart ved -20°C og senere brukt til mikrobiotastudier ved Illumina sekvensering.

### 3.3 Isolering og identifisering av melkesyre bakterier og gjær i surdeigene

For å isolere og identifisere bakterier og gjær i de fire surdeigene ble det brukt dyrkningsavhengige metoder, der de ble innstøpt i selektive vekstmedier. Figur 3.3 illustrerer de ulike stegene i prosessen der kolonier fra de ulike vekstmediene ble plukket og isolert ved poding i de MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS)- eller Glucose yeast extract peptone (GYE)-buljong avhengig av om de var forventet

å være melkesyrebakterier (MSB) (isolert fra MRS- eller *Lactobacillus* selektiv (LBS)-agar) eller gjær (isolert fra Yeast & Mould (YM)- eller Rose-Bengal Chloramphenicol (RB)-agar). Deretter ble isolatene strøket ut på respektiv MRS-agar eller Potato Dextrose agar (PDA) inntil renkultur var etablert. Kulturens renhet ble vurdert ved visuell betraktning av skål og mikroskopering (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Tyskland). Isolatene ble karakterisert ved mikroskopering, Gram-farging og katalasetest. Noen av isolatene ble også identifisert ved Sanger sekvensering. Kapittel 3.3.1 - 3.3.4 beskriver fremgangsmåten i de ulike stegene.



**Figur 3.3**

Etablering av surdeig ved spontanfermentering, og innstøping ved stabil pH i selektive vekstmedier. Fem kolonier fra henholdsvis MRS-, LBS-, YM- og RB-agar ble plukket fra hver surdeig. Kolonier fra MRS- og LBS-agar ble podet i MRS-buljong og kolonier fra YM- og RB-agar ble podet i GYP-buljong. Koloniene ble strøket ut på MRS- eller PDA-agar etter som de var forventet å være bakterier eller gjær, og sjekket for renhet ved mikroskopering. Fenotypiske egenskaper ble sjekket ved mikroskopering, Gram-farging og katalase-test, mens 39 av isolatene ble identitetsjekk ved Sanger sekvensering. *Illustrasjonen er laget i BioRender.com*

### 3.3.1 Vekstmedier

Det ble benyttet flytende buljongmedier og faste agarmedier til dyrking av bakterier og gjær. Av faste medier ble det benyttet Plate Count Agar (PCA), MRS-, LBS-, YM-, RB- og PDA-agar, og av flytende medier ble det benyttet MRS- og GYP-buljong på rør. Vekstmediene ble laget i samsvar med produsentens anbefalinger (tabell 3.2) og autoklavert ved 121°C i 15 min. Fram til mediene skulle benyttes ble de oppbevart mørkt og ved 4°C.



**Tabell 3.2**

Vekstmedier benyttet i studien, med sine respektive inkubasjonstemperaturer og inkubasjonstider. Alle inkuberingene ble gjort aerobt, utenom vekst på LBS-agar som ble inkubert i anaerobe omgivelser.

Agar	Produsent	Konsentrasjon (g/l)	Vekst	Inkubasjonstemperatur (°C)	Inkubasjonstid (dager)
<b>Plate Count Agar (PCA)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland	22,5	Totalt antall mesofile bakterier	30	2-4
<b>de MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar**</b>	Merck KGaA, (MRS buljong) + VWR International, Leuven, Belgia (agar)	52,2 (MRS buljong) 15 (agar)	Melkesyre-bakterier	30	2-4
<b><i>Lactobacillus</i> selektiv (LBS) agar***</b>	Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA	84	<i>Lactobacillus ssp.</i>	30, anaerobt	3-4
<b>Yeast &amp; Mould (YM) agar</b>	OXOID Ltd., Hampshire, UK	41 g/l YM agar + melkesyre*	Mugg og gjær	30	4
<b>Rose-Bengal Chloramphenicol (RB) agar</b>	Merck KGaA,	32,2	Mugg og gjær	22	5
<b>Glucose yeast extract peptone (GYP) buljong</b>	Merck (glucose + yeast extract) OXOID Ltd., (peptone)	20 g/l anhydrous D(+)-glucose, 1,5 g/l yeast extract, 10 g/l peptone	Gjær	30	1-3
<b>MRS buljong</b>	Merck KGaA,	52,2	Melkesyre-bakterier	30	1
<b>MRS agar***</b>	OXOID Ltd., (MRS buljong) VWR International, (agar)	52 g/l MRS buljong, 15 g/l agar	Melkesyre-bakterier	30	2-4
<b>Potato Dextrose agar (PDA)</b>	Becton, Dickinson Microbiology Systems, (Potato Dextrose broth) VWR International, (agar)	24 g/l PD buljong 15 g/l agar	Gjær	30	2-4

\*YM: Tilsetning av melkesyre til pH 4 (1 ml 20% steril melkesyre/200 ml YM agar)

\*\*MRS-agar: Innstøping av surdeigsprøver

\*\*\*MRS-agar: Utstrykning av isolater

\*\*\*\*LBS agar: Tilsetning av 264 µl iseddik per 200 ml agar. Inkubering i anaerob kar ved bruk av AnaeroGen™ (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

### 3.3.2 Isolering av melkesyrebakterier og gjær

For å isolere bakterier og gjær fra de ulike surdeigene, samt å bestemme antall kolonidannende enheter, ble de støpt inn i vekstmedier som selekterer for melkesyrebakterier og gjær (tabell 3.2). Uttaket fra surdeigene for utplating og isolering av bakterier og gjær, ble for havre-1, bokhvete og quinoa gjort 11 dager etter surdeigene ble etablert. For havre-2 ble utplatingen for isolering av bakterier og gjær foretatt 27 dager etter at surdeigen ble etablert.

Det ble veid ut 10,0 g surdeig fra hver av surdeigene etter 24 timers fermentering (T24) som ble tilsatt 90 ml Ringers løsning. Prøvene ble homogenisert (Stomacher 400, Seward Ltd, West Sussex, Storbritannia) ved full hastighet («high») i 120 sekunder før videre fortynning i Ringers løsning. For innstøping i PCA-, MRS- og LBS-agar ble surdeigene fortynnet til  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  og  $10^{-7}$ , mens for innstøping i YM- og RB-agar ble surdeigene fortynnet til  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  og  $10^{-6}$ . Skålene ble inkubert i henhold til temperaturer og inkuberingstid angitt i tabell 3.2.

Ved isolering av bakterier og gjær fra de ulike surdeigskulturene ble fem kolonier isolert fra MRS-, LBS-, YM- og RB-agar fra hver av de ulike surdeigskulturene. Totalt ble 70 kolonier isolert (surdeigskultur 1 hadde ingen vekst på YM- og RB-agar). Koloniene fra MRS- og LBS-agar ble overført til 5 ml MRS-buljong, og koloniene fra YM- og RB-agar ble overført til 5ml GYP-buljong, og inkubert ved 30°C i ca. 24 timer. Det ble deretter tatt ut 750 µl kultur fra hver prøve og tilsatt 250 µl steril 60% glycerol, tilsvarende en konsentrasjon på 15% (v/v) glycerol i hver prøve. Kulturene ble fryst ned i cryorør på -80°C.

Hvert isolat ble strøket ut på MRS-agar for de som var antatt å være melkesyrebakterier, og PDA for isolatene som var antatt å være gjær. De ble inkubert ved 30°C i 3 dager. Deretter ble morfologiske egenskaper og renheten til de ulike isolatene studert ved mikroskopering ved at koloniene på platen ble visuelt sjekket for likhet/ulikheter og 2-3 kolonier ble plukket og studert i mikroskop. Isolatene som ikke fremsto som rene ble overført til henholdsvis MRS- eller GYP-buljong på nytt og inkubert i 30°C i 24 timer for deretter å bli strøket ut på MRS- og PDA-agar. Dette ble gjentatt inntil isolatene fremstod som rene. De ble deretter fryst ned ved -80°C i MRS- eller GYP-buljong, avhengig av om de var forventet å være MSB eller gjær, og tilsatt 15% (v/v) glycerol.

### 3.3.3 Fenotypisk identifisering av MSB og gjær ved Gram-farging og katalasetest

Bakterie- og gjær-isolatene ble studert ved mikroskopering for å se på morfologiske egenskaper. I tillegg ble det utført Gram-farging og katalase-test på bakterieisolatene for å verifisere at de var melkesyrebakterier.

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 (1 min) etterfulgt av jod-jodkalium (3 min), vasket med etanol (30 sek) og til slutt kontrastfarget med safranin (1 min). De Gramfargede preparatene ble studert med Leica ICC50 HD lysfeltmikroskopi ved 400x og 1000x forstørrelse. 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 ( $H_2O_2$ ) på et objektglass og eventuell gassdannelse ble observert.

### **3.3.4 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering**

For å bestemme identiteten til isolatene, ble 39 av 70 renkulturer plukket ut til videre DNA-analyse ved Sanger sekvensering. Isolatene som hadde størst morfologisk ulikheter ved mikroskopering, ble valgt. Det ble plukket ut både bakterie- og gjær-kulturer fra alle surdeigene, utenom havre 1 som ikke hadde gjær-vekst ved utplating. Kriterier for utvelgelsen var at isolater fra alle de selektive vekstmediene skulle være representert. I tillegg ble kolonier som hadde ulike morfologiske egenskaper valgt ut. For mer detaljer om hvilke renkulturer som ble sekvensert, se vedlegg 3.

#### *3.3.4.1 DNA ekstraksjon*

De nedfryste renkulturene ble podet i 5 ml MRS-buljong for bakterier og GYP-buljong for gjær og inkubert over natt ved 30°C. 1 ml av kulturen ble overført til 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert ved 13.300 RPM i 1 min i Eppendorf 5415D sentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble dekantert og pelleten fryst ved -20°C til videre behandling.

DNA ble ekstrahert ved bruk av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek, GA, USA). Ekstraksjonen ble utført i henhold til produsentens metodebeskrivelse med noen unntak: Pelletene ble løst i 350  $\mu$ L Solution I og overført til 2 ml microtubes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland) som inneholdt syrevaskede glassperler ( $\leq 106 \mu$ m, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA). Rørene ble vortexet i Fast-prep 24 (MP Biomedicals, CA, USA) i 20 sekund ved 6,5 m/s. Alle rørene ble så sentrifugert ved 13.200 RPM i 2 minutter og supernatanten overført til nye eppendorfrør. Resten av ekstraksjonen ble utført i henhold til metodebeskrivelsen med unntak av at 30  $\mu$ l elueringsbuffer ble tilsatt istedenfor 50  $\mu$ l. Prøvene ble fryst ned ved -20°C inntil videre bearbeiding.

### 3.3.4.2 PRC, agarose gelelektroforese og rensing av PCR-produkt

Det isolerte DNA-et fra de ulike isolatene ble amplifisert ved PCR der primere som amplifiserer for 16S-genet og ITS-området for henholdsvis bakterier og gjær ble valgt. Reaksjonsløsningen til PCR ble preparert i henhold til tabell 3.3 og overført til PCR-rør før amplifisering i en C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Primerne benyttet for amplifisering av 16S rRNA-genet til bakterie-isolat var 1F (5'- GAGTTTGATGGTGGGTCAG - 3') og 5R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'), og for amplifisering av 5.8S rRNA og ITS1- og ITS2 -regionene til gjær-isolat, ble primerne ITS 1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') og ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') benyttet.

**Tabell 3.3**

Reagenser, konsentrasjoner og volum i PCR reaksjonsblandingen.

Reagens	Initialkonsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µL)
Q5 master mix	2x	1x	10
1F	5 µM	0,2 µM	1
5R	5 µM	0,2 µM	1
Evagreen	20x	1x	1
PCR grade H2O			6
DNA-templat			1
			<b>Totalt 20 µL</b>

PCR-reaksjonsmik (19 µl) og 1 µl DNA-templat ble tilsatt i hver PCR-brønn. Amplifiseringen ble utført etter PCR-program gjengitt i tabell 3.4. Det ble brukt identisk PCR-program for både bakterie- og gjær-DNA.

**Tabell 3.4**

PCR-program benyttet for amplifisering av 16S rRNA-genet og ITS1-5.8S rRNA-ITS2 området til hhv. bakterier og gjær.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Repetisjoner
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:15	98	35
Hybridisering	00:30	55	
Syntetisering	01:00	72	
Endelig syntetisering	10:00	72	1

Etter amplifisering av 16S rRNA- og ITS1-5.8S rRNA-ITS2 området, ble produktene sjekket ved agarose gelelektroforese. To 1% agarosegeler, en liten og en stor, ble laget ved at 0,5 g agarose (SeaKem® LE agarose, Lonza, Rockland, USA) ble løst i 50 ml 1 x TAE (Tris Acetate EDTA, Merck) for den lille gelen, og 2,1 g agarose ble løst i 210 ml 1 x TAE for den store gelen. Gel-pulveret ble løst opp i væsken ved koking i mikrobølgeovn. Løsning ble deretter delvis nedkjølt og tilsatt 2,5 µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, USA), og deretter forsiktig overført til ett stort og ett lite støpekar for geler. Etter gelen hadde stivnet ble gelene overført til elektroforesekar og hver brønn ble tilsatt 10 µl prøve bestående av 2 µl PCR-produkt, 2 µl agarose gel loading dye 6X ultra Pure (VWR International, Leuven, Belgia) og 6 µL PCR-grade H<sub>2</sub>O. En 100 bp ladder ble brukt. Elektroforesen ble kjørt ved 110 V i ca. 30 minutter med Power Pac 300 (Bio Rad Laboratories, CA, USA).

Rensing av PCR-produktet ble utført med GenElute PCR-Clean up kit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland). Produktene ble renses slik det står beskrevet i Sigma-Aldrich sin prosedyre, med unntak av at det ble benyttet 25 µl elueringsbuffer i stedet for 50 µl.

#### *3.3.4.3 Sanger sekvensering, bearbeiding og database-søk*

Etter rensing av PCR-produktet ble DNA-konsentrasjonen i bakterieprøvene sjekket med Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA), mens gjærprøvene ble sjekket med NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) grunnet at Qubit 2.0 var utilgjengelig på daværende tidspunkt.

Hvert PCR-produkt ble tilsatt i to separate 1,5 ml eppendorfrør og tilsatt 5 µM primer, F-primer i ett av rørene og R-primer i det andre. Det ble brukt samme primere som i PCR-reaksjonen (kapittel 3.5.2). Totalvolum i hvert rør var 10 µl, og det ble tilsatt 5-8 µl PCR-produkt avhengig av DNA-konsentrasjon i de ulike prøvene. Ved DNA-konsentrasjoner rundt 20-60 ng/µl ble 5 µl PCR-produkt tilsatt i rørene, mens ved lavere konsentrasjoner ble volumet på PCR-produktet økt og primer-volum senket tilsvarende økningen, slik at totalvolumet ble 10 µl.

Rørene ble sendt til Eurofins Genomics (Köln, Tyskland) for Sanger sekvensering. Sekvensene ble deretter trimmet og satt sammen i SnapGene® (versjon 6.0.2) før sekvensdatabasen GenBank (National Library of Medicine, Bethesda, USA) og søkeverktøyet BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), ble benyttet for å finne isolatenes antatte identitet.

## **3.4 Mikrobiell sammensetning i surdeigene ved Illumina NovaSeq 6000 sekvensering**

For å analysere den mikrobielle sammensetningen og stabiliteten til surdeigene over tid, ble det gjennomført neste generasjon sekvensering av deler av 16S rRNA genet for bakterier og ITS regionen for sopp. Det ble utført analyse på totalt 48 prøver som ble innhentet fra surdeigene over 8 uker. Det ble plukket ut 3 prøver fra hver av surdeigene fra den første uken av etableringen (2 prøver fra havre-2), og deretter en prøve i uken fra uke 1 til uke 8. Surdeigene ble podet og prøvene ble tatt ut etter ca. 24 timers inkubering ved 22°C. I tillegg ble også prøver ved 0 timer (T0) og 24 timer (T24) fra den ene uken av metabolismeforsøket analysert. Ved uke 3 ble det ikke tatt ut prøve fra 3 av surdeigene (havre 1, bokhvete og quinoa) grunnet sykdom.

Illumina sekvensering innehar flere arbeidssteg som DNA-ekstraksjon, PCR av V3 og V4 regionene av 16S rRNA-genet og ITS-gener til hhv. bakterier og gjær, Illumina indexing PCR, opprensing, normalisering og kvantifisering av Illumina PCR-produkt og Illumina NovaSeq 6000 sekvensering. Disse stegene er beskrevet i detalj i avsnitt 3.6.1 - 3.6.6.

En fullstendig oversikt over prøvene tatt ut til sekvensering finnes i vedlegg 6.

### **3.4.1 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 13.300 RPM 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 en gang før all supernatanten ble pipettert vekk og pelleten ble frosset ned ved -20 °C inntil DNA ekstraksjon. Mikrobielle pellerer fra ufermentert deig ble preparert ved at 10 g prøve fra de respektive deigene ved dag 0 ble blandet med 90 mL Ringers løsning og homogenisert i 120 sekund ved high speed (Stomacher 400, Seward Ltd, West Sussex, Storbritannia). 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 Falconrør 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® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland). Ekstraksjonene ble utført etter metoden beskrevet av produsenten, QuickStart Protocol (Qiagen, 2017). DNA ble frosset ned ved -20°C før videre analyser.

### 3.4.2 qPCR for 16S og ITS rRNA amplifisering

Deler av 16S rRNA-sekvensen til bakteriene og ITS-regioner til gjær- og mugg-sopp ble amplifisert med LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Sveits). For å amplifisere V3 og V4-regionen til 16S rRNA-genet til bakterier ble primer Uni340F (5' - CCTACGGGRBGCASCAG - 3') og Bac806R (5' - GGACTACYVGGGTATCTAAT - 3') benyttet. For amplifisering av ITS-regionen til gjær og sopp ble primerne BITS (5' - ACCTGCGGARGGATCA - 3') og B58S3 (5' GAGATCCRTTGYTRAAAGTT - 3') benyttet (Østlie et al., 2021).

PCR-mastermiks ble preparert etter tabell 3.5, og 18 µl mastermiks og 2 µl DNA ble tilsatt til en brønnplate med 96 brønner.

**Tabell 3.5**

Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i qPCR for 16S- og ITS rRNA amplifisering

Reagens	Opprinnelig konsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum (µl) per reaksjon
<b>Q5 master mix</b>	2x	1x	10
<b>Primer 1</b>	100 µM (16S), 200 µM (ITS)	0,2 µM	1
<b>Primer 2</b>	100 µM (16S), 200 µM (ITS)	0,2 µM	1
<b>Evagreen</b>	20x	1x	1
<b>Templat DNA</b>	1-100 ng/µl	7,5-150 ng	2
<b>PCR grade H<sub>2</sub>O</b>			5
			<b>Totalt 20 µl</b>

Det ble utført to separate qPCR for alle prøvene der 16S-primere ble brukt ved den ene amplifiseringen og ITS-primere ved den andre. Samme PCR-program ble brukt for både 16S- og ITS-amplifiseringene. Se tabell 3.6 for detaljert PCR-program.

**Tabell 3.6**

PCR-program for amplifisering av 16S og ITS-regionen hos bakterier og gjær i surdeigsprøvene.

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Sykluser
Innledende denaturering	00:30	98	1
Denaturering	00:10	98	35
Hybridisering	00:30	53	
Syntetisering	00:20	72	
Endelig syntetisering	5:00	72	1
Smeltekurve	∞		-

Etter qPCR ble smeltekurven sjekket for alle PCR-produktene, og for prøver hvor det ikke ble registrert amplifisering av DNA, ble det utført en ny qPCR med fortynnede DNA-prøver. Prøvene ble først sjekket for DNA-konsentrasjon ved bruk av Qubit 2.0 fluorometer og deretter ble prøvene fortynnet 1:10 før de ble tilsatt til PCR-platen. Dette ble gjort både for amplifisering med 16S-primere og ITS-primere.

PCR-produkt ble deretter renset med Agencourt AMPure XP kuler (Beckman Coulter, Inc Brea, CA, USA). Ampure beads (14 µl) ble tilsatt til 20 µl PCR-produkt. Blandingen ble mikset ved pipettering og overført til en ren brønn-plate. Blandingen ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter og deretter flyttet til en magnet og inkubert i ytterligere to minutter. Supernatanten ble fjernet, og 100 µl 80% etanol ble tilsatt og inkubert i 30 sekunder. Supernatanten ble deretter fjernet og vaskesteget med 80% etanol ble gjentatt en gang til. Prøvene ble lufttørket i 7 minutter til alle rester av etanol var fordampet. Platen ble deretter fjernet fra magneten og 20 µl elueringsbuffer (EB Qiagen, Hilden, Tyskland) ble tilsatt. Prøvene ble inkubert i 2 minutter, og platen ble deretter flyttet tilbake til magneten og inkubert i ytterligere 5 minutter. Eluatet (16 µl) ble deretter pipettert over til en ny brønn-plate og fryst ned ved -20°C inntil videre bearbeiding.

### 3.4.3 Illumina Index PCR

Illumina index PCR ble utført av forsker Misti Dawn Finton ved NMBU.

Renset PCR-produkt (4 µl) ble brukt som templat for Illumina Index PCR med unike kombinasjoner av i5 og i7 primere (Illumina, CA, USA). PCR-mastermikks ble preparert etter tabell 3.7 og overført til en 96 hulls brønnplate.



**Tabell 3.7**

Reagenser, konsentrasjoner og volum benyttet i Illumina Indexing PCR

Reagens	Konsentrasjon i opprinnelig løsning	Konsentrasjon per prøve	Volum per prøve/reaksjon (µL)
HotFirePol® DNA Polymerase	5 U/µl	1,25 U	0,25
HotFirePol® buffer B2	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTPs	10 mM	200 µM	0,5
Evagreen	20x	1x	1
Index forward primer	5 µM	0,25 µM	1
Index reverse primer	5 µM	0,25 µM	1
Templat-DNA	5-100 ng/µl	7,5-150 ng	4
PCR-grade H <sub>2</sub> O			12,25
			<b>Totalt 25 µl</b>

Indexing-PCR ble utført i en Lightcycler® 480 og PCR-programmet som ble brukt er gjengitt i tabell 3.8.

**Tabell 3.8**

PCR-program for Illumina indexing PCR

Program	Tid (minutter)	Temperatur (°C)	Sykluser
Innledende denaturering	15:00	95	1
Denaturering	00:30	95	10-15
Hybridisering	01:00	55	
Syntetisering	00:45	72	
Endelig syntetisering	7:00	72	1

PCR-produkt ble deretter rensert og normalisert ved bruk av SequelPrep™ Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) slik det står beskrevet i manualen til Invitrogen (Invitrogen Corporation, 2008). Rensert og normalisert bibliotek ble så kvantifisert med Qubit 2.0 og Illumina NovaSeq 6000 sekvensering ble utført av Novogene, Cambridge, UK.

### 3.4.4 Bioinformatisk analyse

Mikrobiell sammensetning i de fire surdeigene ble undersøkt ved hjelp av sekvensdataene fra Illumina NovaSeq 6000 sekvenseringen. Ukentlige uttak fra surdeigene over åtte uker og prøver fra den ene

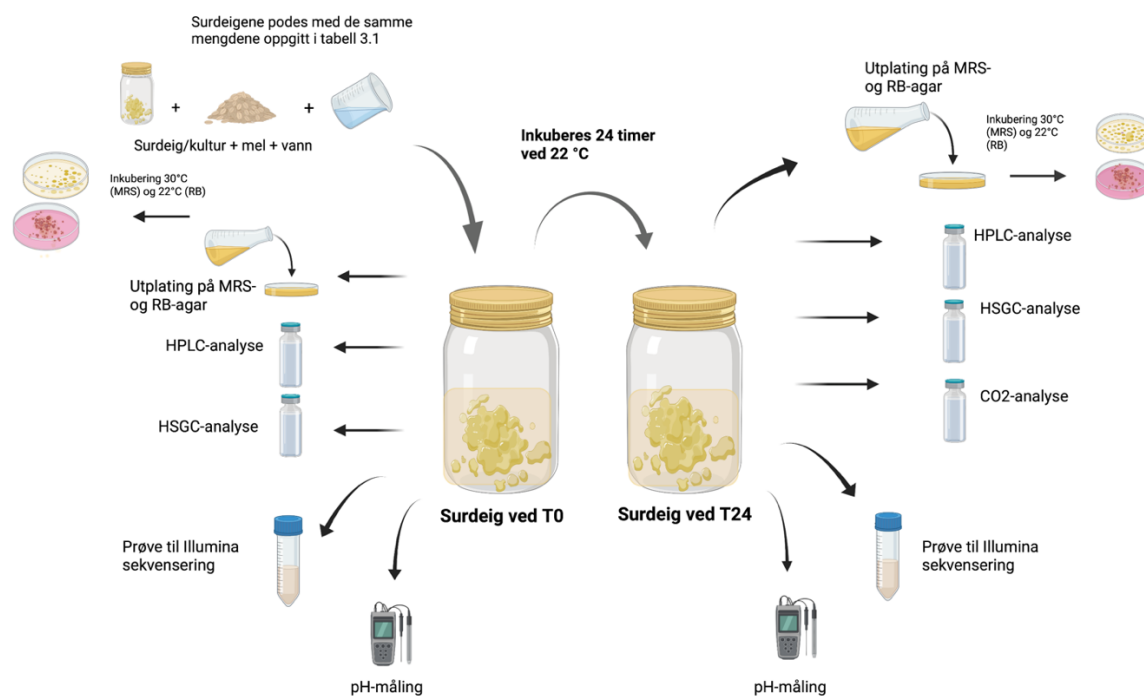
ukes metabolismeforsøk ble analysert. Både 16S- og ITS-data gjorde det mulig å se på stabiliteten og den mikrobielle sammensetningen av både bakterier og sopp i surdeigene i løpet av de første åtte ukene etter etablering.

Råfiler fra Novogene sekvensering ble kvalitetsfiltrert og sekvensvarianter (SV) ble utledet ved bruk av R package: DADA2 (Callahan et al., 2016). Sekvensene kortere enn 375 basepar for 16S og 250 for ITS ble fjernet og taksonomi på slett nivå ble tildelt ved å bruke «DECIPHER» r package mot SILVA SSU-databasen til 16S sekvenser og UNITE for ITS sekvenser (Quast et al., 2013; Wright, 2016). SV-tabellen ble normalisert ved å bruke samme antall sekvenser per prøve. 16S sekvensene ble normalisert med 1000 sekvenser per prøve (antall av hver sekvens per 1000 totalt) og ITS sekvensene med 3000 sekvenser per prøve. Deretter ble sekvenser som utgjorde < 0,5% av totalt antall sekvenser tatt bort. Søkeverktøyet BLAST ble brukt for å tilegne sekvensene taksonomisk identitet. Dataene ble deretter plottet i Excel.

### **3.5 Vekst- og metabolismeforsøk**

For å undersøke produksjon av organiske syrer, CO<sub>2</sub> og flyktige aromakomponenter, samt forekomst og omdannelse av karbohydrater, ble det gjennomført «high performance liquid chromatography» (HPLC) og «head space gas chromatography» (HSGC) av surdeigskulturene ved mating (T0) og etter 24 timers inkubasjon ved 22°C (T24). For noen av prøvene ble det også kjørt «Thermal Desorber Gas Chromatography Mass Spectrometry» (TD-GC-MS). Ved uttakene til HPLC, HSGC og TD-GC-MS 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, og det ble også tatt ut 20 g prøve som ble fryst ned. For å måle CO<sub>2</sub> ble det tatt ut prøve etter poding ved T0, som ble inkubert i headspace-prøveglass i 24 t før CO<sub>2</sub> gass ble målt.

Det ble gjort tre gjentak, med en ukes mellomrom, med start i 8. uke for havre-1, bokhvete og quinoa og 7. uke for havre-2. Før start av hvert forsøk ble surdeigene matet og inkubert ved 22°C i 24 timer. Figur 3.4 illustrerer forsøksoppsettet for hver surdeig ved de tre gjentakene.



**Figur 3.4**

Metabolismeforsøk utført med tre gjentak over tre uker. Før start av hvert forsøk ble surdeigene matet/podet og inkubert ved 22°C i 24 timer. Ved T0 ble surdeigene matet/podet og prøver ble tatt ut til utplating på MRS- og RB-agar, CO<sub>2</sub>-analyse (etter 24 t), pH-måling, HPLC analyse, HSGC analyse og prøver til Illumina sekvensering. Resten av surdeigene ble inkubert i 24 timer ved 22°C. Ved T24 ble prøver tatt ut til utplating på MRS- og RB-agar, HPLC-analyse, HSGC-analyse, pH-måling og prøver til Illumina sekvensering. Prøvene til Illumina sekvensering ble fryst ved -20°C. *Illustrasjonene er laget i BioRender.com*

### 3.5.1 HPLC

Innhold av organiske syrer og karbohydrater ble analysert i surdeigene ved T0 og T24. Analysen ble gjennomført ved bruk av HPLC etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid inn i et 10 ml rør. Prøvene ble tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 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 60 min. Prøvene ble sentrifugert i romtemperatur, 15 minutter ved 1470 x g (3400 rpm) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Supernatanten ble deretter filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør. Analysen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), 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). Prøven (25 µl) 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.

### 3.5.2 HSGC

Måling av flyktige forbindelser ble gjennomført i surdeigene ved T0 og T24. Prøvene ble analysert ved bruk av HSGC, modifisert etter en metode tidligere beskrevet av Grønnevik et al. (2011).

Prøvene ble godt blandet før innveiling av 10,00 g i headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Headspaceflaskene ble forseglest med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble plassert i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent Technologies) og en flamme ioniseringsdetektor. Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies).

Som bæregass ble det benyttet helium (Aga, Norge) med en total flow på 11,1 ml/min. Vilrårene for headspaceflaskene var 50 °C med en forvarmingstid på 45 minutter, med miksing satt til 70 shakes/min. Headspaceflaskene var trykksatt til 10 PSIG i 1,50 minutter før injeksjon og injeksjonstiden var på 0,5 minutt.

En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble benyttet for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, med indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Det ble benyttet følgende temperaturprogram under analysen 53°C, 1min; økning med 15°C min<sup>-1</sup> til 70°C, 2 min; økning med 22°C min<sup>-1</sup> til 130°C, 3 min.

De flyktige komponentene ble separert basert på komponentenes ulike flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase. Identifisering og kvantifisering av de ulike forbindelsene ble gjennomført ved kalibrering med standardløsninger med kjent konsentrasjon av følgende komponenter:

acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 2-butanon, 2-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol (Sigma-Aldrich), acetoin, acetone, etanol, 1-butanol, 2-butanol og 2,3-pentadion (Merck, Tyskland).

### 3.5.3 TD-GC-MS

For noen av uttakene ble de flyktige forbindelsene i surdeigene analysert ved bruk av TD-GC-MS.

Prøvene ble godt blandet før innveing av 5,0 g i al-skåler (volum 50 ml, Sigma Aldrich, USA) og tilsetning av 20 µl av 31.5 ng/µL H<sub>2</sub>O 4-metyl-1-pentanol (produsent, by, land) som intern standard. Skålene ble videre plassert i et mikroemisjonskammer (Micro-Chamber/Thermal Extractor M-CTE250, Markers International Ltd. Llantrisant, UK) ved 45°C i 20 min, og gjennomblåst med en N<sub>2</sub>-flow på 50 ml/min. De flyktige forbindelsene ble oppkonsentrert over på adsorbenttrør, Tenax TA/Carbograph 1TD (Markers International). Adsorbenttrørene ble videre plassert i et automatisk termisk desorpsjonsinstrument (Thermal Desorber, TD-100, Markers International), med et 7890B GC system (Agilent Technologies Inc. Wilmington, De, USA) og koblet til MS Systems, 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Adsorberte komponenter ble desorbert ved 280°C, 10 min, N<sub>2</sub>-flow 30 ml/min over på en elektrisk kjølefelle (trap U-T2GPH-2S) som holdt 25°C. Prøven ble videre desorbert fra kjølefellen ved 280°C i 3 min., før injeksjon på en DB-WAXETR GC kolonne (30 m, 0,25mm i.d., 0,5 µm filmtykkelse, Agilent Technologies). GC temperatur programmet var som følger: 35°C i 5 min, økende med 10°C min<sup>-1</sup> til 230°C, med en holdetid på 5 min. Komponentene ble detektert med en 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Massespektrometeret parametere var, elektronisk ioniserings mode (70eV), ionekildetemperatur på 230°C og kontinuerlig skanning i masseområdet m/z 33-400.

Som bæregass ble det benyttet helium grad 6.0 (Aga) med en flow på 1 ml/min. Programvaren som ble benyttet var Masshunter GC/MS Acquisition B.07.00.1413 (Agilent Technologies). Toppene ble integrert og tentativt identifisert med Masshunter Qualitative Analyse (Agilent Technologies), og NIST 17-database (Agilent Technologies). Prøvene ble analysert som paralleller.

### 3.5.4 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, Hodderson, England) etter en metode beskrevet av Narvhus et al. (1993) med noen modifikasjoner.

Surdeigskulturene (10,0 g) ble overført til sterile «headspace» prøveglass (Machery Nagel, Dueren, Tyskland) og forseglet med sterile septa med aluminiumring (20-CBT3 septa, Agilent technologies, Wilmington, DE, USA). Prøvene ble så inkubert i 24 timer ved 22°C før analyse av CO<sub>2</sub>-produksjon. Prøvene ble vortexet i 2 minutter og 0,1 mL av gassfasen ble injisert i CO<sub>2</sub>-analysatoren for havre og bokhvete og 0,05 ml for quinoa ved å benytte en engangssprøyte. Alle målingene ble gjort i to paralleller. Standardkurven i Vedlegg 7 ble benyttet for omregning til ppm.

### 3.5.5 Principal Component Analysis (PCA)

Det ble utført en «principal component analysis» (PCA) av analyseresultatene fra HSGC og GC-MS. Dette ble gjort for å se på korrelasjon og sammenhenger mellom de flyktige komponentene i surdeigene etter 24 timers fermentering. PCA ble utført i ConsumerCheck v2.3.1 (Nofima, Ås, Norge).

## 3.6 Bakeforsøk

Åtte glutenfrie brød ble bakt, der fire brød var med surdeig og fire med bakegjær. Tabell 3.9 viser formuleringen for hvert brød.

I forkant av bakingen ble surdeigene matet i henhold til tabell 3.1. De ble inkubert ved romtemperatur (ca. 22°C) i 24 timer. Deretter ble de igjen matet der 30 g surdeig ble tilsatt 30 g av respektiv meltype, 30 g rismel og 100 g vann. Surdeigene ble inkubert ved romtemperatur over natt (tilsvarende 9 timer) og var klare til baking neste dag.

Deigen ble eltet i en kjøkkenmaskin (Kenwood Chef, Kenwood, Stockholm, Sverige) ved først å tilsette vann, malte psyllium frø og carboxy metylcellulose (CMC). Dette ble mikset i 1 min. på medium hastighet før resten av ingrediensene ble tilsatt. Deigen ble deretter eltet på medium hastighet i to min. Olje ble tilsatt mot slutten av eltingen.

Deigen ble overført til benk og rullet inn i rismel, før den ble overført til 25x15x8 cm hevekurv (The Modern House, London, UK).

Brødene hevet i ca. 3-4 timer i romtemperatur, og deretter i 9 timer i kjøleskap. To og to brød ble stekt i en forvarmet ovn (Gorenje BO 7510AX, Gorenje, Velenje, Slovenia) på 240°C med vannbad i 20 minutter. Deretter i 20 minutter på 215°C uten vannbad. Brødene ble kjølt ned og fryst ved -18°C til de skulle evalueres. Tining i ca. 5 timer før sensorisk evaluering.

**Tabell 3.9**

Råvareinnhold i åtte glutenfrie brød der fire brød ble laget med surdeig og fire brød med bakegjær

<b>Ingredienser</b>	<b>Bokhvet ebrød surdeig (g)</b>	<b>Bokhvet brød gjær (g)</b>	<b>Havre1 surdeig (g)</b>	<b>Havre1 gjær (g)</b>	<b>Havre 2 surdeig (g)</b>	<b>Havre 2 gjær (g)</b>	<b>Quinoa Surdeig (g)</b>	<b>Quinoa gjær (g)</b>
<b>Bokhvet</b>	90	120						
<b>Havre 1</b>			90	120				
<b>Havre 2</b>					90	120		
<b>Quinoa</b>							90	120
<b>Rismel fullkorn (Det Glutenfrie Verksted)</b>	110	140	110	140	110	140	110	140
<b>White flour mix (Semper)</b>	132	132	132	132	132	132	132	132
<b>Pofiber (Semper)</b>	8	8	8	8	8	8	8	8
<b>Salt</b>	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Bakegjær tørrgjær (Idun)</b>		1 ts*		1 ts		1 ts		1 ts
<b>Psyllium (Finax)</b>	1 ss**	1 ss	1 ss	1 ss	1 ss	1 ss	1 ss	1 ss
<b>CMC*** (Silikomart)</b>	1 ts	1 ts	1 ts	1 ts	1 ts	1 ts	1 ts	1 ts
<b>Rapsolje (Odelia)</b>	2 ts	2 ts	2 ts	2 ts	2 ts	2 ts	2 ts	2 ts
<b>Surdeig</b>	150		150		150		150	
<b>Springvann</b>	260	350	290	380	280	350	307	397

\*ts = teskje

\*\*ss = spiseskje

\*\*\*CMC= carboxy metylcellulose

### 3.7 Sensorisk analyse

En sensorisk evaluering ble utført på de åtte glutenfrie brødene der forfatter av oppgaven og fire ansatte (en nylig pensjonert) med ulik bakgrunn innen sensoriske analyser, fermentering og kornteologi fra KBM, NMBU var til stede.

Evalueringen ble ikke utført som en blindtest med et trent testpanel. Det var en evaluering og diskusjon for å se på egnethet for å bake med surdeigene, i tillegg til hvilke egenskaper og forskjeller det var mellom brødene bakt med og uten surdeig. Brødene var merket med meltype og om de var bakt med surdeig eller bakegjær. Alle til stede fikk utlevert et skjema med ulike oppgitte egenskaper som porestruktur, fasthet, kompaktet, farge på krummen, smak, syrlighet, tørrhet (smuldreegenskaper) og tørrhet/saftighet, se vedlegg 11.

Brødene ble delt på midten og bredde og høyde i midten ble målt. Deretter fikk alle utdelt hver sin smaksprøve, og det ble gjort en evaluering og diskusjon basert på egenskapene som var oppgitt på skjemaet. Det ble gitt kommentarer og/eller poengskår (1-5) på hver egenskap, der lavt skår tilsa dårlig kvalitet og høyt skår tilsa høy kvalitet.

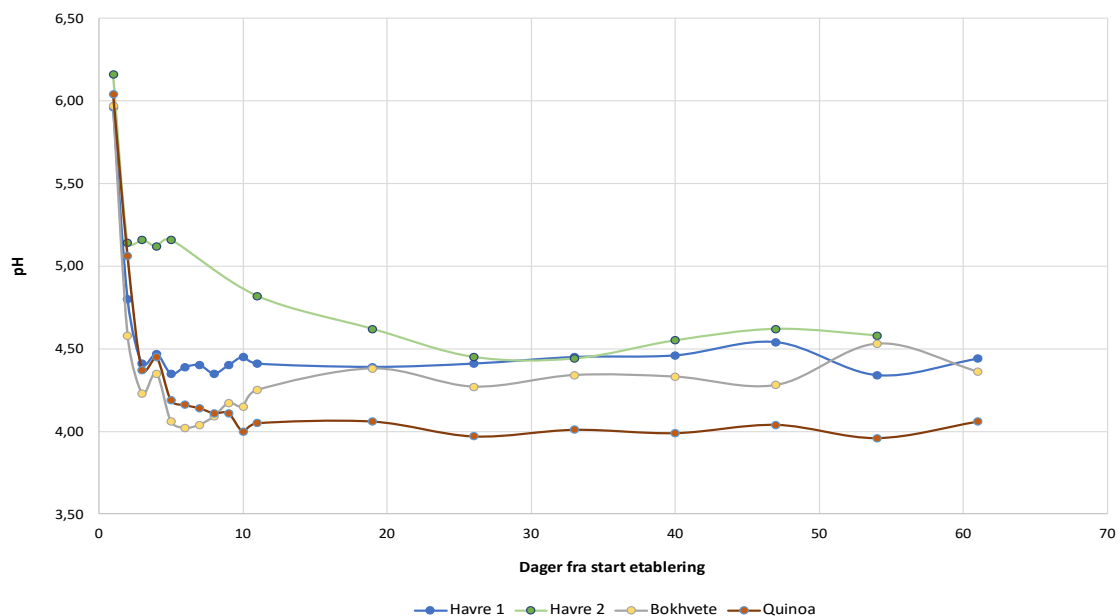
Det ble også tatt bilde av krummen til alle brødene.



## 4. Resultater

### 4.1 Isolering og identifisering av melkesyrebakterier og gjær i surdeigene

Etablering av fire surdeiger (havre-1, havre-2, bokhvete og quinoa) ble utført ved spontanfermentering der mel og vann ble mikset sammen til en deig og inkubert ved 22°C. pH i surdeigene sank raskt de første dagene, men stabiliserte seg i løpet av den første uken etter etablering (Figur 4.1). I surdeigene av havre-1 og havre-2 stabiliserte pH seg på hhv. 4,40 og 4,45. pH i havre-2-surdeigen steg til ±4,60 etter 33 dager. I surdeigen av bokhvete var pH på det laveste 4,02 etter 6 dager, men i denne surdeigen steg pH til ±4,30 når den gikk over til ukentlige matinger. I quinoa-surdeigen stabiliserte pH seg på ca. 4,0 og forble relativt stabil gjennom hele perioden pH ble målt.



**Figur 4.1**

pH i surdeigene 24 t etter poding (T24) ved tilsats av surdeig fra foregående surdeig. Fra etableringsstart til 61 dager etter etablering.

Gjentakende daglige matinger dannet grunnlaget for etablering av en mikrobiota som etter 11 dager (havre-1, bokhvete og quinoa) og 27 dager (havre-2) ble dyrket på ulike medier for å bestemme celletall i surdeigene. Resultatet fra dyrkingen er gjengitt i tabell 4.1, og viser at totalantall mesofile bakterier ved 30°C var forholdsvis likt og over 9 log kde/g for alle de fire surdeigene. På vekstmediene MRS og LBS, som selekterer for henholdsvis melkesyrebakterier og *Lactobacillus* spp., var veksten mellom 9,34-9,51 log kde/g og 9,27-9,48 log kde/g for hhv. MRS og LBS. På vekstmediene YM og RB var veksten høyest i quinoa-surdeigen med hhv. 7,84 og 7,91 log kde/g. I surdeig av bokhvete og havre-2 var veksten litt lavere med hhv. 6,99 og 6,89 log kde/g fra bokhvete og 7,15 og 7,07 log kde/g

fra havre-2. Fra surdeig av havre-1 var celletallet  $<5$  log kde/g på YM og RB, da det ikke var vekst på disse skålene.

**Tabell 4.1**

Celletall (log kde/g) i de fire surdeigene etter etableringsfasen. Uttaket ble gjort i sammenheng med isolering av bakterier og gjær fra fire surdeigene. PCA-agar ble brukt til å anslå totalantall mesofile aerobe bakterier ved 30°C, LBS-agar for selektering av presumptivt *Lactobacillus* spp., MRS-agar for melkesyrebakterier og YM- og RB-agar for å anslå antall gjær.

Celletall (log kde/g)					
Surdeig:	PCA	LBS	MRS	YM	RB
Havre-1	9,49	9,48	9,49	<5	<5
Havre-2	9,47	9,31	9,42	7,15	7,07
Bokhvete	9,41	9,44	9,51	6,99	6,89
Quinoa	9,36	9,27	9,34	7,84	7,91

#### 4.1.1 Fenotypisk identifisering av renkulturer

Kolonier fra de fire surdeigene ble tilfeldig plukket; fem kolonier fra hver av skålene MRS, LBS, YM og RB, noe som ga 40 og 30 renkulturer av hhv. presumptivt melkesyrebakterier og gjær (det var ingen vekst på YM/RB fra havre-1). Mer detaljert beskrivelse fra fenotypisk identifisering av renkulturene er beskrevet i tabell 4.2.

**Tabell 4.2**

Fenotypisk identifisering av renkulturer fra 40 presumptive melkesyrebakterier og 30 presumptive gjær

Agar	Totalt antall plukkede kolonier	Antall bakterier	Antall gjær	Katalase-test*	Gram-reaksjon*	Morfologi	Kommentar
MRS/LBS	40	37	3	Negativ	Positiv	Runde, ovale, kort stavform, lengre staver, tetraeder, rekker, par	10 renkulturer fra hver surdeig
YM/RB	30	0	30			Runde, ovale, eggeformede, knoppsskyting	10 renkulturer fra hver surdeig. Havre-1 hadde ikke vekst på YM/RB

\*Testen ble kun utført på renkulturer som ble identifisert som bakterier ved mikroskopering.

Mikroskopering av renkulturene viste varierende morfologi. Plukkede kolonier fra MRS- og LBS-skålene var bakterier, med unntak av tre kolonier som var gjærceller. Både runde og ovale kokker og korte og lange staver ble observert. Mange opptrådte unicellulært, men en del var også arrangert i par, tetraeder og kjeder. Koloniene plukket fra YM- og RB-skålene var alle gjærceller, og også disse hadde noe ulik form; ovale, kule- og eggeformede gjærceller ble observert. Det ble registrert knoppskyting hos de fleste gjærkoloniene. Se Vedlegg 3 for fullstendig morfologisk beskrivelse av de enkelte isolatene.

Isolatene som ble identifisert som bakterier ved mikroskopering ble katalase-testet og Gram-farget. Samtlige av isolatene var katalase-negative og Gram-positiv.

#### 4.1.2 Genotypisk identifisering av renkulturer

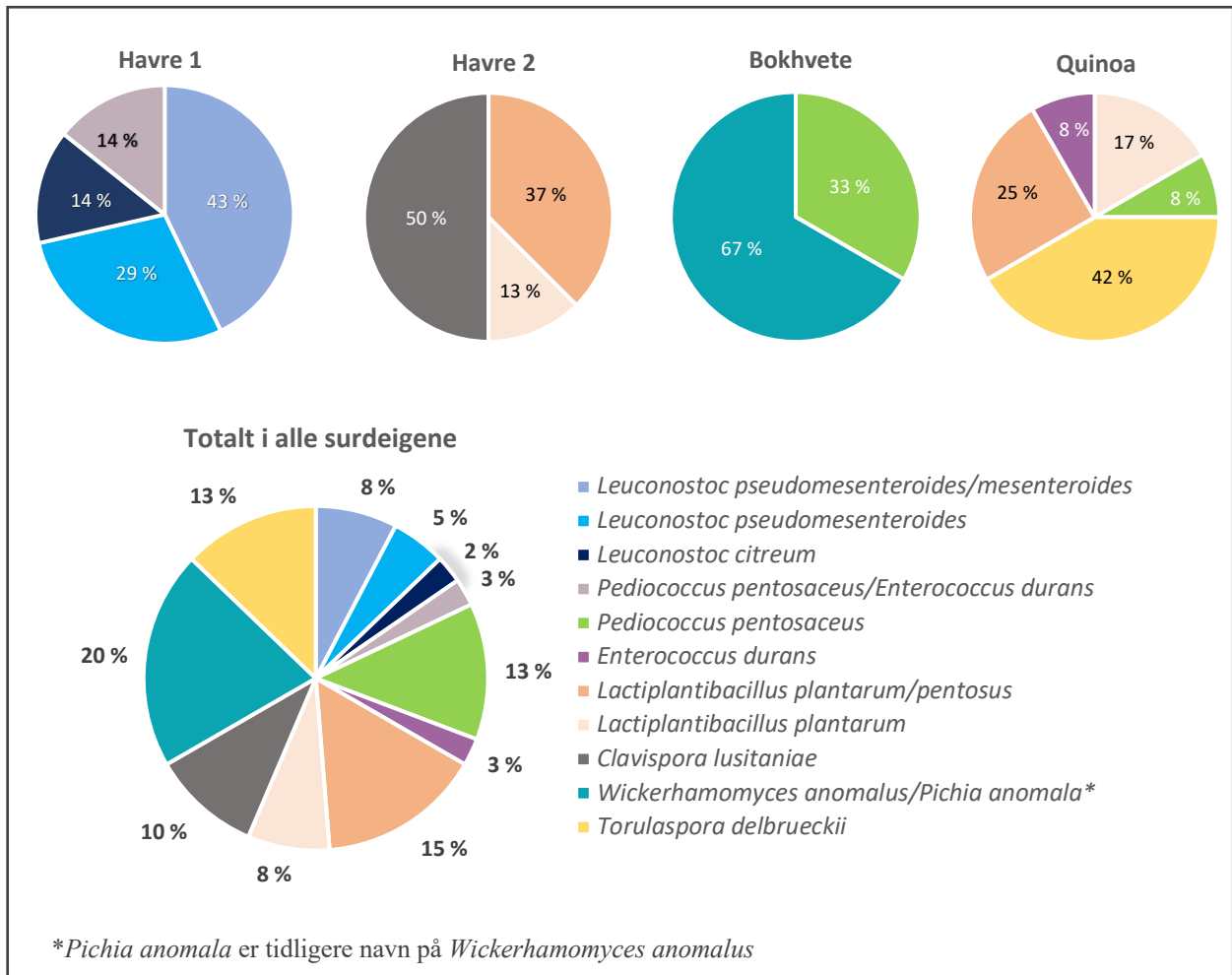
Det ble valgt ut totalt 39 renkulturer (22 bakterieisolat og 17 gjærisolat); 7 fra havre-1, 8 fra havre-2, 12 fra bokhvete og 12 fra quinoa, som ble videre sekvensert ved Sanger sekvensering. Taksonomisk identitet på artsnivå ble bestemt ved hjelp av søkeverktøyet BLAST. Der taksonomi ikke med sikkerhet kunne bestemmes til en art, er de ulike alternativene oppgitt med «/».

Antatt identitet, fordeling mellom de ulike surdeigene og totalfordeling er gjengitt i figur 4.2.

Alle bakterieisolatene ble identifisert som MSB, og totalt ble 4 ulike slekter identifisert (*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactiplantibacillus* og *Enterococcus*). Fra havre-1 ble alle isolatene identifisert som MSB. Av de 7 bakterieisolatene ble ett identifisert som *Pediococcus pentosaceus/Enterococcus durans*, mens de 6 resterende isolatene ble identifisert som *Leuconostoc* (*L. mesenteroides/pseudomesenteroides*, *L. pseudomesenteroides* og *L. citreum*). Av 4 bakterieisolat fra hver av surdeigene havre-2 og bokhvete ble 3 fra havre-2 identifisert som *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus* (*Lactobacillus plantarum/pentosus*) og ett som *Lactiplantibacillus plantarum*, mens i bokhvete ble alle 4 identifisert som *Pediococcus pentosaceus*. Fra 7 bakterieisolat fra surdeig av quinoa, ble 3 ulike MSB-arter identifisert; *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans* og *Lactiplantibacillus plantarum/pentosus*.

Av gjærisolatene ble 3 ulike arter isolert; *Clavispora lusitaniae*, *Wickerhamomyces anomalus/Pichia anomala* og *Torulaspora delbrueckii*. Det var ingen vekst ved dyrking av havre-1 på YM- og RB-skåler, dermed ble det kun identifisert gjærisolat fra surdeig av havre-2, bokhvete og quinoa. Ingen av de tre surdeigene hadde like gjærarter av de som ble plukket og isolert. I havre-2 ble alle gjærisolat identifisert som *C. lusitaniae*, mens i quinoa ble gjærisolatene identifisert som *T. delbrueckii*. I bokhvete ble både *W. anomalus* og *P. anomala* identifisert blant de plukkede koloniene. *Pichia*

*anomala* er tidligere navn på *W. anomalus*. For fullstendig oversikt over alle sekvenserte renkulturer, se Vedlegg 4.



**Figur 4.2**

Isolerte bakterie- og gjær-celler identifisert ved Sanger sekvensering. Totalt 39 renkulturer (22 bakterieisolat og 17 gjærisolat) ble identifisert, og diagrammene viser en oversikt over fordelingen av de isolerte og identifiserte isolatene fra de ulike surdeigene. 7 isolat ble plukket fra havre-1, 8 isolat fra havre-2, 9 isolat fra bokhvete og 12 isolat fra quinoa-surdeigen.

## 4.2 Mikrobiota-analyse ved Illumina sekvensering

Mikroorganismer til stede i surdeigene ble undersøkt ved Illumina-sekvensering av 16S og ITS-regionene hos hhv. bakterier og gjær. For surdeig av havre-1, bokhvete og quinoa ble det utført analyser fra daglige uttak (dag 2 og 5) i den første uken av surdeigsetableringen, og deretter ukentlig i åtte uker. For havre2-surdeigen ble det kun gjort analyser av ukentlige uttak i åtte uker. Det ble også tatt ut prøver til DNA-sekvensering under metabolismeforsøkene i 9. uke. Da var surdeigene av

bokhvete, havre-1 og quinoa 8 uker gamle, mens havre-2 var 7 uker gammel. Prøver ble tatt ut ved T0 (M0) og T24 (M24).

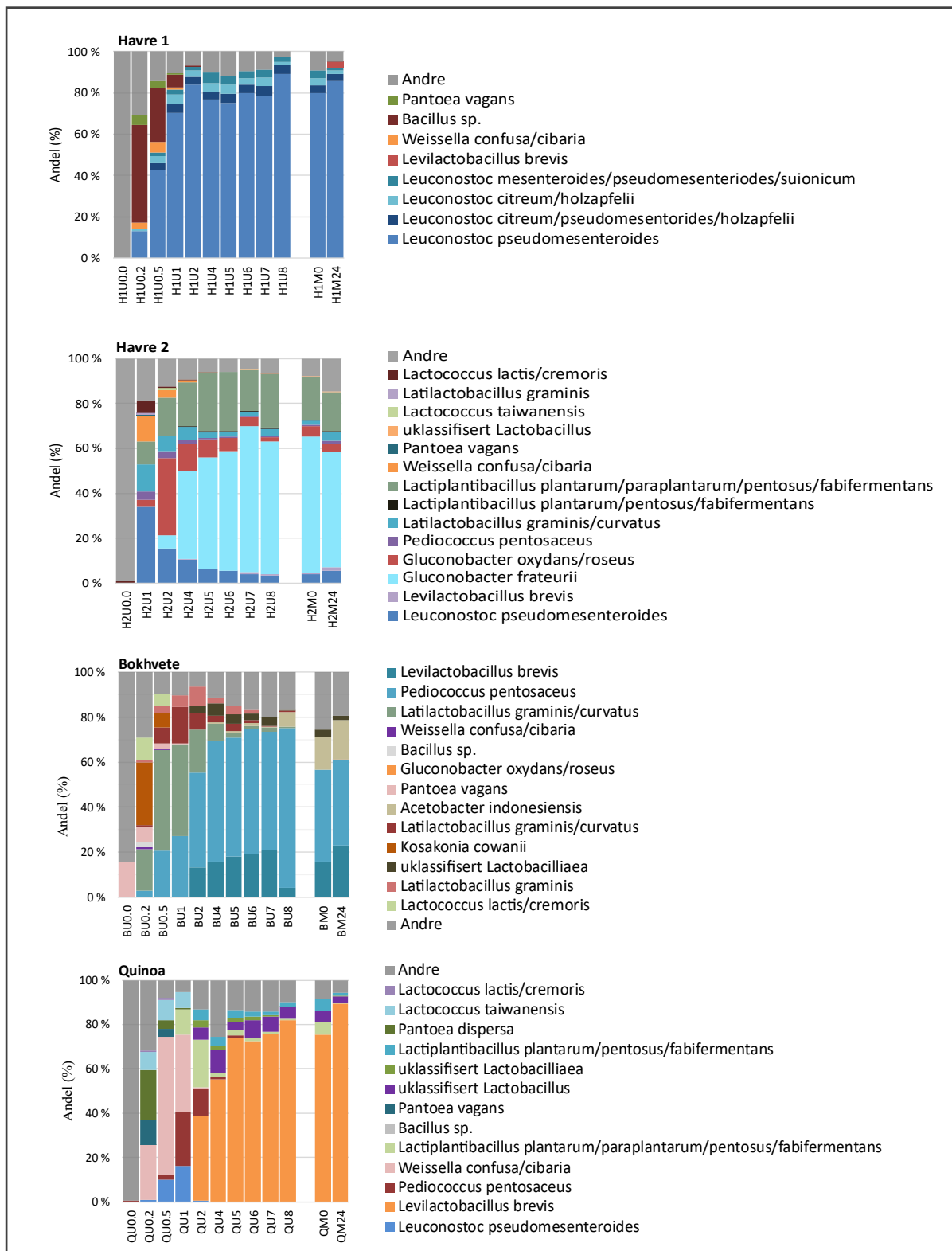
Søkeverktøyet BLAST ble brukt til å avgjøre den sannsynlige taksonomiske identiteten til sekvensene ved sammenligning mot andre sekvenser i sekvensdatabasen NCBI. Sekvensenes identitet ble bestemt på arts-nivå, og der identiteten til en sekvens ikke kunne knyttes til kun en bakterieart, er alle artsnavnene med tilsvarende sannsynlighetscore inkludert. Flere sekvenser hadde samme arts-identitet da en del av sekvensene var svært like (kun ulikheter i 1-2 basepar). I presentasjonen er sekvensene som er identifisert som samme art slått sammen.

Sekvensdataene viste at den mikrobielle sammensetning i de fire surdeigene var svært ulik hverandre. Alle surdeigene gjennomgikk store endringer i løpet av de første dagene og ukene av etableringen, men etter 2 uker var den mikrobielle sammensetningen relativt stabil i surdeigene av havre-1, bokhvete og quinoa, mens havre-2 brukte litt lengre tid på å bli stabil. Fra uke 4 og utover viste 16S-sekvensdataene at miljøet i havre -1 og quinoa stort sett var dominert (>75%) av en bakterie-slekt. I havre-2 og bokhvete var det større variasjon av ulike bakterieslekter. ITS-dataene fra DNA-sekvenseringen av prøvene viste at det tidlig etablertes en dominerende gjærart i surdeigene av havre-2, bokhvete og quinoa. I surdeigen av havre-1 ble det ikke funnet ITS rRNA i prøvene under amplifiseringen av DNA.

#### 4.2.1 Identifisering av bakterielle samfunn i surdeigene

Den relative fordelingen av bakterier i løpet av de første åtte ukene etter etablering av de fire surdeigene er presentert i Figur 4.3.

1-2 uker etter etablering domineres det bakterielle miljøet i surdeigene av havre-1, bokhvete og quinoa av melkesyrebakterier, mens i surdeigen av havre-2 tar det opp mot 4 uker før miljøet er stabilt og det domineres da av eddiksyrebakterier. I havre-1 var *Leuconostoc* den mest dominerende slekten med over 80% tilstedeværelse. I surdeigen av bokhvete var *Pediococcus pentosaceus* mest dominerende, men også *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*) og eddiksyrebakterien *Acetobacter indonesiensis* var til stede (opp mot 20% av hver i noen prøver). Den dominerende bakteriearten i quinoa var *Lev. brevis*, mens i havre-2 ble den største andelen bakterier identifisert som *Gluconobacter frateurii*.



**Figur 4.3**

Relativ fordeling av bakterier i surdeig av havre-1, havre-2, bokhvete og quinoa basert på 16S rRNA-sekvensering. Taksonomisk identifisering er oppgitt for alle sekvensene som utgjorde > 0,5% av totalt antall sekvenser. Sekvenser som utgjorde < 0,5% er oppgitt som «andre». Prøver til sekvensering er tatt da surdeigen var 0, 2 og 5 dager gammel (havre-2 ble kun tatt ukentlig), og deretter ukentlig fra 1 uke til 8 uker etter etablering (U0.0=dag 0, U0.2=dag 2, U0.5=dag 5, U1=uke 1, U2=uke 2, U4=uke 4, U5=uke 5, U6=uke 6, U7=uke 7, U8=uke 8, H1= Havre-1, H2= Havre-2, B=Bokhvete, Q=Quinoa). Det ble også tatt ut prøver ved T0 (M0) og T24 (M24) sammen med metabolismeforsøkene i 9. uke (8 uker etter etablering for havre-1, bokhvete og quinoa, og 7 uker etter etablering for havre-2).

Sekvensdataene fra havre-1 viser at det i løpet av de første dagene er en økning i andelen *Leuconostoc pseudomesenteroides* og *Bacillus*, sammen med en liten andel *Weisella* og *Pantoea*. Allerede en uke etter at surdeigen ble etablert var *Leuconostoc* i overtall, med *L. pseudomesenteroides* som den dominerende arten. Etter 2 uker var *Bacillus*, *Pantoea* og mesteparten av *Weisella* helt utkonkurrert av *Leuconostoc*. Mange av sekvensene under kategorien «andre» ble også identifisert som *Leuconostoc* på dette tidspunktet. Den mikrobielle sammensetningen er svært stabil fra uke 2 til uke 8 i surdeigen av havre-1.

16S-sekvensdata fra metabolismeforsøkene da havre-1 var 8 uker gammel viser at også her domineres bakteriemiljøet av *L. pseudomesenteroides*. I prøven fra surdeigen som er fermentert i 24 timer ble det også funnet 2,6% *Lev. brevis*, og i kategorien «andre» ble 32,7% identifisert som *Lactobacillus* sp.

I ufermentert mel (dag 0) av havre-2 ble, som for havre1, ble de fleste sekvensene identifisert som *Rhodoligotrophos*, vist som «andre» i figuren. En uke etter etablering er de fleste *Rhodoligotrophos* utkonkurrert av *Leuconostoc*, *Lactilactobacillus* og *Weisella*. Fra 2 uker etter etablering ble *Gluconobacter* mer dominant i surdeigen. *Gluconobacter oxydans/roseus* dominerte i starten, men etter hvert overtok *Gluconobacter frateurii*. Den mikrobielle sammensetningen til bakteriene i surdeigen er forholdsvis stabil fra uke 4 til uke 8, men andelen *L. pseudomesenteroides* synker uke for uke mens *G. frateurii* tar mer og mer over og er mot slutten representert med over 50% tilstedeværelse. Også *Lactiplantibacillus* var til stede (20%) etter uke 4.

Sekvensdataene av 16S-dataene fra metabolismeforsøket (H2M0 og H2M24) viste en lignende trend som prøven fra samme uke (H2U7). *Gluconobacter* synker noe etter 24. timers fermentering, mens *Leuconostoc*, *Levilactobacillus* og «andre» økte.

Også i surdeigen av bokhvete skjer det store endringer i den bakterielle sammensetningen i løpet av de første dagene. I løpet av den første uken ble *Lactilactobacillus graminis/curvatus* (*Lactobacillus graminis/curvatus*) mer dominerende, mens *Pantoea vagans* og *Kosakonia cowanii* utkonkurreres. Også *Pediococcus pentosaceus* økte jevnlig fra dag 2, og ble etter hvert den dominerende bakteriearten i surdeigen. Fra uke 2 steg andelen *Lev. brevis*, som ved uke 7 utgjorde 21% av bakteriene. Det samme sees også i sekvensdataene fra prøvene tatt ut i metabolismeforsøkene i uke 8, hvor de utgjør 14,5% og 17,5% ved hhv. T0 og T24. Dataene fra metabolismeforsøkene viste også en nedgang i andelen *Pediococcus* samtidig som det var en økning av *Acetobacter*.

16S-sekvensdataene fra quinoa viser at også i denne surdeigen var det store endringer i løpet av de første dagene og ukene etter etablering. I løpet av de første dagene er det *Weisella*, sammen med *Pantoea* og *Lactococcus* som dominerer i surdeigen. Omtrent en uke etter etablering øker andelen

melkesyre bakterier som *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Lactiplantibacillus*, men etter to uker tar *Lev. brevis* mer over, som etter hvert ble den dominerende arten i surdeigen. Ved uke 4 er *Leuconostoc* og *Pediococcus* utkonkurrert av de andre melkesyrebakteriene fra *Lactobacillus*-slekten.

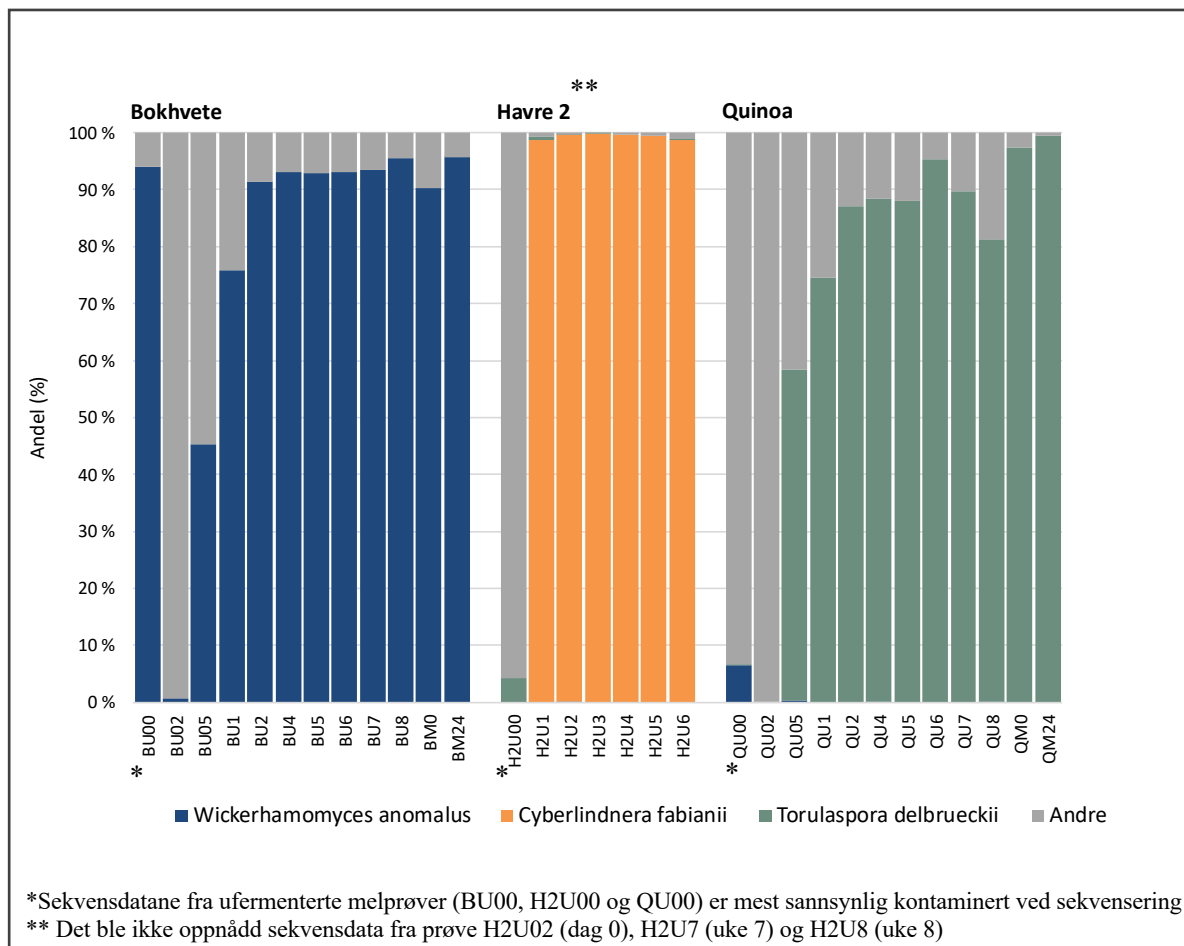
Dataene fra metabolismeforsøkene i uke 8 viser ved T0 en nedgang i *Lev. brevis*, sammenlignet med prøveuttakene fra samme uke (QU8). Samtidig var det en økning i *L. plantarum*. Etter 24 timers fermentering har andelen *Lev. brevis* økt igjen og *L. plantarum* sunket fra 11% til 1,6%.

#### 4.2.2 Identifisering av soppsamfunn i surdeigene

Sekvensering av ITS rRNA av daglige og ukentlige prøver viste tidlig dominans av gjær i surdeigene av bokhvete, havre-2 og quinoa. I surdeigen av havre-1 kunne det ikke påvises sopp da det ikke ble funnet ITS-sekvenser i prøvene ved amplifisering av ITS rRNA. Relativ prosentvis fordeling av sopp i surdeigene er gjengitt i Figur 4.4. En uke etter etablering av surdeigene var ca. 70% av soppforekomsten *Wickerhamomyces anomalus* i bokhvete og *Torulaspota delbrueckii* i quinoa, mens nesten 99% av sopp i havre-2 ble identifisert som *Cyberlindnera fabianii*. Fra uke 1 til uke 8 var den mikrobielle sammensetningen til sopp i de tre surdeigene svært stabil der de respektive gjærartene var dominante gjennom hele prøvetakingsperioden. PCR-produktet fra melprøvene (BU00, H2U00 og QU00) har mest sannsynlig blitt kontaminert ved sekvensering, og er derfor ikke tatt med i videre vurderinger.

Uttakene fra metabolismeforsøkene til bokhvete og quinoa viste samme trend som tilsvarende prøver i samme uke (U8). I kategorien «andre» er blant annet slekter som *Mucor*, *Udeniomyces*, *Pyrenophora*, *Hyphodermella*, *Eremothecium* og *Alternaria* identifisert. Vedlegg 5 viser den relative fordelingen av 16S- og ITS-sekvenser ved Illumina sekvensering fra hver surdeig og uttak.





**Figur 4.4**

Relativ fordeling av sopp i surdeig av bokhvete, havre-2 og quinoa ved ITS rRNA-sekvensering. Taksonomisk identifisering er oppgitt for alle sekvensene som utgjorde > 0,5% av totalt antall sekvenser. Sekvenser som utgjorde < 0,5% er oppgitt som «andre». Prøver til sekvensering er tatt da surdeigen var 0, 2 og 5 dager gammel, og deretter ukentlig fra 1 uke til 8 uker etter etablering (U0.0=dag 0, U0.2=dag 2, U0.5=dag 5, U1=uke 1, U2=uke 2, U4=uke 4, U5=uke 5, QU6=uke 6, U7=uke 7, U8=uke 8, B=Bokhvete, H2=Havre-2, Q=Quinoa). Det ble også tatt ut prøver ved T0 (M0) og T24 (QM24) sammen med metabolismeforsøkene når surdeigene var 8 uker gamle.

## 4.3 Vekst- og metabolismeforsøk

Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer, flyktige komponenter og CO<sub>2</sub> i løpet av 24 timers fermentering ble undersøkt i de fire surdeigene med HPLC, HSGC, GC-MS og CO<sub>2</sub>-målinger. Ved uttak til de ulike analysene ble også surdeigene støpt inn i MRS- og RB-agar for å bestemme celletall av hhv. bakterier og gjær, i tillegg ble pH målt før og etter 24 timers inkubering. Analysene ble utført tre ganger med en ukes mellomrom.

### 4.3.1 Celletall, pH og CO<sub>2</sub>-produksjon

Celletall i surdeigene rett etter mating (T0) og etter 24 timers inkubering (T24) er gjengitt i tabell 4.2. Konsentrasjon av celletall på MRS-skålene var >9 log kde/g både før og etter 24 timers inkubering for alle surdeigene. Konsentrasjonen økte noe i alle surdeigene i løpet av 24 timers fermentering, med den største økningen i havre-1 og quinoa, som økte fra 9,03 til 9,40 log kde/g (havre-1) og 9,05 til 9,40 log kde/g (quinoa). I havre-2 og bokhvete var økningen fra 9,01 til 9,29 log kde/g (havre-2) og 9,18 til 9,44 log kde/g (bokhvete).

Celletall på RB-skålene i havre-2 og quinoa-surdeigen økte noe i løpet av 24 timers inkubering fra 7,10 til 7,31 log kde/g (havre-2), mens celletallet i surdeigene av quinoa og bokhvete var relativt stabilt der de gikk fra hhv. 7,72 til 7,83 log kde/g og 7,51 til 7,48 log kde/g. Havre-1 hadde ingen vekst på RB-skålene og konsentrasjonen var derfor <1 log kde/g før og etter 24 timers inkubering.

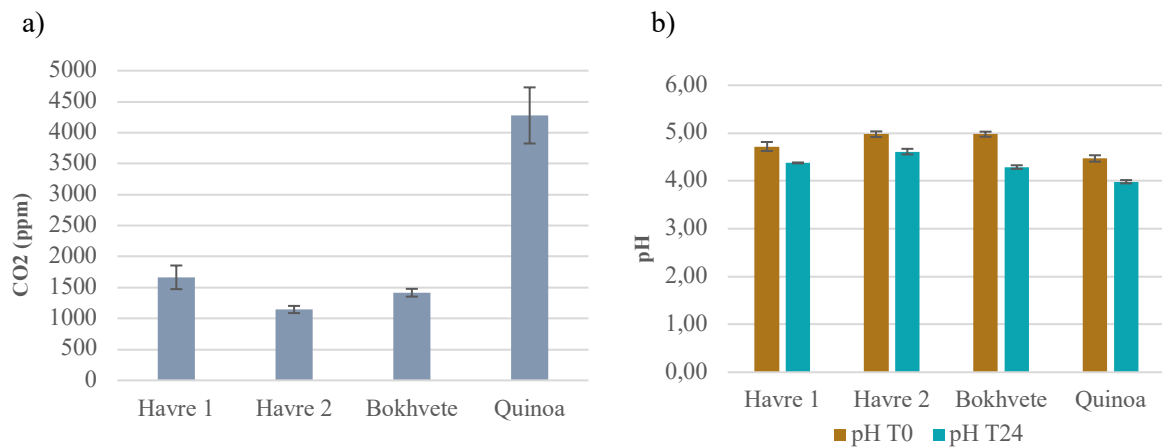
**Tabell 4.2**

Celletall (log kde/g) i de ulike surdeigene av havre 1, havre 2, bokhvete og quinoa rett etter poding (T0) og etter 24 timers inkubering (T24). Uttaket ble gjort i sammenheng med uttak til HPLC, HSGC, GC-MS og CO<sub>2</sub>-målinger. MRS-agar ble brukt for selektering av melkesyrebakterier og RB-agar for selektering av gjærceller. Celletallene er gjennomsnittsverdier fra tre gjentakende forsøk.

Celletall (log kde/g)				
Surdeig:	MRS		RB	
	T0	T24	T0	T24
Havre 1	9,03	9,40	<1	<1
Havre 2	9,01	9,29	7,10	7,31
Bokhvete	9,18	9,44	7,51	7,48
Quinoa	9,05	9,40	7,72	7,83

CO<sub>2</sub> ble målt etter 24 timers inkubering (tabell 4.5), og resultatet viser at CO<sub>2</sub>-produksjonen var klart høyest i quinoa-surdeigen med en snittproduksjon på 4277±453 ppm CO<sub>2</sub>. De andre surdeigene hadde en snittproduksjon godt under 2000 ppm der havre-2 hadde lavest produksjon på 1144±58 ppm CO<sub>2</sub>, mens bokhvete produserte 1415±63 ppm og havre-1 1664±191 ppm CO<sub>2</sub>.

pH ble også målt før og etter 24 timers inkubering. Resultatene er gjengitt i figur 4.x og viser at pH gikk ned i alle surdeigene i løpet av fermenteringstiden der den største nedgangen var i surdeig av bokhvete (4,98±0,05 til 4,29±0,04). Surdeigene av havre-1 og havre-2 hadde tilnærmet lik nedgang i pH på ca. 0,35, men pH i havre-2 (4,98±0,06 til 4,61±0,06) lå i snitt høyere enn pH i havre-1 (4,72±0,09 til 4,38±0,01). Surdeigen av quinoa hadde lavest pH av de fire surdeigene, og er den eneste som hadde en pH under 4 etter 24 timers fermentering (4,47±0,07 til 3,98±0,03).



**Figur 4.5**

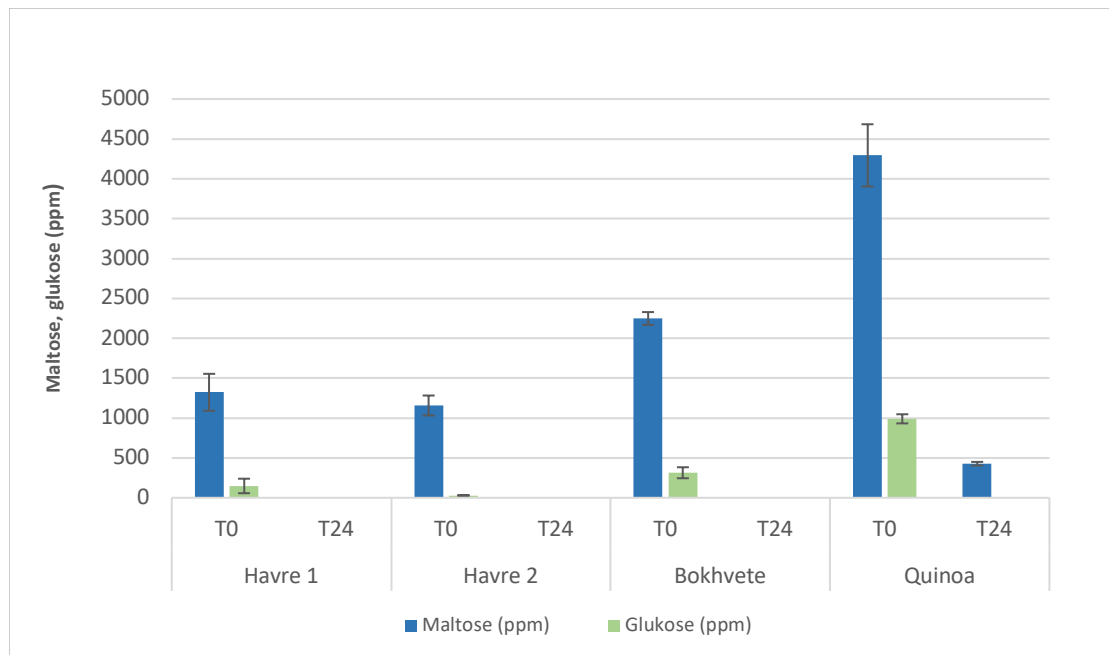
Gjennomsnittsverdier fra a) CO<sub>2</sub>-målinger og b) pH-målinger ved tre ukentlige gjentak. CO<sub>2</sub>-målingene ble utført etter 24 timers inkubering ved 22°C, og pH ble målt etter poding (T0) og etter 24 timers inkubering (T24).

### 4.3.2 Omsetning av karbohydrater og produksjon av organiske syrer

I løpet av 24 timers fermentering blir karbohydrater omsatt til blant annet melkesyre og eddiksyre.

Figur 4.6 viser konsentrasjonen av maltose og glukose i surdeigene før og etter 24 timers

fermentering. I alle surdeigene var det i løpet av fermenteringstiden en nedgang i konsentrasjonen av maltose og glukose.



**Figur 4.6**

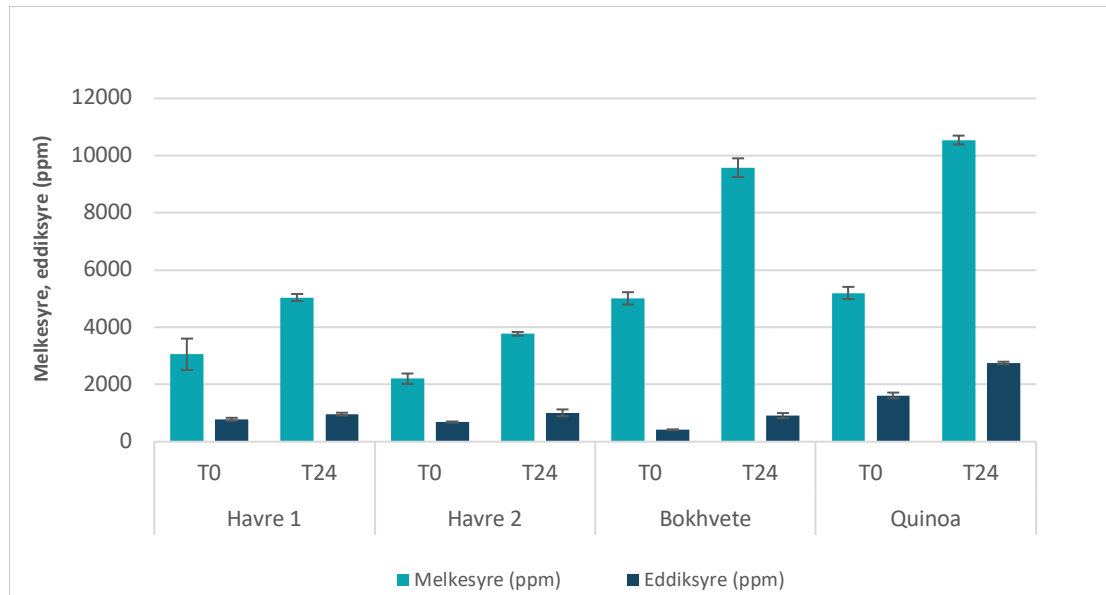
Konsentrasjon av maltose og glukose i surdeigene før (T0) og etter 24 timers inkubering (T24). Verdiene er gjennomsnittsverdier fra tre parallelle målinger og er oppgitt med standardavvik.

De laveste startkonsentrasjonene av maltose og glukose ble målt i havre-surdeigene. I surdeig av havre-1 ble startkonsentrasjonen av maltose og glukose målt til hhv.  $1322 \pm 231$  ppm og  $148 \pm 91$  ppm, mens i surdeigen av havre-2 var konsentrasjonene lavere enn i havre-1 både for maltose ( $1157 \pm 125$  ppm) og glukose ( $29 \pm 3$  ppm). Etter 24 timers fermentering var sukkekomponentene omsatt i begge surdeigene da det ikke ble funnet noe maltose og glukose i prøvene.

I surdeigen av bokhvete ble det målt høyere startkonsentrasjoner av maltose ( $2249 \pm 80$  ppm) og glukose ( $314 \pm 69$  ppm) enn i havre-surdeigene, men også for surdeigen av bokhvete var all maltose og glukose omsatt etter 24 timers fermentering. Quinoa-surdeigen hadde den klart høyeste konsentrasjonen av maltose ( $4294 \pm 390$  ppm) og glukose ( $990 \pm 57$  ppm) før fermentering, sammenlignet med de andre surdeigene. Etter 24 timers fermentering var maltosekonsentrasjonen redusert til  $427 \pm 23$  ppm, mens all glukose var omsatt.

Endring i konsentrasjon melkesyre og eddiksyre i løpet av 24 timers fermentering ble også målt, og er gjengitt i Figur 4.7. I alle surdeigene var det en økning i melkesyre- og eddiksyre-konsentrasjonen etter fermentering. Den høyeste produksjonen av melkesyre ble målt i surdeigen av bokhvete (91% økning) og quinoa (103% økning) der melkesyre-konsentrasjonen etter 24 timers fermentering var hhv.  $9581 \pm 326$  ppm og  $10546 \pm 154$  ppm. Surdeigen av havre-2 hadde lavest konsentrasjon melkesyre ved T0 og T24, med hhv.  $2201 \pm 183$  ppm og  $3772 \pm 65$  ppm, mens havre-1 hadde den laveste

prosentvise økningen i melkesyre under fermentering med ca. 65% økning i løpet av 24 timers fermentering fra  $3056 \pm 549$  ppm (T0) til  $5042 \pm 123$  ppm (T24).



**Figur 4.7**

Konsentrasjon av melkesyre og eddiksyre i surdeigene rett etter mating (T0) og etter 24 timers inkubering (T24). Verdiene er gjennomsnittsverdier fra tre gjentakende målinger og er oppgitt med standardavvik.

Eddiksyre-konsentrasjonen var klart høyest i surdeigen av quinoa med  $1616 \pm 100$  ppm eddiksyre i startkonsentrasjon, som økte til  $2751 \pm 45$  ppm i løpet av fermenteringstiden. Den laveste eddiksyre-konsentrasjonen ble målt i bokhvete-surdeigen, som var  $420 \pm 2$  ppm ved T0 og økte til  $911 \pm 90$  ppm ved T24. Det var likevel havre-1 som hadde den laveste prosentvise økningen (24%) i eddiksyre-konsentrasjonen i løpet av fermenteringstiden, som gikk fra  $783 \pm 53$  ppm (T0) til  $967 \pm 46$  ppm (T24). I surdeigen av havre-2 økte eddiksyre-konsentrasjonen fra  $687 \pm 20$  ppm (T0) til  $1009 \pm 119$  ppm (T24).

#### 4.3.3 Produksjon av flyktige komponenter

Produksjon av flyktige komponenter i løpet av 24 timers fermentering ble målt i surdeigene ved at analyser ble utført før og etter 24 timers inkubering. Målte verdier ved T0 og T24 for de respektive surdeigene er gjengitt i tabell 4.3, som viser svært ulik produksjon av flyktige komponenter i de fire surdeigene.

**Tabell 4.3**

Flyktige komponenter i surdeigene ved T0 og T24 målt med HSGC. Verdiene målt med HSGC er gjennomsnittsverdier av tre målinger - utført med en ukes mellomrom over tre uker.

Komponenter	<i>Havre 1</i>		<i>Havre 2</i>		<i>Bokhvete</i>		<i>Quinoa</i>	
	<i>T0 (ppm)</i>	<i>T24 (ppm)</i>	<i>T0 (ppm)</i>	<i>T24 (ppm)</i>	<i>T0 (ppm)</i>	<i>T24 (ppm)</i>	<i>T0 (ppm)</i>	<i>T24 (ppm)</i>
<b>Acetaldehyde</b>	<i>0,61 ± 0,02</i>	<i>1,19 ± 0,10</i>	<i>0,94 ± 0,05</i>	<i>1,10 ± 0,06</i>	<i>1,52 ± 0,15</i>	<i>2,07 ± 0,19</i>	<i>2,28 ± 0,18</i>	<i>10,37 ± 0,43</i>
<b>2-metylpropanal</b>	<i>0,03 ± 0,00</i>	<i>0,03 ± 0,00</i>	<i>0,03 ± 0,00</i>	<i>0,03 ± 0,00</i>	<i>0,67 ± 0,15</i>	<i>1,37 ± 0,32</i>	<i>0,73 ± 0,07</i>	<i>1,23 ± 0,08</i>
<b>Diacetyl</b>	<i>1,01 ± 0,14</i>	<i>1,37 ± 0,24</i>	<i>6,20 ± 0,22</i>	<i>10,15 ± 0,72</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>Acetoin</b>	<i>17,39 ± 3,97</i>	<i>14,12 ± 1,86</i>	<i>322,19 ± 22,47</i>	<i>594,85 ± 29,81</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>5,16 ± 1,25</i>	<i>2,02 ± 0,19</i>
<b>2-metyl-1-propanol</b>	<i>n.d.</i>	<i>0,06 ± 0,01</i>	<i>0,08 ± 0,00</i>	<i>0,09 ± 0,00</i>	<i>0,45 ± 0,10</i>	<i>0,96 ± 0,28</i>	<i>8,87 ± 0,81</i>	<i>15,52 ± 0,57</i>
<b>3-metyl-1-butanol</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>1,27 ± 0,39</i>	<i>3,01 ± 1,12</i>	<i>10,51 ± 0,55</i>	<i>17,81 ± 0,43</i>
<b>2-metyl-1-butanol</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>0,36 ± 0,12</i>	<i>0,66 ± 0,16</i>	<i>1,86 ± 0,11</i>	<i>3,18 ± 0,10</i>
<b>Etanol *</b>	<i>2498,07 ± 258,14</i>	<i>4227,51 ± 134,96</i>	<i>402,71 ± 5,46</i>	<i>708,33 ± 13,29</i>	<i>426,60 ± 35,41</i>	<i>1039,15 ± 135,30</i>	<i>14951,30 ± 398,70</i>	<i>27975,89 ± 490,63</i>
<b>2-butanol</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>27,82 ± 1,38</i>	<i>65,10 ± 1,19</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>Etylacetat</b>	<i>0,34 ± 0,05</i>	<i>0,48 ± 0,06</i>	<i>1,71 ± 0,38</i>	<i>1,84 ± 0,31</i>	<i>18,95 ± 3,81</i>	<i>111,07 ± 37,99</i>	<i>4,96 ± 0,38</i>	<i>9,64 ± 0,59</i>
<b>Dimetylsulfide</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>0,04 ± 0,02</i>	<i>0,25 ± 0,02</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>Etylpropionate</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>0,11 ± 0,06</i>	<i>0,66 ± 0,04</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

n.d = ikke detektert

n.m. = ikke målt

\* Etanolkonsentrasjonene er semikvantitative. Verdiene var utenfor kalibreringskurven

**Tabell 4.4**

Flyktige komponenter i surdeigene ved T24 målt med GC-MS. Analyse er utført på ett uttak (en uke), og verdiene er gjennomsnitt av to parallelle målinger. Verdiene er semikvantitative. De er beregnede ekvivalenter av komponentene mot ekvivalenter av internstandard (ng internstandarddekvalenter av stoffet /g)

Komponenter	Havre 1		Havre 2		Bokhvete		Quinoa	
	T0 (ng i.s.e./g)*	T24 (ng i.s.e./g)*	T0 (ng i.s.e./g)*	T24 (ng i.s.e./g)*	T0 (ng i.s.e./g)*	T24 (ng i.s.e./g)*	T0 (ng i.s.e./g)*	T24 (ng i.s.e./g)*
2-metylbutanal	<i>n.m.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.m.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.m.</i>	0,96 ± 0,12	<i>n.m.</i>	<i>n.d.</i>
3-metylbutanal	<i>n.m.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.m.</i>	1,66 ± 0,05	<i>n.m.</i>	4,05 ± 1,20	<i>n.m.</i>	10,26 ± 0,47
D-Limone	<i>n.m.</i>	0,80 ± 0,07	<i>n.m.</i>	0,74 ± 0,24	<i>n.m.</i>	0,52 ± 0,08	<i>n.m.</i>	0,59 ± 0,05
1-hexanol	<i>n.m.</i>	80,9 ± 1,72	<i>n.m.</i>	6,33 ± 0,62	<i>n.m.</i>	9,14 ± 0,28	<i>n.m.</i>	184,23 ± 14,82
3-metyl-1-butanol	<i>n.m.</i>	8,98 ± 0,49	<i>n.m.</i>	304,10 ± 10,52	<i>n.m.</i>	407,37 ± 31,53	<i>n.m.</i>	1137,42 ± 90,86

\*ng i.s.e/g = ng internstandarddekvalenter av stoffet /g

Det ble detektert acetaldehyd i alle prøvene. I surdeig av havre-1, havre-2 og bokhvete var verdiene lave, mens for quinoa var produksjonen betydelig med en økning fra  $2,28 \pm 0,18$  ppm til  $10,37 \pm 0,43$  ppm etter 24 timers fermentering.

2-metylpropanal var kun til stede i lave konsentrasjoner i surdeigene av bokhvete og quinoa, hvor de ble målt til hhv.  $1,37 \pm 0,3$  og  $1,23 \pm 0,08$  ppm etter 24 timers fermentering. I havre-1 og havre-2 var konsentrasjonene svært lave og ubetydelige ( $0,03 \pm 0,00$  ppm) både ved T0 og T24.

Diacetyl- og acetoin-konsentrasjonene var relativt høye i havre-2 i forhold til de andre surdeigene. Ved T0 ble det målt  $6,20 \pm 0,22$  ppm, som steg til  $10,15 \pm 0,72$  ppm i løpet av fermenteringstiden. Også acetoin-konsentrasjonen var høy i havre-2 med  $322,19 \pm 22,47$  ppm ved T0 og  $594,85 \pm 29,81$  ppm etter 24 timer (T24).

Alkoholene 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol og 2-butanol ble ikke detektert i surdeigen av havre-1 og havre-2. Også i bokhvete var verdiene lave, utenom 2-butanol som hadde en økning på ca 37 ppm (til  $65,10 \pm 1,19$  ppm) etter 24 timers fermentering. Etanol-verdiene er meget semikvantitative da verdiene gikk langt over kalibreringskurven, men viser likevel at quinoa hadde betydelig høyere etanolproduksjon enn de andre surdeigene med semikvantitativ verdi på  $27975,89 \pm 490,63$  ppm ved T24, mens havre-2 og bokhvete hadde lavest produksjon av etanol med hhv.  $708,33 \pm 13,29$  ppm og  $1039,15 \pm 135,30$  ppm ved T24.

Esteren etylacetate var til stede i lave konsentrasjoner i surdeigen av havre-1, havre-2 og litt høyere i quinoa. I bokhvete ble det produsert langt høyere konsentrasjoner av etylacetate. Startkonsentrasjonen ved T0 var  $18,95 \pm 3,81$  ppm, som steg til  $111,07 \pm 37,99$  ppm i løpet av 24 timer.

Etylpropionat og dimetylsulfid var kun til stede i bokhvete i veldig lave konsentrasjoner.

2-metylbutanal ble kun detektert i bokhvete etter fermentering, og da ved lave verdier ( $0,96 \pm 0,12$  ng/g). 3-metylbutanal ble detektert etter 24 timers fermentering i surdeigen av havre-2, bokhvete og quinoa. Verdiene for quinoa var høyest med  $10,26 \pm 0,47$  ng/g etterfulgt av bokhvete og havre-2 med hhv  $4,05 \pm 1,20$  ng/g og  $1,66 \pm 0,05$  ng/g.

D-Limone ble kun detektert i veldig lave konsentrasjoner i alle surdeigene ( $0,52-0,8$  ng/g).

1-hexanol ble detektert i alle surdeigene. Konsentrasjonene i surdeiger av havre-2 og bokhvete var lave med hhv.  $6,33 \pm 0,62$  ng/g og  $9,14 \pm 0,28$  ng/g, mens det i quinoa og havre-1 ble detektert betydelig høyere verdier med hhv.  $184,23 \pm 14,82$  ng/g og  $80,9 \pm 1,72$  ng/g.

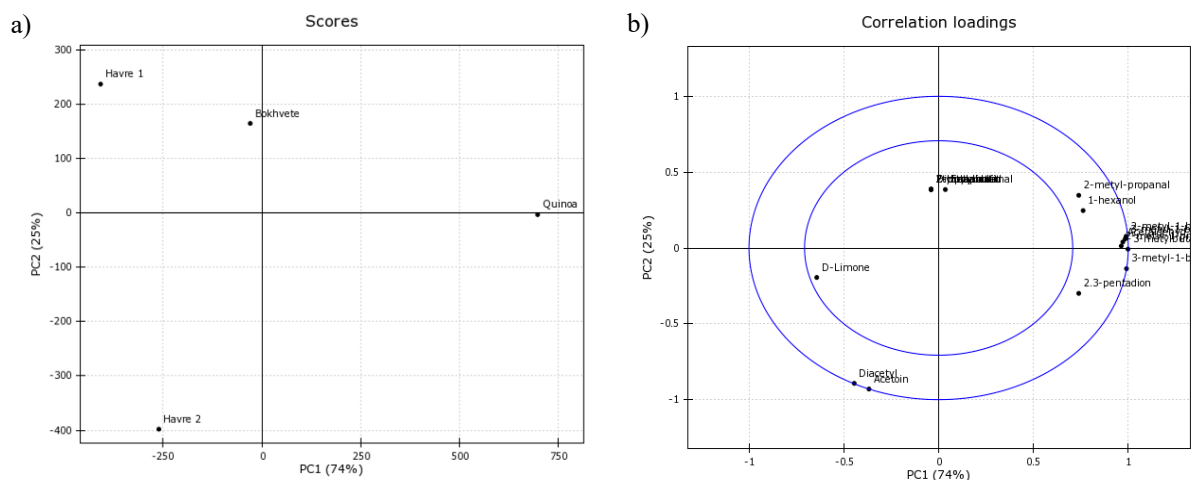


Ved GC-MS analyse ble det etter 24 timers fermentering i quinoa-surdeigen detektert  $1137,42 \pm 90,86$  ng/g 3-metyl-1-butanol, mens det i bokhvete og havre-2 ble detektert hhv.  $407,37 \pm 31,53$  ng/g og  $304,10 \pm 10,52$  ng/g. I havre-1 ble det kun detektert  $8,98 \pm 0,49$  ng/g 3-metyl-1-butanol. Verdiene fra GC-MS er semikvantitative, og ved HSGC ble det ikke detektert 3-metyl-1-butanol i surdeigen av havre-1 og havre-2, men ellers var trenden den samme ved begge målingene der surdeigen av quinoa hadde høyest verdi etterfulgt av bokhvete.

Oppgitte verdier fra GC-MS analysen (2-metylbutanal, 3-metylbutanal, D-Limone, 1-hexanol og 3-metyl-1-butanol) er semikvantitative og beregnede ekvivalenter av indre standarder. Verdiene kan dermed kun sammenlignes mot hverandre. Målinger utført med GC-MS ble kun utført en gang ved T24 (2 parallelle målinger).

#### 4.3.3.1 Principal component analysis (PCA)

For å evaluere korrelasjon og sammenhenger mellom de flyktige komponentene i surdeigene etter 24 timers fermentering, ble det gjennomført en «Principal component analysis (PCA) basert på data fra HSGC og GC-MS analyse (Figur 4.8). GC-MS analyser ble utført på ett uttak (to parallelle målinger), mens HSGC analyser ble utført tre ganger med en ukes mellomrom mellom hver måling. Dataene som er brukt i PCA-plottet er gjennomsnittstall fra 24 timers uttak (T24).



**Figur 4.8**

«Principal component analysis» (PCA) som viser a) «Sample comparison score» basert på de analyserte nivåene av flyktige komponenter etter 24 timers fermentering (T24), og b) «Correlation loadings» som viser korrelasjoner mellom variablene

De to første komponentene (PC1 og PC2) forklarer 99% av variasjonen i dataene. «Score»-plottet viser at surdeigen av havre-1, havre-2 og bokhvete er mest like hverandre, bortsett fra konsentrasjonene av diacetyl og acetoin, som havre-2 har høy korrelasjon til. Quinoa er veldig ulik de

tre andre surdeigene da de ligger langt fra hverandre på x-aksen (PC1), som forklarer 74% av variasjonen i dataene. Diacetyl og acetoin korrelerer sterkt med hverandre. D-Limone, acetoin og diacetyl har negativ korrelasjon til 2,3-pentadion og 3-metyl-1-butanol. Det vil si at i de surdeigene det ble detektert høye nivå av 2,3-pentadion og 3-metyl-1-butanol, ble det detektert lave nivåer av D-Limone, diacetyl og acetoin. Komponentene acetaldehyd, 3-metyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol og 3-metylbutanal hadde sterk positiv korrelasjon til hverandre. Det vil si at når en av komponentene ble detektert med høye verdier, ble de andre også detektert med høye verdier. Bokhvete ligger nærmest 2-butanon, 2-butanol, etylacetat, dimetylsulfid, etylpropionat og 2-metylbutanal i plottet. Havre-1 og havre-2 korrelerer negativt med de komponentene som quinoa korrelerer sterkt med, som viser at quinoa og havre-surdeigene er veldig ulike i forhold til produksjon av flyktige komponenter.

#### **4.4 Sensorisk evaluering**

Det ble utført en sensorisk evaluering av åtte glutenfrie brød der fire var bakt med surdeigene fra oppgaven og fire bakt med tradisjonell bakegjær. Evalueringen ble ikke utført som en blindtest med trent panel. Det var ment som en evaluering og diskusjon for å se på egnethet ved å bruke de fire surdeigene i glutenfritt brød. I tillegg ble egenskaper og forskjeller mellom de ulike brødene evaluert og diskutert. Tabell 4.4 gjengir evalueringer og kommentarer av brødene fra de som deltok på smakingen. I korte trekk ble brødene som var bakt med gjær bedømt som litt mindre kompakte enn surdeigsbrødene. Surdeigsbrødene hadde generelt mer syrlighet, aroma, ettersmak og bitterhet enn brødene med bakegjær. Havre-brødene ble best likt på smak, mens bokhvetebrødet av surdeig ble bedømt som mest syrlig. Quinoabrødet med surdeig hadde en gressaktig/erteaktig aroma, som ikke ble gjenkjent i quinoabrødet bakt med gjær.

**Tabell 4.4**

Kommentarer og evalueringer fra deltakerne ved smaksevaluering av åtte glutenfrie brød (fire med surdeig og fire med bakegjær). Ved tomme «ruter» ble det ikke gitt kommentarer.

Brød	Porestruktur	Volum HxB* (cm)	Fasthet	Kompakthet	Smuldreegenskaper	Tørt/saftig	Farge på krummen	Smak	Syrlighet
<b>Bokhvete surdeig</b>	Tett, veldig kompakt, jevne porer	6,5x12,0	Fast	Veldig kompakt		Veldig tørt	Lys gul, lys beige	Litt bitter ettersmak	Veldig syrlig
<b>Bokhvete gjær</b>	Jevnere enn bokhvete surdeig	6,0x12,5	Litt mer elastisk enn bokhvete surdeig	Litt mindre kompakt enn bokhvete surdeig			Grått	Mer nøytral smak	Ikke syrlig, mildt
<b>quinoa surdeig</b>	Jevn, småporet	5,5x12,2		Kompakt	Deigete	Deiget, saftig	Gul	Litt ettersmak, litt besk, "surfór", ertesmak, gress-smak	God syrlighet, passe syrlig
<b>Quinoa gjær</b>	Fin poring	5,8x12,8	Fast	Kompakt, passe	Litt sandete, litt smulete, mindre deigete	Saftig	Litt mindre gult	Nøytral smak, litt ertesmak	Ikke syrlig, mildt
<b>Havre-1 surdeig</b>	Større porer, ujevne, noe sprekker	6,6x13			Litt smulete	Deiget	Grå-gul	"Havre-smak"	Syrlig, passe syrlig
<b>Havre-1 gjær</b>	Større porer, ujevne, fin poring	5,6x17	Mykere, mer elastisk krumme	Virker mer åpent		Litt deiget	Grå-gul	Kornsmak, nøytral, god	Nøytralt
<b>Havre-2 surdeig</b>		5,9x14,4			Litt tørt	Tørr	Gul-grå	Mye ettersmak, bitter ettersmak	Syrlig, passe
<b>Havre-2 gjær</b>	Større porer, noe revner	5,3x16			Tørrere enn havre surdeig, litt tørt		Litt gråere enn havre-2 surdeig	God nøytral smak	

\* HxB = høyde x bredde målt i midten av brødet

Figur 4.9 viser bilde av krummen til alle de åtte brødene. Skorpen til surdeigbrødene hadde generelt en rødbrun fargetone, mens brødene med gjær hadde mer brun farge på skorpen. Også krummen hadde noen ulikheter i fargetone mellom brød bakt med surdeig og gjær. Alle brødene av bokhvete og quinoa var mer kompakte enn brødene bakt med havre. Havrebrødene bakt med surdeig var høyere enn havrebrød med gjær, som var bredere, men lavere.



**Figur 4.9**

Bilde av krummen til de åtte glutenfrie brødene bakt med havre, bokhvete og quinoa: a) bokhvete med surdeig b) bokhvete med gjær c) quinoa med surdeig d) quinoa med gjær e) havre-1 med surdeig f) havre-1 med gjær g) havre-2 med surdeig h) havre-2 med gjær

## 5.0 Diskusjon

### 5.1 Mikrobiell sammensetning i surdeigene

#### 5.1.1 Bakteriesammensetning

Sekvenseringsdata fra de fire surdeigene viste store ulikheter i den mikrobielle sammensetningen mellom de ulike surdeigene. Både totalsekvensering (Illumina) og sekvensering av isolat fra surdeigene (Sanger) viste dette. I løpet av den første uken var det en stor økning av MSB, noe som også vises i pH-målingene gjennomført den første uken der pH sank raskt i surdeigene, og stabiliserte seg etter en uke. Det var kun surdeigen av havre-2 som ikke hadde en like hurtig nedgang i pH. Denne surdeigen ble kun matet daglig i fem dager, etter det ukentlig, og pH i denne surdeigen var først stabil etter 3-4 uker. Det er vanlig praksis at surdeiger etableres ved daglige matinger i ca. 14 dager til det mikrobielle miljøet er stabilt nok til at den kan stå på kjøll og mates ukentlig. Det er derfor interessant at dominansen av MSB i uke 1 overtas av AAB (*Gluconobacter fraterii* og *Gluconobacter oxydans/roseus*) fra og med andre uke i surdeigen av havre-2. Dette er samme tid som surdeigen ble satt på kjøll og matet ukentlig. Det er svært sjeldent at et bakterielt økosystem i surdeig domineres av AAB, og det er som regel heller ikke ønskelig. AAB er obligat aerobe og helt avhengig av oksygen for å vokse, noe som det er begrenset tilgang til i surdeig. I surdeigen av havre-2 er deigutbyttet relativt høyt (DY=250), og denne surdeigen ble etter hvert tynn i konsistens sammenlignet med de andre surdeigene. Høyt deigutbytte der viskositeten er lav kan gi bedre tilgang til oksygen for AAB i følge De Vuyst et al. (2021). At matning av surdeigen gikk over til ukentlige matinger mens pH ennå var >5, i tillegg til at deigutbyttet og overflatevolumet var høyt grunnet stort fermenteringsglass, kan ha gitt gode vekstbetingelser for *Gluconobacter*.

Sammen med *Gluconobacter* var også *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*) til stede i litt mindre antall i surdeigen. Isolerte renkulturer av MSB fra uke 4, ble også identifisert som *L. plantarum*. Det er interessant at dette er samme kombinasjon av MSB og AAB som ved flere anledninger er funnet ved fermentering av kakaobønner. Fermentering av bønnene er svært viktig for å produsere sjokolade med god kvalitet. Den spontane fermenteringsprosessen foregår ofte i tre steg der gjær er dominant i starten, etterfulgt av en økning i MSB. AAB tar over mot slutten av fermenteringsprosessen hvor de omdanner den produserte etanolen fra gjær og MSB til eddiksyre (Chagas Junior et al., 2020). Ut fra 16S-dataene fra totalsekvenseringen av uttak ved T0 og T24 under metabolismeforsøkene, kan det se ut som andelen AAB er høyest ved T0, mens MSB øker i løpet av 24 timers fermentering. Det kan tyde på at veksten av AAB, som i kakaobønnene, er høyest etter gjær

og MSB er aktive, og i dette tilfellet etter de 24 timene med fermentering mens surdeigen står lagret på kjøll.

Ved isolering av MSB fra samme surdeig ble alle sekvenserte renkulturer identifisert som *L. plantarum/pentosus*. Det ble ikke isolert eddiksyrebakterier, men dette kan ha sammenheng med at mediene, som ble brukt, selekterer for melkesyrebakterier og *Lactobacillus* spp.

I de tre andre surdeigene av havre-1, bokhvete og quinoa ble det tidlig etablert en dominans av MSB i surdeigene, som holdt seg stabil gjennom de åtte ukene surdeigene ble analysert. I surdeigen av havre-1 er andelen *Bacillus* høy i de første dagene av etableringen, også *Weisella*, *Leuconostoc* og *Pantoea* er til stede, men etter en uke domineres surdeigen av *Leuconostoc*. Av alle sekvenserte 16S-dataene fra surdeigen gjennom åtte uker, var 65% like, og identifisert som *Leuconostoc pseudomesenteroides*. I prøven fra åttende uke var andelen 89%. Også isolering av MSB i uke 2 viste en overvekt av *Leuconostoc* der 6 av 7 isolat ble identifisert som ulike arter av *Leuconostoc* og den siste ble identifisert som *P. pentosaceus/E. durans*.

Ved spontanfermentering av en vann-melmiks er opprinnelige bakterier fra melet ofte til stede i starten. Dette kan være proteobakterier, stafylokokker og MSB, tilhørende enterokokker, laktokokker og streptokokker. I løpet av kort tid vil vekst av opprinnelige MSB fra ulike slekter av *Lactobacillaceae*, gi en rask senking av pH. Dette er ofte ulike arter fra *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Weisella* (De Vuyst et al., 2021). Disse forblir vanligvis bare i en mellomfase av fermenteringen og vil etter hvert bli utkonkurrert av surdeigsspesifikke MSB som forblir stabile i økosystemet til en moden surdeig. Typiske surdeigsspesifikke MSB er *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), *Limosilactobacillus fermentum* (*Lactobacillus fermentum*), *Companilactobacillus paralimentarius* (*Lactobacillus paralimentarius*), *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *Fructolactibacillus sanfranciscensis* (*Lactobacillus sanfranciensis*) og *Pediococcus pentosaceus* (De Vuyst et al., 2021).

I surdeigen av havre-1 ble ikke *Leuconostoc* utkonkurrert av surdeigsspesifikke MSB, slik som ofte er vanlig i et surdeigsmiljø. Få studier er tidligere utført på mikrobiell sammensetning i spontanfermentert havre-surdeig. En studie av Hüttner et al. (2010) der MSB ble isolert fra spontanfermenterte surdeiger av havre (28°C og 37°C), viste at surdeigen etablert ved 28°C var dominert av *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Weisella*, mens surdeigen etablert ved 37°C var dominert av *Loigolactobacillus coryniformis* (*Lactobacillus coryniformis*). Også Hajinia et al. (2020) utførte en studie på havre-surdeig (fermentert ved 37°C) der dominante og isolerte MSB ble identifisert som *P. pentosaceus*. Komponenter som flavanoider, tanniner og ulike enzymer i havremel kan ha antimikrobielle egenskaper (De Vuyst et al., 2017). Dette kan være med å påvirke utviklingen av det

mikrobielle miljøet i surdeig laget av havre, men også andre faktorer som høy bufferkapasitet kan gi bedre betingelser for mer syre-sensitive MSB.

I surdeigene av havre-2 og quinoa er også *L. pseudomesenteroides* til stede i tidlig fase av etableringen. I quinoa blir de etter hvert utkonkurrert av andre mer syretolerante MSB, men det er interessant at i havre-2 forblir *Leuconostoc* til stede, dog i mindretall, det vil si at den blir ikke utkonkurrert.

I surdeigen av bokhvete var det den første uken en dominans av *Latilactobacillus graminis/curvatus* (*Lactobacillus graminis/curvatus*), som etter hvert fra uke 2 ble overtatt av *P. pentosaceus* (mest dominerende), sammen med *Lev. brevis*. Også dyrkningsavhengig metode der isolerte MSB fra 2 uker gammel surdeig ble sekvensert, ble alle identifisert som *P. pentosaceus*. Dette er med på å bekrefte dominansen til denne bakterien i surdeigen. *P. pentosaceus* er en homofermentativ MSB, og den vil derfor ikke bidra til produksjon av CO<sub>2</sub> i deigen, men studier har vist at bakterien kan bidra positivt til smak, tekstur og næringsinnhold i mat, i tillegg til å ha antimikrobielle egenskaper. Den kan produsere større mengder EPS, og noen stammer kan også ha probiotiske egenskaper som anti-inflammatoriske, krefthemmende, antioksidant, detoksifiserende og lipidreducerende egenskaper (Abid et al., 2018; Franco et al., 2021; Ilavenil et al., 2016; Jiang et al., 2021; Kim et al., 2019; Won et al., 2020; Yin et al., 2020; Yuksekdağ & Aslim, 2010).

Det har ved flere tilfeller tidligere også blitt rapportert om funn av *P. pentosaceus* i surdeig av bokhvete. Moroni et al. (2011) utførte PCR-DGGE av spontanfermentert bokhvete (DY 200, 25°C) der de fra femte dag identifiserte *L. plantarum*, *W. cibaria*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Latilactobacillus sakei* (*Lactobacillus sakei*), *L. graminis* og *P. pentosaceus*. Det interessante i denne studien var at intensiteten til blant annet *P. pentosaceus* økte utover i fermenteringsperioden, mens *L. plantarum* og *W. cibaria*-konsentrasjonen sank. Dette samsvarer med funnene i denne oppgaven der dominansen av *P. pentosaceus* økte etter den initiale fermenteringsfasen.

Flere forfattere har også beskrevet *L. plantarum* som en konkurransedyktig MSB i bokhvete-surdeig, som flere ganger er isolert fra surdeig av bokhvete (Moroni et al., 2010; Vogelmann et al., 2009) Denne bakteriearten ble ikke identifisert i bokhvete-surdeigen i denne oppgaven.

I quinoa er *W.confusa/cibaria* relativt dominant i starten av fermenteringen. Også *L. pseudomesenteroides*, *P. vagans*, *P. dispersa*, *Lactococcus lactis/cremoris*, *Lactococcus taiwanensis* og *P. pentosaceus* er til stede i de første dagene av etableringen av surdeigen. Fra uke en til to er det en økning i andelen *P. pentosaceus*, *L. plantarum/paraplantarum/pentosus/fabifermentans* og *L. pseudomesenteroides*. Fra andre uke og utover øker andelen av *Lev. brevis*, og den blir etter hvert dominerende i surdeigen. Andelen øker uke for uke og ved uke åtte ble 82% av 16S-sekvensene

identifisert som *Lev. brevis*. Også en liten andel *Lactiplantibacillus* og uklassifisert *Lactobacillus* er til stede i det stabile økosystemet som etableres i surdeigen.

Heller ikke i surdeig av quinoa er det utført mange tidligere studier på den mikrobielle sammensetningen. Franco et al. (2020) gjorde en studie der de ved åttende dagen av seks spontanfermenterte surdeiger av quinoa (rød, svart og hvit quinoa) isolerte og identifiserte ulike bakteriearter fra *Pediococcus*, *Leuconostoc* og *Lactobacillus*-slekten. Ingen av isolatene som ble identifisert var *Lev. brevis*, men dette var tidlig i etableringen av surdeigene (8 dager), og tidsmessig er funnene sammenlignbare med bakterieartene som ble identifisert en uke etter start etablering (QU1) i quinoa-surdeigen i denne studien.

Ved dyrking og isolering av bakterier fra quinoa-surdeigen i uke 2, ble *L. plantarum/pentosus*, *E. durans* og *P. pentosaceus* identifisert. Dette stemmer godt overens med funnene ved Illumina sekvenseringen i samme uke, men det er interessant å merke seg at selv om *Lev. brevis* ble identifisert med en tilstedeværelse på 38% ved Illumina sekvensering i samme tidsperiode, ble ikke denne funnet blant de isolerte bakteriene fra surdeigen.

### 5.1.2 Gjærsammensetningen

Gjærforekomstene i de fire surdeigene var også svært ulik hverandre. I surdeigen av havre-1 ble det ikke funnet sopp, hverken ved utplating på YM- og RB-agar eller ved Illumina sekvensering. Det har også vært rapportert at det ikke ble funnet gjær ved flere tidligere studier på surdeig av havre (De Vuyst et al., 2021; Hajinia et al., 2020; Hüttner et al., 2010; Moroni et al., 2011; Sørensen et al., 2010; Vogelmann et al., 2009). Dette gjelder særlig surdeiger etablert under laboratorieforhold (aseptiske forhold), og forklares ved at det kan være til stede endogene sopphekkende komponenter i melet. Det samme gjelder også for bokhvete (De Vuyst et al., 2021).

I de tre andre surdeigene (havre-2, bokhvete og quinoa) ble det i løpet av den første uken etablert en dominans av en gjærart i surdeigene av bokhvete og quinoa. Dette var *Wickerhamomyces anomalus* (bokhvete) og *Torulaspota delbrueckii* (quinoa). Allerede en uke etter etablering av surdeigene var disse gjærartene til stede med >70% av soppforekomsten. Identiteten og dominansen av en gjærart i surdeigen av bokhvete og quinoa samsvarer med resultatene fra den dyrkningsavhengige metoden, der alle identifiserte gjær var samme gjærart. I surdeigen av havre-2 viste de to ulike metodene (dyrkningsavhengig og dyrkningsuavhengig) to ulike gjær. *Cyberlindnera fabianii* (tidligere kalt *Candida fabianii*) ble identifisert ved Illumina sekvensering og *Clavispora lusitaniae* ble identifisert ved Sanger sekvensering. Det er vanskelig å si hvorfor ulike gjærarter ble funnet ved de to metodene. Ved identifisering av renkulturer fra surdeigen, ble kun fire av de isolerte gjærkulturene valgt ut til



identifisering ved Sanger sekvensering. Det kan være en tilfeldighet at det ikke ble identifisert *C. lusitaniae* blant de isolerte gjærkulturene, men det er likevel vanskelig å forklare hvorfor *C. lusitaniae* ikke ble funnet ved Illumina sekvensering av prøvene. Begge gjærartene er maltose-negative ved fermentering (Obinna-Echem et al., 2014; Rijswijk et al., 2019), og det er få rapporterte tilfeller der disse er isolert fra surdeig (Korcari et al., 2019). *Clavispora lusitaniae* er blant annet ofte funnet i forbindelse med produksjon av tequila og andre fermenterte drikker fra agaveplanten (Escalante-Minakata et al., 2008; Navarrete-Bolaños et al., 2021; Pérez-Brito et al., 2015; Verdugo Valdez et al., 2011), mens *C. fabianii* er mest kjent som en opportunistisk patogen, som i sjeldne tilfeller kan føre til soppinfeksjon hos mennesker (Park et al., 2019). At begge gjærartene er maltose-negative og avhengig av tilgjengelig glukose for vekst, kan tyde på at det har dannet seg gjensidige relasjoner mellom gjær og maltose-positive MSB i surdeigen.

I surdeigen av bokhvete ble alle gjærisolatene fra uke 2 som ble identifisert ved Sanger sekvensering, identifisert som *W. anomalus*. Illumina-sekvenseringen viste også dominans av denne gjæren, da hovedandelen av ITS-sekvensene fra prøveuttak i uke 2 til 8 ble identifisert som *W. anomalus*. Tilstedeværelsen av *W. anomalus* var svært stabil gjennom de åtte ukene surdeigen ble studert. Denne gjæren er ikke uvanlig å finne i et surdeigsmiljø. I en gjennomgang av 394 spontanfermenterte surdeiger ble denne gjæren funnet i 6% av surdeigene (tredje mest vanlige). *Saccharomyces cerevisiae* ble funnet i 68% av surdeigene, og er med det den gjærarten som er absolutt mest vanlig i surdeig (Van Kerrebroeck et al., 2017). I en studie av Daniel et al. (2011) ble *W. anomalus* funnet som den andre mest isolerte gjæren i surdeig fra belgiske bakeri, etterfulgt av *S. cerevisiae*. Det ble også funnet at *W. anomalus* er mer vanlig i laboratoriesurdeig sammenlignet med surdeig etablert andre steder (De Vuyst et al., 2021). Dette kan ha sammenheng med at *W. anomalus* oftere er til stede i melet enn *S. cerevisiae*, men at *S. cerevisiae* ofte er til stede i miljøet der surdeig lages, og at det derfor ikke er uvanlig at *S. cerevisiae* blir introdusert til surdeigen via «kontaminering» fra omgivelsene.

*Wickerhamomyces anomalus* er en allsidig gjær som finnes og trives under mange ulike forhold. Den kan tilpasse seg ulike forhold, metabolisere mange ulike karbonkilder, deriblant maltose, og trives i stressende miljø (lav pH, lav vannaktivitet og osmotisk stress), som gjør at den ofte kan utkonkurrere andre sopparter, og lett vil tilpasse seg miljøet i surdeig (Daniel et al., 2011). Det er interessant at det i flere tidligere studier ikke er funnet tilstedeværelse av gjær i laboratorie-surdeiger av bokhvete. Antimikrobiell aktivitet fra flavanoider og tanniner i melet oppgis som mulige årsaker (De Vuyst et al., 2016; Moroni et al., 2011; Vogelmann et al., 2009).

I surdeigen av quinoa ble tilstedeværelsen av *T. delbrueckii*, som dominerende gjær funnet både ved Sanger sekvensering og Illumina sekvensering. Heller ikke *T. delbrueckii* er uvanlig å finne i et

surdeigsmiljø. I samme gjennomgang, som nevnt tidligere, der 394 surdeiger ble undersøkt, var også *T. delbrueckii* den gjæren som var tredje mest vanlig (6% forekomst) i tradisjonell surdeig.

*Torulaspora delbrueckii* brukes noe i forbindelse med vin-fermentering da den bidrar positivt til smak og har lav produksjon av ikke-ønskede komponenter som acetaldehyd, acetoin, eddiksyre og etylacetat (Renault et al., 2009; Renault et al., 2015). Den er maltose-positiv, har god toleranse for osmotisk stress og lave temperaturer, og har også vist seg å ha tilnærmet lik CO<sub>2</sub>-produksjon og heveegenskaper som bakegjær (Alves-Araújo et al., 2007). Den er i så måte en godt egnet kandidat for surdeigsfermentering.

### 5.1.3 De mikrobielle forskjellene mellom surdeigene

Både de dyrkningsavhengige og dyrkningsuavhengige metodene i denne oppgaven viser at det var store forskjeller i mikrofloraen mellom de fire surdeigene. I surdeigene som inneholdt gjær, ble det identifisert en dominant gjærart i bokhvete- og quinoa-surdeigen, mens i surdeigen av havre-2 ble to ulike gjærarter identifisert ved de to metodene, og det er grunn til å tro at begge disse gjærartene var til stede i surdeigen.

Alle de fire surdeigene gjennomgikk de tre typiske bakterielle etableringsfasene der de opprinnelige bakteriene fra melet raskt ble utkonkurrert av MSB. Noe som førte til en rask nedgang i pH. De første MSB, som etablerte seg, ble bare værende i en mellomfase. De ble i løpet av 1-2 uker utkonkurrert av andre bakterier (hovedsakelig MSB), som forble stabile gjennom de åtte ukene surdeigene ble analysert.

Selv om de fire surdeigene gjennomgikk tilsvarende faser fra etablering til stabil mikrobiota, viser sekvensdataene svært ulik mikrobiell sammensetning der både bakterie- og gjærforekomstene var ulike. Sammenlignet med tilsvarende studier på tradisjonelle surdeiger laget på hvete og rug, var den mikrobielle sammensetningen i bokhvete- og quinoa-surdeigen ikke veldig ulik et typisk økosystem som etableres i tradisjonelle surdeiger. Gjæren i begge surdeigene har blitt isolert fra tradisjonelle surdeiger ved flere anledninger, og MSB både fra mellomfasen og ved stabilt miljø, er regnet som typiske surdeigs-MSB, spesielt artene som ble identifisert i quinoa.

Mikrobiotaen i surdeigene av havre skilte seg mer ut i forhold til tradisjonelle surdeiger. I havre-2 etablerte det seg en dominans av AAB, som er svært uvanlig i et surdeigsmiljø. De er ofte til stede i mindre mengder, men dårlig tilgang på oksygen i deigen vil sjelden gi en dominans av AAB. Også gjærforekomsten i denne surdeigen var veldig ulik det som er rapportert tidligere ved tilsvarende studier på tradisjonelle surdeiger. I surdeigen av havre-1 ble det ikke funnet gjær og

bakterieforekomsten i stabil surdeig var nesten utelukkende *Leuconostoc*. Denne bakterien er ofte til stede i en etableringsfase av surdeig da den er mer syre-sensitiv, og ofte utkonkurreres av mer syretolerante MSB, vanligvis fra den «opprinnelige» slekten *Lactobacillus*. Den relativt høye pH-en i surdeigen, sannsynligvis på grunn av høy bufferkapasitet og lav næringstilgang, kan ha gitt bedre konkurransebetingelser for *Leuconostoc*.

Fra start av etableringen av surdeigene og gjennom de åtte ukene de ble analysert, ble de matet og vedlikeholdt under aseptiske forhold. Det er derfor grunn til å anta at opphavet til mikroorganismene kom fra melet. Ulikheter i den mikrobielle sammensetningen i de fire surdeigene, viser at substratet har stor påvirkning på hvilket økosystem som etableres i en surdeig. Forhold i melet, som for eksempel opprinnelige mikroorganismer til stede, næringsstoffer, antimikrobielle komponenter og endogene enzymer i melet, er mest sannsynlig viktige faktorer til utviklingen av det mikrobielle økosystemet i surdeigen.

## 5.2 Vekst og metabolismestudier av surdeigene

Vekst av både bakterier og gjær ved utplating på MRS- og RB-agar viste at celletallet i surdeigene lå på  $>9$  log kde/g for bakterier og  $>7$  log kde/g for gjær. Dette er i henhold til det som er vanlig i surdeig, der gjær:bakterietallet ofte er 1:10-100 (De Vuyst et al., 2021; Rehman et al., 2006). Det var liten endring (ca 0,28-0,37 log kde/g for bakterier og 0-0,21 log kde/g for gjær) i celletallene fra T0 til T24 i metabolismeforsøkene. Dette kan ha sammenheng med at høy andel surdeig (50%) ble brukt ved matingen av surdeigene, og at det var lav metabolsk aktivitet i flere av surdeigene.

Som forventet var det en pH-nedgang i alle surdeigene i løpet av fermenteringstiden. Quinoa hadde lavest pH etter fermentering, differansen i pH fra T0 til T24 var størst i surdeigen av bokhvete, mens i havre-surdeigene var differansen minst, og pH lå også høyest i havre-surdeigene etter fermentering, sammenlignet med de andre surdeigene. Den største pH-nedgangen i bokhvete-surdeigen kan ha sammenheng med at denne surdeigen var dominert av homofermentative MSB, som hovedsakelig produserer melkesyre ved fermentering. I en studie av Hüttner et al. (2010), målte de tilsvarende pH i havresurdeiger etter 24 timers fermentering ved 28°C og 37°C, som ble målt i havre-surdeigene i denne oppgaven. Den høye pH-en kan forklares med den mikrobielle sammensetningen, tilgangen på fermenterbare karbohydrater og /eller høy bufferkapasitet i deigen, selv om også bokhvete og quinoa er kjent for å ha høy bufferkapasitet. (Chen et al., 2020; Rühmkorf et al., 2012). I begge havre-surdeigene etablerte det seg en stabil bakteriesammensetning, som ikke er typisk for tradisjonelle surdeiger. Dette kan ha sammenheng med forholdsvis høy pH i deigene, som ofte stimulerer mer syre-sensitive MSB (De Vuyst et al., 2017).

Målte verdier av melkesyre og eddiksyre var høyest i surdeigen av quinoa og lavest i havre-surdeigene, noe som sannsynligvis henger sammen med at det var vesentlig høyere konsentrasjon av maltose og glukose ved T0 for quinoa-surdeigen enn for havre-surdeigene. Det var kun i surdeigen av quinoa at en liten andel maltose ikke var omsatt etter 24 timers fermentering. For de andre var begge sukkerkomponentene fullstendig omsatt i løpet av fermenteringsperioden. Høy eddiksyreproduksjon i quinoa-surdeigen har mest sannsynlig sammenheng med dominansen av heterofermentative *Lev. brevis* (*Lb. brevis*), som produserer eddiksyre i tillegg til melkesyre og CO<sub>2</sub>.

Det kan være mange ulike årsaker til hvorfor det var så store forskjeller i pH-nedgang og produksjon av organiske syrer. Ved mating av surdeigene ble en høy andel surdeig brukt (50%), mens andelen mel tilsatt var relativt lav. Dette kan ha gitt begrenset tilgang på karbohydrater under fermentering. Meltypene har også ulik mengde og sammensetning av karbohydrater, i tillegg kan forskjeller i aktiviteten og mengden endogene plantezymer i de forskjellige meltypene, gi ulik nedbrytning av tilgjengelig stivelse.

Det er interessant at surdeigen av havre-2 hadde lavere produksjon av eddiksyre enn surdeig av bokhvete og quinoa all den tid *Gluconobacter frauterii* var den dominerende bakterien i denne surdeigen. Det er vanskelig å si hvorfor det er sånn ut fra analysene som er gjort i denne studien, men det kan se ut som surdeigen av havre-2 hadde lavest metabolsk aktivitet av de fire surdeigene. Dette kan ha sammenheng med lav konsentrasjon av tilgjengelige fermenterbare karbohydrater i løpet av fermenteringstiden.

CO<sub>2</sub> produsert i løpet av 24 timers fermentering var også betraktelig høyere i surdeigen av quinoa, og lavest i surdeigen av havre-2, etterfulgt av bokhvete og havre-1. Som nevnt tidligere har den dominerende gjæren i quinoa, *T. delbrueckii*, vist ved tidligere studier at den har tilnærmet like gode heveegenskaper, i form av CO<sub>2</sub>-produksjon, som *S. cerevisiae*. Maltose- og glukosekonsentrasjonen var også høyest i denne surdeigen. I tillegg vil heterolaktisk fermentering fra *Lev. brevis* bidra til CO<sub>2</sub>-produksjon i quinoa-surdeigen. I surdeigen av bokhvete var den homofermentative melkesyrebakterien, *P. pentosaceus*, mest dominerende. Den omdanner mesteparten av sukkeret til melkesyre, og vil derfor ikke bidra med CO<sub>2</sub>-produksjon. Det kan være en medvirkende årsak til lav CO<sub>2</sub>-produksjon, selv om det ble målt relativt høye verdier av maltose ved T0, og den hadde en stor andel gjær til stede. I surdeigen av havre-1 var det ikke gjær til stede. CO<sub>2</sub> i denne surdeigen er mest sannsynlig produsert av *Leuconostoc*, fra heterolaktisk fermentering der sukker blir omdannet til melkesyre, eddiksyre, etanol og CO<sub>2</sub>. Det er interessant at denne surdeigen hadde mer produksjon av CO<sub>2</sub> enn surdeigen av havre-2 og bokhvete, til tross for at havre-1 ikke inneholdt gjær. Den lave produksjonen av CO<sub>2</sub> i havre-2 kan forklares med dominansen av AAB, og at den tilstedeværende

gjæren ikke er en stor CO<sub>2</sub>-produsent. Som nevnt tidligere, kan også den lave tilgangen på karbohydrater ha vært en årsak til lav CO<sub>2</sub>-produksjon i havre-2.

Det var også store forskjeller mellom de fire surdeigene i produksjon av flyktige komponenter. Spesielt quinoa skilte seg ut fra de andre surdeigene med høy korrelasjon til flere aldehyder og høyere alkoholer. Siden også CO<sub>2</sub>-nivået og produksjon av organiske syrer var mye høyere i surdeigen av quinoa, enn i de andre surdeigene, kan det bety at det var gode vekstbetingelser for *Lev. brevis* og *T. delbrueckii* i denne surdeigen.

En gjennomgang av Pétel et al. (2017) av 26 tidligere studier/analyser av flyktige komponenter i ulike surdeiger og surdeigsbrød av hvete og rug, fant de at 196 ulike aromakomponenter var rapportert. Tidligere studier har også vist at den mikrobielle sammensetningen i surdeigen, i stor grad styrer hvilke komponenter som blir produsert. Gjærfermentering og homo- og heterolaktisk MSB fermentering vil generere ulike flyktige komponenter, da de metabolske prosessene er ulike. Også ulike arter og stammer av MSB og gjær, i tillegg til trofiske samhandlinger mellom ulike mikroorganismer, kan gi ulikheter i hvilke komponenter som produseres (Hansen & Hansen, 1996; Rehman et al., 2006). Gjær produserer blant annet 2-metyl-1-propanol, 2,3-metyl-1-butanol og andre iso-alkoholer fra aminosyrer, mens heterolaktisk MSB produkter er dominert av etylacetat, ulike alkoholer og aldehyder. Homofermentative MSB produserer hovedsakelig diacetyler og carbonyler (Rehman et al., 2006).

I surdeigen av havre-1 ble det ikke produsert alkoholer som 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol og 2-butanol. Heller ikke aldehydene 2-metylpropanal, 2-metylbutanal og 3-metylbutanal ble detektert i surdeigen. Dette kan forklares med at det ikke var til stede gjær i denne surdeigen da disse komponentene som regel produseres av gjær. Det ble detektert høyest verdier av høyere alkoholer i quinoa-surdeigen. For eksempel regnes 3-metyl-1-butanol som en viktig aromakomponent i brød (Hansen & Hansen, 1996), og i PCA-plottet viste quinoa høy korrelasjon med denne komponenten. Ved HSGC-analysen ble det detektert 17,81±0,43 ppm i quinoa-surdeigene etter 24 t, mens i de tre andre surdeigene ble det detektert lite eller ingen 3-metyl-1-butanol. Det ble også detektert 3-metyl-1-butanol ved GC-MS analyse. Quinoa-surdeigene hadde også desidert høyest konsentrasjon ved denne målingen (1137,42 ± 90,86 ng i.s.e./g), etterfulgt av bokhvete (407,37 ± 31,53 ng i.s.e./g), havre-2 (304,10 ± 10,52 ng i.s.e./g) og havre-1 (8,98 ± 0,49 ng i.s.e./g). Disse dataene (GC-MS) er semikvantitative, men forteller likevel at quinoa hadde høyest produksjon av denne komponenten.

I surdeigen av havre-2 ble de fleste flyktige komponentene (som ble analysert) detektert ved lave eller ikke tilstedeværende konsentrasjoner. De lave konsentrasjonene av flyktige komponenter i havre-2 sammenfaller med den lave produksjonen av organiske syrer og CO<sub>2</sub>. Det kan se ut som det var lav

tilgang på næringsstoffer for mikroorganismene i denne surdeigen, som førte til lav metabolsk aktivitet. De eneste komponentene som utmerket seg i surdeigen av havre-2 var diacetyl og acetoin, som ble detektert ved relativt høye konsentrasjoner, henholdsvis  $10,15 \pm 0,72$  ppm og  $594,85 \pm 29,81$  ppm, etter 24 t fermentering. Diacetyl blir redusert til acetoin og 2,3-butanediol, og disse tre komponentene er ofte til stede samtidig. Diacetyl har lav smaksterskel, og gir en smøraktig aroma, mens acetoin ikke påvirker smak i like stor grad. Det er funnet flere stammer av AAB som omdanner melkesyre til acetoin via alfa-acetolaktat reaksjonsveien (Chagas Junior et al., 2020). Om dette er tilfellet for de høye konsentrasjonene av diacetyl og acetoin i surdeigen av havre-2, er vanskelig å si ut fra analysene som er utført i denne studien.

I quinoa ble det detektert høyere konsentrasjoner av acetaldehyd enn i de tre andre surdeigene. Acetaldehyd, har i studier blitt positivt korrelert med smaken på hvetebrød (Hansen & Hansen, 1996), og kan være produkter av både MSB-, gjær-metabolisme og lipidoksidering (Rehman et al., 2006).

I bokhvete ble esteren etylacetat detektert i relativt høye konsentrasjoner, sammenlignet med de andre surdeigene. Denne komponenten er i hovedsak relatert til gjær- og heterolaktisk MSB fermentering, og gir en gressaktig aroma (Pétel et al., 2017). I bokhvete var den dominerende MSB *P. pentosaceus*, som er homofermentativ. Etylacetat er derfor mest sannsynlig produsert av *Wickerhamomyces anomalus*, i tillegg til at heterofermentative *Lev. brevis*, som ble funnet i mindre mengder i surdeigen, også kan ha bidratt til produksjon av etylacetat.

D-Limone ble detektert i alle surdeigene (høyest i havre-1 og lavest i quinoa), mens 3-metylbutanal ble detektert i surdeigene av quinoa, bokhvete og havre-2 (høyest i quinoa og lavest i havre-2). Begge disse komponentene har svært lav smaksterskel (D-Limone: 8-15 ppb, 3-metylbutanal: 0,2-2 ppb) (Pétel et al., 2017). Ved en studie av Chiş et al. (2019) ble quinoamuffins, laget med quinoa-surdeig, analysert for aromakomponenter før og etter steking, i tillegg til sensorisk analyse av muffinsene. I studien ble aromaer som fruktig, sitrus og sjokolade positivt korrelert med komponentene D-Limone og 3-metylbutanal. Konsentrasjonen av 3-metylbutanal i denne surdeigen er i samme størrelsesorden som konsentrasjonen de fant i den nevnte studien.

Produksjon av etanol i de ulike surdeigene kan også se ut til å variere mye mellom surdeigene. Selv om verdiene var semikvantitative viser likevel analysen at quinoa produserte mye høyere verdier av etanol enn de andre surdeigene, med ca 28000 ppm etter 24t. Etanol produseres både fra heterofermentative MSB og gjær. Den høye etanolproduksjonen i quinoa samsvarer med den høye CO<sub>2</sub>-produksjonen i surdeigen og tilstedeværelse av *Lb. brevis* og *T. delbrueckii*. Den lave konsentrasjonen i havre-2-surdeigen kan ha sammenheng med at noe etanol sannsynligvis er omdannet til eddiksyre da surdeigen var dominert av eddiksyrebakterier.

### 5.3 Bakeforsøk og sensorisk evaluering

Et bakeforsøk ble utført der åtte glutenfrie brød ble bakt – fire med surdeig og fire med bakegjær. Etterpå ble en sensorisk evaluering utført der struktur, volum, tekstur og smak ble diskutert. Evalueringen ble ikke utført i henhold til vanlig praksis med trenet panel og blindprøver. Det ble heller ikke utført HPLC eller HSGC for å sammenligne konsentrasjoner av ulike komponenter i brødene mot den sensoriske evalueringen. Det var ment som en diskusjon for å se hvordan surdeigene oppførte seg under baking og hvordan de opplevdes ut fra et sensorisk perspektiv.

Som forventet hadde alle de fire brødene, som ble bakt med surdeig, en syrlig smak. Bokhvete ble bedømt som det mest syrlige brødet, mens surdeigbrødene av havre og quinoa ble bedømt som passe syrlige. Det er ikke mulig ut fra denne evalueringen å si hvorfor bokhvete opplevdes mest syrlig. I metabolismeforsøkene hadde quinoa høyest produksjon av både melkesyre og eddiksyre, og man kunne derfor se for seg at dette brødet ville opplevdes som mest syrlig. Men smaksbildet er ofte komplekst og mange faktorer kan spille inn på hvordan syrligheten i et brød vil oppleves. Dessuten ble det, som nevnt tidligere, ikke utført en analyse av de organiske syrene i brødene.

Fargen på skorpen til surdeigsbrødene hadde en rødgyllen farge, sammenlignet med brødene bakt med gjær, som var mer brune i fargen. Maillardreaksjoner mellom redusert sukker og aminosyrer gir farge på skorpen under steking, og ved surdeigsfermentering er det ofte mer tilgjengelige aminosyrer fra fermenteringsprosessen. Dette kan ha vært en medvirkende årsak til fargeforskjellene på skorpen.

Surdeigsbrødet av quinoa skilte seg ut på smak ved at det hadde en gressaktig, ertelignende aroma. Denne aromaen var ikke like fremtredende i quinoabrødet med bakegjær. I metabolismeforsøkene ble det målt relativt høye konsentrasjoner av acetaldehyd i surdeigen av quinoa, faktisk den høyeste blant surdeigene. Denne komponenten er kjent for å gi en bitter, gressaktig aroma, og finnes blant annet i yoghurt (Robinson, 2002). Det er mulig at den gressaktige aromaen i surdeigsbrødet av quinoa kom fra denne aromakomponenten, men her også måtte det vært utført en analyse på flyktige komponenter i brødet, for å kunne si noe sikkert om denne sammenhengen.

I metabolismeforsøkene ble det detektert høye verdier av diacetyl i surdeigen av havre-2. Dette er en komponent som gir en smøraktig aroma, og har en lav smaksterskel. Derfor kunne man forventet at denne komponenten skulle vært gjenkjenbar ved smakingen av brødet, men den ble ikke gjenkjent i surdeigsbrødet. Siden det er en flyktig komponent med lavt kokepunkt, er det mulig at den fordampet under steking.

Alle brødene hadde hevet i løpet av hevetiden. Det ble ikke benyttet bakeformer ved steking av brødene, så variasjon i volum kan skyldes større/eller mindre grad av utflyting av deigene. Likevel ble det vurdert at alle brødene hadde porer/huller, som et resultat av heving. Det var heller ikke veldig store forskjeller i porestrukturen mellom brødene bakt med surdeig kontra de bakt med bakegjær. Det kan tyde på at det har vært produksjon av CO<sub>2</sub> under fermentering, både ved surdeigsfermentering og gjærfermentering (bakegjær).



## 6. Oppsummering og videre arbeid

Funnene i denne oppgaven har vist at ulike meltyper som havre, bokhvete og quinoa gir ulike vekstbetingelser og danner svært ulike mikrobielle samfunn, ved etablering av spontanfermenterte surdeiger under aseptiske forhold. To ulike metoder for identifisering av bakterier og sopp – dyrkningsavhengige og dyrkningsuavhengige – ga informasjon om hvilke bakterier og sopp som etablerte seg i surdeigene og hvor stabile disse økosystemene var over åtte uker fra etablering.

Alle surdeigene etablerte en stabil mikroflora i løpet av de første to ukene med daglige matinger, utenom surdeigen av havre-2 som brukte noe lengre tid, men dette kan relateres til at surdeigen gikk over til ukentlige matinger før den mikrobielle sammensetningen var stabil. I surdeigen av havre-1 ble det ikke funnet tilstedeværelse av gjær, mens *Leuconostoc pseudomesenteroides* var den dominerende MSB med over 80% tilstedeværelse. Surdeigen av havre-2, etablerte en mikroflora som er uvanlig for surdeig, da den var dominert av eddiksyrebakterier (*Gluconobacter frauterii* og *Gluconobacter oxydans/roseus*) og to gjærarter som vanligvis ikke blir isolert fra tradisjonelle surdeiger (*Clavispora lusitaniae* og *Cyberlindnera fabianii*). Surdeigene av bokhvete og quinoa hadde en mikroflora som var mer lik de tradisjonelle surdeigene av hvete og rug. I surdeigen av bokhvete var dominerende gjær *W. anomalus*, mens bakteriesammensetningen var dominert av *P. pentosaceus* sammen med *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*). I quinoa-surdeigen ble *Torulaspora delbrueckii* identifisert som dominerende gjærart, og *Lev. brevis* (*Lb. brevis*) som dominerende MSB.

Siden surdeigene ble etablert under aseptiske forhold er det grunn til å anta at opphavet til startfloraen kom fra melet. Underveis har sannsynligvis ulikheter i næringstilgang (karbohydrater, aminosyrer, fettsyrer, mineraler og vitaminer), endogene planteenzymmer, bufferkapasitet og antimikrobielle komponenter i melet, gitt ulike vekst- og konkurransebetingelser for mikroorganismene i surdeigene.

Metabolismestudiene viste også store ulikheter mellom de ulike surdeigene. Surdeigene av havre hadde lavest metabolsk aktivitet, da det ble produsert lave konsentrasjoner av organiske syrer og CO<sub>2</sub>. Analysene viste også at havre-surdeigene hadde lave konsentrasjoner av maltose og glukose, sammenlignet med surdeigene av bokhvete og quinoa. Det kan tyde på at havremel gir lavere næringstilgang til mikroorganismene, og dermed også opphav til en annerledes mikroflora enn hva som ofte etableres i tradisjonelle surdeiger. Høy bufferkapasitet i melet kan også gi bedre konkurransebetingelser for mer syre-sensitive MSB. Surdeigen av quinoa hadde høyest produksjon av organiske syrer og CO<sub>2</sub>, og lavest pH. Den hadde også mest tilgjengelig maltose og glukose, noe som tilsier at tilgangen til fermenterbare karbohydrater var bedre i denne surdeigen enn for eksempel i surdeigene av havre. Analysen av de flyktige komponentene som ble produsert under fermentering,

viste også store ulikheter mellom de fire surdeigene. «Principal component analysis» viste at quinoa var mest ulik de andre surdeigene, og at forskjellene mellom de tre andre surdeigene var mest styrt av ulikheter i konsentrasjonen av acetoin og diacetyl, som havre-2 surdeigene hadde høy korrelasjon til. Dette viser at mikrobiell sammensetning også har påvirkning på konsentrasjoner og type aromakomponenter som produseres.

I studien ble det utført et bakeforsøk med de fire surdeigene. Den sensoriske evalueringen viste naturlig nok en del forskjeller mellom de ulike brødene da de er bakt med ulike meltyper. Men deltakerne i evalueringen opplevde også ulikheter mellom samme type brød, bakt med og uten surdeig. Bakingen i denne oppgaven var bare ment for å se hvordan surdeigene fungerte ved baking av glutenfrie (GF) brød. I videre arbeid kan mer inngående bakeforsøk gjennomføres der analyser av organiske syrer og flyktige komponenter (HPLC og HSGC) utføres på surdeig og ferdig brød, og vurderes opp mot en sensorisk analyse. Da er det mulig å knytte målte aromakomponenter opp mot intensiteten på ulike sensoriske attributter i brødet.

Det er mulig å se for seg flere veier videre i arbeidet med disse surdeigene. Et alternativ kunne være å se nærmere på egenskapene til de isolerte bakterie- og gjærartene fra surdeigene. Egenskaper som EPS-produksjon, hvor raskt de senker pH og hvilke metabolitter de produserer, kan være viktige egenskaper dersom man vil lage starterkulturer, som er egnet for disse meltypene. Ved baking av GF brød er blant annet tekstur og mangel på viskoelastiske egenskaper en utfordring. Ved å lage starterkulturer, som har EPS-produksjon under fermentering, kan man se for seg at det er mulig å produsere GF brød med mindre tilsetningsstoffer, som samtidig har god tekstur og bedre holdbarhet. Også starterbakterier som bidrar til bedre aroma i brødene, øker tilgjengeligheten av frie aminosyrer, reduserer antinæringsstoffer, osv., kan være aktuelt. Her er det mange muligheter.

Det kunne også vært interessant å sett hvordan spontanfermenterte surdeiger av havre, bokhvete og quinoa hadde utviklet seg, når de ikke utvikles under aseptiske laboratorieforhold. Tidligere studier har vist at laboratoriesurdeiger gjerne utvikler en litt annen mikrobiota enn de som etableres hjemme eller på bakeri. En mikrobiotastudie av innsamlede surdeiger fra bakeri og privatpersoner, som har etablert surdeiger av tilsvarende mel, kunne vært interessant. Det vil mest sannsynlig også være noe ulikheter i mikrobiota mellom surdeig som har blitt matet daglig over lang tid og de som kun mates ukentlig etter stabil pH. Også her kunne en studie vært utført for å sammenligne mikrobiota i surdeig med ukentlig mating mot daglige matinger.

En annen tilnærming er mer bruk av pseudokorn og havre i «vanlig» brød for å øke næringsinnholdet. Utfordringen med det er at pseudokorn har dårlige teknologiske bakeegenskaper, og ved å tilsette det til hvetebakst vil mest sannsynlig tekturen bli påvirket. Da kunne man undersøkt om

surdeigsfermentering med pseudokorn gir bedre teknologiske egenskaper og bedring av tekstur. Her kunne man også sett for seg bruk av starterkulturer som hadde spesifikke egenskaper i forhold til teksturforbedring, som EPS-produserende MSB.

## Referanser

- 16S Metagenomic sequencing library preparation*. (n.d.). Hentet 12.05.22 fra [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf): Illumina Inc.
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H. & Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *Int J Biol Macromol*, 108: 719-728. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155.
- Adams, M. R., Moss, M. O. & McClure, P. (2016). *Food microbiology*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403-410. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M. J., Spencer-Martins, I., Leão, C. & Sousa, M. J. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulopsis delbrueckii*. *Microbiology*, 153 (3): 898-904. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003475-0>.
- Anderson, I. C. & Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6 (8): 769-779. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x>.
- Arendt, E. K., Ryan, L. A. M. & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24 (2): 165-174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011>.
- Arendt, E. K. & Bello, F. D. (2008). 19 - Functional cereal products for those with gluten intolerance. I: Hamaker, B. R. (red.) *Technology of Functional Cereal Products*, s. 446-475: Woodhead Publishing.
- Arendt, E. K. & Zannini, E. (2013). 7 - Oats. I: Arendt, E. K. & Zannini, E. (red.) *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*, s. 243-283e: Woodhead Publishing.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R. & Butt, M. S. (2008). Oat: unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, 47 (2): 68-79. doi: 10.1007/s00394-008-0698-7.
- 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.
- Chagas Junior, G., Ferreira, N. & Lopes, A. (2020). The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 56. doi: 10.1111/ijfs.14740.
- Chen, K.-H., Longley, R., Bonito, G. & Liao, H.-L. (2021). A two-step PCR protocol enabling flexible primer choice and high sequencing yield for Illumina MiSeq Meta-Barcoding. *Agronomy*, 11 (7): 1274.
- Chen, L., Wu, D., Schlundt, J. & Conway, P. L. (2020). Development of a dairy-free fermented oat-based beverage with enhanced probiotic and bioactive properties. *Frontiers in microbiology*, 11: 609734-609734. doi: 10.3389/fmicb.2020.609734.
- Chiş, M. S., Păucean, A., Stan, L., Suharoschi, R., Socaci, S. A., Man, S. M., Pop, C. R. & Muste, S. (2019). Impact of protein metabolic conversion and volatile derivatives on gluten-free muffins made with quinoa sourdough. *CyTA - Journal of Food*, 17 (1): 744-753. doi: 10.1080/19476337.2019.1646320.
- Ciolek, A., Makarski, B., Makarska, E. & Zadura, A. (2007). Content of some nutrients in new black oat strains. *Journal of Elementology*, 12 (4): 251-259.
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J. & McGehee, M. R. (2019). Chapter 8 - DNA sequencing. I: Clark, D. P., Pazdernik, N. J. & McGehee, M. R. (red.) *Molecular Biology (Third Edition)*, s. 240-269: Academic Cell.
- 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 Vuyst, L. & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1): 43-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>.
- 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: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S. & Leroy, F. (2017). Chapter two - Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. I: Sariaslani, S. & Gadd, G. M. (red.) b. 100 *Advances in Applied Microbiology*, s. 49-160: Academic Press.
- De Vuyst, L., Comasio, A. & Kerrebroeck, S. V. (2021). Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr*: 1-33. doi: 10.1080/10408398.2021.1976100.
- Decock, P. & Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1): 113-120. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.012>.
- Dial, H. L. (2014). *Plant guide for black oat (Avena Strigosa Schreb.)*. Tucson, AZ, 85705: USDA - Natural Resources Conservation Service.
- Eggum, B., Kreft, I. & Javornik, B. (1980). Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 30: 175-179. doi: 10.1007/BF01094020.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L. & De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcäl fermentation of Agave salmiana. *Letters in Applied Microbiology*, 46.
- European market potential for quinoa. (2020). Hentet 16.05.22 fra <https://www.cbi.eu/market-information/grains-pulses-oilseeds/quinoa-grains/market-potential>: CBI Ministry of foreign affairs.
- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M. & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2 (1): 6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6.
- Faid, M., Boraam, F., Achbab, A. & Larpent, J. P. (1993). Yeast-lactic acid bacteria interactions in moroccan sour-dough bread fermentation. *LWT - Food science and technology*, 26 (5): 443-446. doi: <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1087>.
- Franco, W., Pérez-Díaz, I. M., Connelly, L. & Díaz, J. T. (2020). Isolation of exopolysaccharide-producing yeast and lactic acid bacteria from quinoa (*Chenopodium quinoa*) sourdough fermentation. *Foods*, 9 (3): 337.
- Franco, W., Evert, K. & Van Nieuwenhove, C. (2021). Quinoa flour, the germinated grain flour, and sourdough as alternative sources for gluten-free bread formulation: Impact on chemical, textural and sensorial characteristics. *Fermentation*, 7 (3): 115.
- Friis Pedersen, S. (2013). *Quinoa - opprinnelse, dyrking og anvendelse*. Bioforsk Organic Food and Farming. Tingvoll, Norge: Bioforsk.
- Friis Pedersen, S. (2017). *Quina - Veiledning og anbefaling om dyrking*. Norsøk faginfo: Norsk senter for økologisk landbruk.
- García-Sancho, M. (2010). A new insight into Sanger's development of sequencing: from proteins to DNA, 1943–1977. *Journal of the history of biology*, 43 (2): 265-323. doi: 10.1007/s10739-009-9184-1.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., Rosa, F. I. & Vincenzi, S. d. (1994). Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy [for breadmaking, Umbria]. *Italian Journal of Food Science (Italy)*.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G. & Rizzello, C. G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 302: 103-113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>.
- Grace, E. S. (1997). *Biotechnology unzipped, promises & realities*. Washington DC, USA: Joseph Henry Press.

- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal - INT DAIRY J*, 21: 601-606. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.01.001.
- Guttormsen, V., Løvik, A., Bye, A., Bratlie, J., Mørkrid, L. & Lundin, K. E. (2008). No induction of anti-avenin IgA by oats in adult, diet-treated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 43 (2): 161-5. doi: 10.1080/00365520701832822.
- Gänzle, M. G., Ehmann, M. & Hammes, W. P. (1998). Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 64 (7): 2616-2623. doi: doi:10.1128/AEM.64.7.2616-2623.1998.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37: 2-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.007>.
- Hajinia, F., Sadeghi, A. & Mahoonak, A. (2020). The use of antifungal oat-sourdough lactic acid bacteria to improve safety and technological functionalities of the supplemented wheat bread. *Journal of Food Safety*, 41. doi: 10.1111/jfs.12873.
- Hansen, Å. & Hansen, B. (1996). Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202 (3): 244-249. doi: 10.1007/BF01263548.
- Holtet, E. K., Uhlen, A. & Holtekjølen, A. K. (2021). *Havre*. Hentet 4. mai 2022 fra <https://snl.no/havre>: Store norske leksikon.
- Hung, P. V., Maeda, T. & Morita, N. (2009). *Buckwheat starch : structure and characteristics – A review*.
- Hüttner, E. K., Dal Bello, F. & Arendt, E. K. (2010). Identification of lactic acid bacteria isolated from oat sourdoughs and investigation into their potential for the improvement of oat bread quality. *European Food Research and Technology*, 230 (6): 849-857. doi: 10.1007/s00217-010-1236-4.
- Ikeda, K. (2002). Buckwheat composition, chemistry, and processing.
- Ilavenil, S., Vijayakumar, M., Kim, D. H., Valan Arasu, M., Park, H. S., Ravikumar, S. & Choi, K. C. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. *J Sci Food Agric*, 96 (2): 593-601. doi: 10.1002/jsfa.7128.
- Introduction to next-generation sequencing technology*. (2017). Hentet 12.05.22 fra [https://www.illumina.com/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf): Illumina Inc.
- Janatuinen, E. K., Kempainen, T. A., Julkunen, R. J., Kosma, V. M., Mäki, M., Heikkinen, M. & Uusitupa, M. I. (2002). No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut*, 50 (3): 332-5. doi: 10.1136/gut.50.3.332.
- Jancurová, M., Minarovičová, L. & Dandár, A. (2009). Quinoa - a review. *Czech journal of food sciences*, 27: 71-79.
- Jany, J. L. & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol*, 25 (7): 839-48. doi: 10.1016/j.fm.2008.06.003.
- Jiang, S., Cai, L., Lv, L. & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20 (1): 45. doi: 10.1186/s12934-021-01537-y.
- Kempainen, T., Janatuinen, E., Holm, K., Kosma, V. M., Heikkinen, M., Mäki, M., Laurila, K., Uusitupa, M. & Julkunen, R. (2007). No observed local immunological response at cell level after five years of oats in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 42 (1): 54-9. doi: 10.1080/00365520600842245.
- Kim, J. S., Kim, J. H., Palaniyandi, S. A., Lee, C. C., You, J. W., Yang, H., Yoon Park, J. H., Yang, S. H. & Lee, K. W. (2019). Yak-Kong soybean (Glycine max) fermented by a novel *Pediococcus pentosaceus* inhibits the oxidative stress-induced monocyte-endothelial cell adhesion. *Nutrients*, 11 (6): 1380. doi: 10.3390/nu11061380.
- Korcari, D., Ricci, G., Quattrini, M. & Fortina, M. (2019). Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 70. doi: 10.1111/lam.13241.

- Kozioł, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5 (1): 35-68. doi: 10.1016/0889-1575(92)90006-6.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). *The Yeasts (Third Edition)*. The Yeasts (Third Edition). Amsterdam: Elsevier.
- Kuktaite, R., Repo-Carrasco-Valencia, R., de Mendoza, C. C., Plivelic, T. S., Hall, S. & Johansson, E. (2021). Innovatively processed quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) food: chemistry, structure and end-use characteristics. *J Sci Food Agric*. doi: 10.1002/jsfa.11214.
- 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.
- Lau, S., Chong, A., Chin, N., A. Talib, R. & Kadir, R. (2021). Sourdough microbiome comparison and benefits. *Microorganisms*, 9: 1355. doi: 10.3390/microorganisms9071355.
- Léder, I. (2009). Buckwheat, amaranth and other pseudocereal plants. I: Fuleky, G. (red.) b. 1 *Cultivated plants, primarily as food sources*, s. 84-101. Oxford, UK: Eolss Publishers Co. Ltd.
- Li, G., Wang, S. & Zhu, F. (2016). Physicochemical properties of quinoa starch. *Carbohydr Polym*, 137: 328-338. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.064.
- Li, H., Hu, S. & Fu, J. (2022). Effects of acetic acid bacteria in starter culture on the properties of sourdough and steamed bread. *Grain & Oil Science and Technology*, 5 (1): 13-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.11.003>.
- Lues, J. F. R., Viljoen, B. C., Miller, M. & Prior, B. A. (1993). Interaction of non-culture microbial flora on dough fermentation. *Food Microbiology*, 10 (3): 205-213. doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1022>.
- Luthar, Z., Zhou, M., Golob, A. & Germ, M. (2020). Breeding buckwheat for increased levels and improved quality of protein. *Plants*, 10: 14. doi: 10.3390/plants10010014.
- Mir, N. A., Riar, C. S. & Singh, S. (2018). Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75: 170-180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.016>.
- Moksnes Weie, H. (2022). *Markedsrapport 2021 - Markeds- og prisvurderinger av sentrale norske landbruksvarer og RÅK-varer*. Oslo: Landbruksdirektoratet.
- Moroni, A., Bello, F. & Arendt, E. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food microbiology*, 26: 676-84. doi: 10.1016/j.fm.2009.07.001.
- Moroni, A. V., Arendt, E. K., Morrissey, J. P. & Dal Bello, F. (2010). Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *Int J Food Microbiol*, 142 (1-2): 142-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.014.
- Moroni, A. V., Arendt, E. K. & Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol*, 28 (3): 497-502. doi: 10.1016/j.fm.2010.10.016.
- Murphy, J. P. & Hoffman, L. A. (1992). The origin, history, and production of oat. I: *Oat science and technology*, s. 1-28.
- Narvhus, J. A. & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. I: Caballero, B. (red.) *Encyclopedia of food sciences and nutrition (Second edition)*, s. 3465-3472. Oxford: Academic Press.
- Navarrete-Bolaños, J. L., Serrato-Joya, O., Chávez-Mireles, H., Vicente-Magueyal, F. J. & Jiménez-Islas, H. (2021). A validated strategy to design efficient fermentation-industrial processes: agave spirit production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44 (11): 2245-2255. doi: 10.1007/s00449-021-02600-z.
- Noda, T., Takahata, Y., Sato, T., Suda, I., Morishita, T., Ishiguro, K. & Yamakawa, O. (1998). Relationships between chain length distribution of amylopectin and gelatinization properties within the same botanical origin for sweet potato and buckwheat. *Carbohydrate Polymers*, 37: 153-158.
- Nout, M. J. (2009). Rich nutrition from the poorest - cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiol*, 26 (7): 685-92. doi: 10.1016/j.fm.2009.07.002.

- Obinna-Echem, P., Kuri, V. & Beal, J. (2014). Evaluation of the microbial community, acidity and proximate composition of Akamu - a fermented maize food. *Journal of the science of food and agriculture*, 94. doi: 10.1002/jsfa.6264.
- Orians, G. H., Purves, W. K. & Heller, H. C. (1994). *Life: The science of biology*. 4 utg. Sunderland, USA: Sinaur Associates Inc.
- Park, J.-H., Oh, J., Sang, H., Shrestha, B., Lee, H., Koo, J., Cho, S.-I., Choi, J. S., Lee, M.-H., Kim, J., et al. (2019). Identification and antifungal susceptibility profiles of *Cyberlindnera fabianii* in Korea. *Mycobiology*, 47 (4): 449-456. doi: 10.1080/12298093.2019.1651592.
- Pérez-Brito, D., Magaña-Alvarez, A., Lappe-Oliveras, P., Cortes-Velazquez, A., Torres-Calzada, C., Herrera-Suarez, T., Larqué-Saavedra, A. & Tapia-Tussell, R. (2015). Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from Agave fourcroydes Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Microbiology*, 53 (1): 14-20. doi: 10.1007/s12275-015-4373-4.
- Pétel, C., Onno, B. & Prost, C. (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59: 105-123. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>.
- Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A. & Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55 (5): 856-866. doi: 10.1373/clinchem.2008.107565.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., et al. (2003). Real-time PCR based on SYBR-green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3 (1): 18. doi: 10.1186/1472-6750-3-18.
- Prego, I., Maldonado, S. & Otegui, M. (1998). Seed structure and localization of reserves in chenopodium quinoa. *Annals of Botany*, 82 (4): 481-488. doi: 10.1006/anbo.1998.0704.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H. & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12 (16): 1607-1633. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4).
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L. & Giudici, P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett Appl Microbiol*, 38 (2): 113-7. doi: 10.1111/j.1472-765x.2003.01454.x.
- Qiagen. (2020). *DNeasy® UltraClean® microbial kit handbook*. Qiagen.
- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E. & Gänzle, M. G. (2022). After the storm—Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. *JDS Communications*. doi: <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>.
- 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 Res*, 41 (Database issue): D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Raja, H., Miller, A., Pearce, C. & Oberlies, N. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- Rehman, S. U., Paterson, A. & Piggott, J. R. (2006). Flavour in sourdough bread: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 17 (10): 557-.
- Reiner, K. (2010). *Catalase test protocol*: American society for microbiology. Tilgjengelig fra: <https://asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase>.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (3): 201-210. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C. & Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed T. delbrueckii/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*, 207: 40-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>.
- Rijswijk, I., van Mastrigt, O., Pijffers, G., Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Abee, T., Zwietering, M. & Smid, E. (2019). Dynamic modelling of brewers' yeast and *Cyberlindnera fabianii* co-culture



- behaviour for steering fermentation performance. *Food Microbiology*, 83. doi: 10.1016/j.fm.2019.04.010.
- Rines, H., Molnar, S., Tinker, N. & Phillips, R. (2006). Oat. I, s. 211-242.
- Ripari, V., Gänzle, M. G. & Berardi, E. (2016). Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *Int J Food Microbiol*, 232: 35-42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025.
- Robinson, R. K. (2002). Fermented milks | Yogurt: Role of starter culture. I: Fuquay, J. W. (red.) *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, s. 529-532. San Diego: Academic Press.
- Rubel, W. (2011). *Bread: A Global History*. The Edible Series. London, UK: Reaktion Books Ltd.
- Rühmkorf, C., Jungkunz, S., Wagner, M. & Vogel, R. F. (2012). Optimization of homoexopolysaccharide formation by lactobacilli in gluten-free sourdoughs. *Food Microbiology*, 32 (2): 286-294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.002>.
- Salovaara, H. & Gänzle, M. G. (2011). Lactic acid bacteria in cereal-based products. I: *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*, s. 227-245: CRC Press.
- Sanger sequencing steps & method*. (n.d.). Hentet 11.05.22 fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>: Sigma Aldrich.
- Schoenlechner, R., Siebenhandl, S. & Berghofer, E. (2008). 7 - Pseudocereals. I: Arendt, E. K. & Dal Bello, F. (red.) *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, s. 149-VI. San Diego: Academic Press.
- Seibel, W., Chung, O., Weipert, D. & Park, S. H. (2006). Cereals. I: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Tyskland: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sekwati-Monang, B., Valcheva, R. & Gänzle, M. G. (2012). Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 159 (3): 240-246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.013>.
- Sengun, I. Y. & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22 (5): 647-656. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.008>.
- 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.
- Srinivasan, U., Leonard, N., Jones, E., Kasarda, D. D., Weir, D. G., O'Farrelly, C. & Feighery, C. (1996). Absence of oats toxicity in adult coeliac disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 313 (7068): 1300-1301. doi: 10.1136/bmj.313.7068.1300.
- Stages of PCR*. (n.d.). Hentet 11.05.22 fra <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>: BioNinja.
- Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R. F. & Hammes, W. P. (1993). Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters*, 109 (2-3): 237-242. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06174.x.
- Svihus, B. (2019). *Korn*. Hentet 4. mai 2022 <https://snl.no/korn>: Store Norske Leksikon.
- Sørensen, H. P., Madsen, L. S., Petersen, J., Andersen, J. T., Hansen, A. M. & Beck, H. C. (2010). Oat (*Avena sativa*) seed extract as an antifungal food preservative through the catalytic activity of a highly abundant class I chitinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160 (6): 1573-84. doi: 10.1007/s12010-009-8557-4.
- Taylor, J. R. N. & Parker, M. L. (2002). Quinoa. I: Belton, P. S. & Taylor, J. R. N. (red.) *Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization Potential*, s. 93-122. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Thompson, T. (2000). Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *J Am Diet Assoc*, 100 (11): 1389-96. doi: 10.1016/s0002-8223(00)00386-2.
- Thompson, T. (2003). Oats and the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 103 (3): 376-379. doi: <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50044>.
- Tripathi, N. & Sapra, A. (2022). Gram staining. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.

- Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F. (2017). Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiology*, 65: 95-104. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.002>.
- Uhlen, A. K. (2014). *Cerealer: Viktige kvalitetsegenskaper knyttet til råvaren, Kompendium MVI275*. Ås, Norge: KBM, Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet.
- Valencia-Chamorro, S. A. (2003). Quinoa. I: Caballero, B. (red.) *Encyclopedia of food sciences and nutrition (Second Edition)*, s. 4895-4902. Oxford: Academic Press.
- Van Kerrebroeck, S., Maes, D. & De Vuyst, L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 68: 152-159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016>.
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González Esquinca, A., Coria, R. & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100 (4): 497-506. doi: 10.1007/s10482-011-9605-y.
- Vogelmann, S. A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M. J. & Hertel, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (3): 205-212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.020>.
- Voige, W. H. (1997). Principles of biochemistry, second edition (Horton, H. Robert; Moran, Laurence A.; Ochs, Raymond S.; Rawn, J. David; Scrimgeour, K. Gray). *Journal of Chemical Education*, 74 (2): 190. doi: 10.1021/ed074p190.
- Von Wright, A. & Axelsson, L. (2011). Lactic acid bacteria: An introduction. I: Sampo Lahtinen, A. C. O., Seppo Salminen, Atte von Wright (red.) b. 4 *Lactic acid bacteria*, s. 1-16. Boca Raton: CRC Press.
- Weisskopf, A. & Fuller, D. Q. (2014). Buckwheat: origins and development. I: Smith, C. (red.) *Encyclopedia of global archaeology*, s. 1025-1028. New York, NY: Springer New York.
- What is qPCR? (2020). Hentet 18.05.22 fra <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-qpcr/>: Thermo Fisher Scientific.
- Wijngaard, H. & Arendt, E. K. (2006). Buckwheat. *Cereal chemistry*, 83 (4): 391-401.
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W. J., Lee, S. & Bai, S. C. (2020). Evaluation of potential probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 8 (2). doi: 10.3390/microorganisms8020281.
- World agricultural production*. (2022). United States Department of Agriculture.
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal*, 8: 352-359.
- Yazynina, E., Johansson, M., Jägerstad, M. & Jastrebova, J. (2008). Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients. *Food Chemistry*, 111: 236-242. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.055.
- Yin, H., Ye, P., Lei, Q., Cheng, Y., Yu, H., Du, J., Pan, H. & Cao, Z. (2020). In vitro probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* L1 and its effects on enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced inflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*, 144: 104163. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104163.
- Yuksekdag, Z. & Aslim, B. (2010). Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from turkish-type fermented sausages (Sucuk). *Journal of microbiology and biotechnology*, 20: 161-8. doi: 10.4014/jmb.0904.04019.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70 (4): 2782-2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zwer, P. K. (2004). Oats. I: Wrigley, C. (red.) *Encyclopedia of grain science*, s. 365-375. Oxford: Elsevier.

Østlie, H. M., Porcellato, D., Kvam, G. & Wicklund, T. (2021). Investigation of the microbiota associated with ungerminated and germinated Norwegian barley cultivars with focus on lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 341: 109059. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109059>.

# Vedlegg

**Vedlegg 1** Celletall ved utplating av de fire surdeigene på ulike medier. Korn#1=havre-1, Korn#3=bokhvete, Korn#4=quinoa og Korn#5=havre-2

Agar	Inkuberings tid	Korn #	-5	-6	-7	-8	log kde/g
PCA	4 dager	1			296		9,47
		1			324		9,51
		3			272		9,43
		3			244		9,39
		4			240		9,38
		4			220		9,34
	2 dager	5			296	31	9,47
		5			300	19	9,48
LBS	3 dager	1			324		9,51
		1			276		9,44
		3			260		9,41
		3			292		9,47
		4			164		9,21
		4			212		9,33
	2 dager	5			188	19	9,27
		5			224	27	9,35
MRS	3 dager	1			296		9,47
		1			320		9,51
		3			348		9,54
		3			296		9,47
		4			228		9,36
		4			208		9,32
	2 dager	5			260	38	9,41
		5			264	22	9,42
YM	4 dager	1	Ingen vekst				
		1	Ingen vekst				
		3	93	18			6,97
		3	101	18			7,00
		4	640	73			7,86
		4		66			7,82
	2 dager	5	128	20			7,11
		5	156	15			7,19
RB	3 dager	1	Ingen vekst				
		1	Ingen vekst				
		3	93	14			6,97
		3	64	15			6,81
		4		80			7,90
		4		81			7,91
	2 dager	5	122	18			7,09
		5	111	21			7,05

**Vedlegg 2** Celletall ved metabolismeforsøkene som gikk over tre uker. Utplating ble gjort ved T0 og T24.

	Agar	Inkuberings tid	T0					T24					
			Korn #	-5	-6	-7	-8	log kde/g	-5	-6	-7	-8	log kde/g
Uke 1	MRS	2 (T0), 5 (T24)	1			154	19	9,19			276		9,44
			1			168	13	9,23			340		9,53
			3			194	42	9,29			252	24	9,40
			3			188	26	9,27			320		9,51
			4			138	19	9,14			316	23	9,50
			4			160	12	9,20			292	34	9,47
			5			156	15	9,19			244	22	9,39
	5			148	12	9,17			264	26	9,42		
	RB	5 (T0), 4 (T24)	1	Ingen vekst, <10 <sup>4</sup>					Ingen vekst, <10 <sup>4</sup>				
			1	Ingen vekst, <10 <sup>4</sup>					Ingen vekst, <10 <sup>4</sup>				
			3		38			7,58	212	17			7,33
			3		44			7,64	236	26			7,37
			4		76			7,88		110			8,04
			4		61			7,79		115			8,06
5			153	13			7,18	147	22			7,17	
5	154	23			7,19	166	18			7,22			
Uke 2	MRS	2 (T0), 5 (T24)	1			64		8,81			288		9,46
			1			83		8,92			176		9,25
			3			126		9,10			268	43	9,43
			3			114		9,06			212	30	9,33
			4			94		8,97			208		9,32
			4			86		8,93			180		9,26
			5			57		8,76			136		9,13
	5			80		8,90			164		9,21		
	RB	5 (T0), 4 (T24)	1	Ingen vekst, <10					Ingen vekst, <10				
			1	Ingen vekst, <10					Ingen vekst, <10				
			3	348	37			7,57		36			7,56
			3		36			7,56		29			7,46
			4		52			7,72		78			7,89
			4		50			7,70		78			7,89
5			90				6,95		31			7,49	
5	83				6,92		24			7,38			
Uke 3	MRS	2 (T0), 5 (T24)	1			118		9,07			196		9,29
			1			88		8,94			260		9,41
			3			166		9,22				32	9,51
			3			134		9,13				31	9,49
			4			110		9,04			264		9,42
			4			104		9,02			268		9,43
			5			106		9,03			200		9,30
	5			106		9,03			184		9,26		
	RB	5 (T0), 4 (T24)	1	Ingen vekst, <10					Ingen vekst, <10				
			1	Ingen vekst, <10					Ingen vekst, <10				
			3	226				7,35		40			7,60
			3	218				7,34		38			7,58
			4		39			7,59		33			7,52
			4		42			7,62		36			7,56
5			146				7,16	202				7,31	
5	158				7,20	200				7,30			

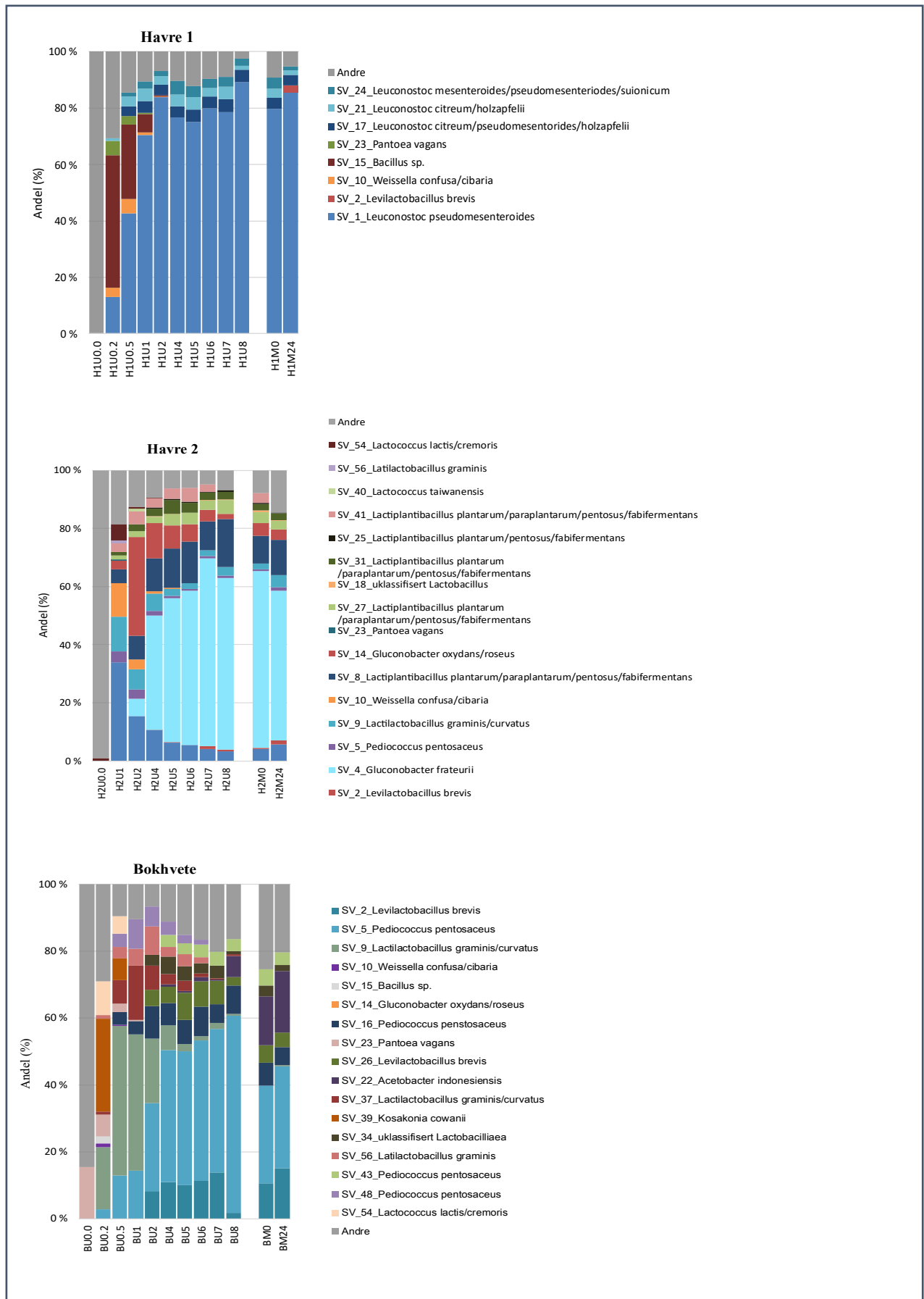
### Vedlegg 3 Resultat fra mikroskopering, katalase-test og Gram-farging.

Prøve nr	Korn #	Sanger sekvensering	Agar	Gram-farging	Katalase-test	Morfologi/mikroskopering
1	Havre #1	x	LBS		negativ	Mest sannsynlig korte staver. Litt stubbete form, noen litt bønneformet. Noen kan også ligne på ovale kokker. En del ligger i lengre rekker. Mange parvis.
2	Havre #1		LBS		negativ	Mest sannsynlig korte staver. Litt stubbete form, noen litt bønneformet. Noen kan også ligne på ovale kokker. En del ligger i lengre rekker. Mange parvis.
3	Havre #1		LBS		negativ	Mest sannsynlig korte staver. Litt stubbete form, noen litt bønneformet. Noen kan også ligne på ovale kokker. En del ligger i lengre rekker. Mange parvis.
4	Havre #1	x	LBS		negativ	Mest sannsynlig korte staver. Litt stubbete form, noen litt bønneformet. Noen kan også ligne på ovale kokker. En del ligger i lengre rekker. Mange parvis. Ser kanskje litt mer stavformet ut enn de andre.
5	Havre #1		LBS		negativ	Mest sannsynlig korte staver. Litt stubbete form, noen litt bønneformet. Noen kan også ligne på ovale kokker. En del ligger i lengre rekker. Mange parvis.
6	Bokhvete		LBS	positiv	negativ	Kokker. Helt runde. Mange single, noen i par, noen også i tetrad
7	Bokhvete	x	LBS	positiv	negativ	Kokker. Helt runde. Mange single, noen i par, noen også i tetrad
8	Bokhvete		LBS	positiv	negativ	Kokker. Helt runde. Mange single, noen i par, noen også i tetrad
9	Bokhvete	x	LBS	positiv	negativ	Kokker. Helt runde. Mange single, noen i par, noen også i tetrad
10	Bokhvete		LBS	positiv	negativ	Kokker. Helt runde. Mange single, noen i par, noen også i tetrad
11	Quinoa	x	LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker. Mange single.
12	Quinoa	x	LBS	positiv	negativ	Korte staver. Litt kortere enn isolat 11.
13	Quinoa	x	LBS	positiv	negativ	Tror dette er kokker - litt ovale. Mange henger sammen parvis. Noen tetrad.
14	Quinoa	x	LBS	positiv	negativ	Kokker. En del i par. Noen tetrad.
15	Quinoa	x	LBS	positiv	negativ	Korte staver. En del ligger som par, andre i lange rekker.
16	Havre #1	x	MRS	positiv	negativ	Korte staver
17	Havre #1	x	MRS	positiv	negativ	Korte staver (evt avlange kokker). Veldig mange ligger parvis.
18-1	Havre #1	x	MRS	positiv	negativ	Kokker eller korte staver. Ser litt ovale ut. Flere ligger parvis.
18-2	Havre #1	x	MRS	positiv	negativ	Korte staver. Flere i par, noen i lengre rekker.
19	Havre #1	x	MRS	positiv	negativ	Kokker eller korte staver? Mange i rekker, noen i par og tetrad. Noen ser litt ovale/eggeformet ut.
20	Havre #1		MRS	positiv	negativ	Korte staver? Noen i lengre rekker
21	Bokhvete	x	MRS	positiv	negativ	Gjær. Litt ovale/eggeforma. Noe knoppsskyting.
22	Bokhvete		MRS	positiv	negativ	Kokker. Mange arrangert parvis.
23	Bokhvete		MRS	positiv	negativ	Kokker. Mange arrangert parvis.
24	Bokhvete	x	MRS	positiv	negativ	Kokker. Mange arrangert parvis.
25	Bokhvete	x	MRS	positiv	negativ	Kokker. Mange arrangert parvis.
26	Quinoa		MRS	positiv	negativ	Staver. Mange av dem arrangert i lange rekker.
27	Quinoa	x	MRS	positiv	negativ	Staver. Mange av dem arrangert i lange rekker.
28	Quinoa	x	MRS			Gjærceller. Forholdsvis rund form.
29	Quinoa	x	MRS	positiv	negativ	Staver. Mange av dem arrangert i lange rekker.
30	Quinoa		MRS			Gjærceller. Runde i formen. Så ikke så mye knoppsskyting
31	Bokhvete	x	YM			Gjærceller. Noen ser litt avlange ut. Noe knoppsskyting
32	Bokhvete	x	YM			Gjærceller. Litt ovale/eggeformet form. Mye knoppsskyting
33	Bokhvete		YM			Gjærceller. Litt ovale/eggeformet form. Mye knoppsskyting
34	Bokhvete	x	YM			Gjærceller. Noen er helt runde mens andre er litt ovale. Mye knoppsskyting
35	Bokhvete		YM			Gjærceller. Noen er helt runde mens andre er litt ovale. Mye knoppsskyting
36	Quinoa		YM			Gjærceller. Rund form (runderer enn de forrige, 31-35). En del knoppsskyting
37	Quinoa	x	YM			Gjærceller. Rund form (runderer enn de forrige, 31-35). En del knoppsskyting
38	Quinoa		YM			Gjærceller. Rund form (runderer enn de forrige, 31-35). En del knoppsskyting
39	Quinoa	x	YM			Gjærceller. Rund form (runderer enn de forrige, 31-35). En del knoppsskyting
40	Quinoa		YM			Gjærceller. Rund form (runderer enn de forrige, 31-35). En del knoppsskyting
41	Bokhvete	x	RB			Gjærceller. Noen runde, men de fleste er litt mer ovale. Synlig knoppsskyting.
42	Bokhvete	x	RB			Gjærceller. Noen runde, men de fleste er litt mer ovale. Noen ser nesten litt stavformet ut. Synlig knoppsskyting.
43	Bokhvete		RB			Gjærceller. Litt avlange, spesielt de som knoppsskyter er litt mindre og mer stavformet
44	Bokhvete	x	RB			Gjærceller. Litt eggforma, spesielt de som knoppsskyter er mer avlange.
45	Bokhvete	x	RB			Gjærceller. Noen runde og noen er litt mer ovale. Mye knoppsskyting.
46	Quinoa		RB			Gjærceller. Rund form. En del knoppsskyting
47	Quinoa	x	RB			Gjærceller. Rund form. En del knoppsskyting
48	Quinoa		RB			Gjærceller. Rund form. En del knoppsskyting
49	Quinoa	x	RB			Gjærceller. Rund form. En del knoppsskyting
50	Quinoa		RB			Gjærceller. Rund form. En del knoppsskyting
51	Havre #2	x	LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
52	Havre #2		LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
53	Havre #2	x	LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
54	Havre #2		LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
55	Havre #2		LBS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
56	Havre #2	x	MRS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
57	Havre #2		MRS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
58	Havre #2		MRS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
59	Havre #2	x	MRS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
60	Havre #2		MRS	positiv	negativ	Staver. Noen i lange rekker
61	Havre #2	x	YM			Gjærceller. Oval/eggeformet. Noen av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
62	Havre #2		YM			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
63	Havre #2	x	YM			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
64	Havre #2		YM			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
65	Havre #2		YM			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
66	Havre #2	x	RB			mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
67	Havre #2		RB			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
68	Havre #2	x	RB			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
69	Havre #2		RB			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.
70	Havre #2		RB			Gjærceller. Noen runde og andre ovale. De største er runde, mens de som er mindre er litt mer ovale. En del av de som har synlig knoppsskyting ser nesten litt stavformet ut og er mindre enn de andre.

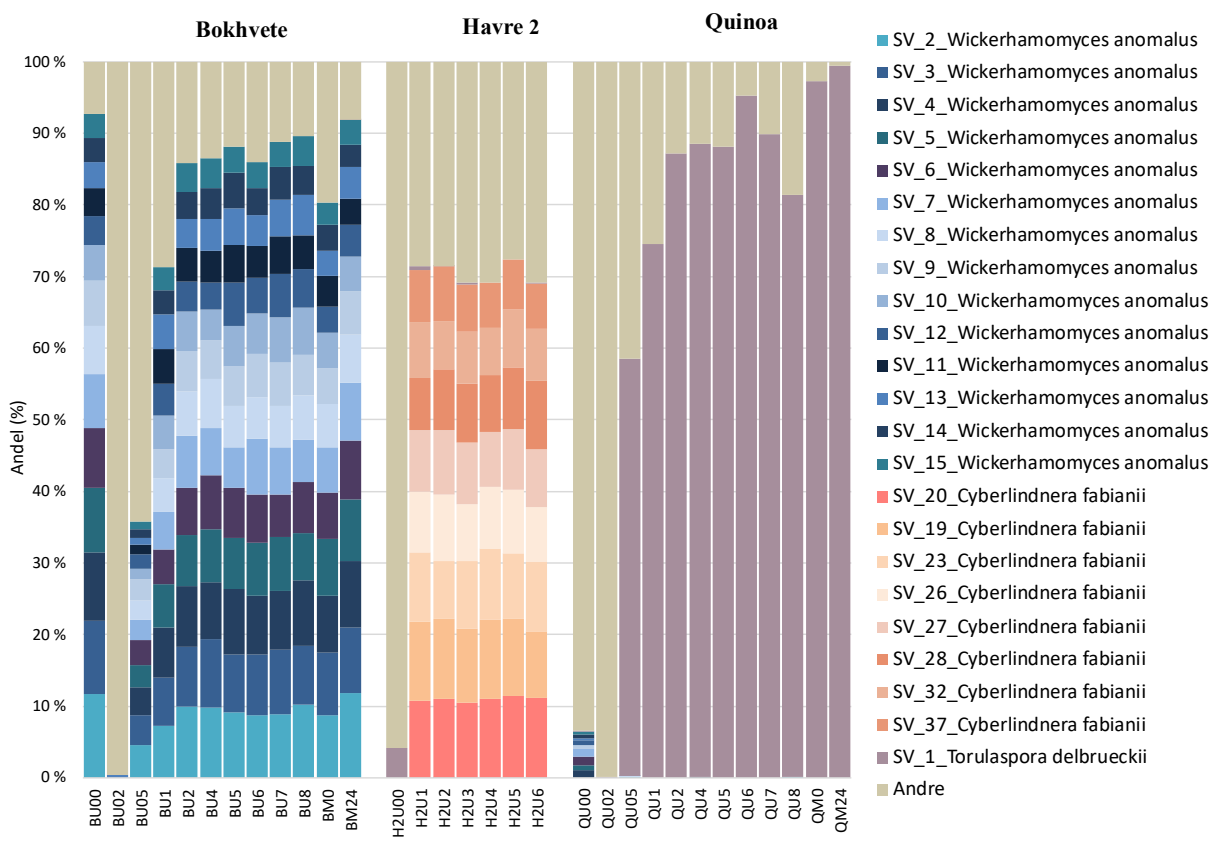
**Vedlegg 4** Resultater fra Sanger sekvensering av totalt 39 isolat fra surdeigene.

	Sanger sekvensering	% identitet	organisme
Havre 1	Leuconostoc mesenteroides / pseudomesenteroides	99,78/99,78	MSB
	Leuconostoc pseudomesenteroides	99,93	MSB
	Leuconostoc pseudomesenteroides	100	MSB
	Leuconostoc citreum	100	MSB
	Pediococcus pentosaceus / Enterococcus durans	100/100	MSB
	Leuconostoc pseudomesenteroides/mesenteroides	99,93/99,93	MSB
	Leuconostoc pseudomesenteroides/mesenteroides	100/100	MSB
Havre 2	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	100/100	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum	99,65	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	99,79/99,79	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	99,79/99,79	MSB
	Clavispora lusitaniae	99,46	Gjær
	Clavispora lusitaniae	99,73	Gjær
	Clavispora lusitaniae	100	Gjær
Bokhvete	Pediococcus pentosaceus	99,92	MSB
	Pediococcus pentosaceus	99,79	MSB
	Pediococcus pentosaceus	99,79	MSB
	Pediococcus pentosaceus	99,79	MSB
	Pichia anomala	100	Gjær
	Wickerhamomyces anomalus	100	Gjær
	Wickerhamomyces anomalus	100	Gjær
	Wickerhamomyces anomalus	99,5	Gjær
	Pichia anomala/Wickerhamomyces anomalus	99,83/99,83	Gjær
	Pichia anomala/Wickerhamomyces anomalus	99,83/99,83	Gjær
	Pichia anomala/Wickerhamomyces anomalus	100/100	Gjær
	Pichia anomala/Wickerhamomyces anomalus	99,84/99,84	Gjær
Quinoa	Lactiplantibacillus plantarum	99,86	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	99,79/99,79	MSB
	Enterococcus durans	99,8	MSB
	Pediococcus pentosaceus	99,66	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	99,86/99,86	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum/pentosus	99,79/99,79	MSB
	Lactiplantibacillus plantarum	99,72	MSB
	Torulaspota delbrueckii	99,87	Gjær
	Torulaspota delbrueckii	99,87	Gjær
	Torulaspota delbrueckii	99,87	Gjær
	Torulaspota delbrueckii	99,87	Gjær
	Torulaspota delbrueckii	99,87	Gjær

**Vedlegg 5** Relativ fordeling av 16S- og ITS-sekvenser ved Illumina sekvensering fra hver surdeig og uttak. Sekvensene er oppgitt med identifisert artsnavn.





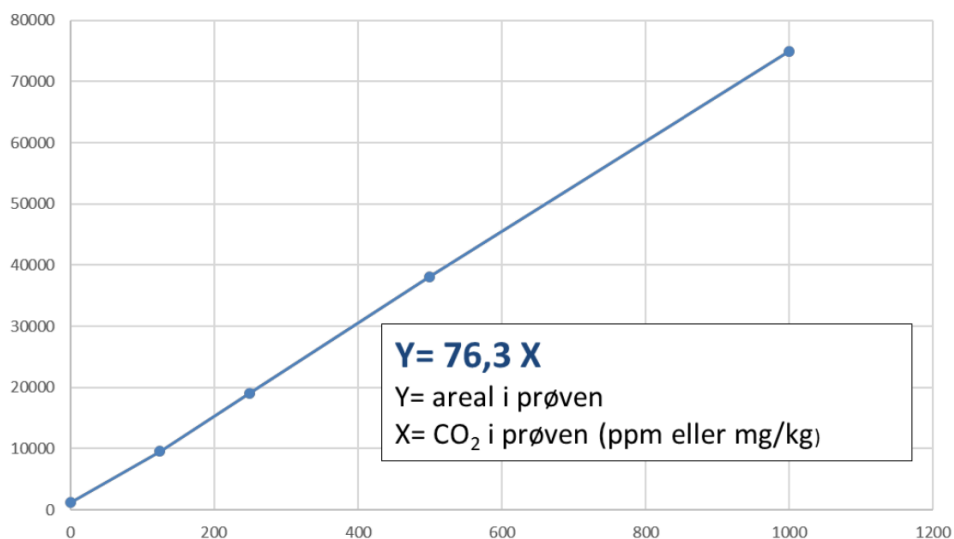


**Vedlegg 6** pH-målinger utført på de fire surdeigene. Rader merket i grønt er målinger utført under metabolismeforsøkene. Venstre og høyre kolonne viser prøvene som ble valgt ut til Illumina sekvensering.

Illumina #1,3,4	Uke #	Dag#	Dato	pH Havre-1		pH Bokhvete		pH Quinoa		pH Havre-2		Dag# for havre-2	Uke# for havre-2	Illumina #5
				T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24			
x	0	0	06.jan	6,15		6,29		6,16						
	0	1	07.jan	6,01	5,96	6,02	5,97	6,07	6,04					
x	0	2	08.jan	5,15	4,80	5,11	4,58	5,45	5,06					
	0	3	09.jan	4,76	4,41	4,82	4,23	0,82	4,37					
	0	4	10.jan	4,85	4,47	4,94	4,35	4,89	4,45					
x	0	5	11.jan	4,72	4,35	4,61	4,06	4,64	4,19					
	0	6	12.jan	4,65	4,39	4,58	4,02	4,63	4,16	6,13		0	0	x
x	1	7	13.jan	4,73	4,40	4,64	4,04	4,63	4,14	6,17	6,16	1	0	
	1	8	14.jan	4,72	4,35	4,76	4,09	4,55	4,11	5,44	5,14	2	0	x
	1	9	15.jan	4,74	4,40	4,82	4,17	4,50	4,11	5,49	5,16	3	0	
	1	10	16.jan	4,75	4,45	4,79	4,15	4,46	4,00	5,42	5,12	4	0	
x	2	11	17.jan	4,84	4,41	4,88	4,25	4,58	4,05	5,33	5,16	5	1	x
	3	18	24.jan	4,85		5,14		4,51		5,36		12	2	
x	3	19	25.jan		4,39		4,38		4,06		4,82	13	2	x
	4	25	31.jan	4,89		4,97		4,45		4,99		19	3	
x	4	26	01.feb		4,41		4,27		3,97		4,62	20	3	x
	5	32	07.feb	4,67		4,53		4,33		4,76		26	4	
x	5	33	08.feb		4,45		4,34		4,01		4,45	27	4	x
	6	39	14.feb	4,87		5,11		4,46		4,86		33	5	
x	6	40	15.feb		4,46		4,33		3,99		4,44	34	5	x
	7	46	21.feb	4,94		5,01		4,45		4,77		40	6	
x	7	47	22.feb		4,54		4,28		4,04		4,55	41	6	x
	7	48	23.feb	4,83		4,91		4,56		5,06		42	6	
	7	49	24.feb		4,39		4,30		4,03		4,69	44	6	
	8	53	28.feb	4,76		5,17		4,48		5,05		48	7	
x	8	54	01.mar		4,34		4,53		3,96		4,62	49	7	x
x	8	54	01.mar	4,73		4,98		4,4		4,94		49	7	x
x	8	55	02.mar		4,34		4,53		3,96		4,62	50	7	x
	9	60	07.mar	4,81		5,01		4,42		4,87		55	8	
	9	61	08.mar		4,44		4,36		4,06		4,58	56	8	
	9	61	08.mar	4,6		5,04		4,45		4,93		56	8	
	9	62	09.mar		4,37		4,33		3,95		4,6	57	8	

Vedlegg 7 Kalibreringskurve for beregning av CO<sub>2</sub>-innhold

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



Vedlegg 8 Areal i prøvene ved CO<sub>2</sub>-analyser og utregnede mengde CO<sub>2</sub> (ppm)

	Gjentak	A	B	C	Gjennomsnitt	CO <sub>2</sub> (ppm)
Havre 1	1	117390	119320		118355	1551
	2	115575	114485		115030	1508
	3	151630	143385		147508	1933
Bokhvete	1	109725	112750	109895	110790	1452
	2	102685	99680		101183	1326
	3	109590	114340		111965	1467
Quinoa	1	355920	352080		354000	4640
	2	281900	273360		277630	3639
	3	333990	369140	339500	347543	4555
Havre 2	1	85755	89505		87630	1148
	2	81145	82320		81733	1071
	3	92215	93080		92648	1214

**Vedlegg 9** Rådata HPLC-analyser, beregnede gjennomsnittsverdier og standardavvik. Konsentrasjonene er oppgitt i ppm. Målingene er utført ved poding (T0) og etter 24 timers inkubering ved 22°C (T24). Det er utført tre gjentakende målinger med en ukes mellomrom mellom hver måling

	Maltose		Glukose		Fruktose		Melkesyre		Eddiksyre (RI)		
	T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24	
	1332,19	0,00	270,85	0,00	693,73	545,40	2655,41	5187,72	823,25	971,65	
	1601,66	0,00	121,33	0,00	454,07	738,19	2681,78	5050,51	707,42	908,21	
	1035,02	0,00	52,40	0,00	637,14	565,24	3832,27	4887,69	816,88	1021,44	
St.avvik	231,42	0,00	91,18		102,28	86,59	548,67	122,64	53,16	46,34	
	981,02	0,00	227,85	0,00	129,17	0,00	2017,13	3682,01	714,02	1177,90	
	1256,42	0,00	26,34	0,00	0,00	0,00	2450,41	3805,78	679,86	930,60	
	1234,57	0,00	32,07	0,00	0,00	0,00	2136,47	3829,62	667,72	919,42	
St.avvik	124,99		2,87		60,89		182,74	64,70	19,60	119,30	
	2355,37	0,00	363,14	0,00	0,00	0,00	5291,99	10038,99	423,29	829,20	
	2162,64	0,00	216,41	0,00	0,00	0,00	4769,84	9309,09	419,32	867,18	
	2227,74	0,00	362,22	0,00	0,00	0,00	4971,77	9394,48	418,11	1036,90	
St.avvik	80,05		68,95				214,98	325,82	2,21	90,30	
	3906,52	431,57	927,14	0,00	147,81	0,00	5197,30	10729,94	1652,09	2789,85	
	4827,65	452,46	977,74	0,00	33,92	169,01	4936,88	10557,20	1480,04	2687,39	
	4146,95	397,02	1065,52	0,00	105,40	227,50	5461,71	10351,66	1716,77	2775,82	
St.avvik	390,11	22,86	57,17		21,21	29,25	214,27	154,63	99,90	45,36	
		<b>Maltose (ppm)</b>	<b>Glukose (ppm)</b>	<b>Fruktose (ppm)</b>	<b>Melkesyre (ppm)</b>	<b>Eddiksyre (ppm)</b>					
		<b>St.avvik</b>	<b>St.avvik</b>	<b>St.avvik</b>	<b>St.avvik</b>	<b>St.avvik</b>					
Havre 1	T0	1322,96	231,42	148,19	91,18	594,98	102,28	3056,48	548,67	782,52	53,16
	T24	0,00		0,00		616,28	86,59	5041,97	122,64	967,10	46,34
Havre 2	T0	1157,34	124,99	29,20	2,87	43,06	60,89	2201,34	182,74	687,20	19,60
	T24	0,00		0,00		0,00	0,00	3772,47	64,70	1009,31	119,30
Bokhvete	T0	2248,58	80,05	313,92	68,95	0,00	0,00	3056,48	214,98	420,24	2,21
	T24	0,00		0,00		0,00	0,00	5041,97	325,82	911,09	90,30
Quinoa	T0	4293,71	390,11	990,13	57,17	126,61	21,21	3553,00	214,27	1616,30	99,90
	T24	427,02	22,86			145,81	29,25	7027,20	154,63	2751,02	45,36

**Vedlegg 10** Rådata HSGC-analyser og beregnede standardavvik. Konsentrasjonene er oppgitt i ppm. Målingene er utført ved poding (T0) og etter 24 timers inkubering ved 22°C (T24). Det er utført tre gjentakende målinger med en ukes mellomrom mellom hver måling

		Sample name	Acetaldehyde	2-methyl-propanal	Diacetyl	2-butanon	2-methyl-1-propanol	2,3-pentadiene	3-methyl-1-butanol	2-methyl-1-butanol	Etanol	Acetoin	2-butanol	Etylacetat	Dimethyl sulfide	Ethyl propionate
			ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
T0	Uke 1	1, 23.02	0,58	0,03	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2369,93	14,89	n.d.	0,32	n.d.	n.d.
	Uke 2	1, 01.03	0,62	0,03	1,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2266,10	22,99	n.d.	0,30	n.d.	n.d.
	Uke 3	1, 08.03	0,63	0,03	1,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2858,18	14,28	n.d.	0,41	n.d.	n.d.
T24	Uke 1	1, 24.02	1,16	0,04	1,37	n.d.	0,07	0,14	n.d.	n.d.	4289,93	14,79	n.d.	0,47	n.d.	n.d.
	Uke 2	1, 02.03	1,32	0,04	1,67	n.d.	0,06	0,16	n.d.	n.d.	4352,50	16,00	n.d.	0,55	n.d.	n.d.
	Uke 3	1, 09.03	1,08	0,03	1,07	n.d.	0,06	0,13	0,04	n.d.	4040,09	11,58	n.d.	0,41	n.d.	n.d.
Havre 1	T0		0,61	0,03	1,01	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	2498,07	17,39	#VERDI!	0,34		
	T24		1,19	0,03	1,37	#VERDI!	0,06	0,15	#VERDI!	#VERDI!	4227,51	14,12	#VERDI!	0,48		
	Differansen	Havre 1	0,58	0,01	0,36	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	#VERDI!	1729,44	0,00	#VERDI!	0,14		
		St.avvik T0	0,02	0,00	0,14						258,14	3,97		0,05		
		St. Avvik T24	0,10	0,00	0,24		0,01	0,01			134,96	1,86		0,06		
T0	Uke 1	3, 23.02	1,31	0,47	n.d.	0,13	0,59	n.d.	1,83	0,52	459,59	n.d.	9,64	20,25	0,032	0,086
	Uke 2	3, 01.03	1,68	0,76	n.d.	0,51	0,35	n.d.	1,02	0,24	442,73	n.d.	26,43	13,76	0,026	0,044
	Uke 3	3, 08.03	1,57	0,79	n.d.	0,78	0,41	n.d.	0,97	0,33	377,48	n.d.	29,2	22,83	0,063	0,196
T24	Uke 1	3, 24.02	1,84	0,92	n.d.	1,58	1,34	n.d.	4,59	0,88	1226,55	n.d.	22,04	164,10	0,227	0,71
	Uke 2	3, 02.03	2,31	1,59	n.d.	3,69	0,69	n.d.	2,20	0,49	978,89	n.d.	63,91	91,96	0,278	0,638
	Uke 3	3, 09.03	2,06	1,6	n.d.	4,4	0,85	n.d.	2,24	0,62	912	n.d.	66,29	77,14	0,245	0,625
Bokhvete	T0		1,52	0,67	#VERDI!	0,47	0,45	#VERDI!	1,27	0,36	426,60	#VERDI!	27,82	18,95	0,04	0,11
	T24		2,07	1,37	#VERDI!	3,22	0,96	#VERDI!	3,01	0,66	1039,15	#VERDI!	65,10	111,07	0,25	0,66
	Differansen	Bokhvete	0,55	0,70	#VERDI!	2,75	0,51	#VERDI!	1,74	0,30	612,55	#VERDI!	37,28	92,12	0,21	0,55
		St.avvik T0	0,15	0,15		0,27	0,10		0,39	0,12	35,41		1,38	3,81	0,02	0,06
		St. Avvik T24	0,19	0,32		1,20	0,28		1,12	0,16	135,30		1,19	37,99	0,02	0,04
T0	Uke 1	4, 23.02	2,08	0,73	n.d.	n.d.	8,74	0,29	10,50	1,92	15160,68	5,64	n.d.	5,45	n.d.	n.d.
	Uke 2	4, 01.03	2,23	0,82	n.d.	n.d.	9,92	0,28	11,19	1,96	15300,00	6,38	n.d.	4,89	n.d.	n.d.
	Uke 3	4, 08.03	2,52	0,64	n.d.	n.d.	7,95	0,28	9,84	1,71	14393,21	3,44	n.d.	4,53	n.d.	n.d.
T24	Uke 1	4, 24.02	10,92	1,31	n.d.	n.d.	15,83	0,52	18,03	3,28	28612,12	2,21	n.d.	10,38	n.d.	n.d.
	Uke 2	4, 02.03	9,87	1,26	n.d.	n.d.	16,01	0,42	18,20	3,21	27897,54	1,83	n.d.	9,61	n.d.	n.d.
	Uke 3	4, 09.03	10,32	1,13	n.d.	n.d.	14,72	0,45	17,21	3,04	27418,01	n.d.	n.d.	8,92	n.d.	n.d.
Quinoa	T0		2,28	0,73	#VERDI!	#VERDI!	8,87	0,28	10,51	1,86	14951,30	5,16	#VERDI!	4,96		
	T24		10,37	1,23	#VERDI!	#VERDI!	15,52	0,47	17,81	3,18	27975,89	2,02	#VERDI!	9,64		
	Differansen	Quinoa	8,09	0,50	#VERDI!	#VERDI!	6,65	0,18	7,30	1,31	13024,59	0,00	#VERDI!	4,68		
		St.avvik T0	0,18	0,07			0,81	0,00	0,55	0,11	398,70	1,25		0,38		
		St. Avvik T24	0,43	0,08			0,57	0,04	0,43	0,10	490,63	0,19		0,59		
T0	Uke 1	5, 23.02	0,89	0,02	6,03	n.d.	0,08	0,10	n.d.	n.d.	405,15	306,42	n.d.	1,85	n.d.	n.d.
	Uke 2	5, 01.03	0,92	0,03	6,07	n.d.	0,08	0,12	n.d.	n.d.	395,15	353,96	n.d.	1,20	n.d.	n.d.
	Uke 3	5, 08.03	1,01	0,03	6,51	n.d.	0,07	0,12	n.d.	n.d.	407,85	306,18	n.d.	2,09	n.d.	n.d.
T24	Uke 1	5, 24.02	1,03	0,03	9,20	n.d.	0,09	0,21	n.d.	n.d.	692,05	623,00	n.d.	2,02	n.d.	n.d.
	Uke 2	5, 02.03	1,17	0,03	10,32	n.d.	0,09	0,22	n.d.	n.d.	724,59	553,59	n.d.	1,39	n.d.	n.d.
	Uke 3	5, 09.03	1,09	0,03	10,93	n.d.	0,1	0,2	n.d.	n.d.	708,36	607,96	n.d.	2,1	n.d.	n.d.
Havre 2	T0		0,94	0,03	6,20	#VERDI!	0,08	0,12	#VERDI!	#VERDI!	402,71	322,19	#VERDI!	1,71		
	T24		1,10	0,03	10,15	#VERDI!	0,09	0,21	#VERDI!	#VERDI!	708,33	594,85	#VERDI!	1,84		
	Differansen	Havre 2	0,16	0,00	3,95	#VERDI!	0,02	0,09	#VERDI!	#VERDI!	305,62	272,66	#VERDI!	0,13		
		St.avvik T0	0,05	0,00	0,22		0,00	0,01			5,46	22,47		0,38		
		St. Avvik T24	0,06	0,00	0,72		0,00	0,01			13,29	29,81		0,31		
	Nullprøve	Havre 1	0,21	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,2	n.d.	n.d.	n.d.		
	Vann+mel	Bokhvete	10,17	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,77	n.d.	n.d.	n.d.		
		Quinoa	2,4	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	0,52	n.d.	n.d.	2,59	27,31	n.d.	n.d.		
		Havre 2	0,37	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,82	n.d.	n.d.	n.d.		

**Vedlegg 11** Evalueringsskjema brukt ved sensorisk evaluering av GF brød

<b>Brød</b>	<b>Porestruktur</b>	<b>Volum HxB</b>	<b>Fasthet</b>	<b>Kompakthet</b>	<b>Tørt, saftig?</b>	<b>Farge krummen</b>	<b>Smak</b>	<b>Syrlighet</b>	<b>Tørrhet/smuldrete</b>
<b>Bokhvete surdeig</b>									
<b>Bokhvete gjær</b>									
<b>Quinoa surdeig</b>									
<b>Quinoa gjær</b>									
<b>Havre-1 surdeig</b>									
<b>Havre-1 gjær</b>									
<b>Havre-2 surdeig</b>									
<b>Havre-2 gjær</b>									





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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway