



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Hemming av muggvekst i brød ved tilsetning av LAB, PAB og kalsiumpropionat i surdeig; en studie om vekst, metabolisme og antimikrobiell effekt av organiske syrer og reduksjon i pH

Antifungal activity in bread by adding LAB, PAB, and calcium propionate to sourdough; a study on growth, metabolism, and antimicrobial effect of organic acids and pH reduction

Kristine Øiestad Høy

Matvitenskap – Produksjon og utvikling av næringsmidler

Forord

Med denne masteroppgaven avslutter jeg min mastergrad i Matvitenskap og Ernæring retning produksjon og utvikling av næringsmidler, ved Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Arbeidet med denne masteroppgaven ble gjennomført ved laboratoriet tilknyttet SciFood.

Den første jeg ønsker å takke er min hovedveileder Førsteamanuensis Hilde Marit Østlie for god oppfølging og konstruktive tilbakemeldinger på mitt arbeid. Jeg setter stor pris på all tiden du har lagt ned og for at du alltid har tid til å svare på spørsmål. Videre ønsker jeg også å takke bi-veileder Førsteamanuensis Davide Porcellato for deling av kunnskap og gode tilbakemeldinger gjennom skriveprosessen.

Jeg ønsker også å takke May Helene Aalberg og Kari Olsen, og øvrige ansatte ved avdelingen for all hjelp på laboratoriet, gode samtaler, og ikke minst kaffepausene.

Til slutt ønsker også å takke min samboer, nærmeste familie og venner for at dere har hatt troen på meg, støttet meg og vært tålmodige gjennom perioden før og under arbeidet med masteren.

Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet
Fakultet for Kjemi, Bioteknologi- og Matvitenskap

Ås, 15. juni 2023

Kristine Øiestad Høy

Sammendrag

Brød og bakevarer står for en stor andel matsvinn årlig, noe som ofte skyldes muggvekst. Mugghemmende bakteriekulturer har fått stor oppmerksomhet som følge av forbrukernes ønske om naturlig mat uten kjemiske tilsetningsstoffer. Det er derfor av stor interesse å undersøke alternativer til kjemiske konserveringsmidler for industri tilknyttet bakerier. Selv om baketeknikk med surdeig er en gammel tradisjon, og det lenge har vært kjent at komponentene i surdeig har en hemmende effekt på mugg, så finnes det begrenset med forskning på hemming av mugg i surdeig ved benyttelse av propionsyrebakterier (PAB) og kalsium propionat. Hensikten med studien var å finne ut om melkesyrebakterier (LAB) og PAB i kombinasjon med hverandre eller alene kunne bidra til å hemme muggvekst på brød ved en synergistisk effekt. pH, organiske syrer og andre spesifikke mugghemmende metabolitter produsert av bakteriene har mest å si for den mugghemmende effekten observert i brødene. Innledningsvis ble vekst og metabolisme av 9 ulike LAB og 4 ulike PAB studert i buljong og et hvetemel hydrolysatmedium. Det ble analysert for evne til å omdanne karbohydrater til organiske syrer og senke pH. Forsøk med surdeig ble gjennomført for utvalgte PAB og LAB alene eller sammen med ulike vekstbetingelser. Brød ble bakt med gjær, surdeig med og uten LAB, surdeig med PAB, LAB og PAB som miks og LAB med kalsiumpropionat. Skivet brød ble inokulert med muggsoppene *Aspergillus niger* ATCC10577, *Penicillium roqueforti*, og *Fusarium* sp. Prøvene ble inkubert og observert visuelt i 21 dager ved 20 °C. I alle prøvene bakt med surdeig ble det observert en stor økning etter fermentering i mengden melkesyre med mer enn >2718,3 mg/kg. Mengden eddiksyre produsert var lav for alle prøvene, med unntak av prøver med propionsyre eller kalsiumpropionat. Kalsiumpropionat produserte mest for alle prøveuttakene fra 2322 mg/kg ved første uttak 2401,2 mg/kg. Den mugghemmende aktiviteten var mest synlig i prøver tilsatt PAB alene og sammen med LAB, og aller best i prøver tilsatt kalsiumpropionat som fullstendig hemmet muggvekst i alle prøver inokulert med sporer fra *Fusarium* sp., og *A. niger*. *P. roqueforti* viste seg mest motstandsdyktig til mugghemming, og ble ikke hemmet av noen av de tilsatte LAB og PAB stammene, eller kalsiumpropionat. Resultatene viste best effekt av syngenetisk effekt mellom flere komponenter hvor surdeig sammen med LAB og kalsiumpropionat viste best hemmende effekt etterfulgt av prøver med surdeig tilsatt både PAB og LAB.

Abstract

Bread and bakery products account for a significant amount of annual food waste, often due to mold growth. Antifungal components have received considerable attention due to consumers' desire for natural food without chemical additives. Therefore, it is of great interest to explore alternatives to chemical preservatives in bakery-related industries. While sourdough baking techniques are an ancient tradition and it has long been known that sourdough components have an antifungal effect on mold, there is limited research on mold inhibition in sourdough using propionibacterium (PAB) and calcium propionate. The aim of this study was to investigate whether lactic acid bacteria (LAB) and PAB in combination or alone could contribute to antifungal activity on bread through a synergistic effect. pH, organic acids, and other specific antifungal metabolites produced by bacteria play a crucial role in the observed mold inhibition in bread. Initially, the growth and metabolism of 9 different LAB and 4 different PAB were studied in broth and a wheat flour hydrolysate medium. The ability to convert carbohydrates into organic acids and lower pH was analyzed. Sourdough experiments were conducted for selected PAB and LAB alone or in combination with various growth conditions. Bread was baked with yeast, sourdough with and without LAB, sourdough with PAB, LAB and PAB in a mixture, and LAB with calcium propionate. Sliced bread was inoculated with the mold species *Aspergillus niger* ATCC10577, *Penicillium roqueforti*, and *Fusarium* sp. The samples were incubated at 20 °C and visually observed for 21 days. In all sourdough bread samples, a significant increase in the amount of lactic acid was observed after fermentation, exceeding 2718.3 mg/kg. The amount of acetic acid produced was low for all samples, except for samples with PAB or calcium propionate. Calcium propionate produced the highest amount among all sample extractions, ranging from 2322 mg/kg in the first extraction to 2401.2 mg/kg. The antifungal activity was most prominent in samples supplemented with PAB alone and in combination with LAB, and it was most effective in samples supplemented with calcium propionate, completely inhibiting mold in all samples inoculated with spores from *Fusarium* sp. and *A. niger*. *P. roqueforti* showed the highest resistance to antifungal activity and was not inhibited by sourdough, any of the added LAB and PAB strains, or calcium propionate. The results demonstrated the best effect of a synergistic interaction among multiple components, with sourdough together with LAB and calcium propionate exhibiting the strongest inhibitory effect, followed by samples with sourdough supplemented with both PAB and LAB.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
1. Innledning.....	1
1.1 Matsvinn.....	1
2. Teori.....	3
2.1 Surdeig.....	3
2.1.1 Sammensetning og etablering av surdeigskultur.....	3
2.1.2 Mikroorganismer i surdeig.....	5
2.1.3 Teknologiske egenskaper i surdeig.....	6
2.2 LAB.....	7
2.3 Propionsyrebakterier.....	10
2.4 Antimikrobielle bakteriekulturer og hemming av mugg.....	12
2.5 Problemstilling.....	14
3. Materialer og metoder.....	15
3.1 Forsøksoppsett.....	15
3.2 Bakteriestammer.....	16
3.3 Vekstmedier.....	16
3.4 Oppdyrking av LAB og PAB.....	19
3.5 Tilberedning av frysestock.....	19
3.6 Tilberedning av sporeløsning.....	20
3.7 pH måling.....	20
3.8 HPLC analyse.....	20
3.9 Etablering og sammensetning av surdeigskulturen.....	21
3.10 Innledende vekst- og metabolismeforsøk.....	22
3.10.1 Vekstforsøk og metabolisme i Buljong og Melmedium.....	23
3.10.2 Vekst og metabolisme i surdeig.....	24
3.10.3 Vekst og metabolisme for PAB i surdeig.....	24
3.11 Hemmeforsøk av mugg i brød.....	25
3.11.1 Brødbaking.....	25
3.11.2 Prøveuttak av deig og brød.....	27
3.11.3 Inokulering av sporer på brød.....	27
4. Resultater.....	28
4.1 Vekstforsøk.....	28

4.1.1 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av LAB i buljong og melmedium	29
4.1.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PAB i buljong og melmedium.	31
4.1.3 Innledende vekst- om metabolismestudier i surdeig.	35
4.2 Hemmeforsøk	42
4.2.1 Celletall	42
4.2.2 pH målinger.....	43
4.2.3 HPLC analyse.....	44
4.2.4 Visuell observasjon av mugg.....	46
5. Diskusjon.....	52
5.1 LAB	52
5.2 PAB	54
5.3 Surdeig	57
5.4 Hemmingsforsøket	58
5.4.1 Effekt av temperatur på pH og produksjon av organiske syrer	59
5.4.2 Visuell observasjon av muggvekst	60
6. Referanser.....	63

VEDLEGG 1: Rådata for innledende vekstforsøk i buljong og melmedium

VEDLEGG 2: Rådata for innledende vekstforsøk med PAB i surdeig

VEDLEGG 3: Rådata for hemmeforsøk (pH, celletall og HPLC) og frysestock

1. Innledning

1.1 Matsvinn

En av de store utfordringene verden står ovenfor er at det forbrukes mer naturressurser enn det som er bærekraftig for kloden. Ifølge «State of Food and Agriculture» rapporten fra FAO i 2019 kastes omtrent 14 % av all maten som produseres i verden før maten når butikkene. I tillegg kunne UNEPs «Food Waste Index Report» rapporterte at ytterligere 17 % av all produsert mat ender opp som søppel gjennom handel og blant husholdningene. Blant de 17 bærekraftsmålene til FN omtales matsvinn under bærekraftsmål 12 “Ansvarlig forbruk og produksjon”, hvor ett av målene innen 2030 er å «... halvere andelen matsvinn per innbygger på verdensbasis, både i detaljhandelen og blant forbrukere, og redusere svinn i produksjons- og forsyningskjeden, herunder svinn etter innhøsting» (FN-sambandet 2020, Mål 12, punkt 12.3). Matsvinn defineres som reduksjon i mengde eller kvalitet på mat langs forsyningskjeden. Et av de viktigste argumentene for å redusere matsvinn er at enhver råvare som ikke utnyttes fører til et tap av en hel verdikjede, noe som er belastende både for miljøet og økonomisk. I tillegg vil et mindre matsvinn føre til økt tilgang til mat uten å øke produksjonen, noe som også reduserer presset på klima og miljø (Meld. St. 40 (2020–2021), 2021).

Brødbaking er sannsynligvis en av de eldste teknologiene kjent for menneskeheten og regnes for å være en av de viktigste produktene i matindustrien (Chavan & Chavan, 2011; De Vuyst & Neysens, 2005). Brød er en grunnleggende matvare i mange land og blir konsumert daglig over hele verden. Bare i Europa er gjennomsnittlig konsum per person på 50 – 80 kg årlig (Axel et al., 2017). Til tross for et høyt forbruk blir det også registrert store mengder svinn på bakevarer, og en undersøkelse fra Norsus (2023) viste at brød og bakevarer utgjorde 5% av all matsvinn i Norge i 2021, noe som tilsvarer mer enn 4000 tonn per år (Stensgård et al., 2023). Samtidig som forbrukere og produsenter rapporterer en høy mengde svinn som følge av produksjon av brød og bakevarer endrer også forbrukeratferden seg. Særlig er det en bekymring blant forbrukerne for mattrygghet og tilsetningsstoffer i maten, i tillegg til at flere forbrukere er mer helsebevisste en før. Et resultat av dette er høy etterspørsel etter «naturlig» og «sunn» mat, uten kjemiske konserveringsmidler og tilsetningsstoffer på markedet. Som følge av dette er det viktig at brød og bakevarer som produseres opprettholder høy kvalitet med god holdbarhet med minimal bearbeiding og uten tilsats av kjemiske konserveringsmidler eller kunstige tilsetningsstoffer (Axel et al., 2017).

De viktigste kvalitetskjenne­tegnene til gjærede brød laget av hvete er høyt volum, myk og elastisk krummestruktur, lang holdbarhet og mikrobiologisk sikkerhet for produktet. Imidlertid har ferskt brød en begrenset holdbarhet, og under lagring skjer det en rekke kjemiske og fysiske endringer som kalles "staling". Disse endringene fører gradvis til forringelse av brødetts kvalitet ettersom det mister ferskhets­ og sprøhet, samtidig som krummens fasthet og hardhet øker. Den behagelige aromaen forsvinner, og smaken blir harsk (Chavan & Chavan, 2011)

Forringelse av brød skyldes hovedsakelig forurensning etter steking, ved luftbåren spredning av muggsporer (Chavan & Chavan, 2011). De mest avgjørende faktorene som påvirker og styrer veksten av uønskede muggsopp på matvarer er oksygen, temperatur, pH og vannaktivitet (a_w). Generelt har brød relativt høyt vanninnhold og har en a_w mellom 0,94 og 0,97, ved pH på rundt 6. Når brødet er innpakket, har nybakt brød uten tilsetning av konserveringsmidler kun noen få dagers holdbarhet ved romtemperatur. Muggsoppforringelse av brød er et alvorlig problem, og den påfølgende kastingen medfører fortsatt store økonomiske tap både for bakeriindustrien og forbrukeren (Axel et al., 2017).

2. Teori

2.1 Surdeig

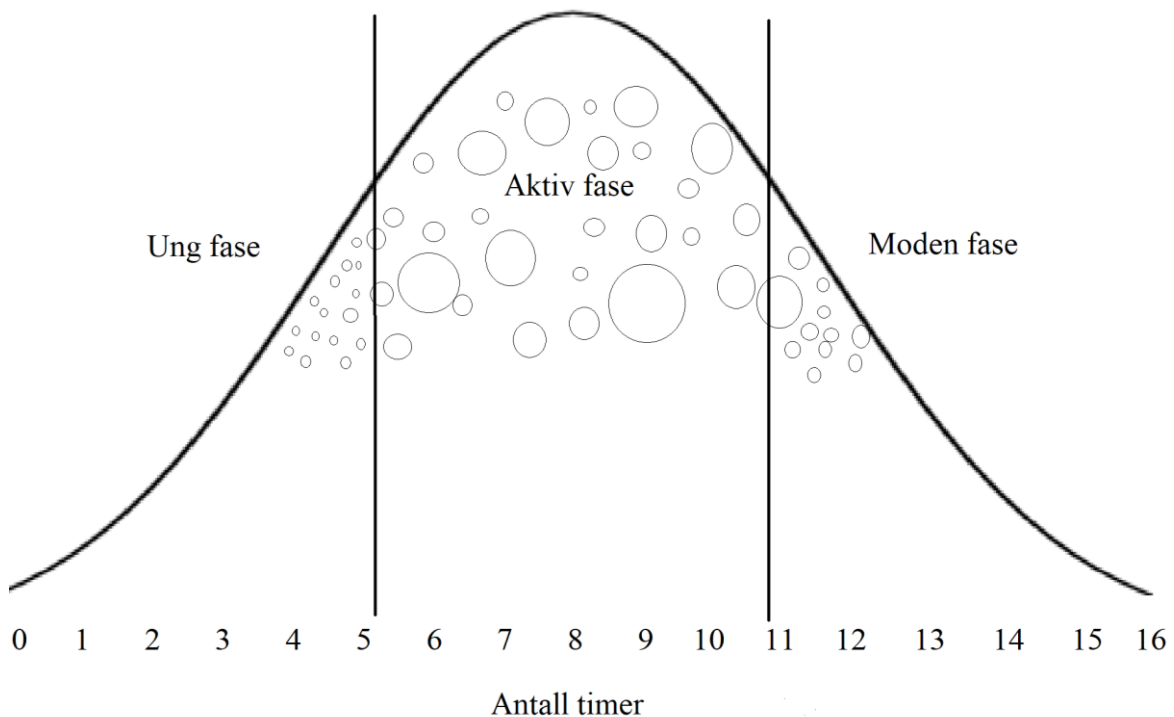
2.1.1 Sammensetning og etablering av surdeigskultur

Produksjon av brød og bakevarer ved bruk av surdeigsstarter er en metode som benyttes for å heve deig og bidrar til å skape luftige bakverk gjennom en fermenteringsprosess. Det er også en av de eldste bioteknologiske prosessene innen produksjon av kornbasert mat. Surdeigsbrød lages ved å fermentere en blanding av mel og vann med melkesyrebakterier (LAB) og gjær. Fermenteringsprosessen resulterer i produksjon av melkesyre, eddiksyre, CO₂, etanol og aromakomponenter som diacetyl, og gir dermed et syrlig, aromatisk og behagelig velsmakende sluttprodukt (Chavan & Chavan, 2011; De Vuyst & Neysens, 2005).

Den tradisjonelle metoden for å etablere en surdeigsstarter på er å blande mel og vann, og som gjennom gjentatte fermenteringssteg oppnår en rik mikrobiell sammensetning som bidrar til de teknologiske egenskapene som kjennetegner surdeig. Denne typen fermentering kalles spontan fermentering, og oppnås ved å oppbevare blandingen med mel og vann i romtemperatur, ca 20 °C, og fornyes hver 24. time imellom 5 – 15 dager, til pH er stabil. Når pH i surdeigsstarteren er stabil er den «moden» (Calvert et al., 2021). Moden surdeigsstarter holdes den ved like ved å tilsette en del av moderdeigen til mel og vann, og dette kalles backslopping. Ved bruk til baking benyttes en aktiv surdeigskultur som erstatning for bakegjær, og blandes sammen med resten av ingrediensene og bidrar til å heve bakverket og tilføre næringsstoffer, smak og aroma (Minervini et al., 2014).

En aktiv surdeigskultur til bruk ved brødbaking oppnås ved backslopping etterfulgt av fermentering ved romtemperatur (20 °C). Det er viktig å bruke kulturen i tidsrommet hvor den er mest aktiv, men antall timer som kreves for å oppnå dette kan variere ut fra ulike faktorer som temperatur, sammensetning i surdeigen (type mel), og mengdeforhold mellom mel og vann. En studie gjennomført av De Vuyst et al. (2014) viste at fermenteringstiden kan variere fra 3 – 72 timer, avhengig av de overnevnte faktorene, i tillegg påvirker også hvilke LAB-stammer som er mest dominerende. Ved romtemperatur, 20 – 25 °C, er det mulig å oppnå en aktiv starterkultur fra mellom 5 – 48 timers fermentering (De Vuyst et al., 2014). Ved et tidlig stadium av fermenteringen vil heveegenskapene være dårlige, og kulturen vil ikke enda være dominert av ønskede LAB og gjær. En aktiv starter har store bobler, og en sur/søt smak og aroma som resultat av fermenteringen. En moden starter har passert toppen av fermenteringskurven og begynner å mangle næring for de fermenterende mikroorganismene,

og karakteriseres ved svært sur lukt og smak, og har mindre bobler og har en mer sammensunket struktur. En illustrasjon av utviklingen til en surdeigsstarter gjennom ulike faser av fermenteringen er illustrert i Figur 1. Ved tradisjonell tillaging av surdeig benyttes visuell observasjon (volum, størrelse på bobler, lukt og smak) og flyte-test (deig som flyter i vann er klar til bruk) som metode for å avgjøre om surdeigsstarteren er klar til bruk (Calvert et al., 2021).



Figur 1. Faser av fermentering av surdeigsstarter med ung fase karakterisert av noe bobledannelse, aktiv fase kjennetegnes ved store bobler og moden fase med en reduksjon av størrelsen på boblene. Antall timer oppgitt er brukt som illustrasjon (Calvert et al., 2021)

Ingrediensenes rolle i brødbakingen er av stor betydning og viktige ingredienser som mel, surdeig og vann spiller alle en unik rolle. Hver ingrediens bidrar til å forme brødets egenskaper og påvirker smak, tekstur og konsistens på forskjellige måter (Chavan & Chavan, 2011).

Mel består av protein, stivelse og andre karbohydrater, aske, fiber, lipider, vann og små mengder vitaminer, mineraler og enzymer. De to grunnleggende typene proteiner som hvitemel inneholder, er gliadin og glutenin som danner et nettverk av gluten når de blandes. Når disse proteinene blir sammenkoblet danner de et kohesivt og elastisk nettverk når de blir fuktet, som for eksempel under tilberedning av deig. Gassretensjonsegenskapene bestemmer igjen volumet på brødet og krummestrukturen (Chavan & Chavan, 2011).

Vann er nødvendig for dannelse av deig og bidrar til den viskøse konsistensen. Det brukes til å løse opp salt og sukker, og hjelper til med å fordele mikroorganismer til stede og påvirker deres vekst. Vann er nødvendig for hydrolyse av stivelse og sukrose. Det er viktig for gelatinisering av stivelse under baking og bidrar til heving i ovnen gjennom fordampning (Chavan & Chavan, 2011). Natriumklorid (NaCl) betraktes som en ingrediens med en funksjonell rolle i produksjonen av mange bakevarer. NaCl styrker glutenettverket, regulerer mikroorganismenes aktivitet og dermed kontrollerer brødets volum. En liten mengde NaCl i deigen forbedrer smaken og påvirker enzymaktiviteten til amylase, som hjelper til med å opprettholde en tilførsel av maltose som næring for mikroorganismene (Chavan & Chavan, 2011)

2.1.2 Mikroorganismer i surdeig

Den typiske karakteristikk til surdeig skyldes hovedsakelig dens mikroflora, som hovedsakelig består av (LAB) og gjær og bidrar til den metabolske aktiviteten.

Mikroorganismene sikrer syreproduksjon og heving av deigen ved tilsetning av mel og vann. Under fermentering skjer biokjemiske endringer i karbohydrat- og protein-komponentene i melet på grunn av mikrobielle enzymer som amylaser og proteinaser (Chavan & Chavan, 2011)

I begynnelsen av første fermenteringssteg ved tillaging av en ny surdeigsstarter vil den mikrobielle populasjonen være dominert av mikroorganismene som er til stede i melet, og består av LAB, Gram-positive (f.eks. *Bacillus* sp.) og Gramnegative (f.eks. *Pseudomonas*) aerobe bakterier, *Enterobacteriaceae*, gjær og mugg. Hver mikrobiell gruppe er til stede med et celletall som vanligvis ikke overstiger 5 log kde/g. Når vann tilsettes i melet vil redokspotensialet reduseres, noe som favoriserer veksten av fakultativt anaerobe *Enterobacteriaceae*, og gjær, og også LAB, hvor de fleste er aerotolerante anaerobe. Siden karbohydratmetabolismen til LAB og gjær er godt tilpasset til mono- og di-sakkarider blir melke- og eddiksyre produsert noe som fører til en pH-nedgang i deigen. En slik nedgang, blir vanligvis synlig ved andre fermenteringssteg. Etter hvert som fermenteringsstegene gjentas, vil LAB og gjær utkonkurrere andre bakteriegrupper i den modne surdeigen med tall opp mot henholdsvis 6 – 9 log kde/g og 5 – 8 log kde/g (Minervini et al., 2014). Det har blitt funnet at uavhengig av hvilket mel som benyttes er det *Lb. fermentum* og *Lb. plantarum* som dominerer i surdeigsstarterkulturer (Huys, 2013)

Gjærceller finnes naturlig i surdeig da de finnes naturlig i mel og metaboliserer forgjærbare sukkerarter som glukose, fruktose, sukrose og maltose under anaerobe betingelser og produserer CO₂ som et avfallsprodukt. CO₂ fungerer som et hevemiddel og øker deigens volum. De vanligste typene gjær som finnes i surdeig er *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua* og *Candida humilis*, i tillegg til *Pichia kudriavzevii* (Chavan & Chavan, 2011; Minervini et al., 2014). (Gobbetti et al., 2019)

2.1.3 Teknologiske egenskaper i surdeig

Surdeigs-fermentering påvirker deigens reologi på to nivåer, hvor både surdeigen i seg selv påvirker og brøddeigen som inneholder surdeig. I surdeigsstarteren reduserer fermenteringen elastisitet og viskositet i blandingen, mens tilsetning av surdeig til den endelige brøddeigen resulterer i en mindre elastisk og mykere deig. Nivået av reologiske endringer som skjer i disse deigene og deres innvirkning på brødetts kvalitet kan kontrolleres ved å justere fermenteringstiden og innhold av aske i melet i forkant av fermenteringsprosessen (Chavan & Chavan, 2011)

Surdeigsfermentering kan utføres som fast deig eller som en flytende suspensjon av mel i vann. Forholdet mellom mel og vann kalles «dough yield (DY) (deigutbytte) og er definert som:

$$DY = \frac{(Mengde\ mel +\ mengde\ vann) \times 100}{mengde\ mel}$$

DY-verdien til en surdeig vil ha betydelig innvirkning på smaksprofilen til surdeigen. Jo fastere surdeigen er (lavere DY-verdi), desto mer eddiksyre produseres da gjær selekteres og desto mindre melkesyre. Syrningshastigheten påvirkes også av DY-verdien til en surdeig. Jo høyere DY, desto raskere vil syringen skje antakelig på grunn av bedre diffusjon av de produserte organiske syrene i miljøet og fordi homofermentative LAB-stammer selekteres, (Chavan & Chavan, 2011; Minervini et al., 2014).

Temperatur er en viktig faktor, som har stor innvirkning på den mikrobielle sammensetningen av surdeigen. Hvis backslopping brukes, der en del av den forrige surdeigen brukes til å inokulere neste gjæring, spiller temperaturen en kritisk rolle, fordi en del av mikrofloraen kan gå tapt gjennom de forskjellige surdeigsoppfriskningene hvis temperaturen ikke kontrolleres. Optimal temperatur for vekst av *Lactiplantibacillus* er 30 til 40 °C avhengig av art og

stamme, og for gjær er det 25 til 27 °C. Generelt sett vil høyere temperatur, høyere vanninnhold i surdeigen og bruk av sammalt mel favorisere LAB fremfor gjær, noe som vil forsterke produksjonen av syrer i hvetesurdeiger (Chavan & Chavan, 2011).

Kaldheving av deig er en vanlig praksis for mange bakerier og er en måte å kontrollere fermenteringen på. Det er viktig av gjær og bakterieceller overlever denne nedkjølingen for å kunne fortsette fermenteringsprosessen under og etter oppbevaring ved kjøletemperatur. Ved 4-8 °C fortsetter mange stammer av gjær å fermentere med redusert hastighet, men det vil likevel være en synlig heving av deigen. Ved lave temperaturer reduseres syrningsprosessen, noe som øker mengden CO₂ som produseres av noen gjærstammer som *Candida milleri*. Reduksjon av temperatur til 4-8 °C er en praktisk måte å kontrollere fermenteringstiden på og for å kunne gjennomføre produksjon av surdeiger til gitte tider (Guerzoni et al., 2013).

pH i surdeigsstartere er et vanlig parameter å bruke for å kontrollere om kulturen er aktiv og kan brukes til brødbaking, særlig ved industriell bruk. Det er også viktig i selve brødbakingen som et mål på mengden organiske syrer produsert. En studie gjennomført av (Wehrle & Arendt, 1998) fant at surdeig hvor det ble benyttet kommersielle surdeigsstarterkulturer hadde raskere fall i pH sammenlignet med backsloppet surdeig (Wehrle & Arendt, 1998)

Surdeig har blitt gruppert i tre typer basert på den anvendte teknologien: Type I, er den tradisjonelle metoden for surdeig hvor en del av en etablert surdeig benyttes videre til å oppnå en aktiv kultur (backslopping). Type II og III er mest benyttet industrielt, hvor type II er en flytende variant som bruker tilpassede stammer for å starte gjæringen, og type III er en surdeig som er tørket. I denne masteroppgaven vil type I surdeig benyttes (Chavan & Chavan, 2011).

2.2 LAB

LAB finnes naturlig i en rekke forskjellige miljøer i naturen som er rike på næring, som frukt, melk, fisk, grønnsaker og kjøtt. De spiller også en viktig rolle i fermenteringsprosesser for å produsere en rekke matvarer, inkludert vin, ost, yoghurt og surdeigsbrød. Egenskapene til LAB er svært nyttige for å skape ønsket smak og aroma i disse produktene. De er i stand til å omdanne sukker til melkesyre og andre organiske syrer, noe som bidrar til å gi produktene en karakteristisk syrlig smak. I tillegg kan LAB bidra til å skape ønsket tekstur i matvarer, for eksempel ved dannelse av viskøse egenskaper i yoghurt eller mykheten i oster (König & Fröhlich, 2017).

En annen viktig fordel med LAB er deres evne til å senke pH-nivået i produktene gjennom syreproduksjon. Dette bidrar til å øke holdbarheten til matvarer ved å hemme veksten av skadelige mikroorganismer. Melkesyre og eddiksyre, som produseres av LAB, senker pH-verdien og skaper et ugunstig miljø for mulige patogene bakterier og muggsopp (König & Fröhlich, 2017).

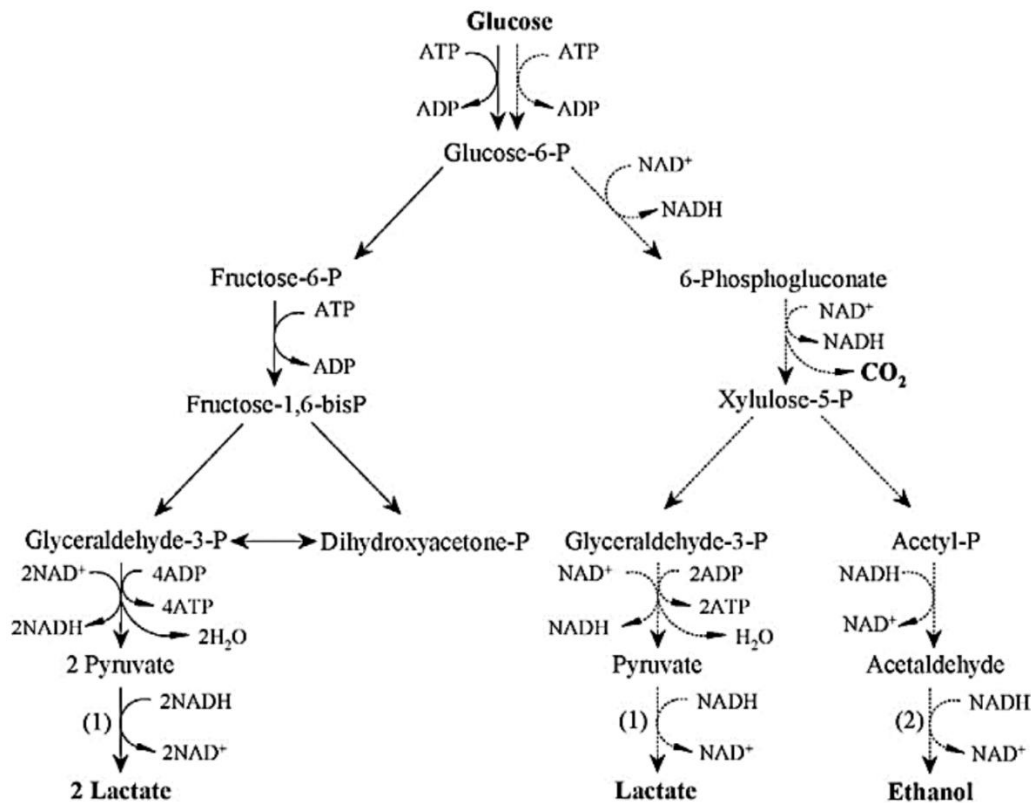
På grunn av disse egenskapene er LAB en viktig komponent i mange fermenterte matvarer. De gir ikke bare smak, aroma og tekstur, men bidrar også til å øke holdbarheten og sikre mattrygghet (König & Fröhlich, 2017).

Kjennetegn for LAB er at de er Grampositive, ikke mobile, ikke sporulerende, katalase-negative og aerotolerante bakterier. De er også syretolerante, produserer melkesyre og eddiksyre og er enten stav- eller kokkeformede (Adams et al., 2016b; König & Fröhlich, 2017).

I 2020 ble slekten *Lactobacillus* reklassifisert til 25 slekter og det vil i denne studien bli benyttet ny nomenklatur på bakteriestammene tilhørende *Lactiplantibacillus*-slekten.

Metabolisme hos LAB kan generelt deles inn i to typer: homofermentativ og heterofermentativ metabolisme (Figur 2). Ved homofermentativ metabolisme fermenterer LAB glukose og produserer melkesyre som hovedsluttprodukt gjennom Embden-Meyerhof-Parnas-veien (EMP). Eksempler på LAB som benytter denne reaksjonsveien inkluderer *Streptococcus*, *Lactococcus* og noen *Lactiplantibacillus*. Disse er vanligvis brukt i fermenterte matprodukter.

Ved heterofermentativ metabolisme benyttes pentosefosfatveien (PF), og sluttproduktene inkluderer melkesyre, etanol, eddiksyre og CO₂. LAB som har heterofermentativ metabolisme mangler enzymet aldolase, som er nødvendig for nedbrytning av fruktose-1,6-difosfat. Eksempler på LAB som har denne type fermentering inkluderer *Leuconostoc*, *Weissella* og noen *Lactiplantibacillus*-stammer. I surdeig er det vanligvis heterofermentative LAB som dominerer, spesielt i tradisjonelt tilberedte surdeiger (De Vuyst & Neysens, 2005). *Lactiplantibacillus*-stammer er generelt mer vanlige enn *Leuconostoc*, *Weissella* og *Pediococcus*-arter, og dette skyldes deres konkurransevne og tilpasningsevne til dette spesifikke miljøet (De Vuyst & Neysens, 2005). Eksempler på ulike LAB-stammer, delt inn etter reaksjonsvei for fermentering av glukose, er oppført i Tabell 1.



Figur 2. Metabolisme hos melkesyrebakterier via fra venstre homofermentativ fermentering (Embden-Meyerhof-Parnas reaksjonsvei) og til høyre heterofermentativ fermentering (pentosefosfatvei) (Mora-Villalobos et al., 2020).

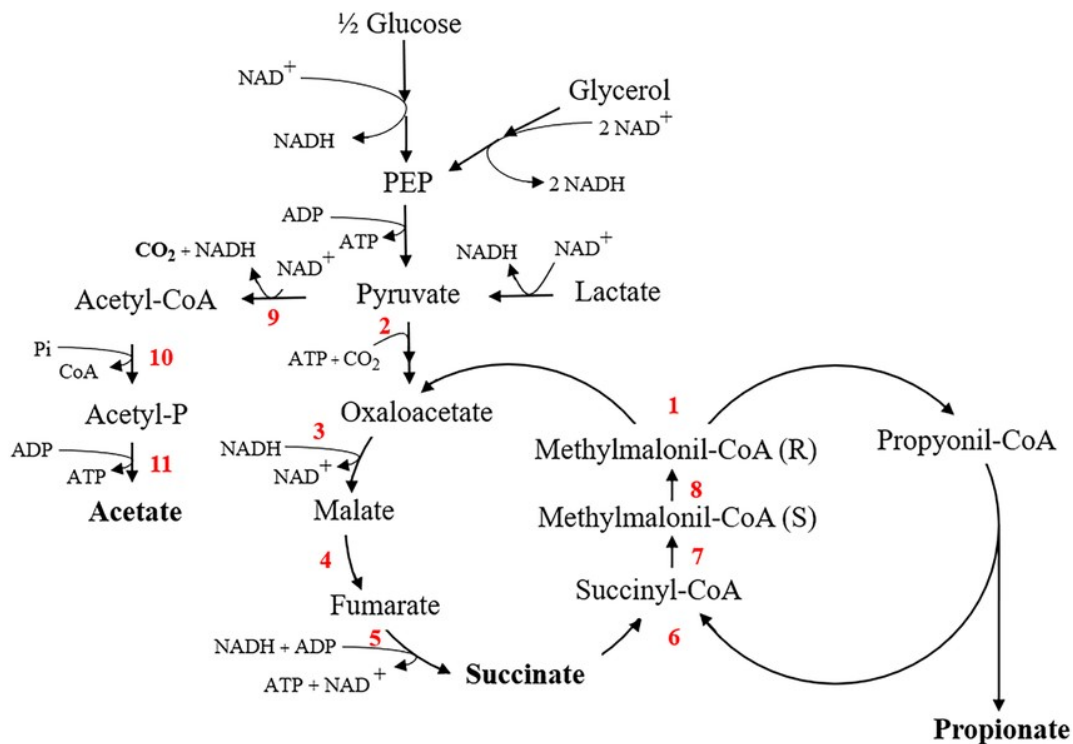
Tabell 1. Gruppering av melkesyrebakterier med hensyn til reaksjonsvei for omsetning av karbohydrat (De Vuyst & Neysens, 2005; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

Homofermentativ	Obligat heterofermentativ	Fakultativ heterofermentativ
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lactiplantibacillus</i> spp.	<i>Lb. alimentarius</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. casei</i>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. bruchneri</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>
<i>Lb. mindensis</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. pontis</i>	<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. sanfranciscensis</i>	
	<i>Lb. frumenti</i>	
	<i>Lb. panis</i>	
	<i>Weissella ciberia</i>	
	<i>W. confusa</i>	

I tillegg til glukosefermentering har flere *Leuconostoc*- og noen *Lactiplantibacillus*-stammer evnen til å fermentere sitrat ved sitratforgjæring (Holzapfel, 2014). Sitratforgjæring innebærer transport av sitronsyre inn i cellen ved hjelp av sitratpermease, etterfulgt av nedbrytning av sitronsyre til eddiksyre og oksaleddiksyre ved enzymet sitratlyase. De endelige produktene av sitratfermentering er eddiksyre, diacetyl, acetoin og CO₂ (Hugenholtz, 1993; Jay, 1982).

2.3 Propionsyrebakterier

Studier gjennomført på propionsyrebakterier (PAB) viser at denne bakterieslekten er i stand til å syntetisere verdifulle metabolitter slik som propionsyre, vitamin B12, bakterosiner og trehalose (Piwowarek et al., 2018). Metabolittene blir hyppig benyttet innen kosmetikk, farmasøytiske produkter og matindustrien. Hovedmetabolismen til PAB (Figur 3) skjer gjennom omdanning av laktat eller glukose til eddiksyre og propionsyre (Wood-Werkman syklusen). I tillegg kan dannes også CO₂ som et bi-produkt fra denne metabolismen som bidrar til ønskede egenskaper i matprodukter som fermenteres med PAB. I matindustrien er PAB mest kjent som en sekundær starter under ostemodning av sveitsiske type oster og Jarlsberg. Under ostemodning bidrar PAB til nøttaktig og søt smak ved å produsere prolin ved hjelp av aminopeptidase som konverterer frie aminosyrer til aromatiske forbindelser (Piwowarek et al., 2018). CO₂, som et biprodukt, gir hulldannelse i osten (Fox et al., 2015).



Figur 3. Reaksjonsvei for propionsyre bakterier ved omdanning av glukose til eddiksyre og propionsyre, og laktat til propionsyre med CO₂ bi-produkt (Assis et al., 2022).

PAB som benyttes i matproduksjon består av underarter innenfor arten *Propionibacterium freudenreichii*; ssp. *shermanii* og ssp. *freudenreichii*. Bakteriestammer fra *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* kan redusere nitrat, men de kan ikke fermentere laktose. Stammer fra *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* kan metabolisere laktose, men kan ikke redusere nitrat (Piwowarek et al., 2018). PAB er Grampositive, ikke-motile, ikke-sporulerende bakterier. De er også katalase negative og har en lengde på ca 1-5 μm og de blir ansett som obligat anaerobe, selv om noen stammer er aerotolerante. Bakteriece llene har form som pleomorfe stavformede bakterier og er saktevoksende (Piwowarek et al., 2018; Prodan, 2012).

Optimal pH for PAB er rundt 7,0, men de vokser også ved pH 4,5 – 8,0. De fleste PAB er mesofile, og har temperaturoptimum på 30 °C, men de kan også tåle høyere temperaturer over kort tid. Faktorer som hemme vekst av PAB er blant annet svært sure miljøer, lave/høye temperaturer, høy saltkonsentrasjon og lav vannaktivitet. I tillegg til å trenge nitrogen og karbon som kilde til vekst, trenger de også supplement av mikroelementer slik som jern, magnesium, kobolt, mangan, kobber, aminosyrer, vitamin B7 og B5 og L-cystein hydroklorid. Tilstedeværelse av asparginsyre fremmer vekst av PAB og øker effektiviteten på fermenteringen og CO₂ produksjonen. Den primære kilden til karbon er sakkarider, slik som

glukose, laktose, fruktose, ribose og galaktose, og organiske syrer som melkesyre. Peptider, aminosyrer, ammoniumsalter og aminer er hovedkildene til nitrogen (Piwowarek et al., 2018).

Propionsyre hemmer vekst av mikroorganismer ved akkumulering inne i cellen, noe som bidrar til å hemme enzymatisk aktivitet. PAB produserer også forbindelser som har konserverende effekt på lik linje som LAB, slik som bakterosiner og eddiksyre, i tillegg til at de kan produsere propionsyre (Piwowarek et al., 2018).

Kalsiumpropionat (KPr) er en kilde til både kalsium og propionsyre og har GRAS («generally recognized as safe») status. KPr dissosierer og danner propionat og kalsiumioner og er et konserveringsmiddel som virker i mat med lav pH. Det antas vanligvis at den antibakterielle mekanismen til KPr er som følger: under sure forhold produserer KPr fri propionsyre for å hemme aktiviteten til intracellulære enzymer, og den antibakterielle aktiviteten til KPr påvirkes av pH-verdien. Ved lavere pH-verdier har KPr bedre antibakterielle aktivitet (Yang et al., 2023). KPr blir vanligvis benyttet i brød som en mugghemmer. I en studie gjennomført av Ryan et al. (2008) ble det observert en synergistisk effekt når surdeig ble fermentert med sopphekkende *L. plantarum*-stammer i kombinasjon med KPr i brød laget av hvete. Det ble observert god mugghekkende effekt på brødet, og økt holdbarheten mot flere muggsopparter (Ryan et al., 2008).

2.4 Antimikrobielle bakteriekulturer og hemming av mugg

Den vanligste årsaken til forringelse av bakevarer er muggvekst, noe som kan føre til bekymringer for folkehelsen hvis muggsoppen til stede produserer mykotoksiner. Muggsopp som forårsaker kvalitetsforringelse og ofte er assosiert med tap av bakevarer, tilhører slektene *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* og *Rhizopus*. Brøddeig er et næringsrikt økosystem og er derfor ofte utsatt for vekst av uønskede kvalitetsødeleggende og patogene mikroorganismer. Melet i deigen består av komplekse karbohydrater som gjennom delvis hydrolyse fra amylaser fra melet og mikroorganismene omdannes til disakkarider (maltose) og monosakkarider (glukose og fruktose). Nitrat, ammoniakk og proteiner er nitrogenkilder med hensyn til mikrobiell vekst. Gjennom fermentering blir proteiner ved hjelp av proteinaser i mel og fra mikroorganismene hydrolysert til enklere bestanddeler som peptider og frie aminosyrer. Med høy tilgang til næring, er det derfor viktig at gjær og ønskede bakterier som LAB og PAB dominerer mikrofloraen, slik at uønskede mikroorganismer ikke kan vokse (Belz et al., 2012; Chavan & Chavan, 2011).

Surdeigsfermentering har flere positive effekter på holdbarheten og mikrobiell sikkerhet i brød. LAB som finnes i surdeig produserer antimikrobielle stoffer som organiske syrer, CO₂, etanol, hydrogenperoksid, diacetyl, fettsyrer, fenylmelkesyre, reuterin og fungisider, som bidrar til å hemme veksten av skadelige bakterier og muggsopp (Chavan & Chavan, 2011).

De organiske syrene som produseres av LAB og PAB, spesielt eddik- og propionsyre, er mer effektive i å hemme mikrobiell vekst sammenlignet med melkesyre. Dette skyldes at svakere syrer har høyere pKa verdier, og dermed er mer udisosiert sammenlignet med sterke syrer med lavere pKa verdier. Eddiksyre og Propionsyre har pKa verdier på henholdsvis 4,75 og 4,87 og er svakere syrer enn melkesyre som har en pKa verdi på 3,86 (Adams et al., 2016a). Disse syrene, sammen med andre organiske forbindelser, spiller en viktig rolle i å forhindre veksten av muggsopp som *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* og *Monilia* i brød. Enkelte LAB-stammer, som *L. plantarum*, produserer mugghemmede forbindelser som 4-hydroksyfenylaktat og fenyllaktat, hvor disse komponentene beholder sin soppdrepende aktivitet selv etter baking (Chavan & Chavan, 2011).

LAB produserer også bakteriosiner, som er antimikrobielle peptider som kan hemme veksten av matbårne patogener og bakterier som forårsaker forringelse av mat, som *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* og *Staphylococcus aureus*. Bruken av LAB-bakteriociner som matadditiver eller bruk av LAB-stammer som starterkulturer kan bidra til produksjon av tryggere bakeriprodukter og redusere behovet for kjemiske konserveringsmidler (Chavan & Chavan, 2011).

Vannaktiviteten (a_w) i brød er vanligvis mellom 0,94 og 0,97, noe som bidrar til at brød enkelt kontamineres av uønskede mikroorganismer. pH i surdeig rett etter backslopping eller setting av deig er vanligvis litt under nøytral, men gjennom inkubering av deigen blir deigen surere og oppnår en pH på ca 4,0 litt avhengig av antall backslopping steg som er benyttet.

Redokspotensialet blir gradvis redusert gjennom fermenteringen og inkubering. Alle disse overnevnte faktorene bidrar til at LAB og gjær kan utkonkurrere uønskede mikrober til stede (Chavan & Chavan, 2011; Minervini et al., 2014).

Generelt spiller LAB og PAB en avgjørende rolle med hensyn til konservering og mikrobiell sikkerhet i fermenterte matvarer, hvor de bidrar til mikrobiell stabilitet i sluttproduktene. Både LAB og PAB har vist seg å ha både antibakterielle og antifungale egenskaper, og tilsetning av surdeig er en effektiv metode for å beskytte brød mot kvalitetsforringelse, samtidig som det

oppfyller forbrukernes krav med hensyn til mest mulig tilsetningsfrie produkter (Chavan & Chavan, 2011; Piwowarek et al., 2018).

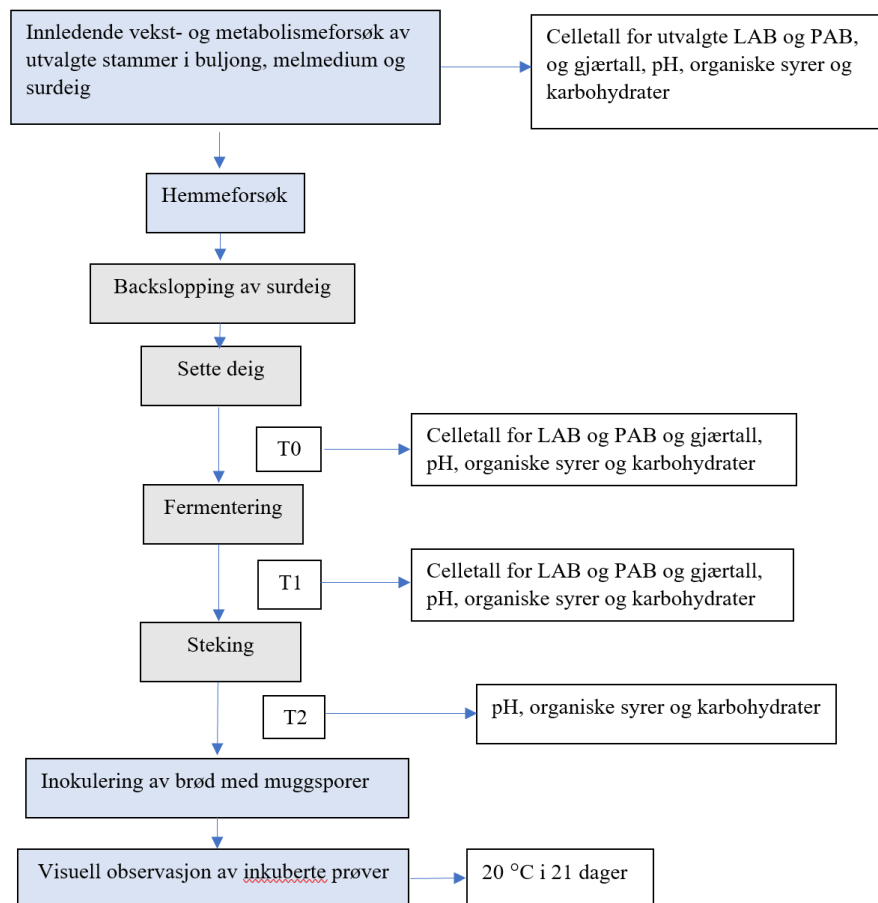
2.5 Problemstilling

Formålet med denne masteroppgaven var å finne ut om melkesyrebakterier (LAB) og propionsyrebakterier (PAB) i kombinasjon med hverandre kunne bidra til å hemme muggvekst på brød både hver for seg og sammen ved en synergistisk effekt. Studien ble gjennomført ved å se på LAB og PAB sin evne til å senke pH og deres påvirkning på innhold av organiske syrer i ulike medier som næringsbuljong, melmedium og i surdeig.

3. Materialer og metoder

3.1 Forsøksoppsett

I denne oppgaven har fokuset vært å undersøke vekstegenskapene til melkesyrebakterier (LAB) og propionsyrebakterier (PAB), samt deres evne til å senke pH-verdien og produsere organiske syrer (Figur 4). Innledningsvis ble vekst og metabolisme til stammer av LAB og PAB testet ut i ulike vekstmedier (buljong og melmedium). Utvalgte stammer av LAB og PAB ble deretter inokulert i surdeig for å videre undersøke vekst og metabolisme. Basert på resultatene fra de innledende vekstforsøkene ble det valgt ut fire stammer LAB og en stamme PAB for inokulering i surdeig og tillaging av surdeigsbrød. Brødene som ble benyttet i forsøket ble sammenlignet med brød bakt uten surdeigsstarter (kontroll). Brødsriver ble inokulert med sporeløsninger av muggsopp på overflaten for å observere muggvekst visuelt.



Figur 4. Forsøksoppsett. Oversikt over de ulike trinnene med aktiviteter og analyser gjennomført i masterstudien fra forberedelser med innledende vekt og metabolismeforsøk med melkesyrebakterier (LAB) og propionsyrebakterier (PAB), og videre til hemmeforsøk med baking av brød med prøveuttak etter elting (T0), etter fermentering (T1) og etter steking (T2), etterfulgt av visuell observasjon av muggvekst på brød.

3.2 Bakteriestammer

I denne studien ble det benyttet totalt 9 ulike LAB (Tabell 2), hvorav 5 stammer *Lactiplantibacillus*, 2 stammer *Weissella* og 2 stammer *Leuconostoc*. For propionsyre ble det totalt benyttet 4 utvalgte stammer av *Propionibacterium freudenreichii* (Tabell 3).

Tabell 2. Utvalgte melkesyrebakterier benyttet

Melkesyrebakterie stammer	Opprinnelse
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 15 D	Ost
<i>Weissella confusa</i> TM76	Soyabønner ¹
<i>Weissella cibaria</i> TM120	Soyabønner
<i>Lactiplantibacillus fermentum</i> TM314	Soyabønner
<i>Leuconostoc citreum</i> GK45	Bygg ²
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides/mesenteroides</i> VL4	Havre ³
<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i> VL51	Havre
<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i> CM65	Erter
<i>Pediococcus pentosaceus/Lactiplantibacillus plantarum</i> CM67	Fababønner

¹(Ng'Ong'Ola-Manani et al., 2015), ²(Kvam, 2017), ³(Leirvik, 2022)

Tabell 3. Utvalgte propionsyrebakterier benyttet

Propionsyrebakterier	Stamme
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	ATCC 9616
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	ISU P50
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	LMG 2948
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	LMG 3001

3.3 Vekstmedier

For dyrking og vedlikehold av bakterier ble flytende buljongmedier og faste agarmedier benyttet. Vekstmedier ble tilberedt for melkesyrebakterier (LAB), gjær og

propionsyrebakterier (PAB). For dyrking av melkesyrebakterier ble det tillaget De Man Rogosa Sharpe (MRS) buljong (Merck, Darmstadt, Tyskland) og MRS agar, hvor det i sistnevnte ble tilsatt 15 g/l agar (VWR, Leuven, Belgia). Til bestemmelse av mugg og gjær celletall ble det benyttet Rose-Bengal Chloramphenicol agar (RB, Merck). Både MRS buljong/agar og RB agar ble laget etter produsentens instruksjoner, se Tabell 4.

For vekst av propionsyrebakterier ble det tillaget natrium-laktatmedium buljong (SLB) som bestod av 15g/l 50% Na-laktat (VWR), 10 g/l trypton (Oxoid, Basingstoke, England), gjærekstrakt 10 g/l (Merck), 0,25 g/l K_2HPO_4 (Merck), 0,20 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$ (VWR), 0,005 g/l $MnSO_4 \times H_2O$ 0,005 (Merck) og 1000 ml destillert vann, hvor pH ble justert til 7,0 ved 22°C. Natriumlaktat agar (SLA) ble tilberedt på samme måte som SLB, men med tilsats av 12 g/l agar (VWR).

Et hvetemelhydrolysat medium (melmedium) ble tillaget basert på en studie gjennomført av Le Lay et al. (2016) med noen modifikasjoner. Melmediet ble laget ved å veie ut 200 g siktet hvetemel (Møllerens, Norge) og blandet med 1 liter destillert vann. Blandingen ble deretter rørt i 4 timer med en magnetisk rører (IKA Magnetic stirrers, Straufen, Germany) ved romtemperatur. Deretter ble blandingen hensatt 1 time uten røring slik at uløste og større partikler falt til bunns. Væskefasen over bunnfallet ble deretter forsiktig pipettert av og 5 ml av dette melhydrolysatet ble overført til 10 ml reagensrør før autoklaving ved 121°C i 15 minutter

Vekstmediene ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter og oppbevart mørkt og kjølig på 4°C frem til bruk.

Tabell 4. Vekstmedier benyttet i denne studien, med respektive produsenter, innhold av komponenter og inkuberingsbetingelser.

Agar/Buljong/ komponenter	Produsent	Konsentrasjon (g/l)	Vekst	Temperatur (°C)	Inkuberingstid (dager)
De MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) Agar	Merck KGaA (MRS buljong) VWR International, Leuven Belgia (agar)	52,2 15	Melkesyrebakterier	30	2-4
De MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) buljong	Merck KGaA (MRS- buljong)	52,2	Melkesyrebakterier	30	1
«Sodium lactate broth» (SLB): Na.laktat, 50% Trypton Gjærekstrakt K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ x 7H ₂ O MnS O ₄ x H ₂ O	VWR Oxoid, Basingstoke, England Merck Merck VWR Merck	15 10 10 0,25 0,20 0,005	Propionsyrebakterier	30	2
«Sodium lactate agar» (SLA): SLB +agar	VWR international agar	12	Propionsyrebakterier	30, anaerobt	2

Rose-Bengal Chloramphenicol- agar (RB)	Merck KGaA	32,2	Mugg og gjær	22	5
Potet dekstrose agar (PDA) ¹	Becton, Dickinson Mictobiology Systems (Potato Dextrose broth) VWR International, agar	24 g/l PD buljong og 15 g/l agar	Mugg	30	21

¹PDA: Skåler til fremvekst av muggsopp til preparering av sporeløsninger

3.4. Oppdyrking av LAB og PAB

Innledende i denne studien ble 9 LAB og 4 PAB oppdyrket til aktive kulturer. Dette ble gjennomført ved gjentakende poding, etterfulgt av inkubering for hver individuell kultur.

Melkesyrebakterier ble podet i 5 ml MRS buljong (1%) før inkubering ved 30°C over natt. Propionsyrebakteriene ble podet i 10 ml SLB (1-2%) i et 10 ml rør før inkubering ved 30°C i 48 timer. Bakteriene ble podet minst 2 ganger før forsøk for at bakteriene skulle være i aktiv vekst.

3.5 Tilberedning av frysestock

Det ble tillaget frysestock av *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og *W. confusa* TM76 til bruk i hovedforsøket. Bakteriestammene ble individuelt podet (1%) i 300 ml MRS-buljong og inkubert ved 30 °C i 24 timer.

Etter at LAB-kulturene hadde vokst opp, ble de vasket i steril Ringers løsning og sentrifugert ved 10.000 omdreininger per minutt (rpm) i 10 minutter ved 4 °C i en Beckman Coulter Avanti JXN-26 sentrifuge (Beckman Coulter Inc., Indianapolis, USA). Deretter ble supernatanten forsiktig helt av og pelleten ble resuspendert i 150 ml Ringers løsning. Denne bakteriesuspensjonen ble deretter sentrifugert under de samme betingelsene som tidligere. Supernatanten ble igjen helt av og cellene ble resuspendert, denne gangen i 90 ml Ringers løsning. Denne suspensjonen ble igjen sentrifugert under de samme betingelsene som

tidligere. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet, og cellene ble resuspendert i 30 ml Ringers løsning tilsatt 15 % (v/v) glyserol. Prøvene ble deretter pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-50 C, Axygen®, Mexico) og oppbevart ved -80 °C inntil bruk.

Celletall i prøvene (kde/ml) ble bestemt etter frysning og opptining ved fortytning i Ringers løsning og utplating i MRS agar (Merck), etterfulgt av inkubering ved 30 °C i 48 timer.

3.6 Tilberedning av sporeløsning

Det ble fremstilt sporeløsninger av muggsoppene *Aspergillus niger* ATCC10577, *Penicillium roqueforti* (isolert fra Selbu Blå TINE) og *Fusarium* sp. Hver muggsopp ble individuelt podet på potet dekstrose agar (20 µl) før inkubering i 3 uker ved romtemperatur. Videre ble en podeøse benyttet til å ta ut konidiesporer av hver muggsopp, som deretter ble suspendert i steril Ringers løsning tilsatt 15% glyserol (v/v). Sporeløsningen ble grundig mikset for å fjerne eventuelle sammenklumpninger. Antall sporer ble telt ved hjelp av et tellekammer, Bürker hemocytometer (Marienfeld, Tyskland), og fortynt slik at innholdet i sporer utgjorde ca 2×10^4 muggsporer/ml. Sporeløsningen ble pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør og oppbevart i fryser ved -20 °C.

3.7 pH måling

For pH målinger ble det benyttet et PHM92 lab-pH-meter (Radiometer, Copenhagen, Denmark). pH-meteret ble kalibrert ved bruk av standard bufferløsning pH 4,0 og 7,0 (Merck).

3.8 HPLC analyse

Analyse av organiske syrer og karbohydratinnhold i prøver av inokulert medium, surdeig, deig og brød ble utført ved bruk av «High-Performance Liquid Chromatography» (HPLC) basert på en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011), men med noen modifikasjoner.

For hver prøve ble det veid ut 1,00 g til et 10 ml belcorør. Deretter ble prøvene tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck) og 8 ml acetonitril (Merck). Prøvene ble deretter plassert i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo,

Norge) i 30 minutter med en hastighet på 45 o/min. Prøvene ble videre sentrifugert (Thermo Scientific, Osterode, Germany) i 15 minutter ved 22 °C. Den resulterende supernatanten ble filtrert med en 0,2 µm PTFE-membran (Acordisc CR 13 mm sprøytefilter, PALL, Storbritannia) og overført til et HPLC-rør.

Analysen ble utført ved hjelp av en Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC-maskin (Agilent Technologies, Singapore), som inkluderte en pumpe (Agilent Technologies), autosamplere (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV-detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Analyseprogrammet som ble brukt var OpenLab CDS (Agilent Technologies). Et injeksjonsvolum på 25 µl av prøven ble injisert og separert ved hjelp av en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). For å beskytte kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio-Rad Laboratories). Kolonnetemperaturen var satt til 32 °C. Den mobile fasen som ble brukt var en 5 mM H₂SO₄ løsning fra Merck, med en strømningshastighet på 0,4 ml/min.

Standardløsninger for kalibrering ble forberedt på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert basert på deres retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater som ble brukt i standardløsningene inkluderte maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck). Organiske syrer som ble brukt i standardløsningene inkluderte sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyroglutaminsyre fra Sigma-Aldrich. Karbohydratene og eddiksyren ble detektert ved hjelp av en refraktometerindeks (RI)-detektor, mens de organiske syrene ble detektert ved hjelp av en diodearray-detektor (DAD-UV).

3.9 Etablering og sammensetning av surdeigskulturen

Ved kartlegging av surdeig ble det i utgangspunktet benyttet en surdeigskultur, opprinnelig fra Italia, som nåværende eier Hilde Marit Østlie har eid i 5 år. Surdeigen har blitt regelmessig fornyet (backsloppet) hver 14. dag med siktet hvetemel (Regal, Norge) med forholdet 50 g surdeig, 50 g vann og 100 g siktet hvetemel. Surdeigen har blitt inkubert ved romtemperatur i ~16 timer og hadde en tykk konsistens. Denne surdeigen vil bli referert til som surdeigskultur 1 (S1)

Den andre surdeigen som ble benyttet, som også ble benyttet i vekst og metabolismeforsøk og hovedforsøket, ble opprettet januar 2023. Den ble tilvirket ved å blande like deler mel og vann før inkubering ved romtemperatur (21-22 °C) i 24 timer. Surdeigskulturen ble fornyet hver 24. time i totalt 14 dager før den var moden. Videre ble surdeigskulturen oppbevart på 4 °C, og backsloppet 1 gang per uke. Ved både opprettelse og vedlikehold av surdeigen ble forholdet 1:1:1:2 benyttet for henholdsvis surdeig, sammalt speltmel (Møllerens, Bergen, Norge), siktet hvetemel (Møllerens) og vann. For å oppnå en aktiv surdeigskultur til baking ble det benyttet en fermenteringstid på 8 timer ved romtemperatur. Denne surdeigen vil videre bli referert til som Surdeigskultur 2 (S2). Aktiv kultur ble benyttet gjennom hele studien og den kjemiske sammensetningen i melet som ble benyttet til backslopping av surdeigskultur 2 finnes i Tabell 5.

Tabell 5. Kjemisk sammensetning siktet hvetemel og sammalt speltmel benyttet i S2.

	Protein (%)	Karbohydrat (%)	Fett (%)	Fiber (%)
Siktet hvetemel (Møllerens, Norge)	11,2	67,9	1,6	3,6
Sammalt speltmel (Møllerens, Norge)	16,4	53,1	4,1	9,9

3.10 Innledende vekst- og metabolismeforsøk

Ved oppstart av denne studien ble alle de utvalgte LAB og PAB stammene (Tabell 2 og Tabell 3) kartlagt med hensyn til evne til å senke pH og analysert for innhold av karbohydrater og organiske syrer ved HPLC. I forkant av prøveuttak av LAB stammene ble 1% renkultur podet over i 5 ml MRS buljong og inkubert ved 30 °C i 24 timer. PAB stammene ble også podet med 1% renkultur over i 10 ml Natriumlaktatbuljong (SLB), og inkubert anaerobt ved 30 °C i 48 timer. Alle prøveuttak for kartleggingen ble gjennomført etter inkubering. pH målinger ble målt med pH-meter. HPLC ble gjennomført som beskrevet i punkt 3.8.

Det ble ikke bestemt celletall for alle LAB-stammene i dette studiet, det ble først gjennomført etter innledende forsøkene med melmedium og buljong. Celletall ble bestemt for alle 4 PAB-stammene, etter poding av oppdyrket renkultur til 10 ml SLB. Til dette ble det benyttet 1 %

poding og prøvene ble inkubert ved 30 °C anaerobt i 48 timer. Oppdyrket kultur ble deretter seriefortynnet i Ringers løsning før innstøping på SLA. Prøvene ble inkubert anaerobt ved 30 °C i 96 timer. Kolonier ble telt i området 30-300, og gjennomsnittsverdiene for hvert bakterietall ble beregnet.

Etter kartlegging av evne til å senke pH, og produksjon av organiske syrer, ble det benyttet et melmedium for å kartlegge LAB og PAB sin evne til å produsere organiske syrer og senke pH i et miljø som etterligner surdeig. De første forsøkene med melmedium ble gjennomført med alle utvalgte LAB stammer og basert resultatene ble de 4 LAB stammene *Lb. plantarum* 15D, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45 og *Lb. plantarum/pentosus* VL 51 valgt ut til videre forsøk med PAB i melmedium og hemmeforsøk.

Alle utvalgte PAB-stammer ble benyttet i forsøk med melmedium. Det ble også gjennomført forsøk med alle PAB stammene tilsatt 0,75 % laktat og forsøk med *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948 sammen med utvalgte LAB. Basert på resultatene fra disse forsøkene ble det gjennomført 2 gjentak med kun *P. freudenreichii* ISU P50 tilsatt 0,75 % laktat.

3.11.1 Vekstforsøk og metabolisme i Buljong og Melmedium

Alle 9 LAB-stammene ble undersøkt i melmedium og ble på forhånd dyrket opp i MRS buljong og podet (1 %) i 5 ml melmedium før inkubering i 24 timer ved 30 °C. pH ble målt både før (T0) og etter inkubering (T24) og HPLC analyse ble gjennomført ved T24. Basert på resultatene ble det valgt ut 4 LAB-stammer til videre forsøk.

Videre ble disse 4 LAB stammene dyrket i buljong før bestemmelse av celledetall. Til dette ble det benyttet 1 % poding av oppdyrket kultur til MRS buljong, som ble inkubert ved 30 °C i 24 timer. Deretter ble kulturen seriefortynnet i Ringers løsning før innstøping og inkubering ved 30 °C i 48 timer. Kolonier ble telt i området 30-300 og gjennomsnittsverdiene for hvert bakterietall ble beregnet.

For PAB ble det gjennomført flere ulike forsøk med melmedium. I forkant ble PAB stammene dyrket i 10 ml SLB anaerobt i 48 timer ved 30 °C. Deretter ble alle PAB stammene podet (2 %) over i 10 ml melmedium. 4 prøver ble tillaget med kun melmedium og 4 prøver med melmedium tilsatt 0,75 % laktat. I tillegg ble det tillaget 2 prøver med *P. freudenreichii* ATCC 9616 tilsatt LAB (en prøve tilsatt *W. confusa* TM76 og en med *L. citreum* GK45) og 2

prøver med *P. freudenreichii* ISU P50 tilsatt LAB (en prøve med *Lb. plantarum/pentosus* VL51 og en med *Lb. plantarum* 15D). Prøvene ble deretter inkubert anaerobt ved 30 °C i 48 timer før HPLC analyse. Det ble målt pH av alle prøvene før (T0) og etter inkubering (T48).

Basert på resultatene fra disse forsøkene ble det gjennomført 2 gjentak med *P. freudenreichii* ISU P50 tilsatt 0,75 % laktat for å undersøke om dette ville forbedre vekstvilkårene. Dette ble gjennomført etter samme metode som beskrevet over, men det ble kun benyttet 1,5 % poding ved siste gjentak. For disse prøvene ble det i tillegg til å måle pH og gjennomført HPLC analyse også bestemt celletall ved innstøping på SLA etter inkubering. Prøvene ble seriefortynnet i Ringers løsning før utplating og deretter inkubert anaerobt ved 30 °C i 96 timer.

3.11.2 Vekst og metabolisme i surdeig

Surdeigen benyttet i denne studien ble kartlagt for vekst av melkesyrebakterier og gjær ved utplating på MRS agar og RB agar. I tillegg ble pH målt og innhold av organiske syrer og karbohydrater analysert. Prøvene ble analysert både før og etter fermentering.

Fermenteringstiden for surdeig uten tilsatt av LAB eller PAB var 8 timer ved 30 °C.

For å bestemme celletall og gjærtall ble 10,0 g surdeig fra hver prøve veid ut i en steril Stomacherpose (Seward, VWR, Oslo) og deretter tilsatt 90 ml steril Ringers løsning. Blandingen ble så homogenisert i en Stomacher 400 (Seward) i 120 sekunder på hastighet høy, for å oppnå en homogen blanding. Den homogene blandingen ble seriefortynnet og innstøpt i vekstmedier. Til dette forsøket ble det benyttet MRS-agar og RB-agar med følgende fortynninger og 2 paralleller av hver fortynning henholdsvis 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} og 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Skålene ble inkubert i henholdsvis 48 timer ved 30°C for MRS agar og 96 timer ved 22 °C for RB agar. Kolonier ble telt i området 30-300, og gjennomsnittsverdiene for hvert bakterietall ble beregnet.

3.11.3 Vekst og metabolisme for PAB i surdeig

Det ble gjennomført vekstforsøk i surdeig med alle de 4 utvalgte PAB stammene. Til dette forsøket ble det tilsatt ca 10^8 kde/ml av hver stamme. Etter oppdyrking av de 4 stammene i 10 ml SLB ble kulturen sentrifugert (Thermo Scientific) i 10 minutter ved 3500 o/min før supernatanten ble helt av. Pelleten ble resuspendert i 1,0 ml Ringers løsning, det vil si 10 ganger oppkonsentrering av celletallet. Surdeigen ble backsloppet umiddelbart før tilsetting av 1 ml resuspendert PAB-kultur til 50 g surdeig, tilsvarende 20% poding. Surdeigskulturen

inokulert med PAB ble inkubert ved 30 °C i 72 timer. Etter inkubering ble det tatt ut prøver til utplating på SLA, MRS og RB for bestemmelse av celletall (beskrevet under punkt 3.11.2). Skålene med SLA ble inkubert anaerobt ved 30 °C i 5 døgn. Kolonier ble telt i området 1-300 som følge av en feil ved fortykning. Det ble foretatt pH-måling før og etter inkubering av surdeig i tillegg til at det ble gjennomført HPLC analyse.

Etter første forsøk ble det gjennomført ett nytt forsøk med PAB stammene *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948. I dette forsøket ble prøvene inkubert ved to ulike temperaturer med to paralleller for hver prøve. Det ble tillaget totalt seks surdeigsprøver av hver bakterie fordelt på sterile glass. Disse inokulerte (10%) surdeigsprøvene ble inkubert ved 15 og 20 °C i tre døgn, hvor et prøveglass ble brukt til analyse rett etter inokulering av PAB i surdeigen. Deretter ble prøveglassene oppbevart på 30 °C i ett døgn. Det ble gjennomført pH-målinger i forbindelse med inokulering av PAB i surdeig (T0), etter 48 timer og etter 96 timer. HPLC analyse, og utplating på MRS agar, SLA og RB agar ble gjennomført ved inokulering av PAB i surdeig (T0), og etter 96 timers fermentering etter standard betingelser.

3.11 Hemmeforsøk av mugg i brød

For å vurdere melkesyre- og propionsyre-bakteriers evne til å hemme muggvekst, ble det gjennomført et bakeforsøk med tre gjentak. I hvert forsøk ble det bakt seks brød med ulike tilsetninger av LAB og PAB, hvor det i tillegg ble tilsatt kjemisk kalsiumpropionat til et brød som vist i Tabell 6. Brød bakt med kun gjær ble brukt som kontroll. Det ble foretatt prøveuttak til utplating etter elting (T0) og etter fermentering (T1). Prøver til HPLC og pH-målinger ble også gjennomført ved T0 og T1 i tillegg til at det ble tatt prøver etter ferdig stekt brød var avkjølt (T2). Prøver av ferdig stekt og avkjølt brød ble skåret i skiver og punktvis tilsatt en sporeløsning (Figur 5). Prøvene ble deretter inkubert i petriskåler, forseglet med parafilm, ved 22 °C i opptil 21 dager. Prøvene ble daglig observert med hensyn til muggvekst. Det ble gjennomført 3 gjentak av hemmeforsøket.

3.11.1 Brødbaking

Til hvert av forsøkene ble det produsert 6 brød og ingredienslisten er fremstilt i Tabell 6. Basen i oppskriften på brødene med surdeig inneholdt 125 g siktet hvitemel og tilsvarende mengde sammalt speltmel, 5 g salt og 50 g aktiv surdeig som ble backsloppet og fermentert i

8 timer før tilsetning. Mengden mel, både hvetemel og sammalt speltmel, og vann ble oppjustert i kontrollen, som erstatning for surdeig. Tre brød ble tilsatt en miks av de fire LAB-stammene, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og *W. confusa* TM76, hvor det ene ble tilsatt kalsiumpropionat tilsvarende 0,3 % av totalt vekt. Det ble også bakt brød tilsatt 75 ml melmedium tilsatt 0,75 % laktat og podet med *P. freudenreichii* ISU P50 (2%) 2 dager i forkant. Ett brød inneholdt kun LAB-stammene og ett brød inneholdt kun PAB tilsatt som nevnt over. Sammen med resterende ingredienser ble deigen eltet for hånd i ca 4 minutter. Deigen ble hevet i romtemperatur i ca 1,5 time, hvor deigen ble strekt hver halvtime. Deigene ble så formet til brød og overført til aluminiums former (20 cm x 7 cm x 6 cm). Deretter ble deigen satt til fermentering i 14 timer ved 4 °C. Videre ble brødene stekt ved 240 °C med over og undervarme i 70 minutter i stekeovnen (Electrolux), hvor halvparten av steketiden var med damp og resterende tid uten. Brødene ble tatt ut av formene og avkjølt i 3-4 timer ved romtemperatur (21 °C).

Tabell 6. Ingredienser i brødene benyttet til hemmeforsøk. Brød tilsatt gjær (K), surdeig (SD), SD fermentert med *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og *W. confusa* TM76 (SDL), SD fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), SD fermentert med en blanding av LAB-miks og PAB (SDLP), og SD tilsatt LAB-miks og kalsiumpropionat (0,3 %) (SDLPr).

	K	SD	SDL	SDP	SDLP	SDLPr
Siktet hvetemel (g)	137,5	125	125	125	125	125
Sammalt speltmel (g)	137,5	125	125	125	125	125
Vann (g)	220	195	193,7	120	118,73	192,23
Surdeig (g)		50	50	50	50	50
Salt (g)		5	5	5	5	5
Gjær (g)	0,55					
Kalsiumpropionat (g)						1,5
TM76 ¹ (ml)			0,47		0,47	0,47
15D ² (ml)			0,094		0,094	0,094
GK45 ³ (ml)			0,574		0,574	0,574
VL51 ⁴ (ml)			0,13		0,13	0,13
P50 ⁵ (ml)				75	75	
Totalt vekt	500,55	500	500	500	500	500

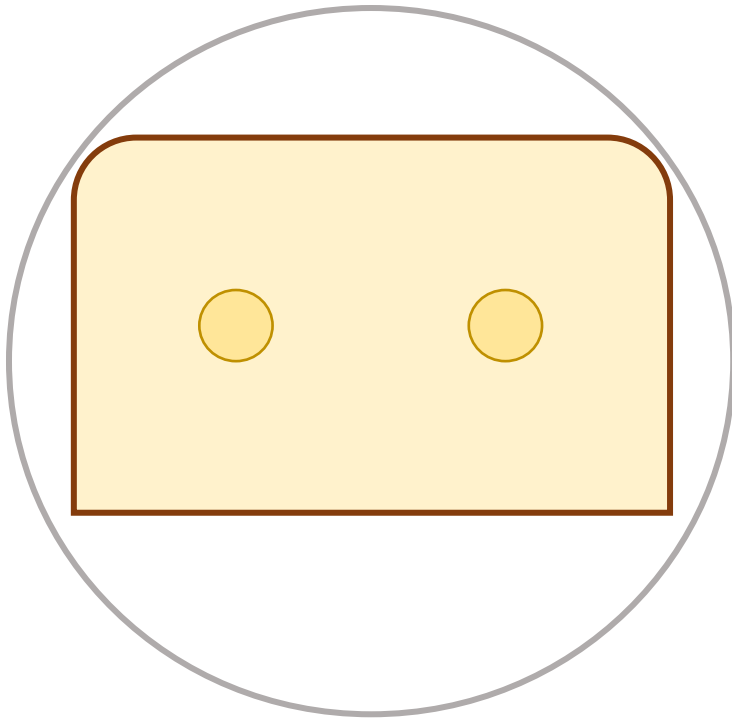
¹ *W. confusa* TM76, ² *Lb. plantarum* 15D, ³ *L. citreum* GK 45, ⁴ *L. plantarum/pentosus* VL51, ⁵ *P. freudenreichii* ISU P50

3.11.2 Prøveuttak av deig og brød

I forbindelse med hemmeforsøket ble det gjennomført prøveuttak ved flere av operasjonene i prosessen. Det ble tatt ut prøver etter elting (T0), etter kaldheving av deigen (T1), og etter steking (T2). De mikrobiologiske prøvene ble foretatt ved T0 og T1, med utplating på MRS agar ved 30 °C i 48 timer, RB agar inkubert ved 22 °C i 5 dager og SLA inkubert anaerobt ved 30 °C i 5 dager og. Fortynningsserie og utplating ble gjennomført slik det er beskrevet i punkt 3.11.2. Kolonier innenfor området på 30-300 ble telt, og deretter ble gjennomsnittsverdiene for hvert respektive bakterietall beregnet. pH målinger og analyse av organiske syrer og karbohydrater (HPLC) ble foretatt ved alle prøveuttakene (T0, T1 og T2). Til pH målinger og HPLC analyse av brød ble det kun benyttet innmat fra brødsnivene. For å lettere måle pH i ferdig stekt brød ble 5 g brød blandet godt med 15 g destillert vann i et Olabeger (Biobe As, Fredrikstad, Norge) før pH målingene ble foretatt etter 30 minutter.

3.11.3 Inokulering av sporer på brød

Etter steking av brødet, ble det avkjølt og deretter skåret opp i skiver som ble plassert i petriskåler. Ved hjelp av en sporeløsning med en konsentrasjon på 2×10^4 muggsporer/ml, ble brødsnivene inokulert på overflaten med 10 µl i to punkter i samsvar med illustrasjonen presentert i Figur 5. Petriskålene med brødsnivene ble forseglet med parafilm før de ble inkubert ved en temperatur på 20 °C. Observasjon av eventuell muggvekst på brødsnivene ble foretatt visuelt over en periode på 21 dager.



Figur 5. Inokuleringspunkter for muggløsning på brødskivene.

4. Resultater

I første del av denne studien ble det gjennomført pH målinger og analyser ved HPLC for å kartlegge metabolismen til alle 9 LAB-stammer og de 4 PAB-stammene i buljong og melmedium. Deretter ble utvalgte LAB og PAB undersøkt videre alene eller sammen i melmedium og i surdeig for å undersøke om de ulike bakteriestammene kunne vokse i mel og surdeig. Det ble også undersøkt for utvikling av pH, omsetting av karbohydrater og produksjon av organiske syrer både før og etter fermentering. 4 utvalgte LAB og alle 4 PAB stammene ble videre innstøpt i henholdsvis MRS-agar og SLA for bestemmelse av celletall. I siste del av forsøket ble det gjennomført et hemmeforsøk hvor det ble bakt 6 brød, hvor 5 brød ble bakt med surdeig og ett brød ble bakt uten surdeig og ble benyttet som kontroll. Angående surdeigsbrødene ble 3 brød tilsatt med en miks av utvalgte LAB, to brød ble tilsatt en stamme PAB og ett brød ble tilsatt kalsiumpropionat. Brødene ble skåret i skiver og tilsatt muggsoppспорer i to punkter før inkubering i en periode på 21 dager ved 20°C og med visuell observasjon daglig.

4.1 Vekstforsøk

Denne delen av studien hadde til hensikt å kartlegge 9 utvalgte LAB-stammer og 4 utvalgte PAB-stammer for å finne ut hvilke stammer som skulle velges for tilsetning i brød for å

hemme muggvekst. pH ble undersøkt både før og etter inkubering. I tillegg ble det analysert for innhold av karbohydrater og organiske syrer etter inkubering i 24 timer for LAB-stammene og 48 timer for PAB-stammene. Celletall ble også bestemt for 4 utvalgte LAB og alle 4 PAB stammene.

4.1.1 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av LAB i buljong og melmedium

For å undersøke vekst og metabolisme av LAB ble 9 utvalgte stammer av melkesyrebakterier dyrket i både MRS - buljong og melmedium; *Lb. plantarum* CM67, *Lb. plantarum/pentosus* CM65, *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *L. pseudomesenteroides/mesenteroides* VL4, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *W. confusa* TM76, *Weisella cibaria* TM120, *Lb. fermentum* TM314, og *Lb. plantarum* 15D. Det ble målt pH både før (T0) og etter 24 timers fermentering (T24) ved 30°C, og det ble analysert for innhold av karbohydrater og organiske syrer..

Resultatene for dette forsøket er fremstilt i Tabell 7.

Resultatene for pH målingene viste til jevne resultater mellom alle prøvene gjennomført ved T0 for prøvene dyrket i både buljong og melmedium. Resultatene etter 24 timers fermentering viste til en større reduksjon i pH for LAB dyrket i melmedium sammenlignet med LAB dyrket i buljong. For LAB dyrket i buljong ble det registrert pH målinger på ca 6 ved T0 med en varierende reduksjon på mellom 3,92 - 5,1 for de ulike prøvene ved T24. I melmedium ble det ved T0 registret pH til ca 6 og det ble her observert en reduksjon i pH til $\leq 4,11$, og den laveste pH-verdien ble målt for *Lb. plantarum* 15D på 3,32.

Karbohydratene det ble analysert for var maltose, fruktose og glukose. I MRS – buljong ble maltosen helt omdannet av *Lb. plantarum* CM67, *Lb. plantarum/pentosus* CM65, *Lb. plantarum/pentosus* VL51 og *Lb. plantarum* 15D. For resterende prøver ble det observert lite eller ingen endring sammenlignet med kontrollen. *Lb. plantarum* CM67 (*Lb. -67*), og *Lb. plantarum/pentosus* CM65 hadde dårligst evne til å omdanne fruktose med 582,93 og 585,80 mg/kg til stede etter fermenteringen, resterende prøver hadde omdannet all fruktosen. Det ble observert stor variasjon i evne til omdanning av glukose hvor *L. pseudomesenteroides/mesenteroides* VL4 og *W. cibaria* TM120 hadde omdannet all glukosen, etterfulgt av *Weisella confusa* TM76 som kun hadde 4,51 mg/kg til stede etter fermentering. Resterende prøver viste til liten omdanning sammenlignet med kontrollen og hadde verdier mellom 11426,37 mg/kg (*Lb. plantarum* 15D) og 2877,64 mg/kg (*Lb. plantarum* CM67).

Resultatene for MRS – buljong viste til omtrent ingen omdanning av sitronsyre i to av prøvene (*Lb. plantarum/pentosus* VL51 og *Lb. fermentum* TM314) med 1488,46 og 1633,05

mg/kg til stede etter fermentering. Forøvrigte stammer hadde fullstendig omdanning av sitronsyre. For melkesyre var det produksjon i alle prøvene fra laveste mengde på 2394,99 til høyeste på 14457,67 mg/kg for henholdsvis *Lb. fermentum* TM314 og *Lb. plantarum* 15D. Eddiksyre ble også produsert i alle prøvene fra 3704,48 til 4680,63 mg/kg for henholdsvis *Lb. fermentum* TM314 og *Weisella cibaria* TM120.

I melmedium var det til stede av maltose i alle prøvene, hvor kontrollen hadde et nivå på 2909,55 mg/kg., *Leuconostoc citreum* GK45 hadde best evne til å omsette maltose med 297,15 mg/kg etter inkubering og dårligst evne hadde *Lb. plantarum* CM67 med 2401,39 mg/kg etter fermentering. Fruktose ble kun observert i *W. confusa* TM76, *W. cibaria* TM120 og *Lb. plantarum* 15D med henholdsvis 745,07, 608,43 og 558,01 mg/kg, etter 24 timers fermentering. Glukose ble omsatt av alle bakterier med unntak av *Lb. plantarum/pentosus* VL51 og *Lb. fermentum* TM314 som hadde 64,21 og 218,36 mg/kg ved fermenteringens slutt.

I prøvene dyrket i melmedium ble det ikke registrert sitronsyre i noen av prøvene. For melkesyre varierte resultatene fra 846,28 mg/kg hos *Lb. plantarum/pentosus* CM65 til 2985,09 mg/kg hos *Lb. plantarum/pentosus* VL51. Eddiksyre ble kun produsert av 3 av stammene (*L. citreum* GK45, *W. confusa* TM76 og *Weisella cibaria* TM120) med tilnærmet like nivåer i området 282,4-287,27 mg/kg.

Lactiplantibacillus plantarum 15D, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45 og *Lb. plantarum/pentosus* ble valgt å bruke videre hvor evne til å danne melkesyre, eddiksyre og senke pH ble benyttet som noen av hovedkriteriene.

Tabell 7. pH, karbohydrater og organiske syrer i melmedium og MRS-buljong (MRS-B) fermentert med *Lb. plantarum* CM67 (Lb.-67), *Lb. plantarum/pentosus* CM65 (Lb.-65), *Lb. plantarum/pentosus* VL51 (Lb.-51), *L. pseudomesenteroides/mesenteroides* VL4 (L-4), *Leuconostoc citreum* GK45 (L-45), *W. confusa* TM76 (W-76), *W. cibaria* TM120 (W-120), *Lb. fermentum* TM314 (Lb.-314) og *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D). Prøver ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer inkubering ved 30°C.

	Prøve	pH		Karbohydrater (mg/kg)			Organiske syrer (mg/kg)		
		T0	T1	Maltose	Fruktose	Glukose	Sitronsyre	Melkesyre	Eddiksyre
MRS - B	Kontroll	5,73	5,73	417,37	894,92	15917,62	1639,35	n.d. ¹	3582,9
	LB.-67	5,77	4,38	n.d.	582,93	2877,64	n.d.	8174,56	4557,54
	LB.-65	5,79	4,38	n.d.	585,8	2834,75	n.d.	8310,05	4560,53
	LB.-51	5,77	3,94	n.d.	n.d.	2712,67	1488,46	12412,96	3652,09
	L-4	5,76	4,27	440,37	n.d.	n.d.	n.d.	9230,05	4643,15
	L-45	5,74	4,25	427,23	n.d.	43,24	n.d.	9076,34	4605,15

	W-76	5,75	4,32	435,4	n.d.	4,51	n.d.	9345,12	4565,96
	W-120	5,77	4,28	437,65	n.d.	n.d.	n.d.	8978,42	4680,63
	Lb.-314	5,78	5,1	384,89	n.d.	11426,37	1633,05	2394,99	3704,48
	Lb.-15D	5,76	3,92	n.d.	n.d.	1757,05	n.d.	14457,67	4294,46
Melmedie	Kontroll	6,28	6,28	2909,55	n.d. ¹	543,33	n.d.	n.d.	n.d.
	Lb.-67	6,02	4,11	2401,39	n.d.	n.d. ¹	n.d.	859,71	n.d.
	Lb.-65	6,02	4,1	2397,65	n.d.	n.d.	n.d.	846,28	n.d.
	Lb.-51	5,83	3,36	1044,97	n.d.	64,21	n.d.	2985,09	n.d.
	L-4	5,93	3,57	354,24	n.d.	n.d.	n.d.	1989,84	n.d.
	L-45	5,99	3,63	297,15	n.d.	n.d.	n.d.	1756,05	287,27
	W-76	5,99	3,63	346,28	745,07	n.d.	n.d.	1733,98	282,67
	W-120	5,97	3,59	369,75	608,43	n.d.	n.d.	1762,6	282,44
	Lb.-314	5,98	3,97	1530,43	n.d.	218,36	n.d.	1062,97	n.d.
	Lb.-15D	5,7	3,32	924,47	558,01	n.d.	n.d.	3457,68	n.d.

¹n.d = ikke detektert

4.1.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PAB i buljong og melmedium.

Det ble gjennomført et eget vekst- og metabolismeforsøk med de 4 PAB-stammene; *P. freudenreichii* ATCC 9616, *P. freudenreichii* ISU P50, *P. freudenreichii* LMG 2948, *P. freudenreichii* LMG 3001) hvor de ble dyrket i SLB, melmedium med og uten tilsetning av laktat (0,75 %) og i melmedium tilsatt de 4 utvalgte melkesyrebakteriene *Lb. plantarum* 15D, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45 og *Lb. plantarum/pentosus* VL51). Resultatene er presentert i Tabell 8

Generelt var pH-målingene utført etter 0 timer (T0) jevne for alle prøvene dyrket i SLB med pH verdier på mellom 6,91 – 6,8. For prøvene dyrket i melmedium var alle resultatene for pH jevne uavhengig av andre faktorer. Derimot varierte resultatene mer for målingene ved T48. Det ble generelt observert større reduksjon fra T0 – T48 for prøvene dyrket i mel sammenlignet med PAB i SLB. Det ble observert størst reduksjon alle prøvene i pH for PAB og LAB i mel med målinger mellom 3,39 – 2,65. For prøvene dyrket i melmedium ble det observert minst reduksjon i pH for PAB i laktat (075 %)

Resultatene for HPLC er presentert etter 48 timer fermentering og resultatene for dette vil bli gjennomgått i grove trekk. Resultatene for analysen viste til at PAB dyrket i mel tilsatt 0,75%

laktat hadde best evne til å omdanne karbohydrater til organiske syrer. Generelt viste resultatene stor variasjon i omsetting av maltose for alle prøvene. De laveste registrerte maltoseverdiene ble registrert for PAB dyrket i melmedie tilsatt laktat 0,75% laktat, med verdier på 278,57 mg/kg og 287,99 mg/kg for henholdsvis *P. freudenreichii* ATCC 9616 og *P. freudenreichii* LMG 3001.

Også for glukose ble det påvist lavest innhold for PAB dyrket i melmedie tilsatt 0,75% laktat. *P. freudenreichii* ATCC 9616 og *P. freudenreichii* LMG 3001 hadde omsatt all glukosen tilgjengelig, mens *P. freudenreichii* ISU P50 hadde 46,10 mg/kg og *P. freudenreichii* LMG 2948 hadde 138,30 mg/kg som restmengde etter 48 timer fermentering. Den laveste omsetningen av glukose og dermed den høyeste verdien som ble målt var for PAB i mel med verdier på 340,01 og 340,25 mg/kg for henholdsvis *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948.

For PAB i SLB viste resultatene at all melkesyre ble omsatt til eddiksyre på 1438,93-1701,79 mg/kg og propionsyre på 2706,81-3137,49 mg/kg. I prøvene med PAB i mel ble det produsert melkesyre av *P. freudenreichii* ATCC 9616 og 3001 på henholdsvis 3814,6 og 3655,46 mg/kg, men lave mengder av eddiksyre (119,84-285,28 mg/kg) og propionsyre (120,87 - 385,70 mg/kg).

Prøvene dyrket i melmedium tilsatt 0,75% laktat hadde best evne til å produsere organiske syrer og hadde de høyeste målingene for både melkesyre, eddiksyre og propionsyre. Mengden melkesyre målt i kontrollen var på 7369 mg/kg, hvor *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948 omsatte melkesyre til henholdsvis 3136 og 4725 mg/kg. For både *P. freudenreichii* ATCC 9616 og *P. freudenreichii* 3001 ble det observert en økning i mengden melkesyre og det ble her produsert melkesyre til henholdsvis 10871 og 10613 mg/kg. Basert på metabolismen til PAB var det forventet at melkesyre skulle omdannes og ikke produseres, og resultatene kan skyldes en forurensning av prøvene av LAB. Produksjon av eddiksyre og propionsyre var høyest for *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948, som henholdsvis målte 875,72 og 679,30 mg/kg for eddiksyre og henholdsvis, og 2370,17 og 1645,97 mg/kg propionsyre

Resultatene for PAB i mel tilsatt LAB ble det registrert melkesyre i området 2166,57 - 3843,96 mg/kg. Nivået av eddiksyre og propionsyre var lavt og målte henholdsvis mellom 256,56 - 190,51 mg/kg og 145,1 - 240,55 mg/kg.

Tabell 8. pH, organiske syrer og karbohydrater i natriumlaktatbuljong (SLB) og melmedium, melmedium tilsatt 0,75% laktat (L 0,75%) og melmedium podet med *W. confusa* TM76 (W-76), *L. citreum* GK45 (L-45), *Lb. plantarum/pentosus* VL51 (Lb.-51) og *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D). Prøver fermentert med *P. freudenreichii* ATCC 9616 (P-9616), *P. freudenreichii* ISU P50 (P-P50), *P. freudenreichii* LMG 2948 (P-2948), *P. freudenreichii* LMG 3001 (P-3001). Prøver ble tatt ut etter 0 (T0) og 48 (T48) timer inkubering ved 30°C.

	Prøve	pH		Karbohydrater (mg/kg)			Organiske syrer (mg/kg)		
		T0	T48	Maltose	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre
PAB i SLB	Kontroll	7,0	7,0	n.d. ¹	98,8	56,5	6221,0	52,1	n.d.
	P - 9616	6,9	5,8	31,9	n.d.	n.d.	n.d.	1541,6	2706,8
	P - P50	7,0	6,3	618,8	n.d.	28,5	n.d.	1438,9	3130,6
	P - 2948	7,0	6,1	98,5	n.d.	n.d.	n.d.	1607,8	3137,5
	P - 3001	6,9	5,8	n.d.	n.d.	14,0	n.d.	1701,8	2932,9
PAB i mel	Kontroll ²	6,3	6,3	2909,6	543,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	P- 9616	6,1	3,3	439,4	81,0	1024,6	3814,6	119,8	120,9
	P- P50	6,1	5,2	2723,8	340,0	1666,0	n.d.	160,7	321,1
	P- 2948	6,1	4,9	2651,0	340,3	1440,7	n.d.	285,3	385,7
	P- 3001	6,0	3,4	447,0	84,2	1064,7	3655,5	165,4	233,9
PAB i mel + L0,75%	Kontroll ³	6,2	6,2	2761,7	484,3	771,1	7369,4	n.d.	12,9
	P- 9616	6,2	4,2	278,6	n.d.	343,0	10871,0	140,0	112,5
	P- P50	5,8	5,7	2756,7	46,1	603,9	3136,0	875,7	2370,2
	P- 2948	6,0	5,8	2658,9	138,3	587,5	4725,3	679,3	1646,0
	P- 3001	5,9	4,2	288,0	n.d.	353,1	10613,5	213,2	221,6
PAB + LAB i mel	Kontroll ²	6,3	6,3	2909,6	543,3	n.d. ¹	n.d.	n.d.	n.d.
	P- 9616 + W-76 ²	6,0	3,7	512,4	105,8	986,5	2166,6	246,1	145,1
	P-9616 + L-45 ²	6,0	3,6	447,4	76,2	962,4	2551,8	256,6	104,3
	P-P50 + Lb.-51 ²	5,8	3,4	497,7	77,8	972,4	3636,7	195,5	240,6
	P- P50 + Lb.-15D ²	5,8	3,4	426,2	75,7	1025,3	3844,0	190,5	155,4

¹ n.d = ikke detektert, ² Kontrollprøve med melmedium, ³ Kontrollprøve med melmedium tilsatt 0,75 %

Resultatene for utplating av LAB på MRS-agar Tabell 9 viste noe variasjon, hvor *L. citreum* GK45 og *W. confusa* TM76 hadde de laveste verdiene på henholdsvis 8,53 og 8,73 log kde/ml. *Lb. plantarum* 15D og *Lb. plantarum/pentosus* VL51 hadde de høyeste verdiene på 9,39 og 9,46 log kde/ml. For bestemmelse av celletall i PAB viste resultatene til jevne verdier mellom de ulike bakteriestammene, med laveste verdi på 9,16 log kde/ml for *P. freudenreichii* ATCC 9616 og høyeste verdi på 9,43 log kde/ml for både *P. freudenreichii* LMG 2948 og *P. freudenreichii* LMG 3001.

Tabell 9. Celletall for renkultur av 4 utvalgte LAB-stammer og alle 4 PAB-stammene innstøpt i henholdsvis MRS-agar og SLA.

Medie	Prøve	Celletall (log kde/ml)
MRS	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 15D	9,39
	<i>Leuconostoc citreum</i> GK45	8,53
	<i>Lb. plantarum/pentosus</i> VL51	9,46
	<i>Weisella confusa</i> TM76	8,73
SLA	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ATCC 9616	9,16
	<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	9,35
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	9,43
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	9,43

Vekst av *P. freudenreichii* ISU P50 ble undersøkt i melmedium tilsatt 0,75 % laktat ved to separate tilleggsforsøk (Tabell 10). Det ble gjennomført prøveuttak etter 0 (T0) timer og 72 timer etter inkubering (T72) ved 30 °C. Ved forsøk 1 ble det observert en nedgang i pH nivået mellom T0 og T72, fra 6,36 til 4,45. Celletallene fra utplating på SLA var jevne med 8,05 og 8,63 log kde/ml. Innhold av karbohydrater viste en reduksjon fra T0 til T72 for både maltose, glukose og fruktose, hvor maltose ble redusert fra 2830,26 til 222,11 mg/kg. All glukose ble omdannet fra T0 til T72. Fruktosen ble også redusert fra 808,08 til 142,02 mg/kg. Innhold av organiske syrer ble kun detekterbart for melkesyre ved T0. Ved T72 ble det funnet 9260,7 mg/kg melkesyre 301,32 mg/kg eddiksyre og 317,84 mg/kg propionsyre.

Ved andre forsøk ble det registrert mindre nedgang i pH med henholdsvis pH 6,25 ved T0 og 5,86 ved T72. Det ble her observert god vekst av *P. freudenreichii* ISU P50 etter utplating på SLA med celletall 7,95 log kde/ml ved T0 og 9,47 log kde/ml etter 72 timer fermentering.

Innhold av karbohydrater var stabile gjennom fermenteringen med hensyn til maltose og fruktose, med en liten endring mellom T0 og T72 fra henholdsvis 3055,5 til 3033 mg/kg og fra 1175,6 til 1154 mg/kg. Innhold av glukose ble redusert fra 580,3 til 162,8 mg/kg fra T0 til T72. Ved T0 ble det registrert 7583,6 mg/kg melkesyre, mens all melkesyre var omsatt ved T72. Mengden eddiksyre gikk opp fra 93,6 mg/kg ved T0 til 1673,9 mg/kg ved T72. Innhold av propionsyre økte fra 62,8 mg/kg ved T0 til 3876,6 mg/kg etter 72 timers fermentering.

Tabell 10. pH, celletall, organiske syrer og karbohydrater i melmedium tilsatt 0,75% laktat fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50. Prøver ble tatt ut etter 0 (T0) og 72 (T72) timers inkubering ved 30°C.

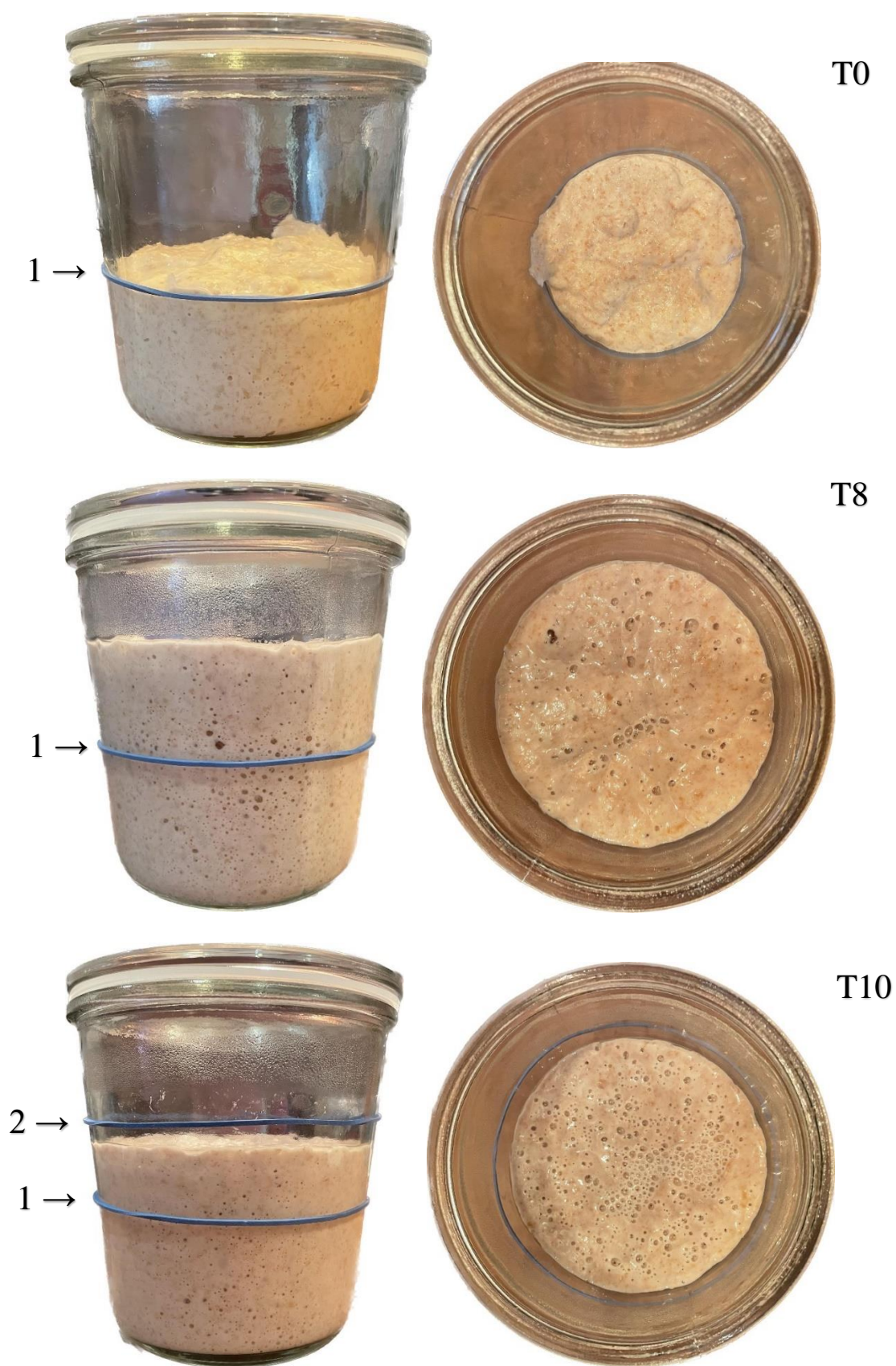
Gjentak	Prøveuttak	pH	Celletall (log kde/ml)	Karbohydrater (mg/kg)			Organiske syrer (mg/kg)		
				Maltose	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre
1	T0	6,36	8,05	2830,3	515,6	808,1	7869,9	n.d ¹	n.d
	T72	4,45	8,63	222,1	n.d	142,0	9260,7	301,3	317,8
2	T0	6,25	7,95	3055,5	580,3	1175,6	7583,6	93,6	62,8
	T72	5,86	9,47	3033,0	162,8	1154	n.d	1673,9	3876,6

¹ n.d = ikke detektert

4.1.3 Innledende vekst- om metabolismestudier i surdeig.

Det ble undersøkt celletall for gjær, LAB og PAB, pH-utvikling og innhold av karbohydrater og organiske syrer i surdeig, for å se effekten av fermentering med ulike melkesyrebakterier naturlig til stede i surdeigen og tilsatte PAB.

Som en del av arbeidet med surdeigsstarter og baking av brød ble det tillaget aktive surdeigskulturer i forkant av forsøkene. Resultatene fra Figur 6 viser surdeig fra backslopping (T0) til aktiv surdeigkultur (T8). Ved T0 var kulturen kompakt og tykk, uten bobler og med en jevn overflate. Ved T8 vises kulturen som aktiv og det kan tydelig observeres store bobler både i kulturen og på overflaten. Overflaten observeres også som noe ruglete, og klumpete. Kulturen hadde en dobling i volum fra 0 til 8 timer (T8), og lukten var svakt syrlig og aromatisk. Konsistensen i deigen var mer rennende og løs sammenlignet med T0. Etter 10 timer (T10) ble volumet redusert (illustrert ved blå strikk 2), og boblene i surdeigsstarteren var mindre. Konsistensen i surdeigskulturen var enda tynnere og mer rennende enn ved T8, og overflaten fremstår som flatere og jevnere som en væske, og lukten var litt surere.



Figur 6. Surdeig avbildet etter 0 (T0) timer, 8 (T8) timer og 10 (T10) timer for surdeigskultur 2 (S2). Blå strikker (markert 1 og 2) ble benyttet som markør for utgangspunkt ved T0, toppunkt for volum ved T8 og regresjon ved T10.

Som forarbeid til masteroppgaven høsten 2022 ble det undersøkt evne til å senke pH og omdannelse av karbohydrater til organiske syrer i surdeig, celletall og gjærtall i surdeigskultur 1 (S1), beskrevet i avsnitt 3.9. Resultatene (Tabell 11) viste til celletall på 9,91 log kde/g og 7,27 log kde/g for henholdsvis MRS og RB. For karbohydrater ble det registrert 2687,8 mg/kg maltose, og 2979,9 mg/kg fruktose. Det ble ikke registrert glukose i surdeigen. For organiske syrer ble det registrert både melkesyre og eddiksyre med henholdsvis 7704,4 mg/kg og 1495,4 mg/kg. pH ble målt til 3,85

Tabell 11. Celletall, pH, karbohydrater og organiske syrer i Surdeigskultur 1, 12 timer etter «backslopping».

Celletall (log kde/g)		pH	Karbohydrater (mg/kg)			Organiske syrer (mg/kg)	
MRS	RB		Maltose	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre
9,91	7,27	3,85	2687,8	n.d. ¹	2979,9	7704,4	1495,4

¹ n.d = ikke detektert

Ved oppstart av studien ble det igjen bestemt celletall for aktiv kultur av S1 i tillegg til en nyoppstartet aktiv surdeigsstarter, Surdeigsstarter 2 (S2) (beskrevet i avsnitt 3.9). Resultatene er fremstilt i Tabell 12. Celletallene fra MRS-agar varierte noe med 7,85 log kde/g for S1 og 8,63 log kde/g for S2. For RB agar var resultatene jevnere med 7,55 log kde/g og 7,53 log kde/g for henholdsvis S1 og S2. pH verdiene for S2 ble målt til 3,9, noe som var litt lavere enn for S1 som hadde en pH verdi på 4,18.

Tabell 12. Celletall og pH til to ulike surdeiger. Prøver ble tatt 8 og 12 timer etter backslopping av henholdsvis S1 og S2. Prøvene ble inkubert i 2 dager for MRS-agar og 5 dager for RB agar ved 30°C.

Prøve	Celletall (log kde/g)		pH
	MRS	RB	
S1	7,85	7,55	3,9
S2	8,63	7,53	4,18

Resultatene for vekst av PAB i surdeig, Tabell 13, viste lite variasjon i pH målingene ved T0 for alle prøvene. pH målingene gjennomført etter fermentering i 72 timer (T72) viste en reduksjon til mellom 3,80 (kontroll) og 3,92 (*P. freudenreichii* LMG 3001). For utplating var

det jevne resultater for alle prøvene dyrket på SLA ved T0, men det ble observert en liten reduksjon fra T0 til T72 på mellom 7,07 – 7,37 log kde/g.

Resultatene for PAB i surdeig innstøpt på MRS-agar viste også til nedgang i antall celler fra 9,77 – 10,07 log kde/g ved T0 til 8,7 – 9,4 log kde/g ved T72 for alle prøvene. Resultatene for innhold av gjærtall i RB-agar viste mer varierende resultater med en nedgang for *P.*

freudenreichii LMG 2948 fra 7,71 log kde/g ved T0 til 7,51 log kde/g ved T72. For resterende prøver ble det observert en økning antall gjærtall etter fermenteringen. Størst økning ble observert for *P. freudenreichii* ISU P50 med 7,06 – 7,65 log kde/g fra T0 – T72.

Tabell 13. Celletall etter innstøpning på natriumlaktat agar (SLA), MRS agar (MRS) og Rose Bengal agar (RB) og pH for fire ulike prøver med surdeig, fermentert individuelt med *P. freudenreichii* ATCC 9616, *P. freudenreichii* ISU P50, *P. freudenreichii* LMG 2948 og *P. freudenreichii* LMG 3001. Prøver ble tatt ved 0 (T0) timer og etter 72 timer ved 30 °C (T72).

Bakteriestammer tilsatt surdeig	Vekst i surdeig (log kde/g)						pH målinger	
	SLA		MRS		RB		T0	T72
	T0	T72	T0	T72	T0	T72		
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	7,73	7,24	9,87	8,7	7,4	7,54	5,51	3,82
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	7,7	7,37	9,89	9,4	7,06	7,65	5,41	3,89
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	7,8	7,07	10,07	9	7,71	7,51	5,44	3,87
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	7,57	7,25	9,77	9,1	7,33	7,73	5,41	3,92
Kontroll							5,41	3,80

For PAB dyrket i surdeig ble det også gjennomført analyse ved HPLC ved T0 og T72 som vist i Tabell 14. For karbohydrater ble det registrert tilstedeværelse av maltose, glukose og fruktose for alle prøvene ved T0, og ved T72 var alle karbohydratene brutt ned til organiske syrer. Resultatene viste lite variasjon mellom de ulike bakteriene. For innhold av organiske syrer ble det ikke registrert eddiksyre eller propionsyre ved T0 for noen av prøvene, men det ble registrert tilnærmet like nivåer av melkesyre mellom 2542,6 - 2699,2 mg/kg. Ved T72 ble det registrert en økning i mengde melkesyre for alle prøvene fra 11892,6 mg/kg til 12810

mg/kg. Eddiksyre varierte fra 445,8 mg/kg hos *P. freudenreichii* ISU P50 til 511,2 mg/kg for *P. freudenreichii* LMG 2948. Det ble ikke registrert propionsyre for noen av prøvene.

Tabell 14. Karbohydrater og organiske syrer målt for fire ulike prøver med surdeig, fermentert individuelt med *P. freudenreichii* ATCC 9616, *P. freudenreichii* ISU P50, *P. freudenreichii* LMG 2948 og *P. freudenreichii* LMG 3001. Prøver ble tatt ut ved 0 (T0) timer og etter 72 timer ved 30°C (T72).

	Bakteriestammer tilsatt surdeig	Karbohydrater og organiske syrer (mg/kg)					
		Maltose	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre
T0	<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	5542,4	784,2	2534,4	2671	n.d. ¹	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	5670,7	721,2	2191,5	2732,6	n.d.	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	5473,4	717,4	2201,7	2542,6	n.d.	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	5496,9	754,9	2224,7	2699,2	n.d.	n.d.
T72	<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	n.d.	n.d.	n.d.	12810	505,3	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	n.d.	n.d.	n.d.	11892,6	445,8	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	n.d.	n.d.	n.d.	12288,2	511,2	n.d.
	<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	n.d.	n.d.	n.d.	12169	473,4	n.d.

¹ n.d = ikke detektert

Basert på resultatene fra Tabell 13 og Tabell 14 ble det gjennomført et nytt vekst- og metabolismeforsøk med kun *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948 i surdeig som vist i Tabell 15 og Tabell 16. Prøvene ble inkubert ved to ulike temperaturer (15 °C og 20 °C) i 3 døgn før de ble plassert på 30 °C i ett døgn. Prøveuttak ble gjennomført etter 0 timer (T0), etter 48 timer for pH (T48) og etter 96 timer (T96) inkubering (3 døgn på 15 eller 20 °C og ett døgn på 30 °C). Resultatene for pH målinger viste lite variasjon mellom de utvalgte PAB stammene ved de ulike prøveuttakene (T0, T48 og T96). Det var også liten forskjell mellom prøven inkubert ved ulike temperaturer. Fra T0 til T48 og T96 var det størst endring for alle prøvene med pH verdier på 3,93-4,06, og liten variasjon mellom T48 og T96.

Utplating for bestemmelse av celledtall (Tabell 15) viste til nedgang i antall celler fra T0 til T96 etter inkubering ved 15 °C for begge bakteriene på alle mediene (SLA, MRS og RB). Fra T0 til T96 ved 20 °C ble det også registrert en nedgang i antall celler for begge bakteriene på alle dyrkningsmediene.

Det ble også gjennomført analyse ved HPLC for prøvene (Tabell 16). Alle karbohydratene funnet ved T0 ble omsatt til organiske syrer ved T4 både ved 15 °C og 20 °C for begge bakteriene. Innhold av melkesyre var tilnærmet like ved begge inkuberingstemperaturene og viste til en økning fra T0 til T96 fra 2438,77 mg/kg til 10271,98 mg/kg ved 15 °C og 11816,27 mg/kg ved 20 °C for *P. freudenreichii* ISU P50 og fra 2629,61 mg/kg (T0) til 10659,18 mg/kg ved 15 °C og 11987,09 mg/kg ved 20 °C for *P. freudenreichii* LMG 2948. Innhold av eddiksyre ble ikke detektert ved T0, men var til stede ved både 15 °C og 20 °C for begge bakteriene i størrelsesorden 490-530 mg/kg med lite variasjon mellom inkuberingstemperaturene. Det ble ikke registrert innhold av propionsyre i noen av prøvene.

Tabell 15. Celletall for surdeig fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50, *P. freudenreichii* LMG 2948 etter innstøpning på natriumlaktat agar (SLA) og MRS agar (MRS) i tillegg til gjærtall ved Rose Bengal agar (RB) etter 0 timer (T0) og etter 96 timer (T96) inkubering ved 15 eller 20 °C i 3 døgn og 1 døgn på 30 °C. pH registrert ved T0, etter 48 timer (T48) og T96. Surdeig fermentert individuelt med.

Bakteriestammer tilsatt surdeig	Tid (timer)	Temperatur (°C)	SLA (kde/g)	MRS- (kde/g)	RB (kde/g)	pH
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	T0		8,72	9,51	7,23	5,24
	T48	15°C	-	-	-	4,01
		20°C	-	-	-	3,94
	T96	15°C	7,96	8,90	6,82	4,01
		20°C	8,39	9,25	6,70	3,96
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	T0		8,74	9,75	7,25	5,14
	T48	15°C	-	-	-	4,06
		20°C	-	-	-	3,98
	T96	15°C	8,13	8,95	7,15	4,04
		20°C	8,30	9,25	6,68	3,93

Tabell 16. Karbohydrater og organiske syrer målt for to ulike prøver med surdeig, fermentert individuelt med *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948. Prøver ble tatt ut ved 0 (T0) timer og etter 96 timer ved inkubering ved 15 eller 20 °C i 3 døgn og 1 døgn på 30 °C (T96).

Prøve	Temperatur (°C)	Karbohydrater (mg/kg)			Organiske syrer (mg/kg)			
		Maltose	Glukose	Fruktose	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre	
P- P50	T0	5386,3	858,7	2469,7	2438,8	n.d.	n.d.	
	T96	15°C	n.d. ¹	n.d.	n.d.	10272,0	488,8	n.d.
		20°C	n.d.	n.d.	n.d.	11816,3	503,8	n.d.
P- 2948	T0	5265,6	758,2	2454,1	2629,6	n.d.	n.d.	
	T96	15°C	n.d.	n.d.	n.d.	10659,2	530,3	n.d.
		20°C	n.d.	n.d.	n.d.	11987,1	497,0	n.d.

¹ n.d = ikke detektert

4.2 Hemmeforsøk

I forkant av hemmeforsøket ble det tillaget frysestock av LAB-stammene *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum/pentosus* VL51 og *W. confusa* TM76. Det ble beregnet celletall for alle stammene (vedlegg 3), og en miks av alle stammene ble benyttet i hemmeforsøket med surdeigsbrød.

Hovedforsøket bestod av et bakeforsøk etterfulgt av en inkuberingsperiode på 21 dager hvor brødsriver av ferdig stekt brød i petriskåler ble inokulert med sporer i to punkter for visuell observasjon av eventuell muggvekst. Prøveuttak ved bakeforsøket ble gjennomført etter elting (T0), etter fermentering ved romtemperatur og kaldheving av deig på 4 °C (T1) og etter steking og avkjøling (T2). De ulike LAB stammene ble tilsatt fra opptint frysestock til ca 7 log kde/g ved tillaging av deigene med LAB-miks tilsats. Resultatene for alle prøvene er presentert som gjennomsnitt av forsøk 1-3. Standardavvik ble regnet ut for celletall, pH og HPLC analysen. Rådata for beregning av celletall, pH målinger og resultater for HPLC finnes i vedlegg 3.

4.2.1 Celletall

Celletall for LAB og gjær ble bestemt ved utplating på MRS-agar og RB-agar (Tabell 17). For alle resultatene med unntak av kontrollen ble det observert lite variasjon i celletallene hvor celletallene varierte fra $8,37 \pm 0,09$ log kde/g til $8,46 \pm 0,1$ log kde/g og ved T0 og $8,44 \pm 0,46$ log kde/g til $8,82 \pm 0,13$ log kde/g for T1 for prøvene dyrket på MRS-agar. Gjærcellene hadde også lite variasjon i prøvene som inneholdt surdeig og varierte fra $6,84 \pm 0,04$ log kde/g til $6,91 \pm 0,04$ log kde/g ved T0 og $6,71 \pm 0,31$ log kde/g til $6,94 \pm 0,1$ log kde/g for T1. Resultatene for kontrollbrød tilsatt gjær var jevne for både celletall i MRS-agar og i RB-agar Celletall i kontrollbrød viste et resultat på $7,15 \pm 0,28$ log kde/g (T0) og $7,08 \pm 0,23$ log kde/g (T1) for LAB og $7,06 \pm 0,3$ log kde/g (T0) og $7,06 \pm 0,13$ log kde/g for gjær. Generelt ble det observert omtrent likt antall eller en liten økning i antall celler fra T0 til T1 for både MRS og RB. For surdeigsbrød ble det observert en liten nedgang i antall gjærceller fra $6,91 \pm 0,04$ log kde/g til $6,71 \pm 0,31$ log kde/g i surdeigbrødet SD og surdeigsbrød (SDLPr) fermentert med LAB og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) fra $6,89 \pm 0,08$ log kde/g (T0) til $6,76 \pm 0,14$ log kde/g (T1).

For PAB ble det benyttet SLA for å bestemmelse av celletall Tabell 17. Resultatene for disse prøvene var også jevne med lavt standardavvik, hvor surdeigsbrød tilsatt PAB (SDP) hadde $8,84 \pm 0,06$ log kde/g ved T0 med en liten økning til $9,06 \pm 0,1$ log kde/g ved T1. Surdeigsbrød

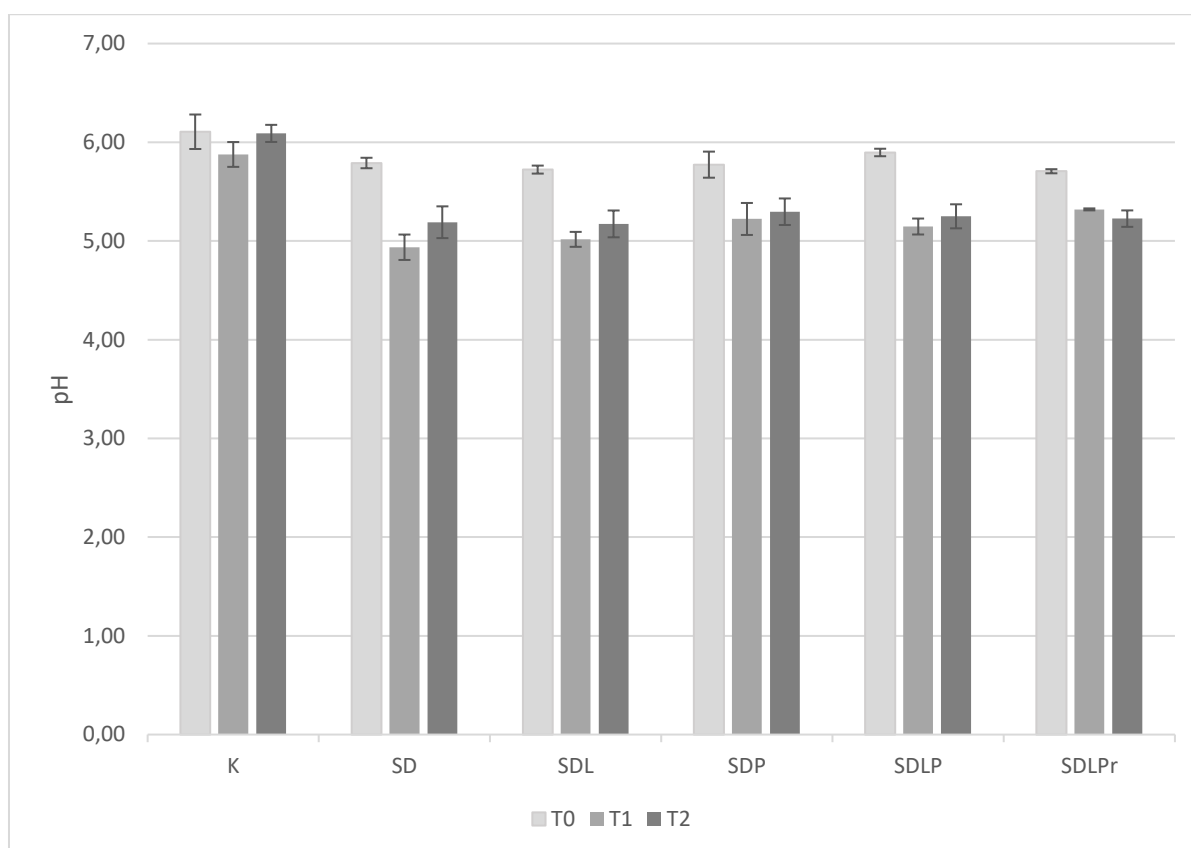
bakt med LAB-miks og PAB (SDLP) hadde resultater på $8,84 \pm 0,08$ log kde/g ved T0 med en økning til $9,11 \pm 0,13$ log kde/g ved T1.

Tabell 17 Celletall ved prøveuttak etter 0 (T0) timer og 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4°C (T1) etter utplating på MRS agar, Rose Bengal agar (RB) og SLA. Prøvene var kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Alle LAB-stammene ble tilsatt til ca 7 log kde/g. Celletall er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik av 3 uavhengige forsøk.

Prøve	MRS (log kde/g)		RB (log kde/g)		SLA (log kde/g)	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
K	$7,15 \pm 0,28$	$7,08 \pm 0,23$	$7,06 \pm 0,3$	$7,06 \pm 0,13$	-	-
SD	$8,37 \pm 0,09$	$8,65 \pm 0,31$	$6,91 \pm 0,04$	$6,71 \pm 0,31$	-	-
SDL	$8,4 \pm 0,05$	$8,73 \pm 0,19$	$6,84 \pm 0,12$	$6,95 \pm 0,21$	-	-
SDP	$8,38 \pm 0,07$	$8,7 \pm 0,16$	$6,86 \pm 0,05$	$6,82 \pm 0,21$	$8,84 \pm 0,06$	$9,06 \pm 0,0,1$
SDLP	$8,39 \pm 0,06$	$8,82 \pm 0,13$	$6,84 \pm 0,04$	$6,94 \pm 0,1$	$8,84 \pm 0,08$	$9,11 \pm 0,0,13$
SDLPr	$8,46 \pm 0,1$	$8,44 \pm 0,46$	$6,89 \pm 0,08$	$6,76 \pm 0,14$	-	-

4.2.2 pH målinger

pH målinger ble gjennomført ved tre tider; etter elting (T0), etter fermentering (T1) og etter steking og avkjøling (T2) og er illustrert som gjennomsnitt av alle 3 forsøkene med standardavvik i Figur 7. Resultatene for de tre forsøkene viste til samme trend for alle prøvene, hvor kontrollbrødet (K) opprettholdt høyere pH fra T0 til T2 med pH $6,11 \pm 0,17$, $5,88 \pm 0,13$ og $6,09 \pm 0,09$ ved de 3 ulike tidene, sammenlignet med resterende prøver. Resterende prøver hadde noenlunde likt utgangspunkt med pH verdier mellom $5,71 \pm 0,02$ (SDLPr) og $5,90 \pm 0,04$ (SDLP). Alle prøvene hadde et fall i pH frem til T1, og resultatene varierte mellom pH $4,94 \pm 0,013$ og $5,32 \pm 0,01$. SD hadde størst gjennomsnittlig reduksjon fra T0 til T1 fra pH 5,79 - 4,94. Resultatene for T2 viste for de fleste resultatene en økning i pH, med unntak av SDLPr som hadde en nedgang fra $5,32 \pm 0,01$ ved T1 til $5,23 \pm 0,08$ ved T2.

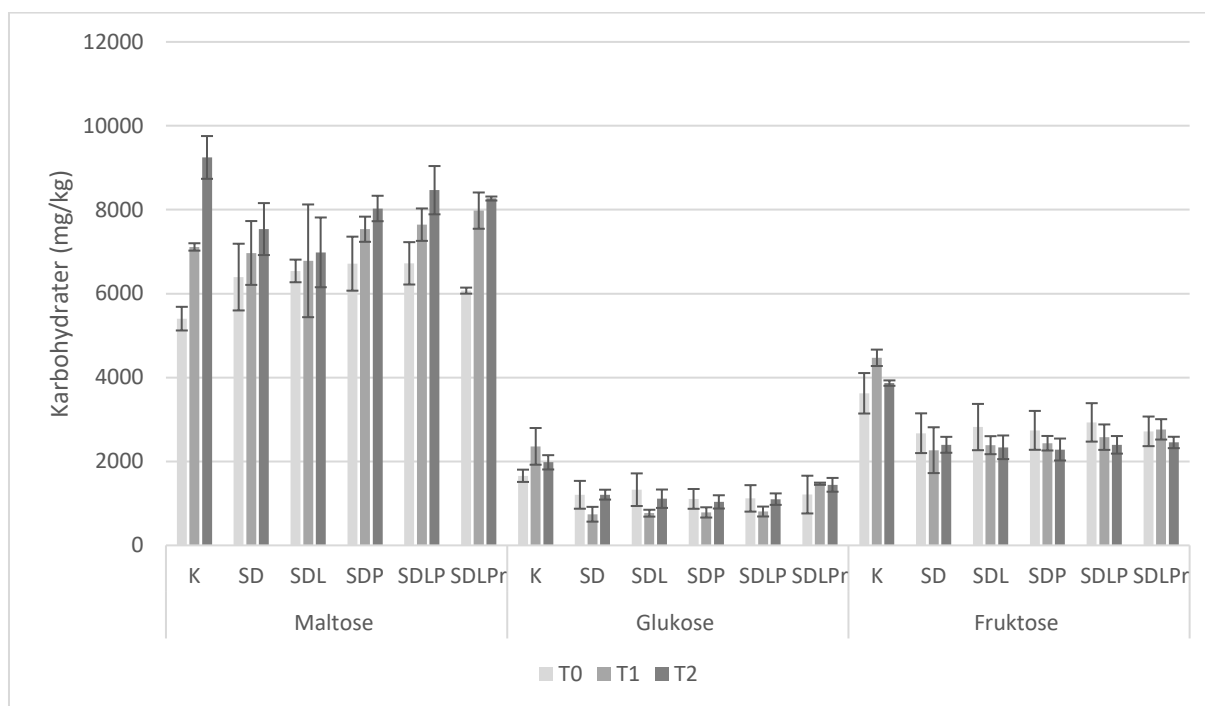


Figur 7. pH i deig etter 0 (T0) timer og 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4°C (T1) og i ferdig stekt og avkjølt brød (T2) vist som gjennomsnitt med tilhørende standardavvik for de ulike prøvene; kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP), surdeigsbrød fermentert med lab-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr).

4.2.3 HPLC analyse

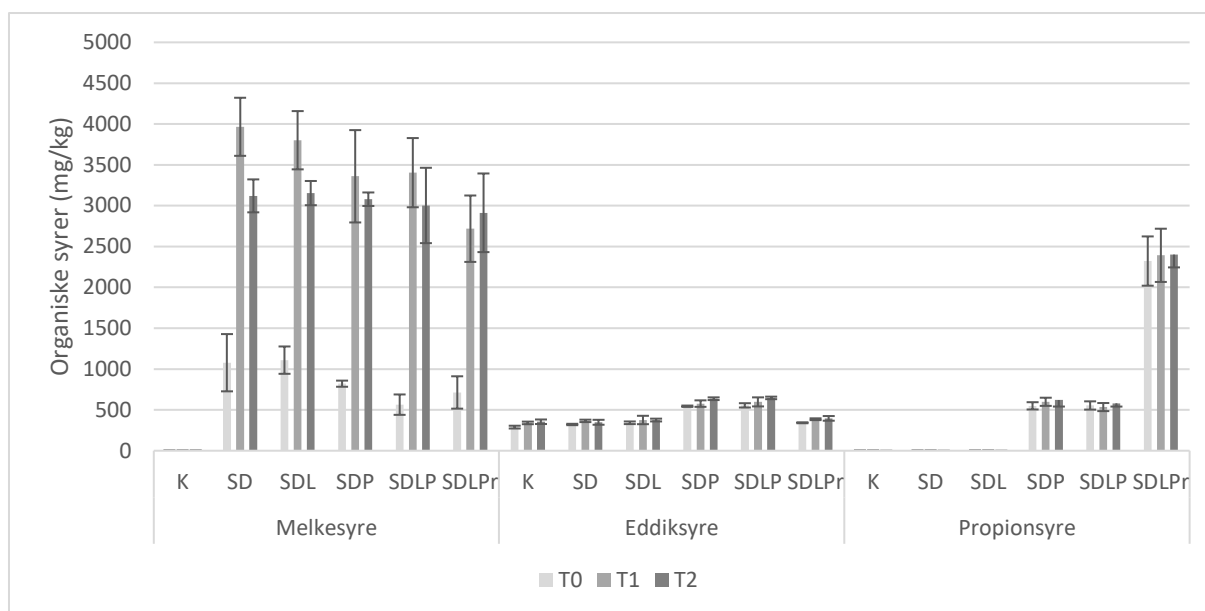
Resultatene for konsentrasjon av karbohydrater i prøvene ble regnet ut som gjennomsnitt med tilhørende standardavvik (\pm) for alle forsøkene for de ulike prøveuttakstidene (Figur 8).

Generelt for maltose ble det observert en jevn økning fra T0 til T2. Innhold av glukose hadde en nedgang i mengde glukose fra T0 til T1 og deretter en liten økning til T2 for SD, SDL, SDP og SDLP. For både kontrollen og SDLPr ble det observert en økning i konsentrasjon av glukose fra T0 til T1 og deretter en liten reduksjon i konsentrasjonen fra T1 til T2. Innhold av fruktose viste de samme trendene som for glukose, men med høyere konsentrasjoner som illustrert i figuren.



Figur 8 Karbohydrater i deig og ferdig stekt brød analysert i kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP) og i surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4°C (T1) og i avkjølt brød etter steking (T2). Resultatene er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

Innhold av organiske syrer er presentert på samme måte som beskrevet for karbohydrater i avsnittet over, hvor gjennomsnitt og standardavvik (\pm) er vist, se Figur 9. Det ble observert noe melkesyre i alle brødene bakt med surdeig ved første prøveuttak (T0), med en kraftig økning etter fermentering (T1) til $2718,3 \pm 406,42 - 3966 \pm 355,4$ mg/kg, etterfulgt av en liten reduksjon etter steking og avkjøling (T2). Kontrollbrødet hadde ingen produksjon av melkesyre. Mengden eddiksyre var jevn for både T0, T1 og T2 i brødene K, SD, SDL og SDLPr og lå i området $288,96 \pm 16,9 - 395,87 \pm 28,6$ mg/kg. Prøver SDP og SDLP hadde noe høyere verdier av eddiksyre for alle prøveuttak (T0, T1 og T2). Innhold av propionsyre var ikke til stede i brøddeigene/brødene K, SD og L, men derimot i brøddeigene/brødene SDP og SDLP ble propionsyre detektert og med relativt like nivåer ved alle prøveuttakstidspunktene. Konsentrasjonen var størst for brødet SDLPr med et innhold på mellom $2322,09 \pm 301,63 - 2401,15 \pm 156,72$ mg/kg, og varierte dermed lite mellom T0 og T2.

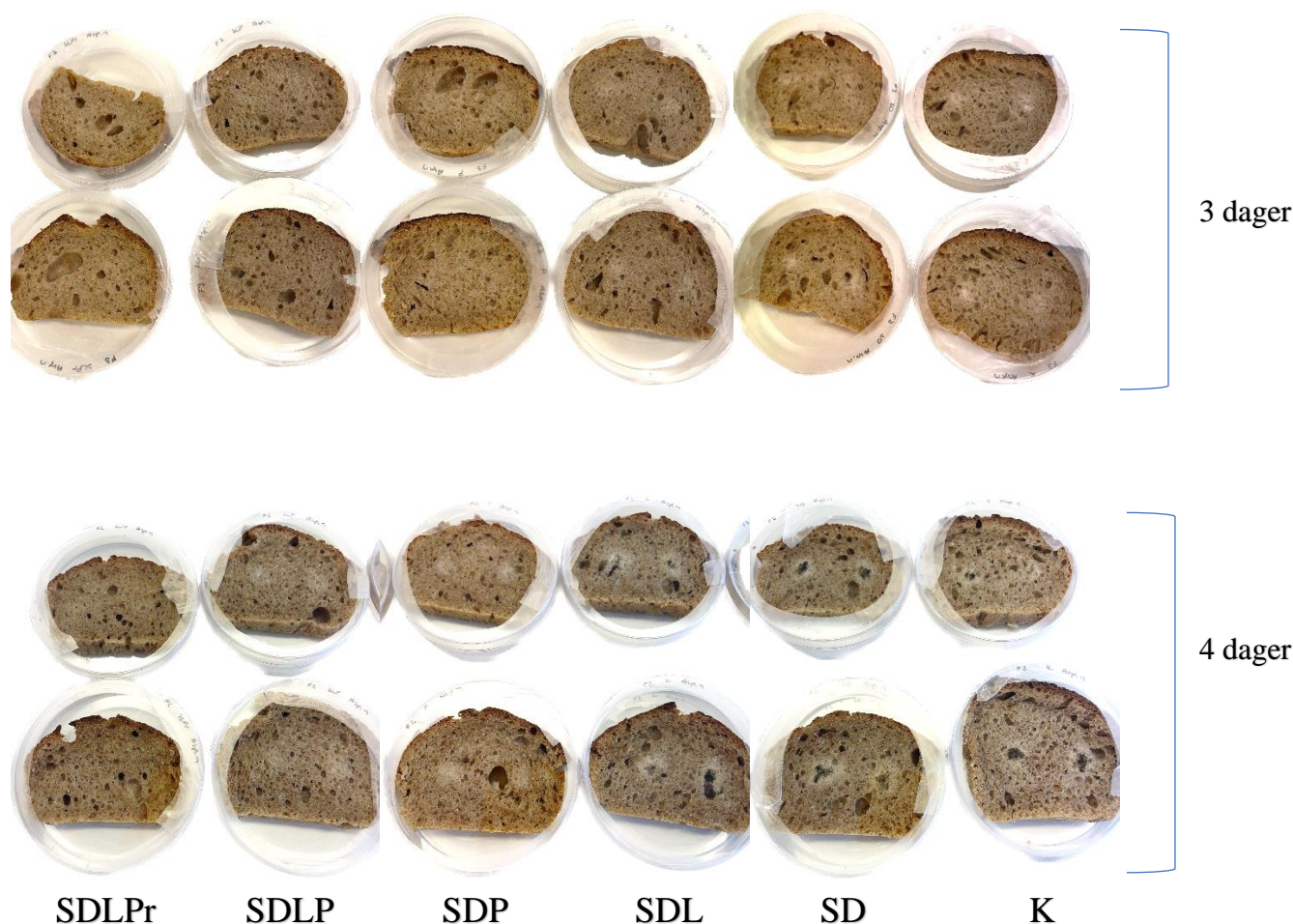


Figur 9 Organiske syrer i deig og ferdig stekt brød analysert i kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP) og i surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4°C (T1) og avkjølt etter steking (T2). Resultatene er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

4.2.4 Visuell observasjon av mugg

Muggvekst på brødsnivene ble visuelt vurdert i 21 dager etter inkubering ved 20 °C. Her ble muggvekst definert som både synlig vegetativt mycel og/eller sporedannelse.

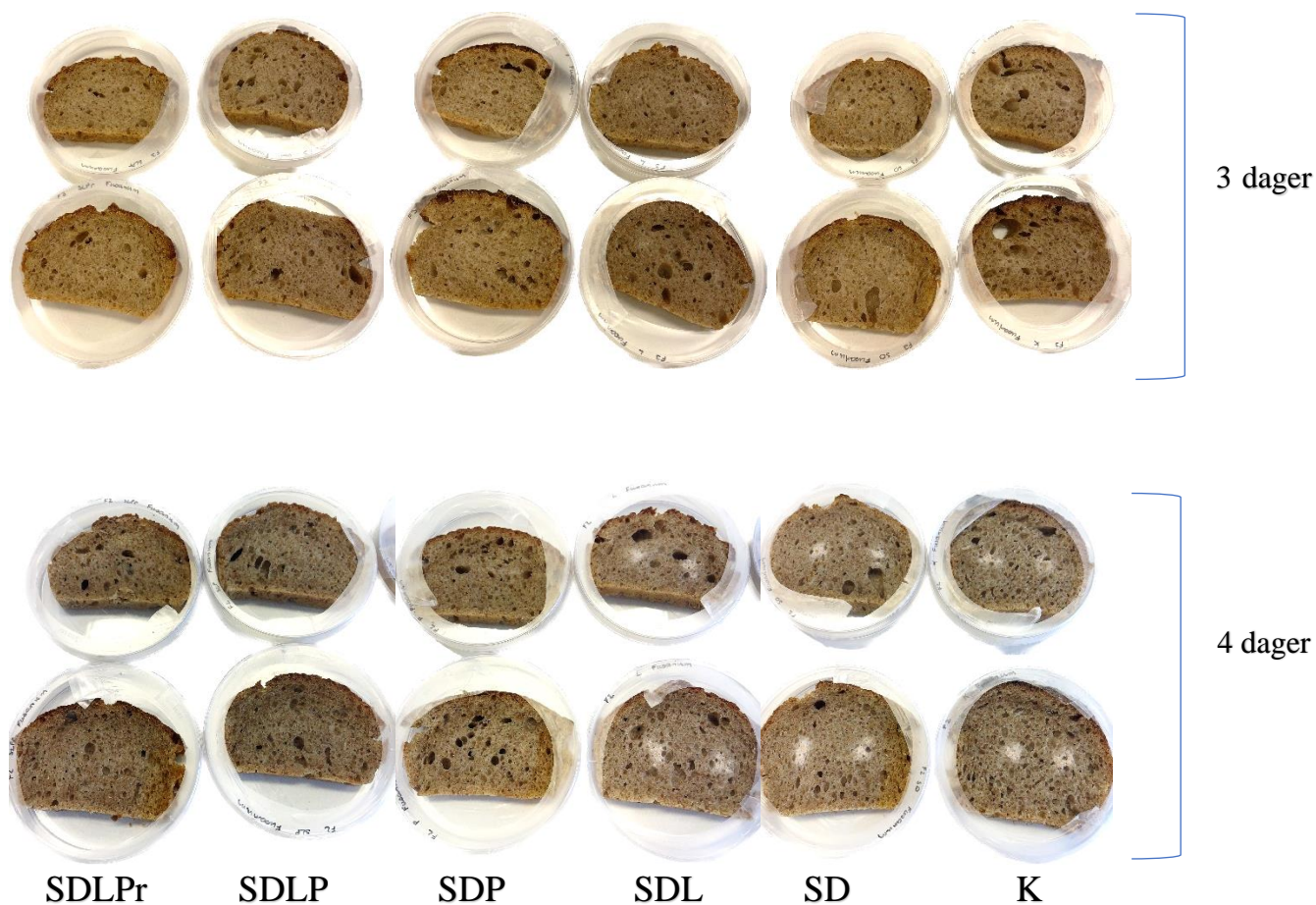
For brødsnivene inokulert med sporer fra *Aspergillus niger* gikk det 3 dager før det ble observert synlig muggvekst på noen av skålene (Figur 10), men etter fire dager var det synlig muggvekst på alle skålene, med unntak av brød bakt med surdeig tilsatt LAB-miks og kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Muggvekst ble observert først som bare hvitt vegetativt mycel, men etter fire dager ble det i tillegg observert sorte sporer (konidie) i midten av det vegetative mycelet på kontrollbrødet (K), surdeigsbrødet (SD) og surdeigsbrød bakt med LAB-miks (SDL). Etter 5 dager hadde alle brødene med unntak av SDLPr synlig sporedannelse observert som sorte konidie-sporer.



Figur 10. Brødskiver inokulert med ~200 sporer av *Aspergillus niger* i to punkter etter 3 og 4 dager inkubering ved 20 °C. Fra venstre surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *W. confusa* TM76, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr), surdeigsbrød fermentert med samme type LAB-miks (SDLP), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks (SDL), surdeigsbrød (SD) og kontroll (K). Parallelle skåler plassert vertikalt for respektive prøver.

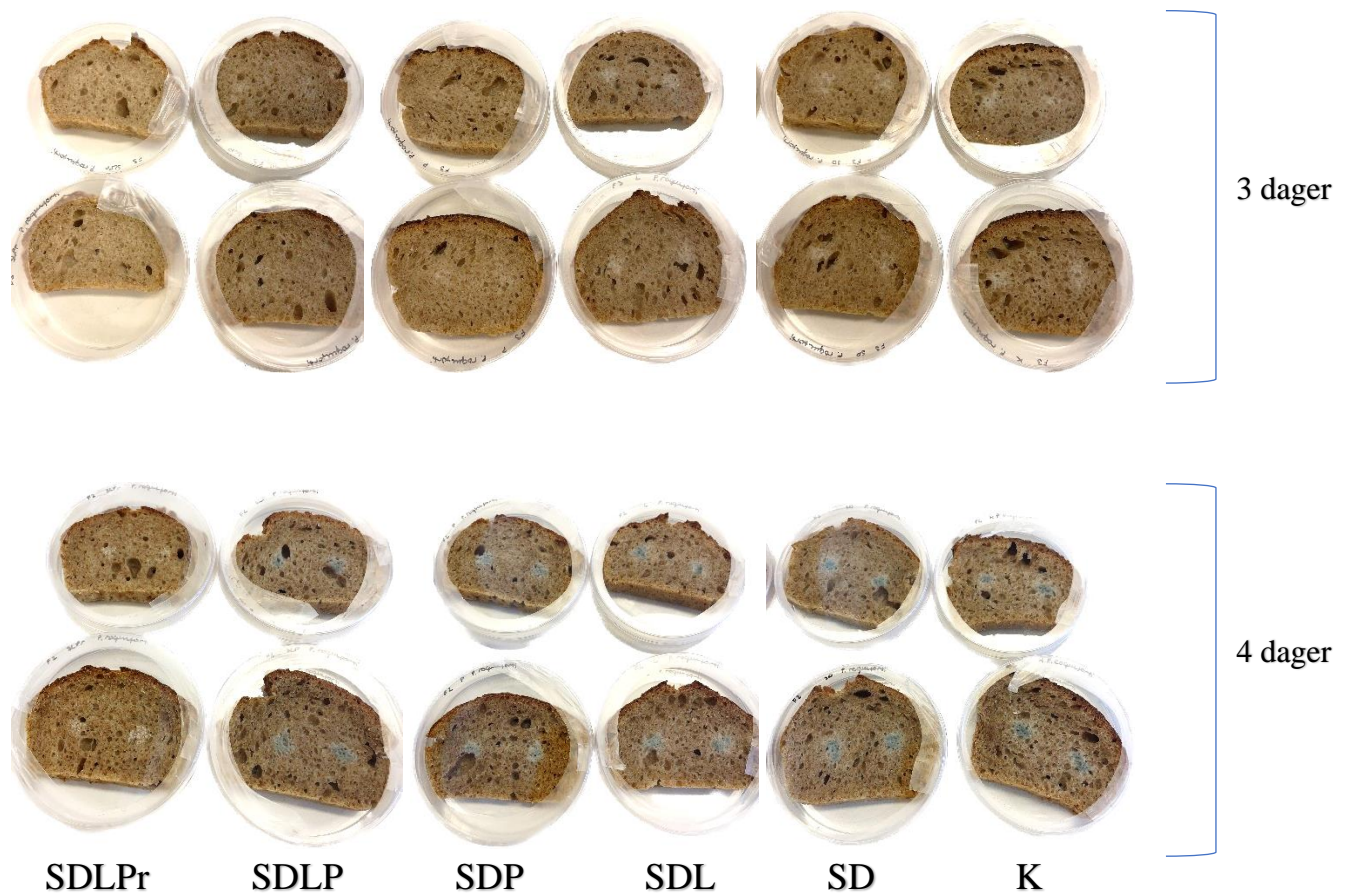
Muggvekst av *Fusarium* sp. ble observert etter 3 dager som hvitt vegetativt mycel kun på kontrollbrødet fra forsøk 1, men etter fire dager ble muggvekst observert som hvitt og rosa “korthåret” vegetativt mycel på alle brødskivene uten PAB eller kalsiumpropionat tilsatt, som vist i Figur 11. Muggvekst ble fra dag 3 til 6 kun observert i prøvene merket som K, SD og SDL. Ved 6 dager og frem til 13 dager med observasjon ble det også observert mugg i noen av prøvene SDP og SDLP, enten i en eller begge parallellene på en eller begge sider av sporeinokuleringen (Tabell 18). Prøver med SDLPr hadde ingen muggvekst gjennom hele observasjonsperioden (

Figur 13)



Figur 11. Brødskiver inokulert med ~200 sporer av *Fusarium* sp. i to punkter etter 3 og 4 dager inkubering ved 20 °C. Fra venstre surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *W. confusa* TM76, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr), surdeigsbrød fermentert med samme type LAB-miks (SDLP), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks (SDL), surdeigsbrød (SD) og kontroll (K). Parallelle skåler plassert vertikalt for respektive prøver.

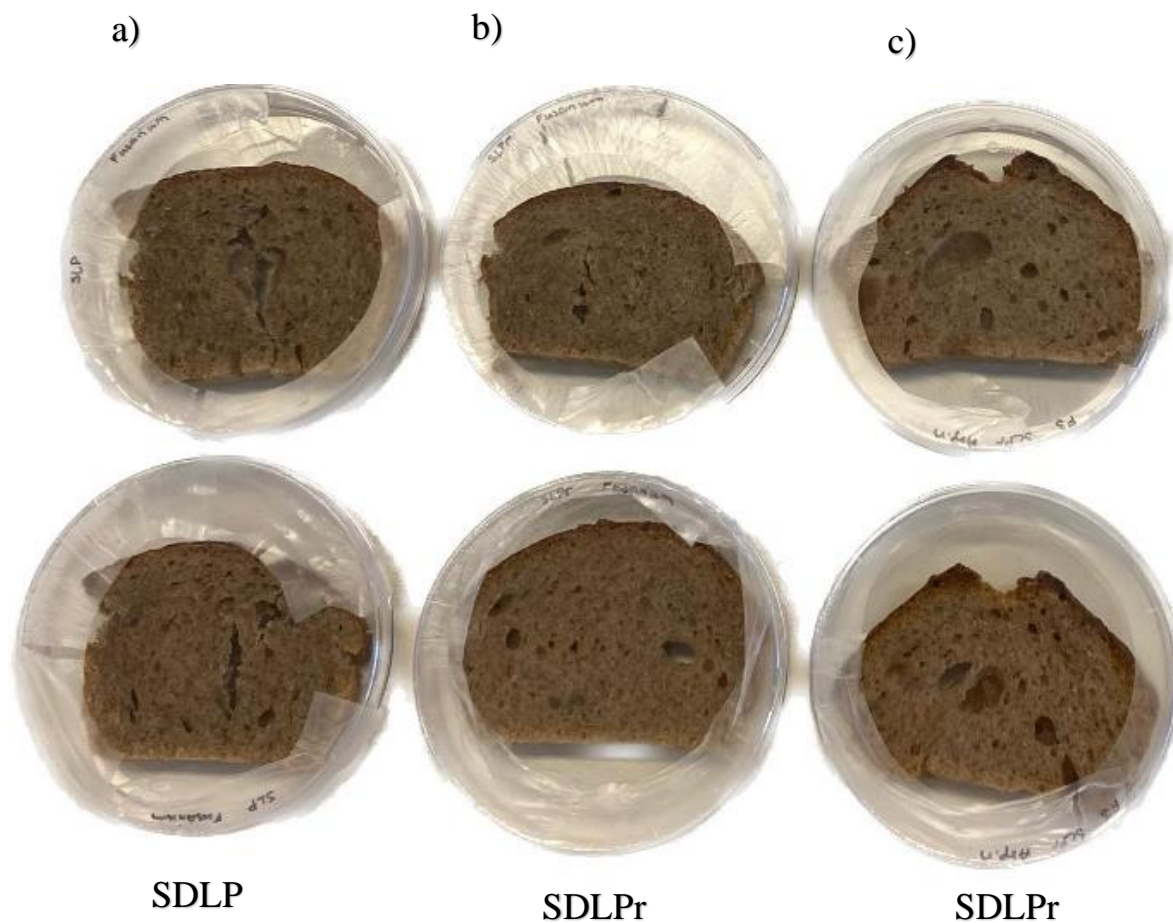
Etter inkubering i 3 dager ble det observert muggvekst for K, SD og SDP prøvene inokulert med *P. roqueforti* i alle forsøkene. For resterende prøver var det noe variasjon om det ble observert etter 3 eller 4 dager (Tabell 18). Etter fire dager ble det observert mugg på alle prøvene ved alle forsøkene. Muggveksten ble observert som hovedsakelig blågrønne konidiesporer.



Figur 12. Brødskiver inokulert med ~200 sporer av *Penicillium roqueforti* i to punkter etter 3 og 4 dager inkubering ved 20°C. Fra venstresurdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *W. confusa* TM76, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr), surdeigsbrød fermentert med samme type LAB-miks (SDLP), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks (SDL), surdeigsbrød (SD) og kontroll (K). Parallelle skåler plassert vertikalt for respektive prøver.

Kalsiumpropionat som ble tilsatt i prøven merket SDLPr hadde sterk hemmende effekt på *A.niger* og *Fusarium* sp. vist i

Figur 13. I tillegg hadde propionsyre produsert av PAB noe hemmende effekt på muggvekst i flere av parallellene med brød merket SDP og SDLP.



Figur 13. Brødskiver etter inkubering i 21 dager ved 20 °C etter tilsats av 200 sporer av a) *Fusarium* sp, b) *Fusarium* sp. og c) *Aspergillus niger*. Fra venstre; a) surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *W. confusa* TM76, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51 og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP), b) surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr) og c) surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%).

Tabell 18. Muggvekst observert på brødskiver gitt som antall dager etter inkubering i kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks (*W. confusa* TM76, *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* GK45, *L. plantarum/pentosus* VL51) (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP), og surdeigsbrød fermentert med LAB-miks sammen med kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Brødene ble inokulert ved to punkter med ~200 sporer av *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., og *P. roqueforti*. Visuell observasjon av prøvene i 21 dager etter inkubering ved 20 °C

		Muggtype												
		<i>Aspergillus niger</i>				<i>Fusarium</i> sp.				<i>Penicillium roqueforti</i>				
Prøve	Paralleller:	1		2		1		2		1		2		
	Inokuleringspunkter illustrert som høyre/venstre													
	Antall inkubasjonsdager													
Gjentak:	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H
K	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3
SD	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	3	3	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3
	3	3	4	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3
SDL	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	4	4	4	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	3
SDP	1	4	4	4	4	12	n.d ¹	7 ³	10	4	4	4	4	4
	2	4	4	4	4	7	6	8	n.d	4	4	4	4	4
	3	4	4	4	4	n.d	n.d	n.d ²	n.d	4	3	3	3	4
SDLP	1	4	4	4	4	n.d	n.d	n.d	n.d	3	3	3	3	3
	2	4	4	4	4	9	5 ³	n.d	6	4	4	4	4	4
	3	4	4	4	4	12	n.d	n.d	n.d	4	4	4	4	4
SDLPr	1	n.d ¹	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4	4	4	4	4
	2	n.d	n.d	n.d	18	n.d	n.d	n.d	n.d	4	4	4	4	4
	3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d ²	n.d	n.d	n.d	4	4	4	4	4

¹ n.d = ikke observert mugg, ² Observert blå mugg utenfor inokuleringspunktet, ³ Observert kontaminering av *A. niger*

5. Diskusjon

Formålet med studien var å evaluere effekten av fermentering med ulike melkesyre- og propionsyre-bakterier i brødbaking, med spesielt fokus mot deres potensielle evne til å hemme muggvekst. Sentrale elementer i studien var analyser av LAB og PAB samt deres metabolske aktivitet i surdeig og brød, i tillegg til å observere eventuelle forskjeller i deres evne til å hemme muggvekst.

I studien ble brød bakt med surdeig og ulike kombinasjoner av en miks med LAB-stammer, en PAB stamme og tilsetning av KPr sammenlignet med brød bakt med gjær. Hensikten var å vurdere om tilsetning av LAB og PAB kunne føre til en effektiv hemming av muggvekst mot ulike typer muggsopparter.

En av hovedårsakene til at brød kastes er muggvekst, noe som oppstår som følge av forurensing etter produksjonsprosessen (Axel et al., 2017). På grunn av det betydelige matsvinnet knyttet til brød og bakevarer både i industrien og blant private husholdninger, er det av stor interesse å finne løsninger som kan forlenge holdbarheten ved å hemme muggvekst. I tillegg til å redusere matsvinn, vil en forlenget holdbarhet også ha økonomiske fordeler både for forbrukere og produsenter. Med bakgrunn i denne problemstillingen ble det i denne studien undersøkt om LAB og PAB tilsatt i surdeig ved brødbaking ville bidra til å hemme muggvekst, og dermed opprettholde holdbarheten i brødet. Det ble også undersøkt om de utvalgte LAB og PAB stammene hadde mer hemmende effekt alene eller i kombinasjon med hverandre basert på deres evne til å produsere melkesyre, propionsyre og eddiksyre.

5.1 LAB

Heterofermentative LAB produserer melkesyre og eddiksyre som er viktig for de tekniske egenskapene til brødet, men i denne studien ble det vurdert som viktig for å potensielt hemme muggvekst (De Vuyst & Neysens, 2005). Det ble gjennomført forsøk med LAB i både buljong og melmedium, hvor det ble produsert betydelig mindre mengder melkesyre og eddiksyre i melmedie sammenlignet med mengden produsert i buljong. I MRS buljong ble det registrert verdier mellom 2394,99 og 14457,67 mg/kg melkesyre, mens det i melmedium ikke ble registrert verdier høyere enn 3457,68 mg/kg. Det ble også registrert lave verdier for eddiksyre produsert i melmedium, hvor 6 av 9 prøver ikke hadde noe produksjon, og prøvene

som hadde noe produksjon av eddiksyre var ikke nivåene høyere enn 287,27 mg/kg. De tre stammene *L. citreum* GK45, *W. confusa* TM76, *W. cibaria* TM120 som produserte eddiksyre i melmedium hadde også de høyeste verdiene av eddiksyre i buljong, med verdier mellom 4565,96 og 4680,63 mg/kg. Siden MRS er tilsatt eddiksyre, gir dette en differanse på henholdsvis 983,06 og 1097,73 mg/kg sammenlignet med kontrollen. LAB dyrket i melmedium viste til et betydelig fall i pH som ble målt til ~6 for samtlige prøver ved T0, og ved T24 ble det registrert et fall på mer enn 2 pH enheter for flere av prøvene i intervallet 3,32 – 4,11. Dette tyder på at bufferkapasiteten til melmediet ikke er optimal, noe som kan ha bidratt til stressende forhold for LAB over tid og ført til at de ikke har klart å produsere melkesyre og eddiksyre på samme måte som i MRS buljong.

Basert på resultatene fra forsøkene for LAB i buljong og melmedium ble det valgt ut 4 LAB stammer til videre forsøk. Etter bestemmelse av celletall for de utvalgte stammene var det *Lb. plantarum* 15D og *Lb. plantarum/pentosus* VL51 som viste til høyest celletall med log 9,4 kde/ml i MRS. Disse stammene produserte mest melkesyre av de utvalgte stammene i både melmedie og buljong med verdier på mellom 12412,96 – 14457,67 mg/kg og henholdsvis 2985,09 og 3457,68 mg/kg. Etter en totalvurdering av resultatene fra de innledende forsøkene ble det besluttet å lage en miks av LAB-stammene *Lb. plantarum* 15D, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum/pentosus* VL51, som alle viste god evne til å senke pH og hadde høyt innhold av både melkesyre og eddiksyre. Denne miksen ble benyttet til hemmeforsøket.

I denne studien var det mest interessant å se på LAB i sammenheng med produksjon av organiske syrer og evne til å senke pH som utgangspunkt for hemming av muggvekst i surdeigsbrød. En studie gjennomført av (Axel et al., 2017; Ryan et al., 2011) viste til at LAB produserer eller slipper ut andre aktive komponenter under fermentering, som bidrar til hemming av muggvekst når surdeig er inkludert i brødbaking. Disse metabolittene er vanligvis lavmolekylære massekomponenter slik som phenyl og substituerte phenyl derivater (3-phenyllactic, 4-hydroxyphenyllactic, og benzosyre), sykliske dipeptider, hydroxy fettsyrer eller antimugg peptider. Sammen med deres høye MIC (minimal inhibition concentration) som spenner seg fra 0,1 til 10,00 mg/kg produseres de i små nivåer i fermenteringssubstratet. I studien ble det antatt at en synergisk effekt oppstår mellom disse lav-molekylære massekomponentene. I en in situ studie ble det benyttet en konsentrasjon på 30 mg/kg av disse mugghemmende komponentene noe som resulterte i forlenget holdbarhet med omtrent 25 %, sammenlignet med kun syrning av deigen ved bruk av eddiksyre og melkesyre. (Axel et

al., 2017). Til videre arbeid kunne det vært interessant å lage et brød med surdeig inokluert med samme mengde mugghemmende komponenter, for å se på effekten av dette både alene og i tillegg sammen med spesifikt utvalgte LAB, da disse metabolske komponentene er arts og stamme spesifikke.

Av de undersøkte stammene i MRS buljong ble det ikke detektert sitronsyre i noen av *Leuconostoc* eller *Weissella* stammene og heller ikke i de tre av *Lactiplantibacillus*-stammene *Lb. plantarum* 15 D, *Lb. plantarum* CM67 og *Lb. plantarum/pentosus* CM65, noe som tyder på at disse er sitratforgjærende. De fleste *Leuconostoc* er sitratforgjærende og dette stemmer med resultatene. I følge (García Quintáns et al., 2008) kan *Lactiplantibacillus plantarum* og noen *Weissella* stammer omdanne sitrat, noe som stemmer med resultatene i dette masterstudie. Det var dermed kun to av LAB-stammene som hadde tilnærmet likt innhold av sitronsyre som i kontrollen (MRS buljong). Ved sitratforgjæring blir sitronsyre brutt ned til eddiksyre og oksaleddiksyre (Hugenholtz, 1993). Diacetyl produseres også ved sitratforgjæring og har antimikrobiell effekt (Hugenholtz, 1993; Jay, 1982), men dette ble det ikke analysert for i dette masterstudie.

5.2 PAB

Endeproduktene ved fermentering av PAB er hovedsakelig eddiksyre og propionsyre, som begge er kjent for å ha en hemmende effekt på muggsopp som vanligvis vokser på brød. Dette ble derfor vektlagt ved utvelgelse av PAB stammer til denne studien. Siden PAB er en saktevoksende bakterier som vokser best under anaerobe forhold, er det utfordrende å sikre gode nok betingelser for vekst. PAB ble i denne studien undersøkt i både SLB, og melmedium.

Ved dyrking av PAB i SLB, viste resultatene fra denne studien at de utvalgte PAB stammene produserte ca 3000 mg/kg propionsyre. Det ble gjennomført flere forsøk med melmedie for dyrking av PAB hvor resultatene for produksjon av propionsyre var svært lave. I disse forsøke ble alle bakteriene dyrket hver for seg i kun melmedium, i tillegg ble de også dyrket i melmedium tilsatt 0,75 % laktat, og det ble også gjennomført et forsøk med en miks av PAB og LAB stammer. Resultatene for PAB i melmedium og i melmedium tilsatt LAB viste til lave mengder propionsyre produsert (104-380 mg/kg), men i melmedium tilsatt laktat (0,75%) ble det registrert god vekst av PAB hvor *P. freudenreichii* ISU P50 og LMG 2948 produserte henholdsvis 2370 og 1646 mg/kg propionsyre. Det ble gjennomført flere gjentak med PAB i

melmedium tilsatt laktat med *P. freudenreichii* ISU P50 og ved ett av gjentakene ble det registrert så mye som 3876 mg/kg propionsyre. Det ble registrert en sammenheng i prøvene hvor betydelig mengde propionsyre ble produsert (>1600 mg/kg) da det også ble observert en nedgang i mengden melkesyre og økning i eddiksyre, noe som er forventet metabolisme av PAB (Piwowarek et al., 2018).

pH i melmediet benyttet i denne studien ble målt til 6,28 som er i nærheten av pH-optimum for PAB (7,0). Inkuberingstemperaturen som ble benyttet for PAB i melmedium var 30 °C, som også er innenfor vekstoptimum for bakteriene (Piwowarek et al., 2018). Likevel var det flere av prøvene hvor det ikke ble registrert noe betydelig vekst. En mulig sammenheng ble observert mellom prøver som hadde propionsyre og en høyere pH enn for prøver med mindre produsert propionsyre, som hadde lavere pH. I både *P. freudenreichii* ATCC 9616, og LMG 3001 ble det produsert betydelige mengder melkesyre både i PAB + mel og i PAB tilsatt laktat (0,75 %), noe som påvirket pH og medførte en større reduksjon i pH verdi under inkubering. Dette kan skyldes en forurensing av LAB i disse 2 kulturene under podingen, noe som har ført til at pH ble for lav og dermed ble det produsert lite propionsyre. Dette ser også ut til å ha vært tilfelle i det ene gjentak gjennomført med *P. freudenreichii* ATCC P50 dyrket i melmedium tilsatt laktat (0,75 %) hvor det også ble registrert en høy mengde melkesyre på 9 260,7 mg/kg og lav pH ved T72. Dette var en av årsakene til at det ble gjennomført et nytt forsøk, hvor det ble registrert høyere verdier med propionsyre.

I et tidligere screeningforsøk utført av Le Lay et al. (2016) ble det også tillaget et hvetemel hydrolysatmedium for å etterligne sammensetningen og bakevarer, og her ble det også tilsatt glukose, maltose, sukrose og fruktose med 15 g/l for hver. I tillegg ble det tilsatt 1 % gjærekstrakt og 0,7 % agar. pH i mediet ble målt til 5,6 og oppdyrket PAB ble innstøpt i mediet, og sporer ble inokulert på overflaten. Resultatene fra denne studien viste at 49 av de 50 testede PAB-stammene hadde en hemmende effekt på muggsoppsporene. Dette skyldes gode vekstvilkår for bakteriene som følge av god tilgang på sukker, noe som bidro til økt produksjon av potente mugghemmende organiske syrer slik som melkesyre, eddiksyre og propionsyre. I den samme studien viste resultatene at færre PAB stammer hadde en hemmende effekt mot muggvekst ved bruk av andre typer medier slik som modifisert gjærekstrakt laktat agar (YELm) (Le Lay et al., 2016). Til tross for at resultatene i denne masterstudien har vist til varierende resultater med hensyn til vekst av PAB i melmedium, viser andre studier at PAB kan ha et potensial for å hemme muggvekst.

Forsøkene som ble gjennomført med surdeigskultur viste ingen produksjon av propionsyre for noen av bakteriestammene testet. Ved første forsøk med surdeigskultur ble det benyttet optimale temperaturbetingelser for PAB på 30 °C, og pH målt ved backslopping ble målt til 5,4-5,5 for surdeigskulturen, noe som er innenfor vekstområdet til PAB (4,5 – 8,0) (Piwowarek et al., 2018). Gjennom fermenteringstiden ble pH redusert til omtrent 3,9 noe som er en stor reduksjon, men likevel innenfor det som er forventet for en surdeigskultur som vanligvis har en pH på 4. Den store reduksjonen i pH har trolig bidratt til et for surt miljø til at PAB kunne vokse. En mulig årsak til den store reduksjonen i pH kan ha vært de allerede til stede værende LAB som vokser nesten dobbelt så raskt som PAB, og med optimale temperaturbetingelser har syrnet pH i kulturen raskere enn PAB kunne vokse (Prodan, 2012; Vamanu et al., 2005). I tidligere studier gjort med PAB sammen med LAB i surdeig ved baking av brød ble det observert langsom, eller til og med fraværende vekst av PAB (Javanainen & Linko, 1993) dette ble også registrert i en tidligere masteroppgave av Rygh (2021), noe som også stemte med resultatene i denne studien.

Det ble gjennomført et nytt forsøk hvor det ble forsøkt å endre vekstbetingelsene til LAB og PAB i surdeig ved å senke temperaturen til 20 og 15 °C ved inkubering i 3 dager etterfulgt av ett døgn inkubering ved 30 °C. Hensikten med å redusere temperaturen var å bremse veksten av LAB slik at pH ikke skulle senkes like raskt og like mye, slik det ble observert i det første forsøket. Hensikten med å øke temperaturen etter 3 døgn var å øke produksjonen av propionsyre. Disse temperaturene er i nedre spekteret for vekst av mesofile bakterier som PAB og LAB (De Assis et al., 2022; Fröhlich-Wyder et al., 2017). Det ble likevel observert lignende resultater med hensyn på reduksjon i pH, hvor det allerede etter 48 timer ble observert en reduksjon til rundt 4 for alle prøvene ved 15 og 20 °C. Det ble ikke observert signifikante endringer mellom pH registrert etter 48 timer og 72 timer. Heller ikke i dette forsøket ble det observert produksjon av propionsyre, og de endrede temperaturbetingelsene ser ut til å ha hatt liten effekt. Til tross for varierende resultater ved de innledende vekstforsøkene ble det besluttet å inkludere PAB i hemmeforsøket, med PAB-stammen *P. freudenreichii* ISU P50 som viste høyest produksjon av propionsyre i melmedium.

5.3 Surdeig

Surdeig kan i utgangspunktet ha en konserverende effekt på bakevarer som følge av naturlig LAB og gjær som produserer organiske syrer, og dermed bidrar til en reduksjon i pH gjennom fermenteringsprosessen. Svake syrer som melkesyre og eddiksyre produseres av melkesyrebakterier og gjær, og bidrar til å hemme mikrobiell vekst (Quattrini et al., 2019). Selv om tilsetning av sterke syrer ville hatt en større effekt på pH, virker de mindre effektivt enn svake syrer ved samme pH. Dette skyldes at hemming av mikrobiell vekst av svake syrer er relatert til konsentrasjonen av udisosiert syre og pKa verdien til syren. Dersom pH foreligger ved eller under pKa verdien til en syre, vil mengden udisosiert syre være i likevekt eller mer enn mengden disosiert syre. Udisosiert syre kan fritt bevege seg over cellemembranen i bakterieceller, som forstyrrer den indre pHen i cytoplasma som holder en nøytral pH på ca 7,5. Cellen vil forsøke å gjenvinne nøytral pH, noe som er energikrevende og hindrer vekst, og vil etter hvert føre til at cellen dør (Adams et al., 2016a). For å oppnå en god hemmende effekt av muggvekst i surdeig, er det derfor viktig at pH senkes til et nivå hvor produksjon av organiske syrer er best mulig.

Surdeigen som ble benyttet i dette studie ble tilvirket etter en tradisjonell metode med backslopping hver 24 time i 2 uker til kulturen ble moden. For å oppnå en aktiv kultur ble en del av moderdeigen blandet sammen med like deler mel og vann, og oppbevart i romtemperatur. En aktiv kultur kjennetegnes ved en dobling i volum fra utgangspunktet, noe som ble bestemt til 8 timer i dette studie. Hvor lang tid som kreves for å oppnå en aktiv kultur etter en tradisjonell metode kan variere med hensyn til inneklime, pH, mengdeforhold mellom mel, vann og surdeigskultur og hvilke stammer av gjær og LAB som dominerer i kulturen. Andre kjennetegn ved surdeigskulturen er aktiviteten i surdeigen, da den skal være boblende når den er aktiv, og ha store bobler. Med tanke på at tradisjonell tilvirkning av surdeigskultur er vanskeligere å kontrollere enn kommersielle starterkulturer brukes det blant mange bakere en test hvor en liten del av surdeigskulturen overføres til vann, for å sjekke om den flyter. Dersom kulturen flyter er den aktiv og klar, dersom den synker er den enten ved et for tidlig stadige, eller den har passert sitt mest aktive stadige. Det er mulige å skille disse stadiene ved å kjenne på lukten, da moden kultur, som har stått for lenge, vil bære preg av sterk syrlig eddiklukt. Lukten på kulturen bør være en blanding mellom søt og sur (Calvert et al., 2021). Disse kjennetegnene stemmer godt overens med observasjonene og metoden som ble benyttet i denne studien.

De innledende vekstforsøkene gjennomført med surdeigen (S2) viste til god tilstedeværelse av både LAB og gjær med celletall på henholdsvis 8,63 og 7,53 log kde/ml. En studie gjennomført av (Minervini et al., 2014) viste til at spontanfermentert surdeigsstarter hadde celletall på mellom 6-9 log kde/ml og 5-8 log kde/ml for henholdsvis LAB og gjær, noe som stemmer godt overens med resultatene i denne studien. Selv om det ikke ble foretatt noen undersøkelser for hvilke spesifikke stammer av gjær og LAB som var til stede i surdeigen viser tidligere undersøkelser at surdeigskulturer ofte domineres av obligate heterofermentative LAB-stammer som *Lactiplantibacillus sanfranciscensis* og *Lactiplantibacillus fermentum* og *Lactiplantibacillus plantarum* (Calvert et al., 2021; Minervini et al., 2014). Disse stammene kjennetegnes ved å være svært robuste og tåler lav pH på rundt 4, noe som ofte kjennetegner pH nivået til aktive surdeigskulturer (Minervini et al., 2014). pH verdien som ble målt for aktiv surdeig fermentert i 8 timer ble målt til 4,18 i denne studien, noe som stemmer godt med teorien.

5.4 Hemningsforsøket

Tiden det tar før det kommer mugg på brød ved vanlig oppbevaring kan variere avhengig av flere faktorer inkludert fuktighet, temperatur og tilstedeværelse av muggsporer. Generelt sett kan mugg begynne å vokse på brød i løpet av noen få dager til opptil en uke under normale oppbevaringsforhold (Axel et al., 2017). Tidligere forskning viser at kontaminering av mugg fra omgivelsene er vanskelig å kontrollere, men at de vokser saktere enn i forsøk utført med brød inokulert med mugg. I studie utført av (Belz et al., 2012) ble det gjennomført et forsøk med muggsoppartene *F. culmorum*, *P. expansum* og *A. niger* hvor brødskivene ble inokulert med 100 muggsporer og inkubert ved 20 °C. I en tidligere masteroppgave (Rygh, 2021) ble det benyttet et høyt antall på 14 000 sporer per inokuleringspunkt og 25°C ved inkubering. Dette førte til at prøvene allerede etter to dager hadde fremvekst av mugg, og det ble utfordrende å skille de ulike prøvene fra hverandre. I denne studien ble det observert mugg etter 3 dagers inkubering ved 20°C, og det ble tilsatt 200 sporer per inokuleringspunkt. Selv med redusert temperatur og langt færre sporer, kom det hurtig vekst på prøvene, og det var utfordrende å skille kontrollbrød fra prøvene med kun surdeig og surdeig tilsatt LAB. Det var likevel noen forskjeller, da kontrollbrødene konsekvent viste til muggvekst på dag 3, hvor det på surdeigsbrødene kunne gå en dag ekstra før det ble observert synlig vekst i begge punktene. Etter dag fire var det muggvekst på alle brødene bakt med surdeig eller tilsatt LAB. Det hadde vært interessant å gjennomføre en studie med enda færre sporer slik det ble

beskrevet i Belz et al., (2012) for å undersøke om muggveksten hadde fordelt seg over flere dager, og hemmeeffekten lettere kunne observeres.

5.4.1 Effekt av temperatur på pH og produksjon av organiske syrer

Etter 1,5 timer med fermentering i romtemperatur, ble det i denne studien benyttet kaldheving i over natten (ca 13-14 timer), før steking for å oppnå best mulig logistikk rundt brødbakingen. Dette er en metode som også brukes ofte av bakere i tillegg til at det er en metode for å kontrollere fermenteringen av surdeigen. Kaldheving kan likevel føre til noen konsekvenser for vekst av mikroorganismer i surdeigen, og noe som vil påvirke produksjon av melkesyre og eddiksyre. Dette vil igjen ha negativ effekt på hemming av muggvekst i surdeigsbrødene, noe som også ble observert i dette studie. Det ble ikke observert at kaldhevingen hadde noen konsekvens for produksjon av melkesyre, som ble registrert i området $1077,55 \pm 350,44$ mg/kg ved T0 til $3966,05 \pm 355,40$ mg/kg ved T1 i surdeigsbrødet (SD), noe som var som forventet, og lignende resultater ble registrert i masteroppgaven gjennomført av Rygh (2021). For eddiksyre derimot ble det observert svært lite produksjon for alle prøvene som ikke var tilsatt PAB (SDP og SDLP). I prøvene tilsatt PAB var det forventet at det ville være en høyere mengde eddiksyre, da dette er forventet metabolisme for både LAB og PAB, og den observerte forskjellen mellom brød med og uten PAB er derfor forventet, selv om nivåene for alle prøvene var svært lave (Piwowarek et al., 2018). I masterstudien gjennomført av Rygh (2021) ble fermentering av brøddeig gjennomført ved romtemperatur i 12 timer, og her ble det registrert høyere verdier for eddiksyre fra $290,3 \pm 33,0$ mg/kg ved T0 til $752,7 \pm 69,8$ mg/kg noe som er en større økning sammenlignet med det som ble funnet i denne studien, hvor eddiksyre ble målt til $321,2 \pm 8,28$ mg/kg ved T0 og $365,3 \pm 14,86$ mg/kg ved T1 for surdeigsbrød. Resultatene var tilsvarende lave for Surdeigsbrød inokulert med LAB-miks (SDL).

pH målingene i denne studien viste til verdier på rundt 5,71 – 5,9 etter setting av deig, noe som er forventet ut ifra teorien (De Vuyst & Neysens, 2005). Det ble det observert en reduksjon i pH gjennom fermenteringsprosessen (fra T0 til T1), til området 4,94 – 5,32 for alle surdeigsbrødene, noe som er svært lite, da det var forventet at denne ville bli redusert til omtrent 4 (Guerzoni et al., 2013). Disse pH verdiene var fordelaktig for PAB som har et vekstområde mellom 4,5 – 8, noe som understøttes av at PAB hadde en økning i celletall under fermenteringstiden (T0 – T1). Tidligere studier har vist at en økning i mengde eddiksyre kan oppnås ved å øke fastheten på deigen, noe som gir en lavere DY. Det ville også vært interessant å undersøke om en forlenget fermenteringstid ville ført til økt produksjon av

eddiksyre, da tidligere studier har vist god sammenheng mellom lav fermenteringstemperatur over lengre tid og produksjon av eddiksyre (Calvert et al., 2021).

De høye pH målingene som ble registrert i dette masterstudiet var mest trolig som følge av for lav fermenteringstemperatur, noe som har hemmet vekst av melkesyrebakteriene og gjær, og dermed begrenset mengden organiske syrer produsert av disse. Dette understøttes også av at celletallene som ble registrert for LAB og gjær var på samme nivå ved T0 som ved T1 i alle surdeigsbrødene, noe som tyder på at det har vært minimal vekst av disse gjennom fermenteringen. Dette kan skyldes at tilsatt LAB har blitt utkonkurrert av allerede til stede værende LAB, som allerede er tilpasset kjølige temperaturer ved gjentatt backslopping og inkubering ved 4 °C. Tilsatt LAB kan ha blitt stresset i det kalde miljøet, noe som understøttes av at celletallene var relativt like mellom prøvene etter fermentering, og det ville vært forventet et høyere celletall for LAB i prøvene som ble tilsatt LAB-miks. I dette tilfellet ser det ut til at en høyere temperatur og/eller en lengre fermenteringstid ville vært hensiktsmessig for å øke produksjonen av organiske syrer. Det kunne også vært interessant å se hvor mye lenger brødet burde vært fermentert ved romtemperatur før eller etter kaldheving for å oppnå bedre produksjon av eddiksyre og propionsyre siden kaldheving, som tidligere nevnt, er svært praktisk ved brødbaking, og fortsatt er vanlig å benytte ved tradisjonell surdeigsbaking.

5.4.2 Visuell observasjon av muggvekst

Kontrollbrødene som ble bakt med gjær i denne studien viste tidlig muggvekst ved alle gjentakene. Allerede etter 3 dager var det synlig vekst på alle prøvene inokulert med *A. niger* og *P. roqueforti*. For *Fusarium* sp. gikk det mellom 3 – 4 dager før det ble observert vekst. Siden *Fusarium* vokser noe langsommere enn de andre to muggsoppartene var dette forventet. For brød bakt med surdeig og surdeigsbrød tilsatt LAB-miks ble det også observert svak eller ingen hemmende effekt på muggvekst og det ble registrert muggvekst ved begge inokuleringspunktene i alle prøvene etter 3-4 dager.

Muggsopparten som er vanligst å finne på brød er *P. roqueforti*. Den vokser raskt, og er svært motstandsdyktig. Dette viste også resultatene fra denne studien. Allerede etter 3 dager ble det observert muggvekst på rundt halvparten av prøvene, og etter fire dager ble det observert muggvekst på alle prøvene i begge inokuleringspunktene. Dette kan bety at selv om antall sporer var lavt, så var ikke konsentrasjonen av organiske syrer høy nok til å hemme

muggvekst, og utvide holdbarheten til disse brødene. Noen studier peker også på at hemming av *P. roquefort* er bedre ved spesifikke stammer av LAB, og kombinasjoner av spesifikke LAB sammen med KPr. I en studie gjennomført av Ryan et al., (2011) ble det gjennomført et forsøk med *Lb. amylovorus* DSM 19280 både *in vitro* og i hvetesurdeig, som viste bedre hemming av *P. roqueforti* enn for KPr (0,3 %). I studien ble mugghemmende stoffer isolert fra den cellefri supernatanten og det ble funnet 17 bioaktive forbindelser identifisert som årsaken til den mugghemmende effekten. Disse forbindelsene blir ikke direkte produsert av LAB, men produseres hovedsakelig som en bivirkning av syrningsprosessen, heller enn av den metabolske aktiviteten til LAB. I studien ble også *Lb. amylovorus* DSM 20531T benyttet, og denne stammen viste dårligere evne til hemming av muggvekst enn *Lb. amylovorus* DSM 19280, og like mye som KPr. Dette indikerer at evne til å hemme muggvekst kan være stamme- og artsspesifikke, og til videre undersøkelser ville det vært interessant å undersøke spesifikke LAB stammers evne til å hemme muggvekst individuelt. Ved videre undersøkelser vil det også være hensiktsmessig å benytte et lavt antall sporer (~100) for å lette kunne observere forskjeller visuelt mellom prøvene. (Calvert et al., 2021)

Prøver tilsatt PAB eller KPr viste bedre hemming av mugg enn resterende prøver. Dette kan skyldes at det i disse brødene ble observert propionsyre og høyere konsentrasjoner av eddiksyre som også har en bedre hemmende effekt sammenlignet med melkesyre. Det kan også skyldes at propionsyre virket mer effektivt på muggsoppartene som ble undersøkt i denne studien (Axel et al., 2017). Særlig prøver med KPr hadde god hemmende effekt på *Fusarium sp.* og *A. niger* og det ble ikke observert muggvekst for disse prøvene gjennom hele inkuberingsperioden. I denne studien utgjorde KPr kun 0,3% av totalvekten av brøddeigen, noe som er innenfor anbefalt mengde benyttet som konserveringsmiddel i bakevarer (Adams et al., 2016c). Den hemmende effekten av KPr understøttes av at så lenge pH holdes nært pKa verdien på 5 for kalsiumpropionat, vil dette gi god mugghemmende effekt (Le Lay et al., 2016). Dette stemmer godt overens med resultatene i denne studien hvor pH ble målt mellom 5,18 og 5,32 for de ulike gjentakene i surdeigsbrød tilsatt KPr. I en tidligere masteroppgave gjennomført av Rygh (2021), ble det observert en hemmende effekt på gjær av KPr, noe som ikke ble observert i denne masteroppgaven. Gjærtallene holdt seg på samme nivå som for resterende prøver. Tidligere studier gjennomført med surdeig, LAB og KPr har vist en økt hemming av mugg sammenlignet med brød bakt kun med KPr, på grunn av synergisk effekt mellom kjemikalier, svake syrer, sykliske dipeptider and polylaktatsyrer (PLA) (Ryan et al., 2008). Selv om dette ikke ble undersøkt spesifikt i denne studien, og hemming av mugg kun

ble observert visuelt kan dette indikere at tilsvarende synergiske effekter kan ha oppstått mellom komponenter produsert av LAB og KPr i denne studien.

For prøvene tilsatt PAB til surdeig, eller miks av LAB med PAB gikk det fire dager før det kom synlig vekst på alle brødene inokulert med sporer fra *A. niger*, noe som indikerer at denne muggsopparten ble noe hemmet av propionsyrebakterier til stede som følge av produsert propionsyre og økt innhold av eddiksyre. Det hadde vært interessant å se om en eventuell økning i mengden eddiksyre for disse brødene ville ført til bedre hemming av *A. niger* for brødene tilsatt PAB enten ved å øke fermenteringstiden, eller tilsette mer propionsyrebakterier. Det kunne også være en mulighet å tilsette Eddiksyrebakterier som kan omdanne alkohol produsert av melkesyrebakterier til eddiksyre.

Prøvene som ble tilsatt sporer fra *Fusarium* sp. viste god hemming av mugg i surdeigsbrød tilsatt PAB, og surdeigsbrød tilsatt LAB og PAB. I prøvene med PAB tok det 6 dager før det var synlig muggvekst på ett av punktene. Ved videre inkubering varierte resultatene om det kom mugg i begge eller kun ett av punktene. Ved slutten av inkuberingsperioden var det mugg på alle brødene, men to brød hadde kun muggvekst i ett punkt. Det kan derfor se ut til at propionsyrebakterier har hatt en hemmende effekt på surdeigsbrødet kun tilsatt PAB, sammenlignet med brød bakt med kun surdeig eller kontrollen. SD med LAB og PAB viste til god hemmende effekt på *Fusarium* sp., og første observasjon av mugg ble gjort etter 6 og 9 dager. Flere av parallellene hadde ikke vekst gjennom hele inkuberingsperioden. Dette tyder på at LAB sammen med PAB har en bedre hemmende effekt på denne muggsoppen sammenlignet med brød bakt med kun LAB eller PAB.

Resultatene fra denne studien viste til at betingelsene som ble valgt for hemming av *P. roqueforti* ikke var tilstrekkelig for å hemme muggvekst i disse prøvene. For *A. niger* viste det seg at brød tilsatt KPr og LAB hadde en god hemmende effekt og hemmet mugg fullstendig. Brød inokulert med *Fusarium* sp. viste generelt seinere fremvekst av mugg, det vil si at muggsoppen ble mer hemmet over en lengre periode. Dette kan skyldes at dette er en muggsopp som bruker noe lengre tid på å vokse frem sammenlignet med de øvrige muggsoppene som ble benyttet i denne studien. Forsøket ga en tydelig indikasjon på at både PAB, en kombinasjon av PAB sammen med LAB, og LAB sammen med KPr har en hemmende effekt på *Fusarium* sp. sammenlignet med kontrollbrødet.

6. Referanser

- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016a). Factors Affecting the Growth and Survival of Micro-organisms in Foods. In *Food Microbiology* (4 ed., pp. 28-31). Royal Society of Chemistry 2016.
- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016b). Fermented and Microbial Foods. In *Food Microbiology* (4 ed., pp. 352-361). Royal Society of Chemistry.
- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016c). The Microbiology of Food Preservation. In *Food Microbiology* (4 ed., pp. 108-112). Royal Society of Chemistry.
- Assis, D., Machado, C., Matte, C., & Ayub, M. (2022). High Cell Density Culture of Dairy Propionibacterium sp. and Acidipropionibacterium sp.: A Review for Food Industry Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02748-2>
- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3528-3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Belz, M. C. E., Mairinger, R., Zannini, E., Ryan, L. A. M., Cashman, K. D., & Arendt, E. K. (2012). The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 493-501. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4052-x>
- Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ*, 9, e11389. <https://doi.org/10.7717/peerj.11389>
- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 169-182. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x>
- De Assis, D. A., Machado, C., Matte, C., & Ayub, M. A. Z. (2022). High Cell Density Culture of Dairy Propionibacterium sp. and Acidipropionibacterium sp.: A Review for Food Industry Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 15(4), 734-749. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02748-2>
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 43-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37, 11-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry* (2 ed.). Springer Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., & Wechsler, D. (2017). Chapter 35 - Cheeses With Propionic Acid Fermentation. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 889-910). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1>

- García Quintáns, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C., & López, P. (2008). Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications: Citrate Metabolism and Aroma Compound Production in Lactic Acid Bacteria. In 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.018>
- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). *Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage* (Vol. 21). International Dairy Journal.
- Guerzoni, M. E., Serrazanetti, D. I., Vernocchi, P., & Gianotti, A. (2013). Physiology and Biochemistry of Sourdough Yeasts. In (pp. 155-181). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_6
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Holzappel, W. W., B. (2014). *Lactic Acid Bacteria* (1 ed.). Wiley. <https://www.perlego.com/book/996657/lactic-acid-bacteria-biodiversity-and-taxonomy-pdf>
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 165-178. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00017.x>
- Huys, G. D., Heide-Marie
- De Vuyst, Luc (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. In M. G. Gobbetti, Michael (Ed.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (1 ed., pp. 105-154). Springer New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/987-1-4614-5425-0>
- Javanainen, P., & Linko, Y. Y. (1993). Mixed-culture Pre-ferments of Lactic and Propionic Acid Bacteria for Improved Wheat Bread Shelf-life. *Journal of Cereal Science*, 18(1), 75-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jcrs.1993.1036>
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 525-532. <https://doi.org/10.1128/aem.44.3.525-532.1982>
- Kvam, G. (2017). *Vekst, metabolisme og ølbrygging med melkesyrebakterier og gjær* [Masteroppgave, Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet]. https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmloi/bitstream/handle/11250/2453987/Kvam2017_masteroppgave.pdf?sequence=1
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic Acid Bacteria. In (pp. 3-41). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., & Coton, E. (2016). *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Elsevier*, 60, 247-255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>.
- Leirvik, V. (2022). *Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av spontanfermenterte surdeiger av havre, bokhvete og quinoa* [Masteroppgave, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet].
- Meld. St. 40 (2020–2021). (2021). *Mål med mening — Norges handlingsplan for å nå bærekraftsmålene innen 2030*. Retrieved from <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/meld.-st.-40-20202021/id2862554/>
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2014). Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 136-146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021>

- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Ng'Ong'Ola-Manani, T. A., Wicklund, T., Mwangwela, A. M., & Østlie, H. M. (2015). Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Involved in Natural and Lactic Acid Bacterial Fermentations of Pastes of Soybeans and Soybean-Maize Blends Using Culture-Dependent Techniques and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Food Biotechnology*, 29(1), 20-50. <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.996894>
- Piwożarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., & Ścibisz, I. (2018). Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 515-538. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>
- Prodan, A. (2012). *A proteomic study of Propionibacterium freudenreichii* (1 ed.). LAP LAMBERT Academic Publishing. https://perlego.com/book/3327609/a-proteomic-study-of-propionibacterium-freudenreichii-2de-comparison-of-two-strains-pdf/?utm_medium=share&utm_source=perlego&utm_campaign=share-book
- Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M. G., Xiang, S., Curtis, J. M., & Gänzle, M. (2019). Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 8-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.007>
- Ryan, L. A. M., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2008). The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 274-278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.013>
- Ryan, L. A. M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., & Arendt, E. K. (2011). Lactobacillus amylovorus DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 276-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036>
- Rygh, M. W. (2021). *Vekst, metabolisme og hemming av mugg i surdeigsbrød ved bruk av melkesyrebakterier, propionsyrebakterier og kalsiumpropionat* [Masteroppgave, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.].
- Stensgård, A., Berntsen, I. C., Hohle, S. M., & Callewaert, P. (2023). *Kartleggingsrapport for matbransjen og forbrukerleddet* [Oppdragsrapport](3339).
- Vamanu, E., Adrian, V., & Gheorghe, C. (2005). Isolation of a Lactobacillus plantarum strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. 4.
- Wehrle, K., & Arendt, E. K. (1998). Rheological Changes in Wheat Sourdough During Controlled and Spontaneous Fermentation. *Cereal Chemistry Journal*, 75(6), 882-886. <https://doi.org/10.1094/cchem.1998.75.6.882>
- Yang, X., Zhang, S., Lei, Y., Wei, M., Liu, X., Yu, H., Xie, P., & Sun, B. (2023). Preservation of stewed beef chunks by using calcium propionate and tea polyphenols. *LWT*, 176, 114491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114491>

Rådata for innledende vekstforsøk i buljong og melmedium (organiske syrer og karbohydrater)

Tabell 1 pH, karbohydrater og organiske syrer i Melmedium (M) og MRS-buljong (B) fermentert med *Lb. plantarum* CM67 (Lb.-67), *Lb. plantarum/pentosus* CM65 (Lb.-65), *Lb. plantarum/pentosus* VL51 (Lb.-51), *L. pseudomesenteroides/mesenteroides* VL4 (L-4), *Leuconostoc citreum* GK45 (L-45), *W. confusa* TM76 (W-76), *W. cibaria* TM120 (W-120), *Lb. fermentum* TM314 (Lb.-314) og *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D). Prøver ble tatt ut etter og 24 (T24) timer inkubering ved 30°C.

	Sample name	Maltose	Citric acid	Glucose	Fructose	Lactic acid	Acetic acid (RI)	DL-pyroglutamic acid
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
M 0	Kontroll	2909,55	n.d.	543,33	n.d.	n.d.	n.d.	
M 1	LB.-67	2401,39	n.d.	n.d.	n.d.	859,71	n.d.	19,10
M 2	LB.-65	2397,65	n.d.	n.d.	n.d.	846,28	n.d.	16,85
M 3	LB.-51	1044,97	n.d.	64,21	n.d.	2985,09	n.d.	16,52
M 4	L-4	354,24	n.d.	n.d.	n.d.	1989,84	n.d.	15,69
M 5	L-45	297,15	n.d.	n.d.	n.d.	1756,05	287,27	18,22
M 6	W-76	346,28	n.d.	n.d.	745,07	1733,98	282,67	16,29
M 7	W-120	369,75	n.d.	n.d.	608,43	1762,60	282,44	17,11
M 8	Lb.-314	1530,43	n.d.	218,36	n.d.	1062,97	n.d.	16,84
M 9	Lb.-15D	924,47	n.d.	n.d.	558,01	3457,68	n.d.	18,25
B 0	Kontroll	417,37	1639,35	15917,62	894,92	n.d.	3582,90	405,79
B 1	LB.-67	n.d.	n.d.	2877,64	582,93	8174,56	4557,54	407,88
B 2	LB.-65	n.d.	n.d.	2834,75	585,80	8310,05	4560,53	408,72
B 3	LB.-51	n.d.	1488,46	2712,67	n.d.	12412,96	3652,09	410,28
B 4	L-4	440,37	n.d.	n.d.	n.d.	9230,05	4643,15	411,12
B 5	L-45	427,23	n.d.	43,24	n.d.	9076,34	4605,15	408,05
B 6	W-76	435,40	n.d.	4,51	n.d.	9345,12	4565,96	415,08
B 7	W-120	437,65	n.d.	n.d.	n.d.	8978,42	4680,63	408,09
B 8	Lb.-314	384,89	1633,05	11426,37	n.d.	2394,99	3704,48	406,72
B 9	Lb.-15D	n.d.	n.d.	1757,05	n.d.	14457,67	4294,46	400,00

Rådata for innledende vekstforsøk i buljong og melmedium (organiske syrer og karbohydrater)

Tabell 2. Organiske syrer og karbohydrater i natriumlaktatbuljong (SLB) og melmedium, melmedium tilsatt 0,75% laktat (L 0,75%) og melmedium podet med *W. confusa* TM76 (W-76), *L. citreum* GK45 (L-45), *Lb. plantarum/pentosus* VL51 (Lb.-51) og *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D). Prøver fermentert med *P. freudenreichii* ATCC 9616 (P-9616), *P. freudenreichii* ISU P50 (P-P50), *P. freudenreichii* LMG 2948 (P-2948), *P. freudenreichii* LMG 3001 (P-3001). Prøver ble tatt ut ette 48 (T48) timer inkubering ved 30°C.

Sample name	Maltose	Citric acid	alfa-ketoglutaric acid	Glucose	Pyruvic acid	Fructose	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid (RI)	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
9616+TM76,M	512,40	n.d.	n.d.	105,77	n.d.	986,53	2166,57	n.d.	246,12	145,10	24,16
9616+GK45,M	447,44	n.d.	n.d.	76,21	n.d.	962,35	2551,79	n.d.	256,56	104,33	21,84
P50+VL51,M	497,68	n.d.	n.d.	77,76	n.d.	972,37	3636,69	n.d.	195,52	240,55	27,79
P50+15D,M	426,17	n.d.	n.d.	75,65	n.d.	1025,25	3843,96	n.d.	190,51	155,43	26,65
K,ML	2761,73	n.d.	n.d.	484,30	n.d.	771,08	7369,38	n.d.	n.d.	12,93	16,59
9616,ML	278,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	342,99	10871,02	n.d.	140,03	112,53	23,71
P50,ML	2756,72	n.d.	n.d.	46,10	1397,18	603,93	3136,03	n.d.	875,72	2370,17	22,53
2948,ML	2658,86	n.d.	n.d.	138,30	492,46	587,47	4725,34	n.d.	679,30	1645,97	23,08
3001,ML	287,99	n.d.	n.d.	n.d.	80,48	353,11	10613,49	n.d.	213,17	221,57	23,44
9616,M	439,42	n.d.	n.d.	81,02	n.d.	1024,62	3814,60	n.d.	119,84	120,87	23,91
P50,M	2723,79	n.d.	n.d.	340,01	n.d.	1666,00	n.d.	n.d.	160,68	321,11	22,84
2948,M	2651,00	n.d.	n.d.	340,25	n.d.	1440,73	n.d.	n.d.	285,28	385,70	11,81
3001,M	446,98	n.d.	n.d.	84,19	n.d.	1064,73	3655,46	n.d.	165,35	233,87	24,55
SLB,K	n.d.	n.d.	n.d.	98,80	n.d.	56,46	6220,99	n.d.	52,07	n.d.	358,19
SLB,9616	31,92	n.d.	n.d.	n.d.	107,66	n.d.	n.d.	117,51	1541,60	2706,81	297,40
SLB,P50	618,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28,48	n.d.	19,50	1438,93	3130,64	320,55
SLB, 2948	98,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1607,78	3137,49	299,88
SLB,3001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	297,28	13,99	n.d.	95,99	1701,79	2932,88	320,23

Rådata for innledende vekstforsøk i buljong og melmedium (organiske syrer og karbohydrater)**Tabell 3.** Organiske syrer og karbohydrater i melmedium tilsatt 0,75 % laktat fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50. Prøver ble tatt ut etter 0 (T0) og 72 (T72) timers inkubering ved 30 °C.

Sample name	Maltose	Citric acid	Glucose	Pyruvic acid	Fructose	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid (RI)	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
T0 P50	2830,26	30,49	515,59	n.d	808,08	7869,92	n.d	n.d	n.d	21,97
T72 P50	222,11	n.d	n.d	n.d	142,02	9260,70	n.d	301,32	317,84	22,06
T0 P50	3055,5	n.d	580,28	n.d	1175,63	7583,64	n.d	93,56	62,79	25,15
T72 P50	3033,03	n.d	162,84	161,34	1152,96	n.d	n.d	1673,85	3876,6	23,5

Rådata for innledende vekstforsøk med PAB i surdeig**Tabell 1.** Karbohydrater og organiske syrer målt for fire ulike prøver med surdeig, fermentert individuelt med *P. freudenreichii* ATCC 9616, *P. freudenreichii* ISU P50, *P. freudenreichii* LMG 2948 og *P. freudenreichii* LMG 3001

Sample name	Maltose	Citric acid	alfa-ketoglutaric acid	Glucose	Pyruvic acid	Fructose	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid (RI)	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
9616 T0	5542,38	109,10	n.d.	784,15	n.d.	2534,37	2671,01	n.d.	n.d.	n.d.	16,36
P50 T0	5670,67	115,74	n.d.	721,17	n.d.	2191,47	2732,59	n.d.	n.d.	n.d.	16,30
2948 T0	5473,44	105,87	n.d.	717,38	n.d.	2201,71	2542,56	n.d.	n.d.	n.d.	15,11
3001 T0	5496,85	106,93	n.d.	754,89	n.d.	2224,70	2699,21	n.d.	n.d.	n.d.	13,35
9616 T72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12809,98	n.d.	505,30	n.d.	93,60
P50 T72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11892,61	n.d.	445,78	n.d.	100,48
2948 T72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12288,16	n.d.	511,15	n.d.	96,34
3001 T72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12168,97	n.d.	473,36	n.d.	94,51

Rådata for innledende vekstforsøk med PAB i surdeig**Tabell 2.** Karbohydrater og organiske syrer målt for to ulike prøver med surdeig, fermentert individuelt med *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948. Prøver ble tatt ut etter 96 timer ved inkubering ved 15 eller 20 °C i 3 døgn og 1 døgn på 30 °C (T96).

Sample name	Maltose	Citric acid	alfa-ketoglutaric acid	Glucose	Pyruvic acid	Fructose	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid (RI)	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
P50 T0	5386,27	101,90	n.d.	858,66	n.d.	2469,69	2438,77	n.d.	n.d.	n.d.	15,59
P50 15 grader	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10271,98	n.d.	488,77	n.d.	65,94
P50 20 grader	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11816,27	n.d.	503,76	n.d.	83,68
2948 T0	5265,63	104,10	n.d.	758,18	n.d.	2454,11	2629,61	n.d.	n.d.	n.d.	12,75
2948 15 grader	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10659,18	n.d.	530,27	n.d.	69,72
2948 20 grader	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11987,09	n.d.	497,04	n.d.	90,37

Rådata for hemmeforsøk (pH, celletall og HPLC)

Tabell 1. pH i deig etter 0 (T0) timer og 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4°C (T1) og i ferdig stekt og avkjølt brød (T2) vist for 3 uavhengige forsøk. Prøvene var kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP), surdeigsbrød fermentert med lab-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr).

	T0		T1		T0		T1		T0		T1	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
K	6,79	6,83	6,79	6,83	7,43	7,44	7,10	7,11	7,25	7,19	7,35	7,30
SD	8,35	8,44	8,35	8,44	8,41	8,34	9,08	9,10	8,50	8,43	8,86	8,77
SDL	8,77	8,74	8,77	8,74	8,42	8,42	9,00	9,00	8,39	8,47	8,62	8,56
SDP	9,00	8,97	9,00	8,97	8,35	8,34	8,68	8,61	8,43	8,51	8,68	8,78
SDLP	9,07	9,11	9,07	9,11	8,43	8,42	8,90	9,02	8,43	8,41	8,80	8,83
SDLPr	9,44	9,44	9,44	9,44	8,58	8,58	8,46	8,59	8,34	8,35	8,66	8,52

Tabell 2. Celletall ved prøveuttak etter 0 (T0) timer og 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4 °C (T1) etter utplating på De Man Rogosa og Sharpe (MRS) agar. Prøvene var kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP). surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Alle LAB-stammene ble tilsatt til ca 7 log kde/g. Celletall er presentert som gjennomsnitt ± standardavvik av 3 uavhengige forsøk.

Celletall MRS Hemmeforsøk (log kde/g)						
Prøve	Gjentak 1		Gjentak 2		Gjentak 3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
K	6,81	6,81	7,43	7,11	7,22	7,33
SD	8,27	8,40	8,38	9,09	8,47	8,47
SDL	8,34	8,76	8,42	9,00	8,43	8,43
SDP	8,33	8,98	8,35	8,65	8,47	8,47
SDLP	8,33	9,09	8,42	8,96	8,42	8,42
SDLPr	8,44	8,44	8,58	8,53	8,35	8,35

Rådata for hemmeforsøk (pH, celletall og HPLC)

Tabell 3. Celletall i deig til brødbaking etter innstøping på Rose Bengal (RB) agar. kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP) og i surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4 °C (T1) og i avkjølt brød etter steking (T2). Resultatene er vist for tre uavhengige forsøk.

Gjærtall RB Hemmeforsøk (log kde/g)						
Prøve	Gjentak 1		Gjentak 2		Gjentak 3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
K	6,68	6,95	7,31	7,02	7,19	7,20
SD	6,94	7,17	6,91	6,81	6,87	6,16
SDL	6,99	7,20	6,77	6,90	6,77	6,75
SDP	6,81	7,02	6,89	6,60	6,89	6,84
SDLP	6,84	7,00	6,88	6,99	6,81	6,84
SDLPr	6,93	6,85	6,94	6,85	6,80	6,59

Tabell 4. Celletall i deig til brødbaking etter innstøping på Natriumlaktatbuljong (SLA). Surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP) og surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP)). Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4 °C (T1) og i avkjølt brød etter steking (T2). Resultatene er vist for tre uavhengige forsøk.

Celletall SLA Hemmeforsøk (log kde/g)						
	Gjentak 1		Gjentak 2		Gjentak 3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
SDP	8,77	9,20	8,88	9,01	8,86	8,99
SDLP	8,78	9,27	8,83	9,02	8,91	9,05

Rådata for hemmeforsøk (pH, celletall og HPLC)

Tabell 5. Karbohydrater i deig og ferdig stekt brød analysert i kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP) og i surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr), Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4 °C (T1) og i avkjølt brød etter steking (T2). Resultatene er vist for tre uavhengige forsøk.

	Maltose (mg/kg)			Glukose (mg/kg)			Fruktose mg/kg		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
K	5404,1	7113,2	9246,5	1658,8	2360,1	1979,8	3625,1	4470,9	3868,2
SD	6394,6	6969,7	7539,1	1205,8	741,7	1209,1	2673,5	2269,1	2397,4
SDL	6541,5	6782,0	6984,0	1327,2	767,4	1112,3	2820,0	2388,1	2337,8
SDP	6714,4	7535,4	8029,6	1108,1	785,7	1036,6	2741,7	2434,8	2284,4
SDLP	6722,7	7644,3	8465,9	1120,2	807,1	1102,3	2931,3	2579,5	2396,8
SDLPr	6071,6	7978,7	8267,1	1210,7	1469,3	1443,4	2718,2	2765,0	2453,4

Rådata for hemmeforsøk (pH, celletall og HPLC)

Tabell 6. Organiske syrer i deig og ferdig stekt brød analysert i kontrollbrød (K), surdeigsbrød (SD), surdeigsbrød fermentert med LAB-miks av *Lb. plantarum/pentosus* VL51, *W. confusa* TM76, *L. citreum* GK45, *Lb. plantarum* 15D (SDL), surdeigsbrød fermentert med *P. freudenreichii* ISU P50 (SDP), surdeigsbrød fermentert med samme LAB-miks og *P. freudenreichii* ISU P50 (SDLP) og i surdeigsbrød fermentert med LAB-miks og tilsatt kalsiumpropionat (0,3%) (SDLPr). Prøver ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 1,5 time ved romtemperatur + 14 timer ved 4 °C (T1) og avkjølt etter steking (T2). Resultatene er vist for tre uavhengige forsøk.

Prøve	Sitronsyre (mg/kg)			Melkesyre (mg/kg)			Eddiksyre (mg/kg)			Propionsyre (mg/kg)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
K	150,0	116,3	111,2	n.d.	n.d.	n.d.	289,0	340,5	354,6	n.d.	n.d.	n.d.
SD	117,2	107,2	110,8	1077,5	3966,1	3120,3	321,2	365,3	348,3	n.d.	n.d.	n.d.
SDL	117,2	86,8	97,3	1109,0	3801,7	3154,2	342,2	376,2	375,6	n.d.	n.d.	n.d.
SDP	123,8	114,4	112,8	820,7	3360,2	3079,4	544,7	576,9	636,7	549,4	599,0	620,9
SDLP	126,7	105,6	108,7	564,0	3404,4	3002,9	555,4	597,9	646,5	554,0	534,4	580,4
SDLPr	126,8	116,2	114,6	713,2	2718,3	2913,1	342,1	385,6	395,9	2322,1	2392,4	2401,1

Tabell 7. Celletall for frysestock

Celletall for frysetock-prøver av *Lactiplantibacillus plantarum* 15D, *Leuconostoc citreum* GK45, *Lb. plantarum/pentosus* VL51 og *Weisella confusa* TM76 dyrket på MRS agar. Prøver ble tatt ut etter 24 timers etter fulgt av inkubering ved 30 °C i 48 timer.

	Celletall LAB frysestock (log/kde/ml)	
MRS	<i>Weisella confusa</i> TM76	10,03
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 15D	10,72
	<i>Leuconostoc citreum</i> GK45	9,94
	<i>Lb. plantarum/pentosus</i> VL51	10,58



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway