



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for Veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for Plantevitenskap, Biologi

Masteroppgave 2014
60 stp

Kornfermentering- Karakterisering og anvendelse av melkesyrebakterier til frigjøring av frie fenoliske syrer i korn

Cereal fermentation – characterization and
application of lactic acid bacteria for the release
of free phenolic acids in cereals

Celine Bergum Nilsen

Forord

Denne oppgaven er levert som avsluttende masteroppgave i Biologi ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) i Ås. Laboratoriearbeidet ble utført ved Nofima. Oppgaven ble startet i august 2013 og avsluttet i august 2014.

Først og fremst vil jeg gjerne takke mine veiledere ved Nofima forsker Ida Rud og seniorforsker Lars Axelsson for et fint samarbeid, god veiledning og støtte under hele prosessen. Det har vært et veldig lærerikt år!

En takk til Signe Marie Drømtorp for opplæring på PCR og sekvensering av isolatene mine, og for at du alltid tok deg tid til å svare på alle spørsmål som oppsto.

Jeg vil også takke Merete Rusås Jensen for utførelse av Miseq analyse av surdeigsmikrobiota.

Videre vil jeg takke Silje Johansen for god opplæring av ekstraksjon av fenoliske syrer, RSLC og for at du tok deg tid til å se på resultatene mine. Og ikke minst hyggelig selskap på cereal laben.

Takk til Hanne Zobel som viste meg hvordan maling av korn ble utført, og Stefan Sahlstrøm for god hjelp.

Jeg retter også en takk til Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg som stilte opp som hovedveileder på NMBU.

Takk til alle medstudentene for morsomme og hyggelige dager på laben, og Josephine Prendergast for et godt samarbeid.

Tilslutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste for all støtte gjennom dette året!

Ås, august 2014

Celine Bergum Nilsen

Sammendrag

Hovedmålet med denne studien var å karakterisere melkesyrebakterier (MSB) tilstede i spontan surdeigsfermentering for å oppnå diversitet i stammesamlingen. Teste isolatene for ferulsyreesterase (FAE) aktivitet, og studere effekten på frigjøringen av total frie fenoliske syrer i fermentering med FAE aktive MSB.

Spontane fermenteringsforsøk med ulike kornarter og sorter ble laget for å karakterisere utviklingen og dynamikken av MSB og identifisere isolater med potensiell FAE aktivitet. FAE aktive MSB kan ha potensiale til å frigjøre fenoliske syrer bundet i kornet, og dermed bidra til å gjøre dem mer biotilgjengelige for kroppen. Ulike kornarter og sorter av bygg, havre, hvete, rug, spelt og emmer ble benyttet i fermenteringsforsøkene, som ble utført ved 22°C og 37°C og fulgt gjennom 1- 4 dager. De ulike forsøkene viste ulik grad av pH nedgang, der ferdigmalt korn viste større evne til syring enn nymalt korn. Karakterisering av MSB isolater viste at *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* og *Pediococcus* dominerte i varierende grad i de ulike forsøkene, og dette ble bekreftet med dybdesequensering på total bakterielt 16S rRNA (ikke-dyrkningsbasert metode).

Screening for FAE aktivitet ble utført på isolater fra stammesamlingen, men kun tre isolater av *Lactobacillus* viste FAE aktivitet. Utvalgte stammer fra Nofima ble også screenet. De FAE positive MSB ble videre benyttet som starterkulturer i fermenteringsforsøk med havre og bygg.

Frigjøring av fenoliske syrer ble observert med alle isolatene i forhold til kontrollprøver, med unntak av *L. amylovorous*, som hadde en negativ effekt på syreinnholdet. Den totale frigjøringen av fenoliske syrer viste høyest nivå for *L. reuteri* stammer i både bygg og havre. Effekten av pentopanbehandling i surdeig av bygg viste en signifikant økning på innholdet av total frie fenoliske syrene.

Abstract

The overall aim of this study was to identify lactic acid bacteria (LAB) present in spontaneous sourdough fermentation to achieve a diverse collection of strains, test the isolates for ferulic acid esterase (FAE) activity, and study the effect on the release of total free phenolic acids in fermentation with FAE active LAB.

Spontaneous fermentation experiments with different cereal species and varieties were executed in order to characterize the development and dynamics of LAB and to identify isolates with potential FAE activity. FAE active LAB may have the potential to release phenolic acids bound to the grain, thus helping to make them more bioavailable to the human body. Cereal species and varieties of barley, oats, wheat, rye, spelt and emmer were used in the fermentation experiments, which were performed at 22⁰C and 37⁰C and then monitored for a period of 1- 4 days. The various experiments showed varying degrees of pH reduction, where pre-ground grains demonstrated a greater acidification ability than freshly ground grains. Characterization of LAB isolates showed that *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* and *Pediococcus* dominated in varying degrees in the different experiments, and this was confirmed by means of the Illumina sequencing of the total bacterial 16S rRNA (non-culture-based method).

Screening for FAE activity was carried out on isolates from the strain collection. However, only three isolates of *Lactobacillus* showed FAE activity. Selected strains from Nofima were also screened. The FAE positive LAB was further used as starter cultures in sourdough fermentation experiments for oats and barley.

The release of free phenolic acids was observed for all isolates compared to the controlsamples, with the exception of *L. amylovorus*, which had a negative effect on the acid content. The total release of free phenolic acids showed the highest level with *L. reuteri* strains in both barley and oats. The effect of pentopan treatment in barley showed a significant increase in the content of total free phenolic acids.

Forkortelser

µg	Mikrogram
CA	Kumarinsyre
dH ₂ O	Destillert vann
FA	Ferulsyre
FAE	Ferulsyreesterase
MeOH	Metanol
MilliQ	Dobbelt destillert ionebyttevann
MSB	Melkesyrebakterie
p-CA	p-Kumarinsyre
RSLC	Rapid Separation Liquid Chromatography
SA	Sinapinsyre
PCR	Polymerase kjede reaksjon
CFU	Colony forming units

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.1 Innledning.....	1
1.2 Problemstilling	1
2 Teori	3
2.1 Korn.....	3
2.1.1 Korn og helse.....	4
2.1.2 Prosessering av hele korn	4
2.2 Den generelle strukturen av korn	5
2.2.1 Den kjemiske oppbyggingen av korn	5
2.2.1.1 Kostfiber.....	6
2.3 Fermentering	6
2.3.1 Tradisjonell surdeig.....	6
2.3.2 Melkesyrebakterier assosiert med surdeig.....	7
2.3.3 Surdeigsfermentering med melkesyrebakterie startere	7
2.4 Melkesyrebakterier	8
2.4.1 Klassifisering av MSB.....	8
2.4.1.1 Reaksjonsvei.....	9
2.4.2 Genus <i>Lactobacillus</i>	10
2.5 Fenoliske komponenter	10
2.5.1 Klassifisering av fenoliske komponenter	10
2.5.2 Fenoliske syrer	11
2.5.3 Fenoliske syrer som antioksidanter	12
2.5.4 Biotilgjengelighet av fenoliske syrer.....	13
2.6 Enzymer.....	13
2.6.1 Ferulsyreesterase og xylanaser	13
2.6.2 Melkesyrebakterier med FAE aktivitet.....	14
2.7 Karakterisering av melkesyrebakterier.....	14
2.7.1 16S rRNA gensekvensering	14
2.7.2 Dybdesekvensering med Illumina (Miseq) teknologi	15
3 Materialer og metoder	17
3.1 Materialer	17

3.2	Tillaging av løsninger og medier.....	22
3.2.1	Løsninger.....	22
3.2.2	Medier	22
3.3	Bakteriestammer, dyrkning og celletall (CFU)	23
3.3.1	Dyrkning av bakteriestammer	24
3.3.2	Celletall (CFU).....	24
3.4	Surdeigsfermentering	25
3.4.1	Uttak av surdeigsprøver for videre analyse	25
3.4.2	Kornsorter og preparering	26
3.4.3	Spontan surdeig med ulike melsorter	28
3.4.4	Fermentering med starterkultur	28
3.4.4.1	Preparering av starterkultur	28
3.4.4.2	Surdeig med havremel og MSB starterkultur	28
3.4.5	Fermentering med starterkultur og pentopan.....	29
3.4.5.1	Surdeig med byggmel, MSB starterkultur og pentopan	29
3.5	Karakterisering av isolater.....	30
3.5.1	Polymerase kjede reaksjon (PCR) koloniscreening.....	30
3.5.2	PCR-oppamplifisering av DNA	31
3.5.3	Agarose gel elektroforese	33
3.5.4	Fjerning av primer overskudd fra PCR produktet	33
3.5.5	Sekvenserings PCR	33
3.5.6	Felling av sekvenseringsproduktet	34
3.5.7	Sekvensering	34
3.5.8	Behandling av sekvensdata.....	34
3.5.9	Karakterisering av surdeigsmikrobiota med 16S rRNA dybdesequensering	34
3.6	Ferulsyre esterase (FAE) aktivitet	35
3.7	Ekstraksjon av frie fenoliske syrer til RSLC analyse	35
3.7.1	Preparering av prøver til analyse av fenoliske syrer.....	36
3.7.2	Preparering av standarder til analyse av fenoliske syrer	36
3.7.3	Identifisering og kvantifisering av fenoliske syrer med RSLC	37
4	Resultater	38
4.1	Spontan surdeigsfermentering	39
4.1.1	pH endring under spontan surdeigsfermentering.....	39
4.1.2	Karakterisering av MSB under spontan surdeigsfermentering.....	40
4.1.2.1	Uttesting av 16S rRNA primere for 16S rRNA koloni screening	40
4.1.2.2	Dyrkningsbasert karakterisering - 16S rRNA koloni screening	41
4.1.2.3	Ikke-dyrkningsbasert karakterisering-16S rRNA Illumina dybdesequensering	44
4.2	Screening av surdeigsstammesamling for FAE aktivitet.....	46
4.2.1	Test av screenings assay metoden	46

4.2.2	Screening av surdeigsstammesamling og stammer fra Nofima.....	47
4.3	Surdeigsfermentering med havre og FAE positive MSB starterkulturer – effekt på total frie fenoliske syrer	48
4.3.1	pH og celletall	49
4.3.2	Effekt av surdeigsfermentering på total frie fenoliske syrer i havre.....	50
4.4	Surdeigsfermentering med bygg, FAE positive MSB starterkulturer og pentopan – effekt på total frie fenoliske syrer.....	52
4.4.1	pH og celletall	52
4.4.2	Effekt av surdeigsfermentering på total frie fenoliske syrer i bygg	53
5	Diskusjon	55
5.1	Spontan surdeigsfermentering	55
5.1.1	pH og celletall	55
5.1.2	Karakterisering av MSB under spontan surdeigsfermentering.....	56
5.1.3	Karakterisering av surdeigsmikrobiota fra spontan surdeigsfermentering med Illumina Miseq	58
5.2	Screening av surdeigsstammesamling for FAE aktivitet.....	58
5.3	Frie fenoliske syrer i havre og bygg	59
6	Konklusjon og videre arbeid.....	62
	Referanseliste	63
	Oversikt over tabeller og figurer.....	67
	Vedleggsliste.....	69

1 Bakgrunn for oppgaven

1.1 Innledning

Et kosthold bestående av fiberrike produkter er viktig for å opprettholde og oppnå en god helse. Inntak av frukt, grønnsaker og hele korn er en essensiell kilde for inntak av mineraler, vitaminer, fiber og bioaktive komponenter. De bioaktive komponentene, spesielt fenoliske syrer er av økende interesse på grunn av deres helse frembringende egenskaper. Tilgangen til disse komponentene er reaktivt lav da fenoliske komponenter ofte er bundet til celleveggen. Prosesseringsmetoder har derfor en stor betydning for biotilgjengeligheten av disse komponentene. Fermentering av korn med melkesyrebakterer er en av prosesseringsmetodene som har vist å øke innholdet av fenoliske syrer (Hole et al. 2012). Bygg og havre har i de siste årene hatt en økende interesse på grunn av innholdet av både antioksidanter og fenoliske syrer.

Melkesyrebakterier som innehar ferulsyreesterase aktivitet har vist en øking i innholdet av fenoliske syrer i korn. Melkesyrebakterier som har denne aktiviteten har evne til å spalte ferulsyre fra kornet, slik at de blir mer tilgjengelige for kroppens metabolisme. Denne egenskapen gjør at det er mulig å utvikle nye produkter som har en positive helseeffekter.

1.2 Problemstilling

Denne oppgaven er basert på forsøk av Hole et al. (2012), hvor det er funnet at noen kommersielle probiotiske bakterier har egenskaper til å frigjøre fenoliske syrer ved at de innehar esteraseaktivitet.

Formålet med masteroppgaven har vært å studere effekten av fermentering med ferulsyreesterase aktive melkesyrebakterier på innholdet av total frie fenoliske syrer (antioksidanter) i havre og bygg. Som et innledende forsøk har spontane surdeigsfermenteringer også blitt studert, for å identifisere og karakterisere ulike melkesyrebakterier. Hensiktet med de spontane surdeigene var i hovedsak å opprette en divers bakteriersamling.

Delmålene har vært:

- Karakterisere og identifisere melkesyrebakterier i spontan surdeig av bygg, hvete, havre, spelt, rug og emmer ved hjelp av 16S rRNA koloni screening (dyrkningsbasert),

samt studere den mikrobielle sammensetningen i surdeigsmikrobiota med Illumina (Miseq) sekvensering.

- Screene melkesyrebakterier fra stammesamlingen for esteraseaktivitet etterfulgt av surdeigsfermentering med positive stammer.
- Studere effekten av surdeigsfermentering med ferulsyreesterase aktive melkesyrebakterier samt pentopan på innholdet av de totale frie fenoliske syrene i bygg og havre.

2 Teori

2.1 Korn

Korn er blant de viktigste matplanter i verden, med flere bruksområder og blir benyttet til å produsere kornbaserte produkter som dyrefôr, vin, øl og brød. Kornslagene bygg og hvete er to av de eldste kulturvekstene og har vært dyrket siden 7000 år f.kr. (Coda et al. 2014). I dag utgjør avlingene hvete, mais, ris, bygg, sorghum, millet, havre og rug 60% av verdens totale kornareal. De viktigste avlingene i verden er ris, hvete og mais, hvor mais har størst totalavling (FAOSTAT). Hvor i verden kornartene dyrkes er avhengig av vekstforhold som næringsinnhold i jorden, nedbørmengde og temperatur. I varme klima dyrkes mais, ris, sorghum og millet, da de er godt tilpasset og robuste mot tørre og varme perioder. Bygg, havre, hvete og rug derimot er bedre tilpasset et kjøligere klima (Koehler & Wieser 2013).

I Norge dyrkes bygg, havre, hvete og rug, og er viktige avlinger i produksjon av havregryn, dyrefôr, brød mel og surdeigsbrød (FAOSTAT) (Figur 2.1). Opphavet til Norges kornarter kommer fra Midtøsten, hvor de fortsatt finnes i sine ville former. Norges bønder har dyrket korn siden steinalderen, som gradvis har blitt forbedret for å utvikle nye kornsorter med bedre egenskaper, som kvalitet, avlingsmengde og resistens mot sykdommer (*Norsk institutt for skog og landskap* 2008).



Figur 2.1 F.V Bygg (*Hordeum vulgare*), Hvete (*Triticum aestivum*), Havre (*Avena sativa*) og Rug (*Secale cereale*). (Norgesfôr).

Dyrket bygg finnes i to former, to – og seks rader i akset, og nummerene beskriver hvordan kernelen er gruppert i akset. Akset består av snerp på hvert korn, og dette må fjernes før det kan spises. To raders bygg er vanligst i Europa, mens seks raders bygg er mer utbredt i varmere klima, som Nord Amerika, India og Midtøsten (Pomeranz 1987). Begge formene blir høstet med et intakt skall som utgjør ca. 10% av den totale vekten. Bygg blir i hovedsak benyttet til dyrefôr, malt til øl og whiskeyproduksjon (Newman & Newman 2008). I

hvetefamilien underligger de fem sortene; brødhvete, spelt, durum, emmer og einkorn. Opprinnelsen og oppbyggingen av disse sortene er forskjellige og blir anvendt i ulike produkter, hvor brødhvete er den mest brukte sorten. Den inneholder stivelse som gjør at kornet er et godt utgangspunkt for maling av mel. Bakevarer med hvete gir ofte elastiske deiger på grunn av tilstedeværelsen av glutenproteiner (Hoseney 1994; Kent & Evers 1994). Rundt 90% av havre avlingene blir benyttet til produksjon av dyrefôr, mens bare en liten del av total avlingene blir benyttet som mat til mennesker. I hovedsak blir havre brukt som havregryn og kornblandinger. Havre er høstet med skrogene på, som utgjør ca. 15% av den totale vekten. Etter at disse er fjernet er havre ofte kalt gryn (Hoseney 1994). Rugplanten produserer nakent korn, og de danner aks som bygg. Det meste av avlingene blir brukt til produksjon av brød som er vanlig i Skandinavia og Europa. Selv om rugets innhold av fiber komponenter er høy har dyrkingsandelen gått betraktelig ned de siste tiårene (Kent & Evers 1994).

Over de siste årene har bruken av bygg og havre i matprodukter har hatt en økende interesse på grunn av deres høye innhold av bioaktive komponenter. Disse kan ha positiv helsefremmende effekt hos konsumenten. (Mellen et al. 2008; Newman & Newman 2008).

2.1.1 Korn og helse

Plantebaserte produkter spiller en essensiell rolle i kostholdet hos mennesker og er en viktig kilde for inntak av karbohydrater, proteiner, kostfiber, vitaminer, mineraler og bioaktive komponenter. Generelt inneholder korn rikelige mengder kostfiber og fenoliske komponenter, som er viktige for helsen (Banu et al. 2010; Poutanen et al. 2009). Inntak av mat som inneholder mye kostfiber kan redusere frigjøringen av glukose i blodet, som igjen fører til en nedgang av helserelaterte sykdommer som fedme og diabetes (Lafiandra et al. 2014). Innholdet av de bioaktive komponentene, spesielt fenoliske syrer er assosiert med positive helseeffekter og redusert fare for kroniske sykdommer som diabetes type II, kreft og kardiovaskulære sykdommer (Koehler & Wieser 2013; Mellen et al. 2008).

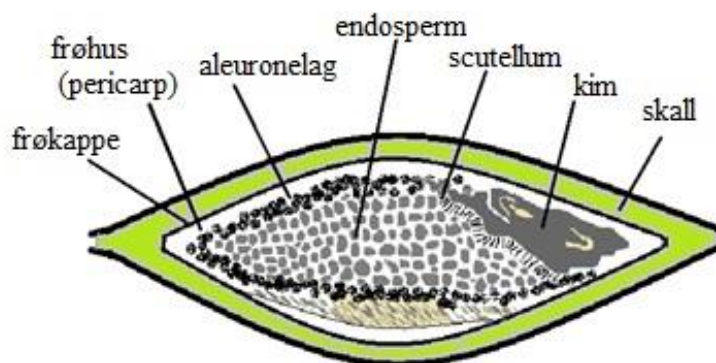
2.1.2 Prosessering av hele korn

Etter at kornet er høstet blir kornet prosessert før det kan spises. Prosessering som avskalling, maling, ekstrudering, germinering eller fermentering er mye brukte metoder og er viktige for å få et tilstrekkelig utbytte av de bioaktive komponentene i kornet (Haard et al. 2009; Hole et al. 2012). Prosesseringsmetodene vil enten kunne øke eller minke innholdet av disse komponentene. Når kornet er prosessert endres kornets form og størrelse, smak,

næringsinnhold og holdbarhet (Newman & Newman 2008). Da kornets fysiske form endres påvirkes også innholdet og biotilgjengeligheten til de bioaktive komponentene. En av prosesseringsmetodene som har potensiale i å øke innholdet av disse komponentene i matprodukter er fermentering (Banu et al. 2010).

2.2 Den generelle strukturen av korn

Korn tilhører grasfamilien *Poaceae*, som produserer tørre enfrøede frukter kalt karyopsis, som ofte er referert som «kernel». Oppbyggingen varierer mellom stammer, slekter eller arter, men den generelle strukturen av et korn er ganske uniform og består av fire hovedkomponenter, frøhus (pericarp), frøkappe, germ (kim) og endosperm (Figur 2.2).



Figur 2.2 Generell struktur av et korn med hovedkomponentene frøhus, frøkappe, kim og endosperm. Frøkappen er omsluttet av et ytre skall.

Frøkappen er et hardt skall som omfavner frøhus, kim og endosperm. Frøhuset inneholder flere lag og utgjør 3-5% av frøkjernen. Endospermen består av stivelses granuler, som kan variere i størrelse og form avhengig av kornart. Stivelses granulene er omsluttet av aleuronelaget som er et proteinrikt cellelag ytterst i endospermen. Dette laget har også høye nivåer av fenoliske komponenter, mineraler, vitaminer og kostfiber. Mellom endosperm og kim er scutellum lokalisert, som virker som et beskyttende lag. (Hoseney 1994; Kent & Evers 1994; Koehler & Wieser 2013)

2.2.1 Den kjemiske oppbyggingen av korn

Korn er karakterisert ved sitt høye nivå av karbohydrater (66-76%), og består vesentlig av stivelse og kostfiber. Stivelse er lokalisert i endospermen (56-74%) og er tilstede som granuler. Granulenes størrelse og form er avhengig av kornart, og består av amylose og amylopektin som danner et kompleks krystallnettverk (Hoseney 1994). Egenskapen til stivelse er viktig for å opprettholde en rigid struktur i kornet, men er også viktig for å oppnå tekstur i

brød og bakevarer. Korn inneholder også andre viktige karbohydrater som arabinoksyulaner (1,5- 8%), β -glukaner (0,5-7%), sukker (-3%), cellulose (-2,5%), glukofruktaner (-1%) og proteiner (Koehler & Wieser 2013).

2.2.1.1 Kostfiber

Ikke stivelsesholdige komponenter i form av kostfiber opptrer som polysakkarider i den ytterste delen av kornet. I kostfiber dominerer arabinoksyulan, som er hovedkomponenten av pentosan. Pentosaner kan deles inn i to grupper basert på kjemiske egenskaper. Den første gruppen består av vannekstrerbare, og den andre gruppen av ikke vannekstrerbare arabinoksyulaner (Hoseney 1994). Arabinoksyulaner består av kjeder av B-(1-,4)-D-xylopyransoyl som kan bli byttet ut med α -L-arabinofuranose i O-2 og/eller O-3 posisjoner. (Selinheimo et al. 2006) Ferulsyre er ofte assosiert med arabinoksyulan og er bundet til arabinose som en ester i O-5 posisjonen (Figur 2.3). Arabinoksyulaner i kostfiber har evnen til å absorbere opptil 20 ganger mer vann enn sin egen vekt. Denne egenskapen gjør dem til gode aktører i brødbaking, hvor de er med på å stabilisere gassboblene som dannes i deige (Koehler & Wieser 2013).

2.3 Fermentering

Surdeigsfermentering er en av de eldste bioteknologiske prosessene kjent og ble benyttet for over 5000 år siden. Surdeig ble hovedsakelig benyttet som en smaksagent under brødproduksjon for å lage mer smaksrike produkter. Produksjonen av surdeigsbrød er en metode som har hatt en økende vekst frem til 1900- tallet, men produksjonen sank betraktelig etter at bakegjæren kom på markedet. (Corsetti & Settanni 2007). De tidlige fermenteringsmetodene var basert på re-inokulering av moderdeigen med nytt mel og vann. Moderdeigen ble lagret frem til neste brødproduksjon, som under lagringen dannet melkesyre fra MSB i melets naturlige mikroflora (Hansen & Schieberle 2005). I dag blir surdeig benyttet i produksjon av flere produkter som brød, kaker og kjeks (De Vuyst & Neysens 2005)

2.3.1 Tradisjonell surdeig

Produksjon av tradisjonelle surdeigsbrød blir laget med vann og mel som er fermentert av gjær og/eller MSB som finnes naturlig i melet. Tilstedeværelsen av mikroorganismene gir bakevarer en unik tekstur og den karakteristiske syrlige smaken (Haard et al. 2009). Fermenteringsprosessen foregår i 1 til 3 dager hvor melkesyre og andre organiske syrer, gass og aromakomponenter blir dannet. Dannelse av melkesyre gjør at miljøet i produktet blir syrlig som gir gode vekstvilkår for MSB. Samtidig som pH synker øker den mikrobielle

aktiviteten i produktet. Typisk for tradisjonell surdeig er en pH på ~3-4 og en bakteriepopulasjon på 10^9 cfu g⁻¹ (Charalampopoulos et al. 2002).

2.3.2 Melkesyre bakterier assosiert med surdeig

Den mikrobiologiske aktiviteten i surdeigs mikrofloraen under fermenteringen er et resultat av flere parametere, både endogene faktorer og prosess parametere. De endogene faktorene er i hovedsak biokjemiske endringer i karbohydrat og protein komponentene i melet, ved påvirkning av mikrobielle enzymer. Disse endringene har en effekt på egenskapen og kvaliteten av det endelige produktet. Prosess parametere som temperatur, fermenteringstid, deigutbytte har også en påvirkning på surdeigs mikrobiotaen. (Arendt et al. 2007)

I dag er det funnet mer enn 50 arter av MSB som er assosiert med surdeig. De fleste artene er fra genuset *Lactobacillus*, noen av de vanligste stammene i surdeig er *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis* og *L. reuteri* (Gobbetti et al. 2005). Andre stammer som er identifisert i surdeigsmikrobiota er stammer av *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus* og *Enterococcus* (Coda et al. 2014; Corsetti & Settanni 2007). Metabolismen og syredannelsen til disse MSB varierer mellom stammer, så den mikrobielle sammensetningen i hver enkelt surdeig vil i hovedsak være forskjellig. (Arendt et al. 2007)

Det har lenge vært en fokus på surdeig av rug og hvete i bakeindustrien, grunnet deres høye nivå av fenoliske komponenter (Gänzle 2014). Syreproduksjonen under fermenteringen er med på å senke pH, slik at fenoliske komponenter blir mer tilgjengelig for human metabolisme. Hole et al. (2012) har vist at tilsetning av enkelte probiotiske MSB til surdeig med bygg og havre ga en økning i innholdet av fenoliske syrer. I senere tid har studier på surdeig av havre og bygg hatt en økende interesse, da fenoliske syrer har vist en signifikant økning under fermentering, som kan gi positive helsegevinster (Hansen & Schieberle 2005).

2.3.3 Surdeigsfermentering med melkesyrebakterie startere

Det har blitt mer vanlig å tilsette starterkulturer av MSB til fermenteringsprosesser. En starterkultur er beskrevet som en mikrobiell preparering av celler som er tilsatt mel for at fermenteringsprosessen skal komme raskere i gang. Valg av starterkultur er basert på egenskapen til bakteriestammen, evnen til å dominere og utkonkurrere andre skadelige stammer, surgjøing og syntese av komponenter under fermentering (Coda et al. 2014).

Tilsetting av starterkulturer ved fermentering har vært viktig i utviklingen av fermentert mat, da det er mulig å kontrollere forholdene under syrningsprosessen. En rekke funksjonelle starter kulturer finnes på markedet, men tilgjengeligheten av kommersielle startere er derimot begrenset. Noen vanlige MSB startere benyttet i surdeig er stammer av *L. plantarum* og *L. sanfrancisco* (Leroy & De Vuyst 2004).

2.4 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) er ofte assosiert med fermenterte produkter som vin, øl, surdeigsbrød, salami, ost og yoghurt, og har blitt benyttet for bevaring av mat i flere hundre år (Messens & De Vuyst 2002). MSB sin metabolske aktiviteten er med på å opprettholde kvaliteten i maten, ved å danne organiske syrer og redusere pH. Dannelse av melkesyre under fermenteringsprosessen syrliggjør produktet, som hindrer vekst av ødeleggende bakterier og matpatogener som kan være skadelige for mennesker (Axelsson 2004)

Generelt er MSB sett på som fordelaktige mikroorganismer, hvor noen stammer også har såkalte probiotiske egenskaper (Gänzle et al. 2009; Von Wright & Axelsson 2011). Probiotiske bakterier er levende organismer, som i riktige mengder gir konsumenten fordelaktige effekter på helsen (FAO/WHO). Flere laktobaciller har probiotiske egenskaper, og kan finnes i tradisjonell fermentert mat. I dagens kosthold er det meste av probiotika konsumert og tilgjengelig gjennom meieriprodukter som melk, ost og yoghurt. Det er imidlertid også utviklet nye, ikke-meieriprodukter som bærere av probiotiske mikroorganismer, f.eks. basert på korn, for å overkomme noen av ulempene assosiert med fermenterte meieriprodukter, som laktose intoleranse og allergier. (Rathore et al. 2012; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro 2010). Probiotiske bakterier virker blant annet ved at de har evnen til å forbedre og opprettholde den mikrobielle balansen i tarmen. Den mest kjente probiotiske bakterien benyttet i fermenterte produkter er stammen *L. rhamnosus* GG, etterfulgt av ulike lactobaciller, f.eks *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. johnsonii* og *L. plantarum*. I tillegg brukes også stammer av slekten *Bifidobacterium* (Charalampopoulos et al. 2002).

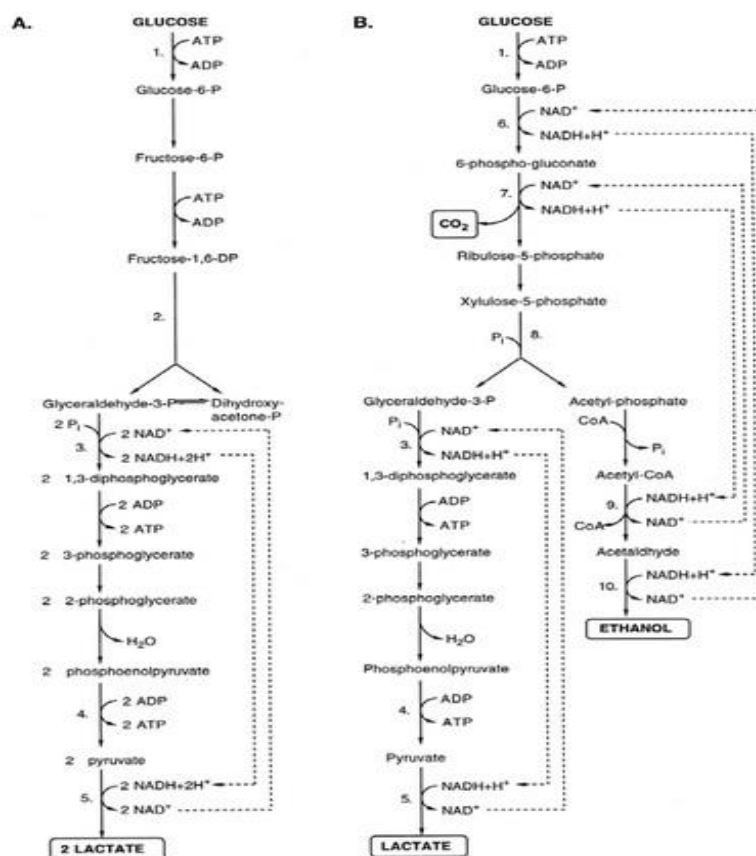
2.4.1 Klassifisering av MSB

MSB er gram positive, ikke sporedannende, opptre som kokker eller staver, ikke mobile, syretolerante bakterier som danner melkesyre som hovedendeprodukt under fermentering av karbohydrater (Balcázar et al. 2007; De Vuyst et al. 2014). De tilhører fylum *Firmicutes*, klasse *Bacilli* og orden *Lactobacillales* som videre er klassifisert i familier som

Aerococcaceae, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae*. Tidlige var genuset *Bifidobacterium* en del av MSB familien på grunn av lignende egenskaper. Nå er bifidobakteriene klassifisert som en del av familien *Actinomycetaceae*, men blir fortsatt assosiert med MSB på grunn av sine probiotiske egenskaper (Axelsson 2004).

2.4.1.1 Reaksjonsvei

Generelt kan MSB fermentere glukose gjennom to reaksjonsveier; Embden- Meyerhof-Parnas (EMP) og fosfoglukonat/fosfoketolase (6-PG/PK) reaksjonsveien. Endeproduktet er i all hovedsak melkesyre, men fordi MSB har evnen til å tilpasse metabolismen i henhold til ulike miljø fører dette til ulike endeprodukter. Fermentering gjennom EMP omdanner glukose til melkesyre, mens 6-PG/PK omdanner glukose til melkesyre, eddiksyre/etanol og CO₂. EMP er benyttet av alle MSB bortsett fra leconocstocer, gruppe III lactobacilli, oneococci og weissella. De resterende heterofermentative MSB bruker 6-PG/PK (Axelsson 2004). (Figur 2.3)



Figur 2.3 Reaksjonsveien for glukose, A) Homolactic fermentering (Glykolyse, EMP reaksjonsveien), B) Heterolactic fermentering (6-PG/PK reaksjonsveien) (Axelsson 2004)

2.4.2 Genus *Lactobacillus*

Genus *Lactobacillus* er den største slekten av MSB. Laktobaciller er en heterogen gruppe stavformede MSB med et G+C (guanin+cytosin) innhold i DNA på 33-55 %. De finnes naturlig i kornprodukter, kjøtt, grønnsaker, meieriprodukter og i tarmen hos mennesker og dyr (Stiles & Holzapfel 1997). *Lactobacillus* kan deles inn i tre grupper I, II og III i henhold til deres fysiologiske egenskaper. Gruppe I består av obligate homofermentative lactobacilli (som *L.brevis*, *L. fermentum*, *L. panis*, *L. reuteri* og *L. sanfranciscensis*), hvor fermentering gjennom EMP danner melkesyre som hovedendeprodukt, de kan ikke fermentere glukonat eller pentoser da de mangler de nødvendige enzymene. Gruppe II er de fakultativt heterofermentative laktobacillene (f.eks. *L. plantarum*, *L. casei* og *L. pentosus*), som fermenterer heksoser homofermentativt, men har evnen til å fermentere pentoser (og glukonat) gjennom 6-PG/PK reaksjonsveien. Fermentering av pentoser gir eddiksyre som endeprodukt i tillegg til melkesyre. Den siste gruppen III omfatter obligate heterofermentative laktobaciller (som *L. amylovorus*, *L. acidophilus* og *L. johnsonii*), disse fermenterer både heksoser og pentoser gjennom 6-PG/PK reaksjonsveien. Dette fører til dannelse av melkesyre, CO₂ og etanol eller eddiksyre (Axelsson 2004).

2.5 Fenoliske komponenter

Fenoliske komponenter består av flere klasser og er en stor gruppe forbindelser som finnes i planteriket. I planteverden opptrer de i konjugert form og det er identifisert mer enn 8000 fenoliske komponenter. Komponentene spiller en viktig rolle i plantens immunsystem, som beskyttelse mot UV-stråling og resistens mot patogener. (Pandey & Rizvi 2009).

Deres kjemiske struktur gjør at forbindelsene er ustabile, som gir dem viktige antioksidante egenskaper (Salah et al. 1995). Fenoliske komponenter finnes naturlig i mat produkter av hele korn, frukt, bær og grønnsaker. Fokuset på inntak av spesielt hele korn har hatt en økende interesse de seneste årene, da de har vist å ha en potensiell effekt på helsen. Fenoliske komponenter er ikke bare assosiert med helsefremmende effekter, de er også aktive i dannelsen av aromakomponenter og farge i øl, vin og brødprodukter. (Holtekjølen et al. 2006).

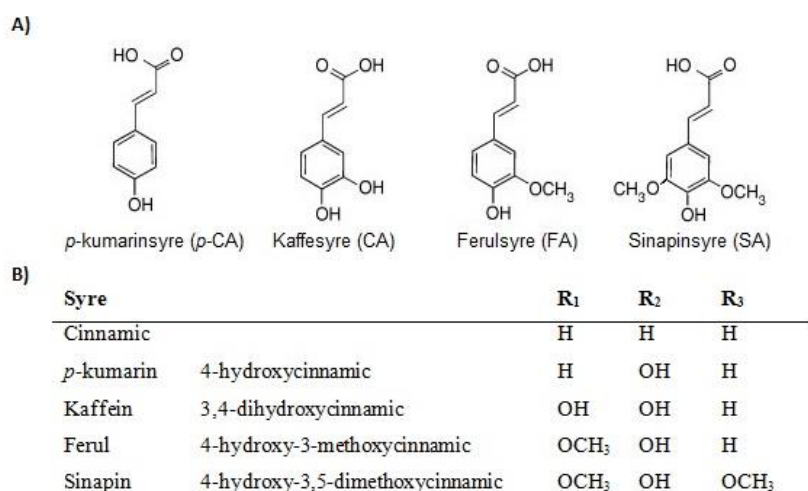
2.5.1 Klassifisering av fenoliske komponenter

Fenoliske komponenter refereres også som enkle fenoler eller polyfenoler, som er klassifisert ut ifra antall fenolringer og strukturelle elementer som binder disse ringene sammen. Enkle fenoler består av en aromatisk ring, mens polyfenoler har en eller flere ringer bundet til

suktermolekyler. Generelt blir polyfenoler delt inn i fire grupper; fenoliske syrer, flavonoider, stilbener og ligander, basert på elementer som binder en eller flere aromatringer sammen. I planteriket er fenoliske syrer og flavonoider er de mest utbredte (Pandey & Rizvi 2009; Rodríguez et al. 2009). I dette studiet er det fokusert på de fenoliske syrene, disse er omtalt i avsnittene nedenfor.

2.5.2 Fenoliske syrer

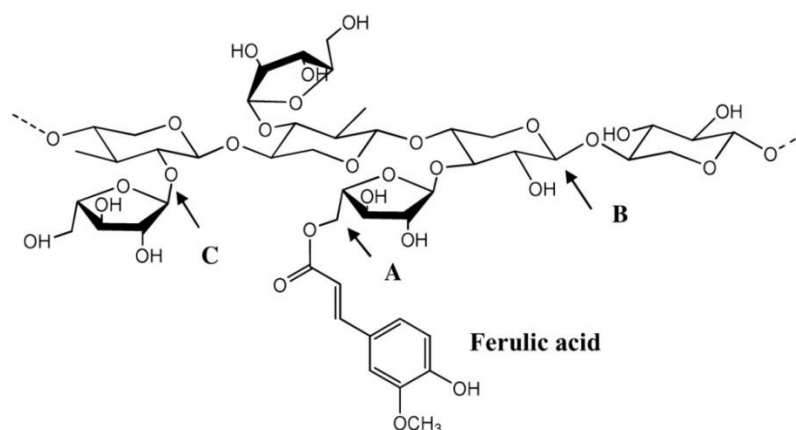
Fenoliske syrer opptrer som organiske syrer og er vidt distribuert i plantefamilien, de kan deles inn i to grupper basert på antall hydroksylgrupper som er bundet til aromatringsen. Gruppene består av derivater av hydroksybenzosyrer og hydroksykanelsyrer, hvor hydroksykanelsyre er den mest vanlige formen (Dykes & Rooney 2007). Denne gruppen består hovedsakelig av bestanddelene ferulsyre (FA), sinapinsyre (SA), kaffeinsyre (CA) og *para*-kumarinsyre (*p*-CA) (Inmaculada et al. 2013). Disse syrene finnes sjeldent i fri form i planten, men ved behandlingsmetoder som fermentering kan de opptre som frie syrer. I kornbasert mat dominerer hovedbestanddelene *p*-CA og FA, som er lokalisert i det ytterste laget av kjernen. Figur 2.3 viser de vanligste hydroksykanelsyre derivatene funnet i hele korn.



Figur 2.4 Oversikt over A) kjemisk struktur av de vanligste syrene *p*-kumarinsyre, kaffeinsyre, ferulsyre og sinapinsyre (Rodríguez et al. 2009). B) kanelsyrederivater og deres funksjonelle grupper (Liu 2007).

Ved dannelse av disse syrene undergår tyrosin i planter enzymatiske reaksjoner som blir omdannet til kanelsyre. Tilføring av en hydroksygruppe til *para*-posisjonen på kanelsyren danner *p*-kumarinsyre. Formene kaffe, ferul og sinapin syre fremtrer ved videre enzymatiske hydroksylering og metylerings steg av *p*-kumarinsyre (Shahidi & Naczk 2003).

I korn finnes syrene hovedsakelig i bundet form, men de kan også være tilstede som frie syrer. Den vanligste formen funnet i korn er ester bundet til arabinosylkjededer eller gjennom eterbinding til ligning. (Hole et al. 2009; Hole et al. 2012). De fiberbundne syrene i korn er bundet til celleveggen i form av ester, mens de frie syrene er funnet i det ytterste laget av pericarpen av kornkjernen (Katina et al. 2005). Figur 2.4 viser strukturen av ferulsyre som er forestret til arabinosylkjededen i celleveggen.



Figur 2.5 A) Ferulsyre bundet som en ester til O-5 posisjonen av arabinosekjeden i arabinosyran. B) β -1,4-linket xylan skjelett. C) α -1,2-linket L-arabinose. (Marcia 2009)

Innholdet av bundet og frie fenoliske syrer i korn er avhengig av opprinnelse og kornsort. I bygg opptrer p- kumarinsyre, ferulsyre og sinapin syre i fri form, med ferulsyre som den mest dominante. De mest vanlige frie fenoliske syrene i havre er av kaffesyre, p-kumarinsyre, ferulsyre og sinapin syre. Det kan også sies at innholdet av bundet fenoliske syrer er mye høyere enn de frie fenoliske syrene i både bygg og havre. (Shahidi & Naczki 2003).

2.5.3 Fenoliske syrer som antioksidanter

Frie radikaler kan samles under navnet ROS (reaktive oksygen arter) som består av molekyler som har et uparet elektron i det ytterste elektronskallet, som er ustabile og veldig reaktive. På grunn av deres ustabile og reaktive struktur angriper de andre molekyler for å oppnå stabilitet. Tilstedeværelsen av frie radikaler kan føre til oksidativ stress sykdommer som for eksempel kreft, hjerteinfarkt og diabetes (Fang et al. 2002). Ved stabilisering av frie radikaler vil molekylene de tar elektroner fra bli ustabile, som igjen kan føre til en rekke kjedereaksjoner.

Fenoliske antioksidanter fungerer som en terminator på oksyderingen av frie radikaler, ved å overføre elektroner til radikalene, slik at kjedereaksjonen stopper opp. (Velioglu et al. 1998).

2.5.4 Biotilgjengelighet av fenoliske syrer

Fenoliske syrer i kostfiber er med på å beskytte kornkjernen ved å danne kryssbinding med polysakkarider i celleveggen og bidrar dermed til rigiditet og styrke. Dette gjør at biotilgjengeligheten av disse antioksidantene er redusert (Liu 2007). Frigjøring av de fenoliske syrene ved hydrolyse av esterbindingene vil bidra til at styrken til celleveggen blir mer redusert som igjen vil bidra til at næringsstoffene i fibre blir mer tilgjengelig (Lai et al. 2012). Kostfiber er ikke fordøyd eller absorbert i tynntarmen, men gjennomgår hydrolyse ved hjelp av bakterier i tarmen før det når ut i blodbanen (Lafiandra et al. 2014).

2.6 Enzymer

Xylanaser og esteraser er enzymer som har evnen til å frigjøre de fenoliske syrene fra plantecelleveggen.

2.6.1 Ferulsyreesterase og xylanaser

Ferulsyreesteraser (FAE) representerer en divers gruppe hydrolaser som er godt distribuert i plante verden. De er involvert i frigjøringen av fenoliske syrer fra celleveggen i planter ved å opptre som enzymer (Esteban-Torres et al. 2013). Disse enzymene er involvert i nedbrytningen av polysakkarider for å frigjøre fenoliske syrene slik at de blir lettere tilgjengelige for absorpsjon, som igjen øker den antioksidante effekten i plasmaen. Arabinoksyllankjedene er ofte krysslinket med di-ferulbroer som kan føre til dimeriseringen av ferulsyre. FAE kan kløyve disse esterbindingene mellom B-D-xylopyransoyl residuer i arabinoksyllans slik at di-ferul eller ferulsyre blir frigjort (Figur 2.4 A) (Fazary & Ju 2007). FAE er også funnet naturlig tilstede på kornet eller i melets mikroflora, hvor de kløyver metyl estere fra hydroksykanelisyre. (Esteban-Torres et al. 2013; Szwajgier & Jakubczyk 2011).

I denne oppgaven ble Pentopan Mono BG benyttet i surdeigfermentering. Pentopan er en kommersiell xylanase som blir benyttet i bakeindustrien. Xylansen virker ved å hydrolysere vilkårlig i xylankjeden i arabinoksyllan, og omdanner ikke-vannekstreherbar arabinoksyllan til vannekstreherbar arabinoksyllan. (Figur 2.4 B) (Selinheimo et al. 2006).

2.6.2 Melkesyrebakterier med FAE aktivitet

I tidligere studier er det observert at mennesker ikke har evnen til å produsere alle enzymer for å hydrolysere alle fiberkomponenter i tarmen. Noen av komponentene kan bli hydrolysert og fermentert ved hjelp av spesifikke tarmbakterier med FAE aktivitet (Charalampopoulos et al. 2002). Flere melkesyrebakterier som er isolert fra diverse matprodukter og tarmflora har vist FAE aktivitet og spiller en potensiell rolle i fordøyelse av fiberkomponenter (Esteban-Torres et al. 2013; Faulds 2009).

Donaghy et. al (1998) utviklet en screening metode som kunne påvise FAE aktivitet hos *Lactobacillus* stammer. Det ble funnet at *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. leichmanni* og *L. farciminis* hadde FAE aktivitet, men genene som koder for denne aktiviteten ble ikke identifisert. Med noen modifikasjoner ble denne metoden brukt av Lai et.al (2012), som identifiserte at *L. johnsonii* LA-5, *L. reuteri* LA1 og *L. helveticus* også produserte FAE.

2.7 Karakterisering av melkesyrebakterier

DNA sekvensering har vært i bruk siden 1970, men var da en dyr metode å bruke og de manglet klonbibliotek som gjorde det vanskelig å identifisere og skille mellom ulike mikroorganismer. De fleste mikrobielle miljø har blitt identifisert ved *in situ* metoder (dyrkningsbasert), som gramfarging, morfologisk karakteristikk av kolonier, vekstfaktorer og metabolsk produksjon. Disse metodene ga der imot lite informasjon på lavere taksonomisk level (Morgan & Huttenhower 2012). Melkesyrebakterier er ofte klassifisert med hensyn på morfologi, reaksjonsvei, vekst temperatur, evnen til å produsere syrer og salt toleranse. Basert på disse observasjonene har det lenge vært en utfordring å klassifisere MSB under genera. I dag finnes flere metoder som baserer seg på DNA sekvensering av rRNA genet som har gjort det mulig å klassifisere MSB på et lavere taksonomisk nivå (Von Wright & Axelsson 2004). I løpet av det siste tiåret er det også utviklet nye ikke - dyrkningsbaserte metoder som kan analysere DNA direkte fra en prøve for å undersøke mikrobielle miljø. (Morgan & Huttenhower 2012)

2.7.1 16S rRNA gensekvensering

Bruken av 16S rRNA sekvenser til å studere fylogeni og taksonomi er en av de vanligste klassifiseringsmetodene benyttet i dag. 16S rRNA genet er den mest kjente markøren og de finnes i nesten alle bakterier. 16S rRNA genet består av flere godt konserverte og variable regioner med en totallengde på ca. 1500 nukleotider (Janda & Abbott 2007). I denne oppgaven ble isolatene identifisert ved hjelp DNA sekvensering av 16S rRNA genet med

polymerase kjede reaksjon (PCR) (avsnitt 3.5.1). Med PCR er det mulig å amplifisere en del av et gen for videre sekvensering av DNA. Denne teknikken er en billig, enkel og effektiv metode for å detektere deler av 16S rRNA genet i bakterier (Fossum & Dissen 2009).

2.7.2 Dybdesekvensering med Illumina (Miseq) teknologi

Illumina dybdesekvensering er av de nyeste neste generasjonssekvenseringsmetodene som er på markedet. Ved hjelp av denne teknologien har det blitt mulig å sekvensere hele genomer, studere ukjente mikrobiologiske miljø (*de novo* sekvensering), detektere mutasjoner og undersøke funksjonell diversitet. De tidligere metodene for karakterisering var i hovedsak dyrkningsbaserte, men med hjelp av Illumina sekvensering er det nå mulig å sekvensere DNA direkte fra mikrobiota. Disse ikke- dyrkningsbaserte metodene gir mye informasjon om det mikrobiologiske mangfoldet i prøven (Morgan & Huttenhower 2012).

I denne oppgaven ble Illumina Miseq brukt for å karakterisere surdeigsmikrobiota. Trinnene i prosessen frem til sekvenseringstrinnet kan leses om i vedlegg 1. Miseq er en relativt ny sekvenseringsmetode og har et avlesningsfelt på 150 bp. Illumina Miseq sekvensering kan deles inn i 4 ulike prosesser; preparering av et bibliotek med prøver, cluster generering, sekvensering og data analyse. Målet med den første prosessen er å gjøre klar prøven til cluster genereringen og sekvensering. Prøvene blir fragmentert og en adaptersekvens blir festet til fragmentet. Adaptersekvenser er benyttet slik at clustergenereringen og sekvenseringstrinnet kan utføres. Dette involverer å fragmentere prøvene slik at adaptor sekvenser kan feste seg. En cluster er et kort område av de amplifiserte fragmentet, og hver enkel cluster inneholder ulike fragmenter. Clustergenereringen undergår 5 ulike trinn. 1) i dette trinnet er målet å hybridisere fragmentenes adapterer til miseq flowcellen. Flowcellen inneholder oligonukleotider som er komplementær til adapterene som er festet på fragmentene. Dette fører til en hybridisering til overflaten på flowcellen. 2) Ved hybridisering dannes en kopi av den originale tråden, som videre blir forlenget i 3 prime retningen av polymerase ved å tilføre deoksyribonukleotider (dNTPer) til tråden. Etter syntese dannes en komplementær kopi av den originale nukleotide tråden, som fører til dannelsen av dobbelt trådede molekyler. Disse blir denaturert og den gamle tråden blir vasket ut. Kopien vil nå kunne binde tilfeldig til overflaten av flowcellen og danner en bro. Dette steget er også kalt broamplifisering, hvor enkelt tådene flipper over for å hybridisere med oligonukleotide primere. Dobbelttråden blir videre denaturert, dette trinnet er repetert helt til alle de multiple broene er dannet. Etter bro amplifiseringen blir trådene linearisert og den reverse tråden fjernes for å blokkere en

eventuell ny bro dannelse. Videre blir trådene blokkert i 3 prime enden for å hindre at DNA og nukleotider fra sekvenseringen kan binde seg. 3) Illumina sekvensering er også kjent som sekvensering ved syntese (SBS). Under sekvenseringen blir polymerase og dideoxynukleotid trifosfater (ddNTPer) tilført. ddNTPene er merket ulike fluorescerende molekyler, som gir fra seg et signal når riktig base er inkorporert. For å detektere signalet blir alle de uinkorporerte basene fjernet før det blir lest av. SBS er avhengig av å bare tilføre en base om gangen, detektere signalet, fjerne blokkeringen og fluorescensen fra den inkorporerte basen før neste base kan bli lagt til. Disse trinene blir repetert frem til alle signalene er detektert og sekvensen er klar for avlesning og analyse (Illumina).

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

Det ble benyttet standard laboratorie utstyr som:

Automatpipetter, pipettespisser, eppendorfrør, glassutstyr, sentrifugerør, podeøser og petriskåler. En detaljert beskrivelse over materialer, kjemikalier, kits, programvare, bakteriestammer og korn utenom standard laboratorieutstyr benyttet i denne oppgaven er oppgitt i Tabell 3.1 – 3.4 og 3.6 - 3.7

Tabell 3.1 Materialer benyttet i denne oppgaven

Utstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Atmosfære generation system	AnaeroGen TM, 3,5 L	Oxoid
Bordmikser	VibrofixVF1 Electronic	IKA® - Laborateknik, Norge
Bordsentrifuge	Microstar 17	VWR , Tyskland
Certoclav-Trich-Autoclav	Certoclav sterilizer Gambatt (CV-EL 12L/18L). A-4050	Østerrike
Cryorør	2 ml	VWR
Dionex™ Ultimate™ 3000 RSLC	-Rapid Separation LC system (RSLC) -Rapid Separation Diode Array Detector (DAD) -Binary rapid Separation (RS) pump -Rapid Separation autosampler -Rapid Separation thermostatted column compartment -Acquity UPLC BEH C8 1,7 um 2,1x150 mm kolonne	Thermo scientific `` `` `` `` Waters
Dybdesequensering	MiSeq TM Illumina	
Elektroforese kar		BIO-RAD, Italia
Elektroforese strøm	POWERPAC TM Basic	``
Filter	Millex-HV filter, 0,45 um, PVDF, 22 mm, gamma sterilized	Millipore
Fotoutstyr til gel	Gel Doc TM EZ Imager	BIO-RAD, Italia
Fryser	Forma -80°C ULT Fryser	Thermo Scientific, USA
Frysetørker	CHRIST GAMMA 1-16	Tyskland

Inkubatorskap	37°C og 22°C	Termaks
Kyvette	1,5 semimicro (12,5 x 12,5 x 45 mm)	BRAND®, Tyskland
Mikrovekt	Mettler Toledo	USA
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	Saveen Werner
PCR-brett	MicroAmp Optical 96 Well reactionplate	Applied Biosystems
PCR-brett mikser	TTS 3 digital Yellowline	Montello diagnostics AS, Norge
PCR-kabinett	Capitar®bio	Erlab, Frankrike
PCR-maskin	Veriti 96 Well Thermal Cyclor	Applied Biosystems, Singapore
Plastikkbeger	100 ml Polypropylene disposable cups	Sarstedt
Ristemastin	2500 rpm Bisan OS-10 Orbital shaker	
Rotavapor	EI 131 Rotavapor and vann bad	Büchi, Sveits
Sekvenseringsbrett	MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Kina
Sekvenseringsmaskin	ABI PRISM® 3130 XL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, HITACHI
Sentrifuge maler (mølle)	ZM 200 Ultra centerifugal mill	Retsch, Tyskland
Sentrifuge til PCR brett	Multifuge 3 S-R	HERAEUS, Tyskland
Sentrifugerotor til PCR brett	Sorvall Roundbucket	
Sentrifuge til sentrifugerør	Multifuge 4 KR	HERAEUS
Sentrifuge rotor	SH-3000	USA
Sentrifugerør	15 ml og 50 ml	VWR
Speedvac	Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator	Thermo
Speedvac Vakumpumpe	UVS800DDA Universal Vacuum System	``
Spektrofotometer	UV - 1600 PC Spectrophotometer	VWR, Kina
Sterilfilter	0,2 µm Steril Syringe filter	VWR, International
Ultralydbad		VWR
Vannbad	GFL	
Vannbad til eppendorfrør	Eppendorf Thermomixer comfort	Bergman AS, Norge
WASP	Whitley Automated Spiral Plater	DW Scientific

WASP digitalrister	MS3 digital rister	^^
Tellemaskin til WASP	Protocol 2, sybniosis	^^
Vakumpumpe til WASP	Whitley Vacuum Source 602	^^

Tabell 3.2 Kjemikalier benyttet i denne oppgaven.

Kjemikalium	Leverandør
0,5 x TBE buffer	
6 M HCL (Hydrogenklorid)	Merck, Tyskland
98% Ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate (C ₁₂ H ₁₄ O ₄)	Aldrich Chemistry, USA
Acetonitrile isocratic grad for HPLC	VWR
Agar no.1	Oxoid Limited, Hampshire UK
De man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar	Oxoid Limited, Hampshire UK
De man, Rogosa, Sharpe (MRS)- buljong	Oxoid Limited, Hampshire UK
Destillert vann, dH ₂ O (milli-Q kvalitet)	Millipore
Di-ammoniumhydrogencitrat	Merck, Tyskland
Di-kaliumhydrogenfosfat, K ₂ HPO ₄	Merck, Tyskland
Eddiksyre, CH ₃ COOH (100%)	Merck, Tyskland
Etanol, C ₂ H ₅ OH	
Etyl acetat for analyse	Merck, Tyskland
Ferulsyre (4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)	Sigma Aldrich, chemie GmbH
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, USA
Glyserol, C ₃ H ₅ O ₃ (85%)	Merck, Tyskland
Kaffesyre	Fluka Chemika, Sveits
LAB-LEMCO POWDER	Oxoid Limited, Hampshire UK
Magnesiumsulfat	Merck, Tyskland
Mangan(2) -sulfat-1-hydrat	Merck, Tyskland
Metanol gradient grad for analyse	Merck, Tyskland
Metanol gradient grad for væske kromatografi	Merck, Tyskland
Molecular biology Agarose	BioRad Laboratories, Spania
N, N-Dimethylformamide (C ₃ H ₇ NO)	Sigma Aldrich, Tyskland

Natriumacetat-trihydrat	Merck, Tyskland
Natriumklorid, 0,9 % NaCl	Emsure
Pentopan 500 BG	Novo Nordisk AS, Danmark
p-kumarinsyre (4-Hydroxycinnamic acid)	Sigma Aldrich, Tyskland
Proteose Pentose no.3	DIFCO Laboratories, USA
Sinapinsyre	Fluka Chemika, Sveits
Tween 80	Sigma Aldrich, Tyskland
YEAST ekstrakt	Oxoid Limited, Hampshire UK

Tabell 3.3 Kits benyttet i denne oppgaven

Kit	Spesifikasjoner	Leverandør
5 Prime HotMasterMiks		VWR International AS
ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kits	BigDye reaction mix pGEM® - 3Zf(+) Control Template, 0,2 µg/µL 21 M13 Control Primer (forward), 0,8 pmol/ µL	Applied Biosystems, USA
BigDye Xterminator Purification kit	XTerimator solution SAM™ Solution	Applied Biosystems, USA
USB® ExoSAP-IT®	Rensing av PCR produkt	Affymetrix, USA
QIAGEN Multiplex PCR kit	HotStarTaq DNA polymerase Multiplex PCR Buffer Q-solution	QIAGEN

Tabell 3.4 Programvare benyttet i denne oppgaven

Programvare	Leverandør
Sequence skanner Software 2	Applied Biosystems
BioEdit software	Ibis Biosciences, USA
Ribosomal Database Project (RDP)	Center for microbial ecology, Michigan State University
Basis Local Alignment Search Tool (BLASTn)	NCBI
Chromleon™ Chromatography Information Management system	Dionex™
NanoDrop 1000 software	Thermo scientific

3.2 Tillaging av løsninger og medier

3.2.1 Løsninger

Etyl ferulat: Etyl ferulat løsning ble laget ved å løse 0,4 g Ethyl 4-hydroxy-3-metohoxycinnamate i 4 ml N, N-Dimethylformamide.

Mobilfase A til RSLC: Mobilfase A med 1% eddiksyre ble laget ved å blande 10 ml eddiksyre (100%) i 990 ml MilliQ vann.

Mobilfase B til RSLC: Mobilfase B med 1 % eddiksyre ble laget ved å blande 10 ml eddiksyre (100%) i 990 ml acetonitrile.

Pentopan stock løsning: Pentopan løsning (5,4 mg/g) ble laget ved å veie 27 mg pentopan 500 BG pulver løst i 5 ml MilliQ vann.

Standard VI til gel elektroforese: Standard til gel elektroforese ble laget ved å mikse 60 µl standard marker VI, 100 µl orange miks og 140 µl dH₂O.

3.2.2 Medier

Alle medier ble sterilisert i autoklav (Certoclav-Trich-Autoclav A - 4050) i 15 minutter ved 115°C. Agar flaskene ble avkjølt i vannbad til 45°C før de ble helt ut i sterile petriskåler i sterilbenk og lagret ved 4°C frem til bruk. Flaskene med buljong ble oppbevart i romtemperatur.

de Man Rogosa Sharp (MRS) Agar:

24,8 g MRS agar ble løst i 400 ml destillert vann og autoklavert i 15 minutter ved 115°C.

de Man Rogosa Sharp (MRS) Buljong:

20,8 g MRS agar ble løst i 400 ml destillert vann og autoklavert i 15 minutter ved 115°C.

Agarose gel:

Agarose ble laget ved å blande 2,1 g agarosepulver med 300 ml 0,5 x TBE buffer. Flaskene ble varmet til kokepunktet i mikrobølgeovn og flyttet til varmeskap ved 55°C. Til 60 ml flytende agarose ble det tilsatt 6 µl GelRed før den ble helt over i et 60 ml støpingskar. Da gelen hadde stivnet ble den overført til gelkaret med TBE buffer.

Ferulate Assay Agar (MRS-EF):

MRS agar hvor glukose er eliminert og tilsatt ethyl ferulate ble laget fra bunnen av. Kjemikaliene ble overført til glassflasker og blandet med 400 ml destillert vann. Det ble lagt en magnetrører i flaskene før autoklaving. Etter sterilisering ble N, N- Dimethylformamide og Ethyl 4-hydroxy – 3- methoxycinnamate laget med konsentrasjon på 4 mg/ml før substratet ble tilsatt flaskene. pH ble målt til 6,5. Følgende kjemikalier og mengde benyttet for å lage MRS-FA agar finnes i Tabell 3.5.

Tabell 3.5 Kjemikalier benyttet i tillaging av MRS-FA agar

Kjemikalier	Mengde
Agar no.1	4,0 g
dH ₂ O	400 ml
Di- ammoniumhydrogencitrat (Mv 226,19)	0,8 g
Di-Kaliumhydrogenphosfat, K ₂ PO ₄	0,8 g
Ethyl 4-hydroxy – 3- methoxycinnamate, C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0,4 g
LAB-LEMCO POWDER	3,2 g
Magnesiumsulfat x H ₂ O *	0,08 g
Mangan(2) -sulfat-1-hydrat	0,0152 g
N, N- Dimethylformamide, C ₃ H ₇ NO	4 ml
Natriumacetat-trihydrat (Mv 136,09),	2,0 g
Proteose pentose no. 3	4,0 g
Tween 80 *	0,4 ml
YEAST Extract	1,6 g

* Tween 80 ble tilsatt etter dH₂O, Magnesiumsulfat ble blandet med 5 ml dH₂O før det ble tilsatt agaren.

3.3 Bakteriestammer, dyrkning og celletall (CFU)

Bakteriestammer benyttet i denne oppgaven er oppgitt i Tabell 3.6. Alle stammene ble oppbevart ved -80°C i cryorør med MRS buljong og 20 % glyserol.

Tabell 3.6 Stammer av *Lactobacillus* brukt i oppgaven

Art	Navn på stamme	(MF) Nofima	Opphav	Referanse
<i>L. amylovorus</i>	NRRL B-4538	146	Etanol ekstrakt, mais	2
<i>L. amylovorus</i>	NRRL B-4542	150	Etanol ekstrakt, mais	2
<i>L. johnsonii</i>	LA1	3633	Meieriprodukt	3
<i>L. plantarum</i>	WCFS1	2301	Enkel koloni variant av NCIMB 8826	1
<i>L. reuteri</i>	DSM 20016 (LRT)	110	Tarm	1
<i>L. reuteri</i>	DSM 17938	3551	Plasmid kurert variant av ATCC 55730	1
<i>L. reuteri</i>	MM4-1a (6475)	3552	Brystmelk	1
<i>L. reuteri</i>	SD2112	3634	Meieriprodukt	3
<i>L.reuteri</i> *	CBN1		Surdeig, denne oppgaven	
<i>L.reuteri</i> *	CBN2		Surdeig, denne oppgaven	
<i>L.reuteri</i> *	CBN3		Surdeig, denne oppgaven	

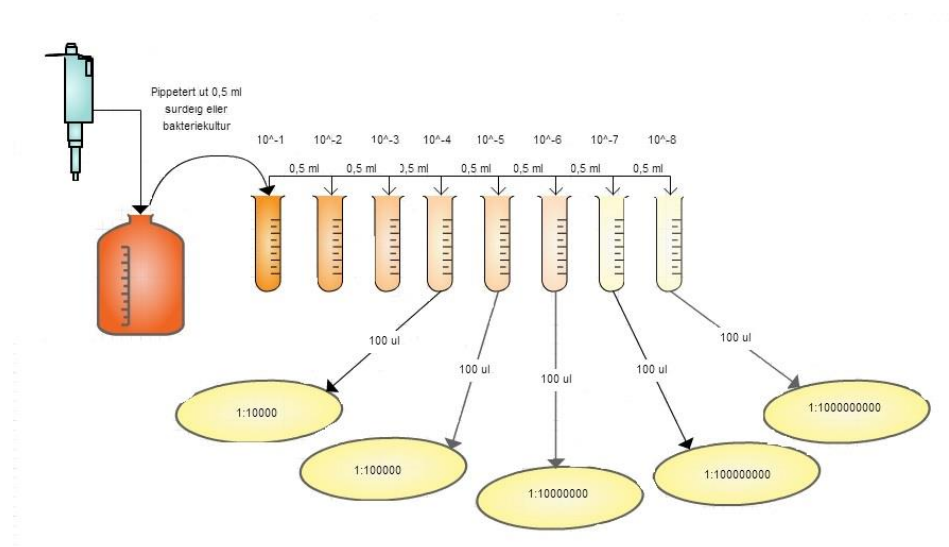
* Identifisert med 16S rRNA sekvensering. ¹ (Jensen et al. 2012) ²(Gold et al. 1992) ³ (Hole et al. 2012)

3.3.1 Dyrkning av bakteriestammer

Bakteriestammer ble dyrket frem fra frysestock ved utstrykning på MRS agar og inkubert anaerobt i 2 døgn ved 37°C. Etter inkubering ble en koloni podet over i 5 eller 10 ml MRS-buljong for å lage renkultur, og inkubert et døgn ved 37°C. Ved behov ble 100 µl av bakteriekulturen re-inokulert i nye rør med MRS buljong og videre inkubert et døgn ved 37°C.

3.3.2 Celletall (CFU)

Celletall (Colony Forming Units, CFU) i bakteriekultur eller surdeig ble beregnet ved hjelp av 10 x fortynningsrekke (Figur 3.1) i peptonvann (0,1% pepton, 0,85% natrium klorid). Bakteriekulturer ble platet ut manuelt, mens for fermenteringsprøvene ble Whitley Automated Spiral Plater (WASP) benyttet. Hvilken fortynning som ble platet ut ble valgt ut ifra absorbans eller antatt celletal. Absorbansen (600 nm) ble målt i bakteriekulturen med et spektrofotometer ved å overføre 1 ml av bakteriekulturen til en 1,5 ml kyvette. En kontroll med medie ble benyttet til å nullstille instrumentet.



Figur 3.1 Oversikt over 10 x fortynningsrekke

Ved manuell utplating ble 100 µl av ønsket fortynning inokulert på MRS agar. En spreder ble benyttet for å fordele fortynningskulturen jevnt over hele agarflaten. Skålene ble plassert i sterilbenk med lokkene halvveis åpne i 15 minutter før de ble inkubert anaerobt ved 37°C i 3 døgn. Koloniene ble telt manuelt og CFU/ml ble regnet ut

Ved utplating med WASP ble fortynningsrørene mikset med en Digital rister og 50 µl ble platet ut på MRS agar. Maskinen ble vasket mellom hver prøve for å unngå kontaminering. Skålene ble satt i sterilbenk med lokkene halvveis av slik at de fikk tørket før de ble inkubert anaerobt ved 22°C/37°C i 3 døgn. Koloniene ble telt med WASP plate counter og CFU ble automatisk beregnet.

3.4 Surdeigsfermentering

Tre ulike fermenteringsforsøk med utvalgte kornarter og kornsorter har blitt utført: 1) Spontan fermentering for karakterisering av MSB med potensiell FAE aktivitet, 2) Fermentering med FAE positive MSB og 3) Fermentering med FAE positive MSB inkludert pentopan. Nivåer av frie fenoliske syrer ble analysert i forsøk 2 og 3. En oversikt over forsøksoppsettet er vist i Figur 3.2

3.4.1 Uttak av surdeigsprøver for videre analyse

Det ble tatt ut surdeigsprøver til flere analyser gjennom fermenteringsprosessen.

pH målinger: pH ble målt med et pH meter ved å løse 0,5 g surdeig i 4,5 ml dH₂O. For hver dag ble det tatt ut 1,5 ml deig i 2 ml eppendorfrør som ble oppbevart ved -80°C frem til videre analyser.

Uttak av surdeig til DNA: For hver dag ble det tatt ut 1,5 ml deig i 2 ml eppendorfrør som ble oppbevart ved -80°C frem til Miseq analyse av surdeigsmikrobiota.

Uttak til frie fenoliske syrer: 4,0 g deig ble overført til falconrør ved de ulike tidene og oppbevart i -80°C før de ble plassert i frysetørkeren i 3 dager. Det ble laget noen hull i lokkene slik at kondens fikk unnslippe gjennom tørkeprosessen. Da prøvene var klare ble de oppbevart i -20°C frem til analyse av frie fenoliske syrer.

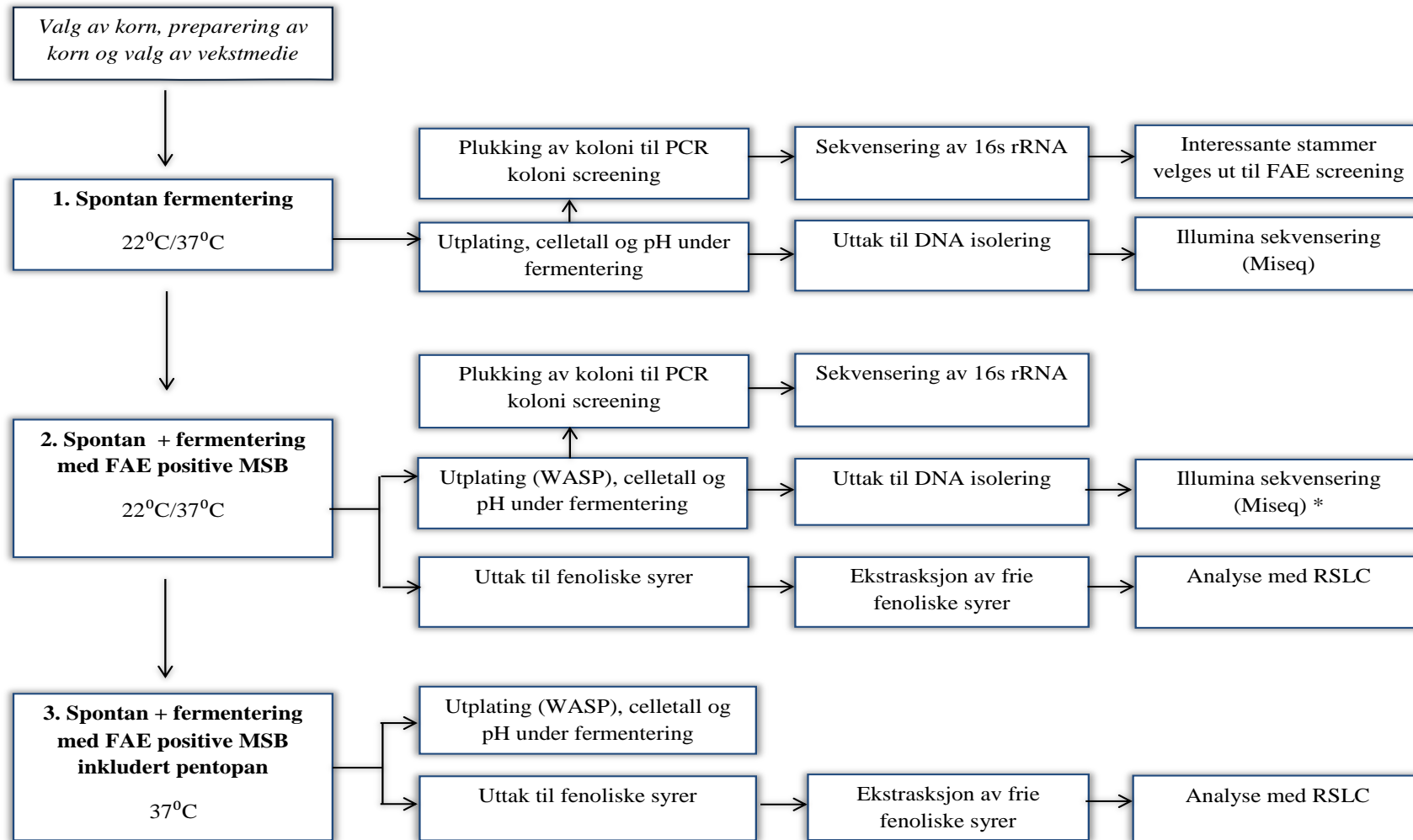
3.4.2 Kornsorter og preparering

Utvalgte kornarter og sorter benyttet i fermenteringsforsøkene er vist i Tabell 3.7. Ulike sorter hele korn av bygg og havre ble malt i en sentrifuge kvern med en 0,5 mm rasper, mens resterende var ferdigmalt fra leverandøren.

Tabell 3.7 Oversikt over kornart, opprinnelse og sort, og hvilke forsøk de har blitt brukt i.

Kornart	Opprinnelse, sort	Spesifikasjon
Bygg ¹	Landvik Olve	Hele korn
Bygg ¹	Landvik Magdalena	Hele korn
Bygg ¹	Tyskland Olve	Hele korn
Bygg ¹	Marigold, Aspevold	Hele korn
Bygg ¹	Skjåkmel	Sammalt
Bygg ¹	Regal, Läntmannen Mills	Byggmel
Bygg ³	Ottadalen Mølle, Skjåkmel	Sammalt
Emmer ¹	Holli Mølle	Sammalt fin
Havre ²	Jæren Mathilda (A.K. Holtekjølen. Nofima)	Hele korn
Havre ¹	Jæren Nes	Hele korn
Havre ¹	Ottadalen Nes (A.K.Holtekjølen. Nofima)	Hele korn
Hvete ¹	Norges Møllene	Sammalt
Hvete ¹	Regal	Sammalt fin
Hvete ¹	Kvelde Mølle	Florsiktet
Rug ¹	Regal	Sammalt fin
Rug ¹	Møllerens	Sammalt fin
Spelt (økologisk) ¹	Holli Mølle	Rotkorn
Spelt (økologisk) ¹	Kvelde Mølle	Sammalt

¹ Spontan fermentering, ² Fermentering med starterkulturer, effekt på frie fenoliske syrer, ³ Fermentering med starterkulturer, effekt på frie fenoliske syrer med og uten pentopan



Figur 3.2 Oversikt over forsøksoppsettet. * Illumina sekvensering av spontan surdeigsmikrobiota

3.4.3 Spontan surdeig med ulike melsorter

Det ble veid opp 20 g mel (Tabell 3.7) i plastikkbeger med skruløkk før 25 ml dH₂O ble mikset inn med en metall spateL. Ved hjelp av en skalpell ble det laget tre hull i lokkene, slik at gassen dannet under fermentering kunne unnslippe. De spontane surdeigene med nymalt korn ble satt opp i to serier, den første serien ble inkubert ved 37°C og den andre ved 22°C i 3 døgn. Fermentering med ferdigmalt korn ble inkubert ved 37°C i 3 døgn. Celletall og pH ble fulgt gjennom hele fermenteringsprosessen. Skålene ble inkubert ved 22°C og 37°C anaerobt i 3 døgn og CFU ble regnet ut. Utvalgte kolonier ble brukt i sekvensering av 16S rRNA.

3.4.4 Fermentering med starterkultur

3.4.4.1 Preparering av starterkultur

Over natt bakteriekultur ble overført til 50 ml sentrifugerør og høstet ved 4000 rpm i 5 min. Supernatanten ble helt av og residuet ble vasket tre ganger i 10 ml 0,9% Natrium Klorid (NaCl) løsning. Etter siste vasking ble residuet reløst i 10 ml 0,9 % NaCl til bakteriepelleten var løst opp. Rørene ble oppbevart kjølig frem til bruk.

3.4.4.2 Surdeig med havremel og MSB starterkultur

Surdeig med havremel (Mathilda, Jæren) ble satt opp med 1:2 ratio (20 g mel + 40 ml dH₂O). Starterkultur av ca. 10⁷ CFU/ml ble tilsatt dH₂O før det ble mikset sammen med melet. Spontan fermentering uten starterkultur ble benyttet som kontroll, i tillegg til en prøve tilsatt eddiksyre. Eddiksyre ble tilført etter vannet og tilsatt i dråper til prøven nådde pH ~3,8. Surdeigsprøvene ble inkubert ved 22°C/37°C i 3 dager. Den ufermenterte prøven (0 tid) ble satt direkte i -20°C frem til analyse. Tabell 3.8 gir en oversikt over prøveoppsettet med og uten MSB startere, inkuberingstemperatur og tidsuttak til ulike analyser.

Tabell 3.8 Oversikt over behandling av surdeig med havre (Jæren, Mathilda) og MSB starterkultur, temperatur og tidsuttak til ulike analyser.

Surdeigsprøve	Temp.	Tidsuttak (etter timer)			
		pH	CFU	DNA	Fenoliske syrer
Ufermentert (0 tid)	-20°C	0 t			0 t
Spontan	37°C	8, 24, 48 t	8, 24, 48 t	8, 24, 48t	8, 24 t
Spontan og eddiksyre	22°C/37°C				8, 24 t
<i>L. reuteri</i> CBN1	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t
<i>L. reuteri</i> CBN2	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t
<i>L. reuteri</i> CBN3	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t
<i>L. reuteri</i> SD2112	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t
<i>L. reuteri</i> 6475	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t
<i>L. amylovorus</i> NRRL B-4538	37°C	8, 24 t	8, 24 t		8, 24 t

Uttak til diverse analyser (illustrert i Figur 3.2) ble utført etter 8 timer, 24 timer og 48 timer. pH ble målt som beskrevet i avsnitt 3.5.1 i alle prøvene gjennom hele forsøket. Utplating av surdeig ble utført på MRS med WASP og skålene ble inkubert anaerobt ved 37 °C i 3 døgn. Utvalgte kolonier ble brukt i sekvensering av 16S rRNA.

Uttak av deig til analyse av frie fenoliske syrer er beskrevet i avsnitt 3.7.1.

3.4.5 Fermentering med starterkultur og pentopan

Preparering av starterkultur ble utført som i avsnitt 3.4.4.1

3.4.5.1 Surdeig med byggmel, MSB starterkultur og pentopan

Surdeig med byggmel (skjåkmel, Ottadalen mølle) ble satt opp med 18 g mel og 22 ml dH₂O (37°C) i en 100 ml plastikkboks med skrulokk. Hver prøve ble satt opp i to serier, den første serien med bare MSB starterkultur og den andre behandlet med pentopan og MSB starterkultur. Begge seriene ble fulgt i 1 døgn. (Tabell 3.9)

For behandling med MSB starterkultur ble 50 µl starterkultur blandet med dH₂O før det ble tilsatt melet. Som en kontroll til analyse av frie fenoliske syrer ble en prøve også behandlet med eddiksyre. Eddiksyre ble tilsatt etter at vannet var mikset inn til prøven nådde pH ~3,8. Til prøvene som ble behandlet med pentopan ble det tilsatt 100 µl pentopan (0,03 mg/g) løsning direkte til surdeigen. Prøvene ble blandet godt sammen med en metall spateL.

Surdeigsprøvene ble inkubert ved 37°C i 1 døgn. Den ufermenterte prøven (0 tid) ble satt direkte i -20°C frem til analyse.

Tabell 3.9 Oversikt over behandling av bygg (Ottadalen Mølle), MSB starterkultur, temperatur og tidsuttak til ulike analyser.

Surdeig prøve	Temp	Tidsuttak (etter timer)		
		pH	CFU	Fenoliske syrer
Serie 1				
Ufermentert	-20°C	0 t		0 t
Spontan	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
Spontan og eddiksyre	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
<i>L.reuteri</i> CBN2	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
<i>L.reuteri</i> CBN3	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
<i>L.reuteri</i> SD2112	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
<i>L.reuteri</i> 6475	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t
<i>L.amylovorus</i> NRRL B-4538	37°C	0 og 24 t	24 t	24 t

Serie 2 ble satt opp likt som (Tabell 3.9), men pentopan ble inkludert i hver prøve. I denne serien ble det ikke tatt ut prøver til CFU, da det ble antatt at pentopan ikke påvirker bakteriepopulasjonen i prøvene. Utplating av surdeig ble utført med WASP og skålene ble inkubert anaerobt ved 37 °C i 3 døgn. pH og uttak til fenoliske syrer er beskrevet i avsnitt 3.7.1.

3.5 Karakterisering av isolater

3.5.1 Polymerase kjede reaksjon (PCR) koloniscreening

DNA ble lysert fra cellene ved PCR koloniscreening designet av Rob Britton`s Lab (Michigan State Univeristy). Kolonier fra MRS skålene ble benyttet, for lagring av kolonier ble de inokulert i MRS buljong i 1 døgn ved 37°C. Det ble også laget frysestocker av alle dyrkingskulturene i 20% glyserol, før de ble satt i -20°C.

Kolonier fra skålene ble plukket med en 200 µl pipette spiss og overført til et 96-brønner PCR Brett. Den samme spissen ble inokulert til korresponderende brønn i dyrkingsplaten som er tilsatt 100 µl dyrkingsmedium. Det ble satt av to brønner til negativ og positiv kontroll for PCR reaksjonen. PCR-brettene ble mikrobølgebehandlet i 1 minutt på full effekt, hvor DNA ble tilgjengelig ved lysering. Deretter ble brettene flyttet til steril PCR-kabinett og

mastermixen ble tilsatt. Brettene ble så spunnet ned i 1 minutt før de ble satt på PCR-maskinen for oppamplifisering. I denne oppgaven ble det benyttet tre ulike mastermikser og PCR program (Tabell 3.11 – 3. 13)

3.5.2 PCR-oppamplifisering av DNA

Etter lysering ble oppamplifisering av DNA fortatt. PCR programmet består av flere sykluser ved ulike temperaturer avhengig av hvilke primere som er benyttet. I de ulike syklusene gjennomgår DNA flere enzymatiske reaksjoner før det endelige PCR produktet ble dannet.

Tabell 3.10 Oversikt over primersekvenser og hvilke posisjon på 16S rRNA de starter hybridiseringen

Primer	Sekvens	Posisjon på 16S rRNA
27F	5` - AGAGTTTGATYMTGGCTCAG - 3`	9-27
907R	5`-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT – 3`	907-926
Mangala F	5`- TCCTACGGGAGGCAGCAGT – 3`	340-358
Mangala R	5` - GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT- 3`	781-806

De enzymatiske trinnene under PCR reaksjonen er; 1) denaturering (94°) for å danne to enkelttrådede DNA fragmenter, 2) som videre gjennomgår hybridisering(50-55°) hvor primerne baseparrer med deres komplementære områder på DNA templatet. I det siste trinnet økes temperaturen til 72° at polymerasen kan feste seg til primerne, og danne dsDNA igjen. Disse stegene ble gjentatt i 30 – 35 sykluser (Fossum & Dissen 2009). Temperaturen under hvert enkelt trinn er avhengig av primserdesign og hvilke polymerase som er benyttet.

5` Mastermiks og mangala primere ble benyttet på kolonier fra spontan surdeig av nymalt korn. Samme mastermiks, men med 27 F og 907 R ble benyttet på kolonier fra ferdigmalt korn.

Tabell 3.11 oversikt over 5 Prime Mastermiks med mangala primere benyttet i PCR-reaksjon.

5` Mastermiks	Volum
5` HotMasterMiks	7 ul
dH ₂ O	5 ul
Forward primer (Mangala)	0,25 ul
Reverse primer(Mangala)	0,25 ul

PCR betingelser: 94 °C i 2 min, (94 °C i 30 sek, 55°C i 30 sek, 72°C i 1 min) x 35 sykluser, 72 °C i 1 min og 4°C ∞

Tabell 3.12 Oversikt over 5 Prime Mastermiks med 27F og 907R primere benyttet i PCR-reaksjon.

5` Mastermiks	Volum
5` HotMasterMiks	7 ul
dH ₂ O	5 ul
Forward primer (27F)	0,25 ul
Reverse primer (907R)	0,25 ul

PCR betingelser: 94 °C i 2 min, (94 °C i 30 sek, 50°C i 30 sek, 72°C i 1 min) x 35 sykluser, 72 °C i 1 min og 4°C ∞

I spontan surdeig med havremel (Mathilda, Jæren) ble QiaGen mastermiks sammen med 27F og 907R benyttet. QiaGen mastermiksen ble testet av medstudent på egne kolonier, som viste flere bånd på gel elektroforesen.

Tabell 3.13 Oversikt over QiaGen Mastermiks med 27F og 907R primere benyttet i PCR-reaksjon.

2 x QiaGen mastermiks	Volum
2x QiaGen mastermiks	10 ul
dH ₂ O	9 ul
Forward primer (27F)	0,5 ul
Reverse primer (907R)	0,5 ul

PCR betingelser: 94 °C i 15 min, (94 °C i 30 sek, 50°C i 1,30 sek, 72°C i 1,30 min) x 30 sykluser, 72 °C i 10 min og 4°C ∞.

3.5.3 Agarose gel elektroforese

PCR-produktet ble testet på 0,7% agarose geL. For å detektere PCR-produktet ble det tilsatt 2 µl Orange G loadingbuffer til 5 µl PCR-produkt. Som en kontroll ble 3,5 µl av standard 6 tilsatt i en av brønnene. Gelen ble kjørt i 40 minutter ved 100 Volt. Båndene på gelen ble detektert ved hjelp av en UV-lampe og visualisert med Gel Imager.

3.5.4 Fjerning av primer overskudd fra PCR produktet

I dette trinnet ble Exo-Sap-It tilsatt PCR-produktet for å fjerne overskuddet av primere. Exo-Sap-It inneholder eksonuklease som bryter ned overflødig enkeltrådet primer og DNA og Alkaline fosfat som hydrolyserer overflødig dNTP'er. PCR-produktet ble fortynnet 1:5 før 2 µl Exo-Sap-It (fortynnet 1:5 i dH₂O) ble tilsatt. Brettene ble satt på PCR-maskinen med betingelsene; 37⁰C i 30 min, 80⁰C i 15 min og 4⁰C ∞.

3.5.5 Sekvenserings PCR

BigDye mastermiks kitet inneholder fluorescerende nukleotider som fester seg på nuleotide basene i DNA. PCR-produktet fra forrige trinn ble pipettert til respektive brønner i sekvenseringsbrett før BigDye mastermiks ble tilsatt (Tabell 3.14). Brettene ble holdt på is under hele prosessen.

Tabell 3.14 Oversikt over Big-Dye Mastermiks benyttet for innmerking av PCR produktet

BigDye Mastermiks	Volum
Big Dye Buffer 5x	1,5 µl
Big Dye v 1.1	1,0 µl
Sekvenseringsprimer*	1,0 µl
H2O	5,5 µl
Pre-sekvenseringsprodukt	1,0 µl

* Samme sekvenseringsprimer som ble benyttet under oppamplifiseringen av DNA. PCR betingelser; (96⁰C i 15 sek, 60⁰C i 4 min) x 25 sykluser, 4⁰C ∞

BigDye kitet inneholder en egen primer (21 M13 0,8 pmol/µl) og kontroll templat (pGEM – 3Zf(+)) 0,2µg/µl), disse ble benyttet som en positiv kontroll for sekvenseringen. Sekvenseringsbrettene ble spunnet ned før de ble kjørt på PCR-programmet for innmerking.

3.5.6 Felling av sekvenseringsproduktet

Før sekvenseringsproduktet ble sekvensert ble produktet fellet ut. Det ble tilsett en mastermix bestående av 10 µl X-terminator og 45 µl SAM-solution til hver brønn. Ettersom utfelling skjer raskt, ble det tilsatt ett og ett brett om gangen. Sekvenseringsbrettene ble satt på en plate-vortexer (TTS 3 digital Yellowline) i 30 min ved 1500 rpm, før de ble spunnet ned ved 2500 rpm i 2 min. X-terminator fanger opp uinkorporerte komponenter gjennom kraftig risting over tid. Sentrifugering gjør at alle overflødig komponenter vil legge seg på bunnen.

Brettene ble satt i stativer, forseglet med en septa matte og satt i sekvenseringsmaskinen.

3.5.7 Sekvensering

For sekvenseringen ble to protokoller for oppsugningstiden valgt. Oppsugningstiden kan korreleres og tilpasses til signalintensiteten til de fire fluorephorene A, G, C og T. Analyserings protokoll ble satt til BD_1_1, dette er standard for rene sekvenser. BD_1_1_ med kortere oppsugningstid ble også benyttet i tilfelle signalintensiteten var høy.

3.5.8 Behandling av sekvensdata

Sekvensene ble behandlet i Sequence scanner hvor sekvensplaten ble visualisert og viste informasjon om sekvensene. De dårlige sekvensene ble filtrert bort ved å se på trace score (TS), contiguous read length (QTL) og signal intensiteten. Etter sekvensanalyse ble alle de gode sekvensene importert til BioEdit, hvor de ble sammenstillet med ClustalW. Sekvensene ble behandlet ved å kutt bort de første 50 basene og etterpå fra base 600 og utover. Sekvensene ble benyttet i 16s rRNA søk i Ribosomal Database Project (RDP) og Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn, NCBI).

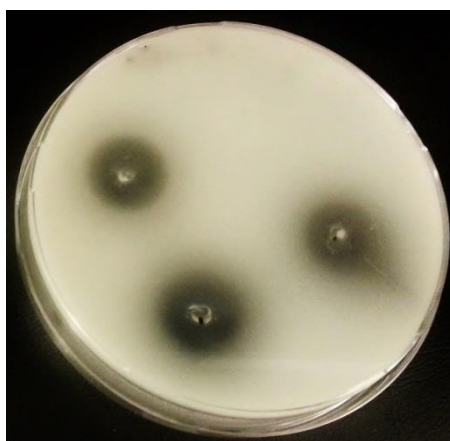
3.5.9 Karakterisering av surdeigsmikrobiota med 16S rRNA dybdesekvensering

DNA isolering fra surdeig og 16S rRNA sekvensering på Miseq (Illumina) ble hovedsakelig utført av senioringeniør Merete Rusås Jensen og forsker Ida Rud, men undertegnede har satt seg inn i mesteparten av metodene. Protokollen er presentert i vedlegg 1.

3.6 Ferulsyre esterase (FAE) aktivitet

Ferulsyre esterase (Ferulic Acid Esterase, FAE) aktiviteten til bakteriesisolater fra ulike spontane surdeigsforsøk og utvalgte Nofima stammer har blitt målt basert på metoden til Donaghy et al (1998). En koloni fra MRS agar ble re-inokulert i spotter på MRS-EF agar hvor karbohydratkilden var eliminert. *L. johnsonii* LA1 ble benyttet som positiv kontroll. Bakteriestammer med FAE aktivitet danner en klar sone rundt det inokulerte området (Figur 3.3), og mengde ferul syre dannet ble målt i diameter av klar sone: + < 10 mm, ++ 10-20 mm og +++ > 20 mm

Bakteriestammene som viste FAE aktivitet ble videre benyttet i surdeig med starterkulturer, og effekten av frigjøringen av frie fenoliske syrer



Figur 3.3 Bakteriestammer med FAE aktivitet.

3.7 Ekstraksjon av frie fenoliske syrer til RSLC analyse

Effekten av fermentering med havre (Jæren, Mathilda) og bygg (Sjåkmel, Ottadalen) ble analysert med hensyn på frie fenoliske syrer. Metoden for ekstraksjon av frie fenoliske syrer er en modifisert metode beskrevet av Hole et. al. (2009).

Fra de frysetørkede prøvene ble 1,0 g (\pm 0,05 g) veid inn i 50 ml sentrifugerør. Til rørene ble 10 ml 80% MeOH tilsatt, og vortexet før de ble satt i ultralydbad i 30 minutter ved 0°C. Rørene ble deretter sentrifugert ved 4000 g i 15 minutter før supernatanten ble overført til nye 50 ml sentrifugerør. Dette steget ble gjentatt to ganger med 5 ml 80% MeOH og supernatantene ble samlet i samme rør som over. De oppsamlede supernatantene ble overført til runde kolber, avdampet i rotavapor og reløst i 10 ml surgjort MilliQ vann (6M HCl til pH

nådde ~ 2,0). Syrevannet med ekstraktet ble overført til 50 ml sentrifugerør og tilsatt 10 ml ethylacetat.

De frie fenoliske syrene blir ekstrahert fra syrevannet med væske-væske ekstraksjon med ethylacetat. Rørene ble ristet ved 250 rpm i 10 minutter før de ble sentrifugert ved 2800 g i 10 minutter. Ethylacetaten ble pipettert over i nye 50 ml sentrifugerør, dette ble gjentatt tre ganger. All ethylacetat ble samlet opp og avdampet i SpeedVac inndamper. Det tørkede residuet ble oppbevart ved -80°C frem til RSLC analyse.

3.7.1 Preparering av prøver til analyse av fenoliske syrer

Det tørkede residuet ble reløst i 1 ml 25% MeOH og filtrert gjennom 0,45 µm sterilfilter over i vialer før injeksjon på RSLC

3.7.2 Preparering av standarder til analyse av fenoliske syrer

Det ble benyttet fire standarder til deteksjon med DAD ved en bølgelengde på 320 nm. Det ble veid inn 10 mg av Kaffeinsyre (CA), *p* - Kumarinsyre (*p*-CA), Ferulsyre (FA) og Sinapinsyre (SA) i en 20 ml målekolbe. Til kolben ble 5 ml 25% MeOH tilsatt og fortynnet med MilliQ vann opp til merket. Disse løsningene fikk en konsentrasjon på 500 µg/mL. Fra denne konsentrasjonen ble det pipettert ut 2 ml, som ble fortynnet til 10 ml i en målekolbe med MilliQ vann. Løsningene hadde nå en konsentrasjon på 100 µg/mL. Standard 4 ble laget ved å overføre 1 ml av alle løsningene til en 10 ml målekolbe og fortynnet til merket med MilliQ vann. Ved å tilsette varierende mengde av standard 4 og MilliQ vann, ble standard 1, 2 og 3 laget. Mengde av standard 4 og vann som er tilsatt standard 1, 2 og 3 er oppført i tabell 3.14.

Tabell 3.15 Tillaging av de fire eksterne standardene og sluttkonsentrasjon på standardrekke

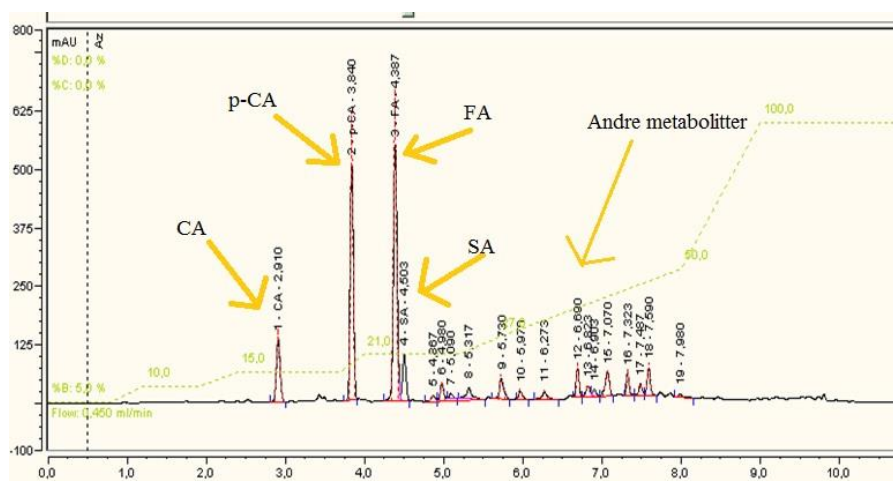
Standard	Standard 4 tilsatt	MilliQ vann tilsatt	Sluttkonsentrasjon (µg/ml)
Standard 1	1 ml	3 ml	2,5 µg/ml
Standard 2	1 ml	1 ml	5 µg/ml
Standard 3	3 ml	1 ml	7,5 µg/ml

Alle standardene ble filtrert over i vialer med 0,45 µm filter. Standardene er lagret i -80°C frem til bruk

3.7.3 Identifisering og kvantifisering av fenoliske syrer med RSLC

Identifisering og kvantifisering av frie fenoliske syrer ble gjort ved hjelp av rapid separation liquid chromatography (RSLC) system med en Diode Array Detector (DAD). Behandling og analyse av data ble gjort i Chromeleon™. Prøvene ble ført inn i systemet ved hjelp av en kolonne (Waters-UPLC kolonne C8, 1,7 µm, 2,1 x 150 mm). Flowen i kolonnen ble satt til 0,450 ml/min med en temperatur på 50°C og ett trykk på 600-700 bar. Deteksjonen med DAD av standardene CA, p-CA, FA og SA ble utført ved 320nm. Identifiseringen av de frie fenoliske syrene i surdeigsprøvene ble utført ved å sammenligne spekter, retetsjonstid og toppsymmetri mot de eksterne standardene.

Et kromatogram av p-CA, CA, FA og SA fra en tilfeldig valgt er vist i Figur 3.4



Figur 3.4 Frie fenoliske syrer i surdeig med havre og bygg som har gjennomgått metanol og etylacetatekstraksjon. Gul pil peker ut de interessante komponentene CA, p-CA, FA og S

4 Resultater

Resultatdelen er presentert i tre deler, I-III

Del I) Spontan surdeigsfermentering- mikrobiell karakterisering og etablering av surdeigsstammesamling.

Hovedmålet for de spontane surdeigsforsøkene var i hovedsak å få isolert ulike MSB for å oppnå en samling med naturlige surdeigsstammer for videre screening for FAE aktivitet. For å øke diversiteten ble ulike parametere valgt; ulike kornarter, kornsorter, nymalt vs. ferdigmalt mel og temperatur (romtemperatur, 22°C vs. human temperatur, 37°C). Fermenteringene ble utført i 3-4 dager, pH endring ble målt, og den mikrobielle sammensetningen ble karakterisert med dyrkningsbasert (koloniscreening) metode og noen utvalgte surdeigsprøver også med ikke-dyrkningsbasert metode (16S rRNA Illumina dybdesequensering). Sist nevnte ble i all hovedsak utført av Nofima ansatte, men ble inkludert fordi det er en ny høyteknologisk metode med potensiale for utvidet informasjon om den mikrobielle sammensetningen og utviklingen under surdeigsfermentering.

Del II) Screening av surdeigsstammesamling for FAE aktivitet

I denne delen var målet å identifisere isolater fra surdeigsstammesamlingen med FAE screening assay for en potensiell FAE aktivitet. Et utvalg av surdeigsstammesamlingen fra del I og stammer fra Nofima ble screenet for FAE egenskapen. De positive MSB isolatene ble videre benyttet i surdeigsfermentering med havre og bygg for å studere effekten på total frigjøring av frie fenoliske syrer.

Del III) Surdeigsfermentering med FAE positiv starterkultur – effekt på total frie fenoliske syrer

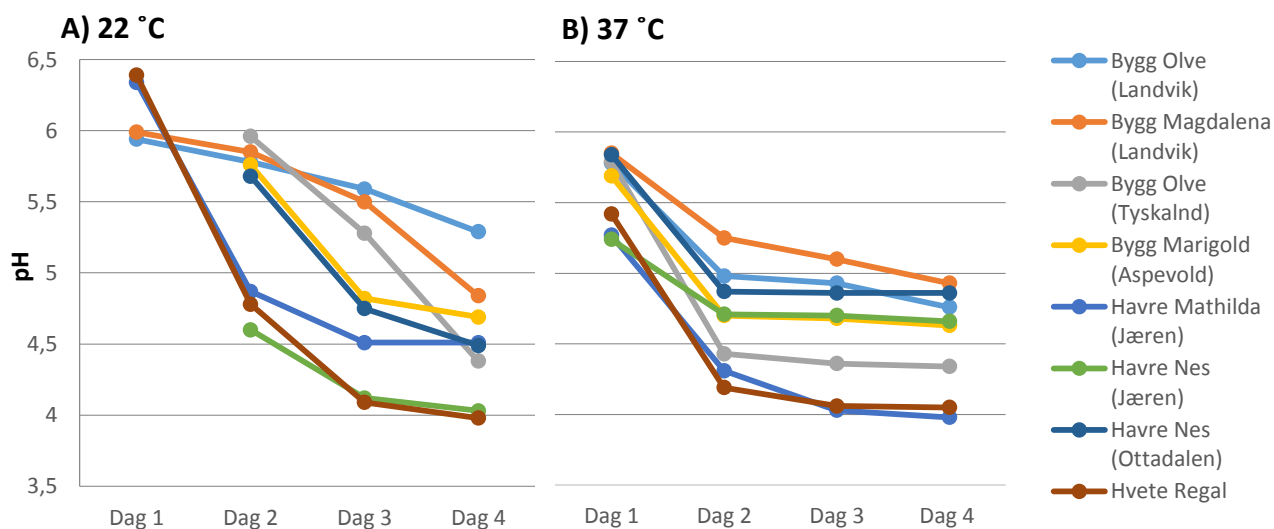
Hovedmålet var å studere effekten av surdeigsfermentering med havre og bygg med FAE positive starterkulturer på total innholdet av de frie fenoliske syrene, ferulsyre, kumarinsyre, p-kumarinsyre og sinapinsyre. Surdeigsprøvene med byggmel ble også behandlet med pentopan for å studere effekten av xylanase på total frie fenoliske syrer.

4.1 Spontan surdeigsfermentering

Spontan surdeig ble laget ved å blande mel og vann til en deig for videre inkubering ved 22°C og/eller 37°C i 3-4 dager. Det ble benyttet mel fra ulike kornarter (bygg, havre, hvete, spelt, rug og emmer), ulike sorter og opprinnelse. Både nymalt korn og ferdigmalt korn ble benyttet. De ulike parameterne påvirket konsistens, lukt og farge (ikke vist), pH, celletall (CFU) og den mikrobielle sammensetningen. Utfordringer med for fuktige MRS skåler og utflytende bakteriekolonier medførte kun et estimat på celletallet under forsøkene, fra ca. 10^5 ved fermenteringsstart til $10^7 - 10^9$ bakterier ved fermenteringsslutt i alle prøvene (data ikke vist). Kolonier fra disse skålene ble plukket og videre benyttet til 16S rRNA sekvensering for karakterisering. Under fermenteringsprosessen ble det også frosset ned surdeig for videre karakterisering av surdeigsmikrobiota med 16S rRNA Illumina dybdesequensering

4.1.1 pH endring under spontan surdeigsfermentering

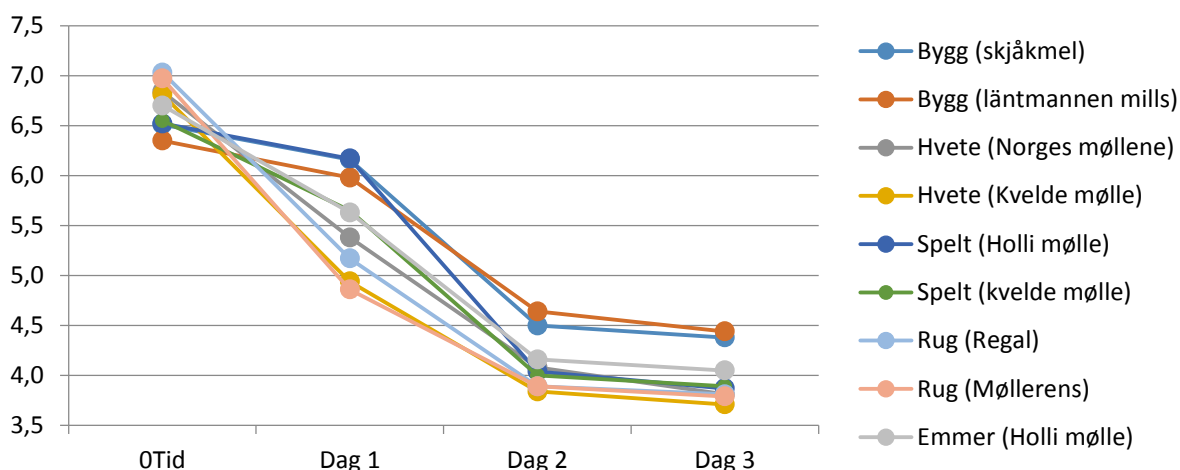
De spontane surdeigsforsøkene ble først utført med nymalt korn av bygg (4 sorter) og havre (3 sorter), og pH nedgangen varierte i varierende grad avhengig av kornsort og temperatur (Figur 4.1). Ferdigmalt hvetemel (Regal) ble inkludert som en kontroll og viste raskest pH nedgang uavhengig av temperatur med slutt pH på 4. Generelt resulterte surdeigene i en pH mellom 4-5 med raskere pH nedgang ved 37 °C.



Figur 4.1 pH endring i spontan surdeig med nymalt korn av bygg og havre, ved 22 °C (A) og 37°C (B).

Byggsortene Olve (Landvik), Magdalena og Marigold hadde en høyere slutt pH ved 22°C sammenlignet med de andre surdeigene, mens ved 37°C var ikke denne trenden lenger gyldig. Surdeig med havresorten Nes (Jæren) hadde lavest pH blant havresurdeigene ved 22°C, mens Mathilda (Jæren) hadde raskest nedgang i pH ved 37°C.

Figur 4.2 viser pH endringen over 3 dager i spontan surdeig med ferdigmalt korn. Spontan surdeig med ferdigmalt korn av bygg (2 sorter), hvete (2 sorter), spelt (2 sorter), rug (2 sorter) og emmer (1 sort) resulterte i slutt pH mellom 3,7 – 4,4.



Figur 4.2 pH endring i spontan surdeig med ferdigmalt korn av hvete, spelt, rug og emmer ved 37°C.

Surdeig av bygg hadde generelt en høyere pH sammenlignet med de andre kornartene og sortene. Hvete fra kvelde mølle viste lavest pH på 3,7 ved fermenteringsslutt. Den største droppen i pH ble observert i surdeig av spelt fra Holli mølle mellom dag 2 og 3.

Tall materiale som ligger til grunn for figur 4.1-4.2 er vist i vedlegg 2.

4.1.2 Karakterisering av MSB under spontan surdeigsfermentering

4.1.2.1 Uttesting av 16S rRNA primere for 16S rRNA koloni screening

Karakterisering av MSB fra surdeig ble utført på kolonier vokst opp på MRS agar. Det ble erfart at metoden hadde sine begrensninger i lyseringstrinnet og PCR reaksjonen. Det ble også kjent at ferskheten til koloniene og mengde koloni var viktig for vellykket lysering fra cellene. For å prøve og oppnå påvisning på lavere taksonomisk nivå fra genus til art ble flere mastermikser og primersett testet ut underveis (Tabell 4.1). Isolatene fra nymalt korn ble sekvensert med hensyn på de variable regionene V3-V4. Dette resulterte i dårlige sekvenser og lite informasjon om art. Isolater fra spontan surdeig av ferdigmalt korn ble derfor

sekvensert for V1-V4 med ulike primersett, hvor 27F/907R fungerte for identifisering på artsnivå. Dette resulterte i at ulike primersett og mastermikser har blitt benyttet for karakterisering av isolater.

Tabell 4.1 Oversikt over hvilke surdeig kolonier var isolert fra og hvilke mastermikser og primersett som ble benyttet i PCR.

Isolater fra	Mastermikser	Primer	Variabel region	PCR betingelser
Nymalt korn	5`Hot Mastermikser	Mangala F/R	V3-V4	Tabell 3.12
Nymalt korn	5`Hot Mastermikser	27F/907R	V1-V4	Tabell 3.13
Nymalt korn	QiaGen Mastermikser	27F/907R	V1-V4	Tabell 3.14

(Jæren, Mathilda 2)

Et utvalg av PCR produktene ble testet på 0,7 % agarose gel for å undersøke om lysing og oppamplifisering var vellykket. Noen av gel bildene er lagt ved i vedlegg 3.

4.1.2.2 Dyrkningsbasert karakterisering - 16S rRNA koloni screening

For karakterisering av isolater med 16S rRNA koloni screening ble enkelt kolonier fra de ulike surdeigene valgt. Fra hver skål ble det plukket 4-10 tilfeldige kolonier. Resultatene nedenfor er i all hovedsak presentert med hensyn på antall isolater per genus (> 2).

Tabell 4.2 viser en oversikt over bakterier identifisert fra surdeig basert på nymalt korn av bygg, havre og hvetemel (22⁰C) fra dag 1-3. I surdeig med bygg ble det hovedsakelig påvist *Enterobacter* og *Enterococcus* i større grad ved dag 2 og 3. I havreprøvene ble det påvist *Lactobacillus* og *Lactococcus* ved dag 2 med en endring til *Enterococcus* etter dag 3. Havresorten Nes (Jæren) ble det ikke påvist bakterier ved dag 2, med *Weissella* ved dag 3.

Fermentering med havresorten Mathilda, Jæren (1) påviste *Lactobacillus* ved dag 2. Sekvenseringen av disse isolatene ga informasjon på lavere taksonomisk nivå enn de andre isolatene, og ble karakterisert som *L. reuteri*. Mathilda, Jæren (1) ble gjentatt i et senere forsøk (2) med FAE positive MSB som resulterte i dominans av *Pediococcus* ved dag 2 og 3. Bakteriene identifisert fra surdeig med hvetemel viste vekst av *Enterococcus* etter dag 2 og *Lactobacillus* ved dag 3.

Tabell 4.2 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (22°C) med nymalt korn av bygg og havre og hvetemel ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V3-V4 primere. Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift

Kornart	Sort, opprinnelse	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Bygg	Olve, Tyskland	<i>Nd</i>	<i>Enterobacter</i> (2), <i>Enterococcus</i> (1)	<i>Enterococcus</i> (4)
Bygg	Olve, Landvik	<i>Enterobacter</i> (2)	<i>Enterobacter</i> (1)	<i>Enterococcus</i> (1)
Bygg	Magdalena, Landvik	<i>Nd</i>	<i>Enterococcus</i> (4)	<i>Enterococcus</i> (1)
Bygg	Marigold, Aspevold	<i>Enterococcus</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (2), <i>Lactobacillus</i> (1)	<i>Enterobacter</i> (1)
Havre	Mathilda, Jæren 1	<i>Enterococcus</i> (1)	<i>Lactobacillus</i> (5)	<i>Enterococcus</i> (5), <i>Enterobacter</i> (1)
Havre ^a	Nes, Jæren	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>Weissella</i> (5)
Havre	Nes, Ottadalen	<i>Nd</i>	<i>Lactobacillus</i> (3), <i>Lactococcus</i> (2)	<i>Enterococcus</i> (4)
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	<i>Lactococcus</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (1), <i>Enterobacter</i> (1)	<i>Enterococcus</i> (2)	<i>Lactobacillus</i> (2)

nd, Ikke detektert grunnet ikke vellykket PCR amplifisering, ^a Surdeigsprøve også analysert med 16S rRNA dybdesekvensering.

Tabell 4.3 viser en oversikt over bakterier identifisert fra surdeig basert på nymalt korn av bygg, havre og hvetemel (37°C) fra dag 1-3. Flere isolater per genus ble identifisert fra surdeigsfermentering ved 37 °C enn fra 22°C. I byggprøvene ble *Lactobacillus* påvist ved dag 2. Den samme dominansen av *Enterococcus* som observert ved 22°C ble påvist ved dag 3.

I havre Mathilda, Jæren (1) ble *Enterococcus* identifisert ved dag 2, mens *Lactobacillus* ble påvist ved dag 3. Sekvenseringen av *Lactobacillus* isolatene fra Mathilda, Jæren (1) ble karakterisert som *L. reuteri*. I surdeig med Mathilda, Jæren (2) ble derimot *Pediococcus* påvist begge dager. Isolatene fra hvetemel viste samme tendens som ved 22 °C.

Tabell 4.3 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (37°C) med nymalt korn av bygg og havre og hvetemel ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V3-V4 primere. Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift

Kornart	Sort, opprinnelse	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Bygg ^a	Olve, Tyskland	<i>Nd</i>	<i>Lactobacillus</i> (3), <i>Lactococcus</i> (1)	<i>Enterococcus</i> (4)
Bygg	Olve, Landvik	<i>Enterococcus</i> (1)	<i>nd</i>	<i>Enterococcus</i> (7)
Bygg	Magdalena, Landvik	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>Enterococcus</i> (4), <i>Streptococcus</i> (1)
Bygg	Marigold, Aspevold	<i>Streptococcus</i> (1)	<i>Enterococcus</i> (1), <i>Lactobacillus</i> 1)	<i>Enterococcus</i> (5)
Havre	Mathilda, Jæren 1	<i>Nd</i>	<i>Enterococcus</i> (7)	<i>Lactobacillus</i> (7)
Havre	Mathilda, Jæren 2*	<i>Pediococcus</i> (9)	<i>Pediococcus</i> (11)	<i>Pediococcus</i> (9)
Havre ^a	Nes, Jæren	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>
Havre	Nes, Ottadalen	<i>Nd</i>	<i>nd</i>	<i>Nd</i>
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	<i>Nd</i>	<i>Enterococcus</i> (6), <i>Enterobacter</i> (1)	<i>Lactobacillus</i> (5)

nd, Ikke detektert grunnet ikke vellykket PCR amplifisering, *spontan surdeigsfermentering fra analyse av frie fenoliske syrer i havre, sekvensert med V1-V4 primere, ^a Surdeigsprøve analysert med 16S rRNA dybdesekvensering.

Tabell 4.4 gir en oversikt over bakterier identifisert fra surdeig med ferdigmalt korn av bygg, hvete, spelt, rug og emmer ved 37°C. Isolatene ble kun sekvensert for dag 1 og 2 på grunn av god pH nedgang i alle surdeigsprøvene. I surdeig av bygg ble hovedsakelig *Enterococcus* påvist ved dag 2, mens fra hvete ble isolater av *Pediococcus* og *Lactobacillus* identifisert. De resterende kornartene spelt, rug og emmer viste dominans av *Pediococcus* etter dag 2. I surdeigsprøvene av bygg, hvete og spelt ble det også påvist *Weissella* etter dag 1, og *Enterobacter* i surdeig med bygg og spelt.

Tabell 4.4 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (37°C) med ferdigmalt korn av bygg, hvete, spelt, rug og emmer ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V1-V4 primere. Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift

Kornart	Sort, opprinnelse	Dag 1	Dag 2
Bygg	Skjåkmel ^a	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Enterococcus</i> (2), Enterobacter(1)	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Enterococcus</i> (8)
Bygg	Läntmannen Mills ^a	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Weissella</i> (1), <i>Enterobacter</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Enterococcus</i> (6)
Hvete	Norges møllene ^a	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Weissella</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (1)
Hvete	Kvelde mølle ^a	<i>Pediococcus</i> (3), <i>Lactobacillus</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (3), <i>Lactobacillus</i> (4)
Spelt	Holli mølle ^a	<i>Pediococcus</i> (1), <i>Enterobacter</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (8)
Spelt	Kvelde mølle ^a	<i>Weissella</i> (2), <i>Pediococcus</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (2)
Rug	Regal ^a	Nd	<i>Pediococcus</i> (2)
Rug	Mølleren ^a	<i>Pediococcus</i> (1)	<i>Pediococcus</i> (3)
Emmer	Holli mølle ^a	<i>Pediococcus</i> (1),	<i>Pediococcus</i> (3)

nd, Ikke detektert grunnet ikke vellykket PCR amplifisering, ^a Surdeigsprøve analysert med 16S rRNA dybdesequensering

Pediococcus og *Weissella* ble identifisert på artsnivå (*Pediococcus pentosaceus*, *Weissella cibaria*) ved sekvensering av V1-V4 regionene, men klarte ikke å skille mellom *Lactobacillus plantarum/pentosus/arizonensis* eller *curvatur/sakei*, *Enterococcus durans/faecium/lactis* eller *Enterobacter*.

4.1.2.3 Ikke-dyrkningsbasert karakterisering-16S rRNA Illumina dybdesequensering

Surdeigsmikrobiota fra utvalgte surdeigsprøver ble også karakterisert med ikke-dyrkningsbasert metode for å kunne utfylle de begrensede resultatene fra koloni screeningen og for å sammenligne resultatene. Dataprosesseringen etter sekvensering på MiSeq resulterte i OTU (operational taxonomic unit) tabeller som viste påvisning av ikke bare MSB i surdeigsprøvene, men også en stor andel av spesielt orden *Enterobacteriales*, selv i prøver ved lav pH. Tabell 4.5 gir en oversikt over relativ kvantitativ påvisning av MSB, orden *Lactobacillales*, i forhold til total mikrobiotaen påvist. Prosent er indikert. (dag 1 og 2 er lagt ved i vedlegg 4)

I surdeig av bygg var det dominans av *Enterococcus* ved begge temperaturer etter dag 3. I havreprøvene var *Weissella* den dominerende bakterien ved både 22^o C og 37^o C. I tillegg til *Weissella* viste også havreprøven Mathilda (Jæren 2) *Lactococcus*, *Leuconostoc* og

f_Leuconostocaceae_other. Surdeig av hvete (Regal) hadde en mer varierende sammensetning av *f_Lactobacillales_other*, *Lactococcus* ved 37°C, i tillegg til *o_Lactobacillales_other* ved 22°C. De andre hveteprovne hadde derimot dominans av *Pediococcus*, men også noe *Weissella* og *Lactobacillus*. I Surdeig av spelt, rug og emmer dominerte *Pediococcus*.

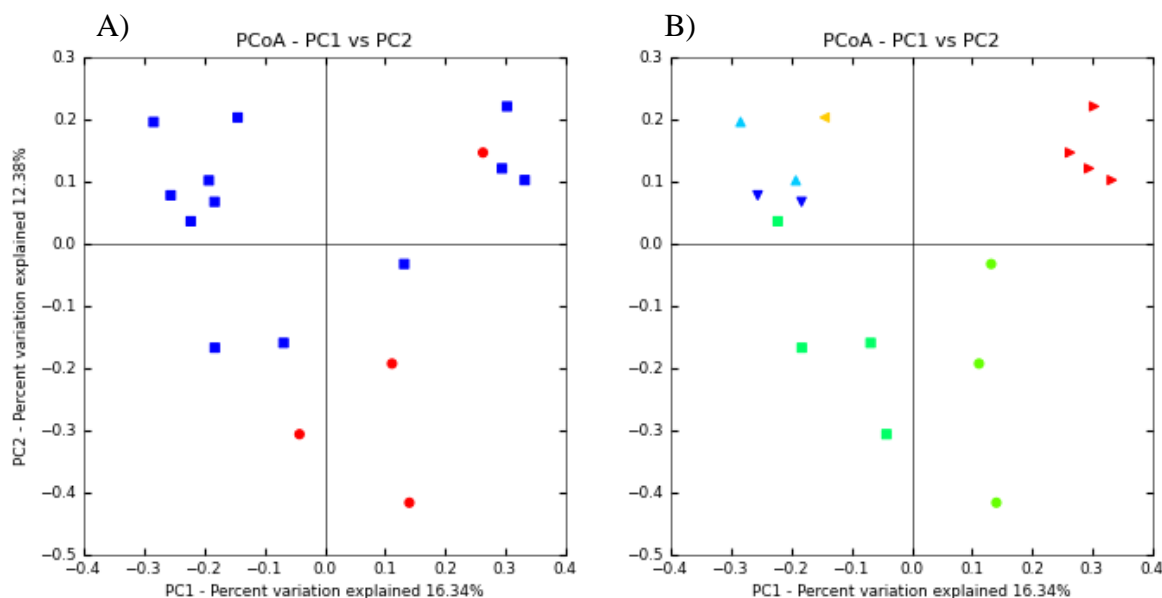
Tabell 4.5 Oversikt over prosent *Lactobacillales* genera detektert av total mikrobiotaen ved dag 3 i utvalgte surdeigsprøver ved hjelp av 16S rRNA Illumina dybdesequensering. Kun *Lactobacillales* genera >1 % er inkludert. Dominerende genus ved dag 3 indikert med fet skrift.

Kornart	Sort, opprinnelse	Temp	Dag 3
Bygg ^a	Olve, Tyskland	22	<i>Enterococcus</i> (39)
Bygg ^a	Olve, Tyskland	37	<i>Enterococcus</i> (36), <i>Streptococcus</i> (6)
Bygg ^b	Lantmannen Mills	37	<i>Enterococcus</i> (60)
Bygg ^b	Skjåkmel	37	<i>Enterococcus</i> (58)
Havre ^a	Nes, Jæren	22	<i>Weissella</i> (88)
Havre ^a	Nes, Jæren	37	<i>Weissella</i> (1)
Havre ^a	Mathilda, Jæren2	22	<i>Weissella</i> (38), <i>Lactococcus</i> (18), <i>Leuconostoc</i> (12), <i>f_Leuconostocaceae_other</i> (3)
Havre ^a	Mathilda, Jæren2	37	na
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	22	<i>f_Lactobacillales_other</i> (49), <i>Lactococcus</i> (17), <i>o_Lactobacillales_other</i> (5)
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	37	<i>f_Lactobacillales_other</i> (65), <i>Lactococcus</i> (2)
Hvete ^b	Norges Møllene	37	<i>Pediococcus</i> (32), <i>Weissella</i> (9)
Hvete ^b	Kvelde Mølle	37	<i>Pediococcus</i> (38), <i>Lactobacillus</i> (27), <i>f_Lactobacillales_other</i> (2)
Spelt ^b	Holli Mølle	37	<i>Pediococcus</i> (57)
Spelt ^b	Kvelde Mølle	37	<i>Pediococcus</i> (47), <i>Weissella</i> (4), <i>f_Lactobacillales_other</i> (1),
Rug	Møllerens	37	<i>Pediococcus</i> (62), <i>Weissella</i> (1)
Emmer	Holli Mølle	37	<i>Pediococcus</i> (50), <i>Enterococcus</i> (3)

nd, ikke påvist *Lactobacillales* genera, na, ikke analysert, ^a Surdeigsprøve basert på nymalt korn, ^b Surdeigsprøve basert på ferdigmalt korn

Beta diversitetsanalyse av *Lactobacillales* surdeigsmikrobiotaen ved dag 3 ble utført med QIIME. Figur 4.3 viser spredningen i de ulike prøvene. Prosentandelen av bakteriesammensetningen fra tabell 4.5 ligger til grunn for PCoA plotene. I diversitetsanalysen er det ikke tatt hensyn på størrelsen til bakteriegruppene (uvektet). Beta

diversiteten beskriver hvor forskjellige prøvene er med hensyn på bakteriesammensetningen. Figur 4.3 A) viser hvor forskjellig bakteriesammensetningen er ved 22°C og 37°C, og B) viser hvor forskjellig kornart er med hensyn på bakteriesammensetningen.



Figur 4.3 Beta diversitetsanalyse (uvektet) av *Lactobacillales* surdeigsmikrobiotaen ved dag 3. A) Temperatur (rød, 22°C; blå, 37°C), B) Kornart (rød, bygg; grønn sirkel, havre; grønn boks, hvete; mørkeblå, spelt; lyseblå, rug; gul, emmer).

4.2 Screening av surdeigsstammesamling for FAE aktivitet

4.2.1 Test av screenings assay metoden

Et utvalg av Nofimas stammesamling ble testet med screenings metoden for deteksjon av FAE aktivitet, både bakteriekultur og koloni. *L. reuteri* SD2112 og *L. johnsonii* LA1 ble benyttet som teststammer. Inokulering med bakteriekultur (10µl) på MRS-EF skåler ga ingen FAE aktivitet etter 7 dager. Grunnet negativ resultat ble skålene laget tynnere for å undersøke om denne faktoren utgjorde negativ aktivitet. Selv om skålene ble optimalisert ble det ikke detektert aktivitet. Utstyking av rendyrket koloni ble deretter testet, dette resulterte i positiv FAE aktivitet for teststammene, ved å danne klare soner rundt det inokulerte området (ikke vist). Utstrykningsmetoden ble derfor benyttet videre i screeningen av surdeigsstammesamlingen og stammer fra Nofima.

4.2.2 Screening av surdeigsstammesamling og stammer fra Nofima

Basert på karakterisering av bakterieisolatene ble utvalgte MSB valgt ut til screening for FAE aktivitet. Et utvalg på totalt 40 isolater fra stammesamlingen samt 8 stammer fra Nofima ble screenet. Isolatene ble valgt fra ulike surdeigsfermenteringer med variasjon med hensyn på kornsort, meltype og temperatur. Hver enkelt stamme ble screenet i to paralleller (totalt 96 screeninger ble utført). Tabell 4.6 gir en oversikt over hvilke MSB og ulike kornarter, nymalt vs. ferdigmalt og temperatur som ble screenet for FAE aktivitet.

Tabell 4.6 Oversikt over hvilke isolater som er testet for FAE aktivitet. Tabellen viser også fra hvilke temperatur, meltype og kornart isolatene stammer fra.

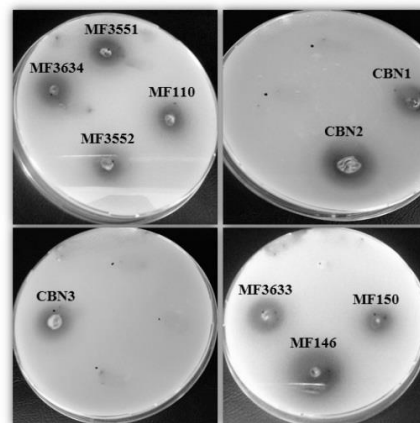
Kornart	Mel type	Temp	Isolater til FAE screening (n=antall)
Bygg	Nymalt	22/37	<i>Enterococcus</i> (1) / <i>Enterococcus</i> (3)
	Ferdigmalt	37	<i>Pediococcus</i> (4), <i>Weissella</i> (1), <i>Enterococcus</i> (5)
Havre	Nymalt	22/37	<i>Lactobacillus</i> (3), <i>Weissella</i> (1) / <i>Enterococcus</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (1)
Hvete	Ferdigmalt (Regal)	22 /37	<i>Lactobacillus</i> (1) / <i>Lactobacillus</i> (1)
	Ferdigmalt	37	<i>Pediococcus</i> (4), <i>Weissella</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (3)
Emmer	Ferdigmalt	37	<i>Pediococcus</i> (2)
Rug	Ferdigmalt	37	<i>Pediococcus</i> (3)
Spelt	Ferdigmalt	37	<i>Pediococcus</i> (4), <i>Weissella</i> (1)

I FAE screening av isolatene *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* samt de fleste *Lactobacillus* ble ingen klar sone observert, dette indikerte ingen FAE aktivitet hos noen av de typiske surdeigs stammene. Tre av *Lactobacillus* isolatene fra havre Mathilda, Jæren viste derimot positiv aktivitet. De positive stammene ble identifisert som *L. reuteri* ved 16S rRNA kolonisekvensering og vil videre bli referert som CBN1, CBN2 og CBN3, hvor CBN1 ble isolert fra dag 2 (22°C) og CBN2 og CBN3 fra dag 3 (37°C)

Tabell 4.7 viser en oversikt over FAE aktiviteten bakteriestammene etter 7 døgn. Stammer fra Nofimas stammesamling *L. amylovorus* NRRL B-4538, *L. amylovorus* NRRL B-4542, *L. reuteri* DSM20016, *L. reuteri* DMS 17938, *L. reuteri* 6475, *L. reuteri* SD2112 og *L. johnsonii* LA1 viste alle FAE aktivitet. Basert på tidligere forsøk med den probiotiske stammen *L. johnsonii* LA1, *L. reuteri* SD2112 og *L. plantarum* WCFS1 ble disse benyttet som positive og negativ kontroller.

Tabell 4.7 FAE aktiviteten for positive stammer av MSB, Sonene er målt i mm etter 7 dager Hvor 10 mm > + , 10-20 mm ++ og 20 mm > +++

Stamme	Navn	FAE 1.forsøk	FAE 2.forsøk
CBN1	<i>L. reuteri</i>	17 ++	17 +++
CBN2	<i>L. reuteri</i>	20 +++	20 +++
CBN3	<i>L. reuteri</i>	13 ++	15 ++
DSM 20016	<i>L. reuteri</i>	13 ++	15 ++
NRRL B-4538	<i>L. amylovorus</i>	23 +++	20 ++
NRRL B-4542	<i>L. amylovorus</i>	13 ++	16 ++
WCFS1 *	<i>L. plantarum</i>	0	0
DSM 17938	<i>L. reuteri</i>	15 ++	16 ++
6475	<i>L. reuteri</i>	8 +	16 ++
LA1	<i>L. johnsonii</i>	16 ++	18 ++
SD2112	<i>L. reuteri</i>	9 +	17 ++



* Negativ kontroll (ingen sone dannet.)

Sonene som ble dannet varierte i størrelse og klarhet. Størst sone (høyest FAE aktivitet) i mm ble observert for stammene *L. amylovorus* NRRL B-4538 og *L. reuteri* CBN2, etterfulgt av *L. reuteri* CBN1, *L. johnsonii* LA1, *L. reuteri* DSM17938, *L. amylovorus* NRRL B-4542, *L. reuteri* DSM 20016, *L. reuteri* CBN3, *L. reuteri* SD2112 og *L. reuteri* 6475. De to sistnevnte viste liten aktivitet i første forsøk, men en større aktivitet i andre forsøk.

4.3 Surdeigsfermentering med havre og FAE positive MSB starterkulturer – effekt på total frie fenoliske syrer

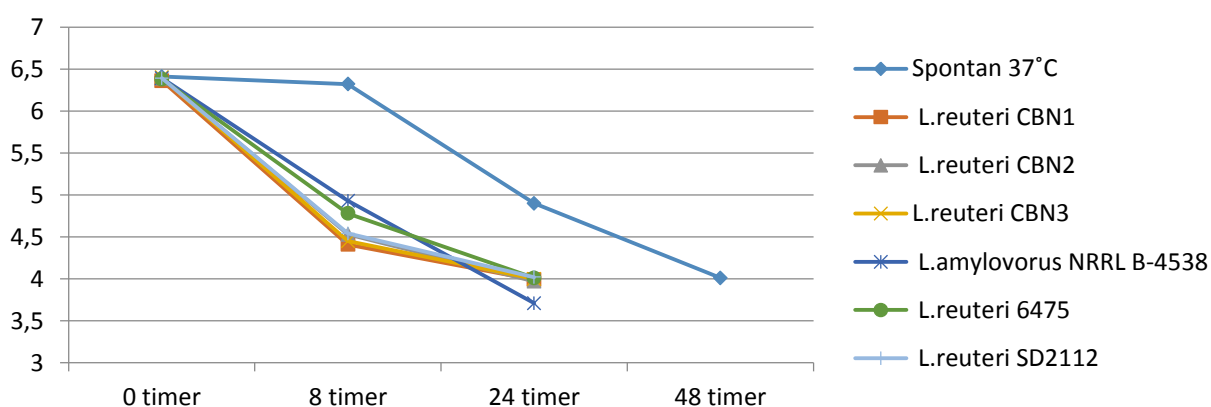
Havre (Mathilda, Jæren) ble benyttet i surdeigsfermentering med FAE positive MSB starterkulturer. Kornet ble valgt på bakgrunn av at de FAE positive *L. reuteri* isolatene (CBN) var isolert fra surdeig med dette utgangsmaterialet. Det var derfor ønskelig å undersøke om disse bakteriene ville anrikes igjen og hvilken effekt de ville ha på frigjøring av fenoliske syrer under en spontan reaksjon. Dette materialet resulterte også i en vellykket syring ved 37°C (pH ca. 4).

Hele havrekorn ble malt til mel på en mølle før det ble benyttet i surdeig. I prøvene med havre og MSB startere ble det tilsatt rundt 10^7 bakterier, dette ble kontrollert ved utplating av inokulum (ikke vist). Uttak av surdeigsprøver til pH, celletall og analyse av frie fenoliske syrer ble samlet underveis i forsøket.

4.3.1 pH og celletall

Surdeig med havremel ble laget ved å blande mel, vann og MSB starterkulturer. Stammene som ble benyttet var *L. reuteri* 6475, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* CBN1, *L. reuteri* CBN2, *L. reuteri* CBN3 og *L. amylovorus* NRRL B-4538. Alle surdeigene ble videre inkubert ved 37 °C i 8-24 timer (48 timer for spontan).

Figur 4.3 viser pH nedgangen i surdeigsfermentering med FAE positive MSB startere. Den spontane prøven med eddiksyre er ikke vist i figuren. Etter 8 timer varierte pH i surdeig med MSB startere fra 4,4 til 4,9 og sank til ~3 – 4 etter 24 timer.



Figur 4.4 pH endringer under surdeigsfermentering av havre med FAE positive MSB ved 37 °C i 48 timer.

Det ble observert en raskere pH nedgang i alle prøvene med tilsatte startere i forhold til spontan surdeig, men denne forskjellen utjevnet seg ved 48 timer. Fermentering med stammen *L. amylovorus* NRRL B-4538 hadde størst effekt på pH med 3,7 etter 24 timer. På grunn av den raske nedgangen i pH ble surdeig med MSB starterkulturer stoppet etter 24 timer, mens den spontane prøven ble fulgt enda 1 dag.

Ved dannelsen av syre økte bakteriepopulasjonen i prøvene (data ikke vist). Celletallet i surdeig med MSB startere økte til 10^8 - 10^9 cfu g^{-1} etter 8 timer, ingen vekst ble observert i spontan surdeig (fortsatt høy pH). Celletallet i spontan surdeig økte med 1 log fra 10^7 til 10^8

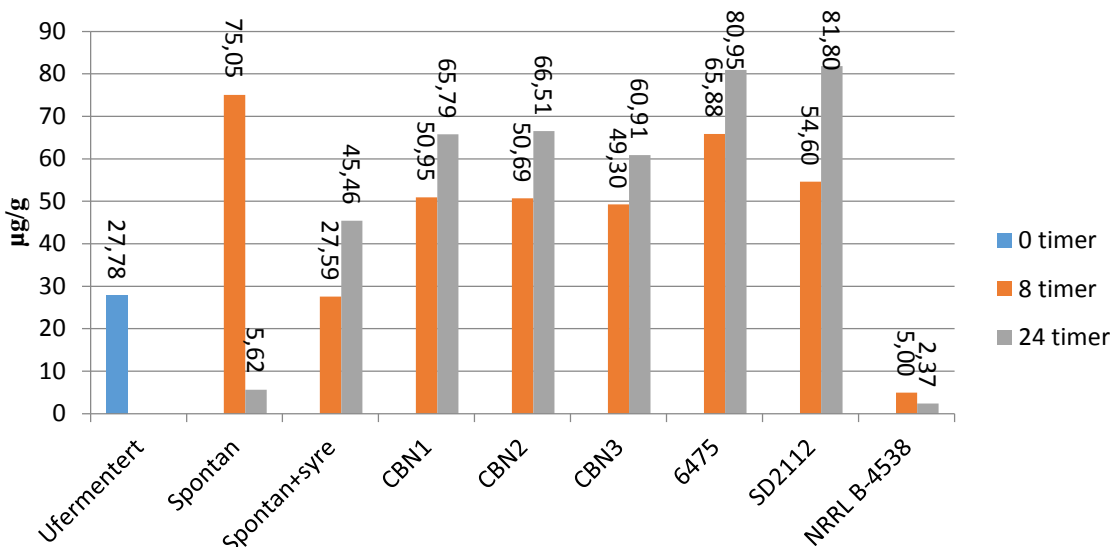
cfu g⁻¹ etter henholdsvis 24 timer og 48 timer. Kolonier fra spontan surdeig ble videre identifisert med 16S rRNA kolonisekvensering (Tabell 4.3 Mathilda, Jæren (2)).

4.3.2 Effekt av surdeigsfermentering på total frie fenoliske syrer i havre

De frie fenoliske syrene som ble studert var ferulsyre (FA), p-kumarinsyre (p-CA), kaffesyre (CA) og sinapinsyre (SA). Disse ble detektert ved bølgelengde 320 nm og identifisert på bakgrunn av retensjonstid, toppsymmetri og UV-spekter med kjente standarder. Fermentering med FAE positive MSB på frigjøringen av total frie fenoliske syrer i havremel var kun basert på en måling, derfor ikke mulig å uttale seg om signifikante forskjeller i dette avsnittet. Ufermentert (0 tid), spontan (vannkontroll) og spontan surdeig med tilsatt eddiksyre (syrekontroll, pH~ 3,8) ble også inkludert for kontrollere at frigjøringen var en effekt av bakteriell fermentering. Eksempel på utregnet mengde frie fenoliske syrer i prøven er vist i vedlegg 5.

Total frie fenoliske syrer i surdeigfermentering med FAE positive MSB starterkulturer er illustrert i Figur 4.5. Effekten av spontan surdeig (vannkontroll) viste en overraskende økning av total frie fenoliske syrer etter 8 timer. Spontan surdeig inneholdt henholdsvis 75,05 µg/g og 5,62 µg/g total frie fenoliske syrer ved 8 og 24 timer. Dette var høyere enn i den ufermenterte (0 t) prøven som inneholdt på 27,78 µg/g total frie fenoliske syrer.

Sammenlignet med den ufermenterte prøven ble det observert en økning av de frie fenoliske syrene FA og p-CA i spontan prøven med eddiksyre etter 24 timer. Total innholdet av frie fenoliske syrer var 24,58 µg/g etter 8 timer og 45,46 µg/g etter 24 timer.



Figur 4.5 Total frie fenoliske syrer i surdeigsfermentering med FAE positive MSB starterkulturer.

Surdeig fermentert med FAE positive MSB starterkulturer viste et lavere innhold av total frie fenoliske syrer etter 8 timer sammenlignet med spontan prøven. Etter 24 timer ble det derimot observert et høyere nivå av total frie fenoliske syrer i disse prøvene enn i spontan surdeig.

Den største frigjøringen ble detektert i surdeig induisert med stammene *L.reuteri* SD2112 og *L.reuteri* 6475 med total innhold av frie fenoliske syrer på henholdsvis 81,80 µg/g og 80,95 µg/g. Det ble også detektert et høyt nivå av fri FA og p-CA i prøvene fermentert med SD2112 og 6475. Innholdet av fri FA var henholdsvis 38,99 og 38,57 µg/g, mens fri p-CA utgjorde henholdsvis 25,86 µg/g og 25,56 µg/g av total frie fenoliske syrer etter 8 og 24 timer.

Fermentering med *L. reuteri* CBN1, *L. reuteri* CBN2 og *L. reuteri* CBN3 hadde et lavere nivå av total frie fenoliske syrer sammenlignet med spontan surdeig og surdeig med stammene 6475 og SD2112. I surdeig med CBN1, CBN2 og CBN3 var innholdet av total frie fenoliske syrer 50,95 µg/g, 50,69 µg/g og 49,30 µg/g etter 8 timer og 65,79 µg/g, 66,51 µg/g og 60,91 µg/g etter 24 timer.

Innholdet av fri p-CA var 15,97 µg/g, 15,53 µg/g og 14,73 µg/g i prøvene fermentert med CBN1, CBN2 og CBN3 ved 24 timer. Fri p-CA i var henholdsvis lavere i disse prøvene enn i spontan surdeig og surdeig fermentert med 6475 og SD2112.

I surdeig fermentert med *L. amylovorus* NRRL B-4538 ble ingen frigjøring observert ved 8 eller 24 timer. Innholdet av total frie fenoliske syrer var henholdsvis 5,00 µg/g og 2,37 µg/g.

Innholdet av de frie fenoliske syrene dominerte i varierende grad, ferulsyre (FA) > p-Kumarinsyre (p-CA), Sinpainsyre (SA) > Kaffesyre (CA) i alle prøvene, bortsett fra i spontan surdeig med eddiksyre og surdeig fermentert med NRRL B-4538. Vedlegg 7 viser innholdet av de frie fenoliske syrene p-CA, CA, FA og SA som gir grunnlaget figur 4.5.

4.4 Surdeigsfermentering med bygg, FAE positive MSB starterkulturer og pentopan – effekt på total frie fenoliske syrer

I surdeigsfermentering med havre (avsnitt 4.3.2) viste spontan surdeig en uvanlig sterk frigjøring av frie fenoliske syrer. Det var derfor ønskelig å utføre et avsluttende eksperiment med kommersielt mel for å studere spontan surdeig som ikke frigjør fenoliske syrer. Ferdigmalt byggmel fra Ottadalen Mølle ble benyttet og *L. reuteri* SD2112 ble inkludert som en kontroll for frigjøringen i dette forsøket. Forsøksoppsettet var basert på en annen students masterstudie som viste at fermentering med *L. reuteri* SD2112 hadde en signifikant effekt på frigjøringen av total frie fenoliske syrer i byggmel.

I surdeig med bygg og MSB startere ble det tilsatt rundt 10^7 bakterier, dette ble kontrollert ved utplating av inokulum (ikke vist). Surdeigsprøvene ble behandlet med og uten pentopan for å undersøke om innholdet av de frie syrene økte ved enzymbehandling. Uttak av surdeigsprøver til pH, celletall og analyse av frie fenoliske syrer ble samlet underveis i forsøket.

4.4.1 pH og celletall

Byggmel fra Ottadalen mølle ble blandet med vann og MSB starterkultur med *L. reuteri* 6475, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* CBN2, *L. reuteri* CBN3 og *L. amylovorus* NRRL B-4538. Pentopan ble tilsatt de respektive surdeigsprøvene etter at vannet var tilsatt. Alle surdeigsprøvene ble videre inkubert ved 37°C i 24 timer.

Start pH i alle prøvene lå rundt 5,9. Generelt resulterte fermentering med MSB startere i en pH mellom 3,5- 3,8, mens spontan surdeig viste ingen pH nedgang etter 24 timer. Tilsetning av pentopan viste ingen effekt på pH og ble derfor ikke plattet ut på skål. Celletallet økte betraktelig i surdeig med MSB startere med en bakteriepopulasjon på $10^8 - 10^9$ cfu g⁻¹ ved fermenteringsslutt. Spontan surdeig hadde ingen nedgang i pH, men allikevel ble det konstatert en bakteriepopulasjon på 10^8 cfu g⁻¹.

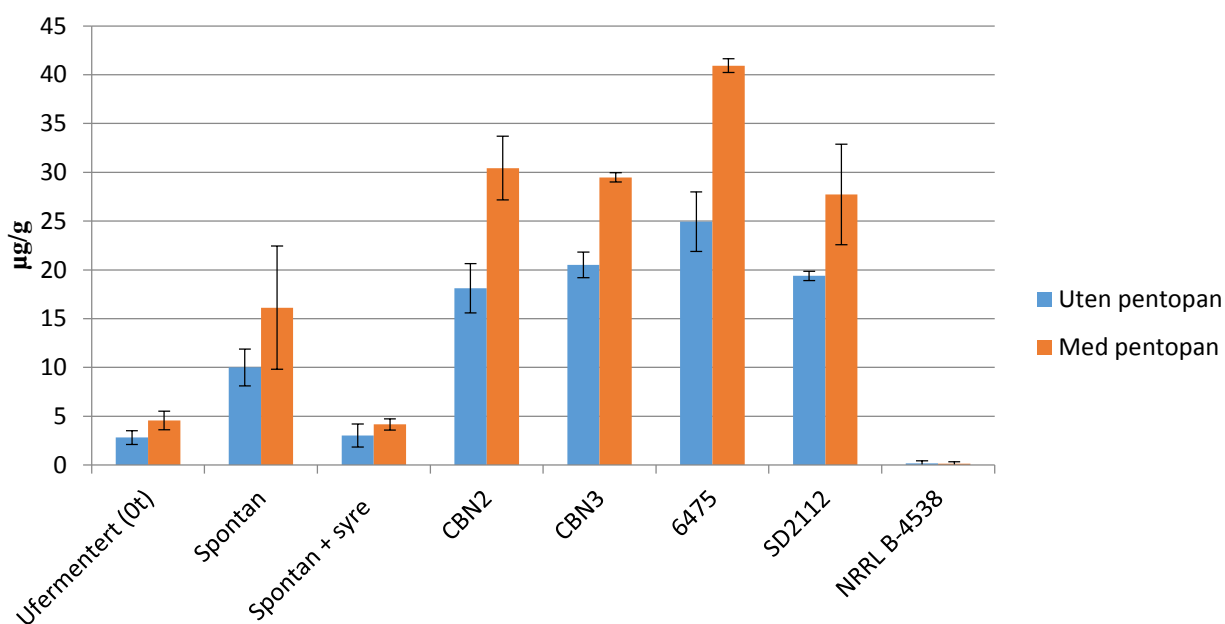
pH målinger og celletallet er lagt ved i vedlegg 6.

4.4.2 Effekt av surdeigsfermentering på total frie fenoliske syrer i bygg

De frie fenoliske syrer i bygg ble detektert og studert som i avsnitt 4.3.1. Forsøket ble utført i to biologiske gjentak og resultatene er presentert som gjennomsnittet av begge gjentakene med standardavvik.

Figur 4.6 viser effekten av surdeigsfermentering med FAE positive MSB startere samt behandling med pentopan på nivået av total frie fenoliske syrer i bygg. Spontan surdeig uten pentopan hadde et innhold på $10,00 \pm 1,89 \mu\text{g/g}$ total frie fenoliske syrer. Dette var signifikant høyere enn ufermentert (0 tid) prøve med et innhold på $2,81 \pm 0,70 \mu\text{g/g}$ total frie fenoliske syrer. Ved pentopanbehandling økte innholdet av total frie fenoliske syrer til henholdsvis $16,12 \pm 6,31 \mu\text{g/g}$ og $4,56 \pm 0,95 \mu\text{g/g}$. Det ble ikke detektert fri p-CA i hverken spontan surdeig med pentopan eller spontansurdeig uten pentopan.

Spontan surdeig med eddiksyre viste ingen signifikant effekt på innholdet av total frie fenoliske syrer sammenlignet med ufermentert prøve.



Figur 4.6 Total frie fenoliske syrer i surdeigsfermentering med FAE positive MSB starterkulturer inkludert pentopan. Standardaviket er indikert

Innholdet av total frie fenoliske syrer i prøvene fermentert med *L. reuteri* 6475 og *L. reuteri* CBN3 var henholdsvis $24,94 \pm 3,05 \mu\text{g/g}$ og $20,51 \pm 1,31 \mu\text{g/g}$. Tilsetting av pentopan til prøvene fermentert med 6475 og CBN3 viste en signifikant effekt på frigjøringen med et innhold på henholdsvis $40,92 \pm 0,71 \mu\text{g/g}$ og $29,48 \pm 0,47 \mu\text{g/g}$ total frie fenoliske syrer.

Prøvene fermentert med *L. reuteri* CBN2 og *L. reuteri* SD2112 hadde også en signifikant økning i innholdet av total frie fenoliske syrer ved tilsetning av pentopan.

Innholdet av fri FA økte signifikant etter behandling med pentopan i prøvene fermentert med 6475, SD2112, CBN2 og CBN3. De resterende syrene CA, p-CA og SA hadde ingen signifikant økning fra pentopanbehandlingen.

Effekten av surdeigsfermentering med MSB startere og pentopan på nivået av total frie fenoliske syrer hadde en signifikant økning i alle prøvene, bortsett fra *L. amylovorus* NRRL B-4538. Innholdet av total frie fenoliske syrer fermentert med NRRL B-4538 var $0,19 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$. Det var ingen signifikant forskjell på innholdet av de frie fenoliske syrene eller total frie fenoliske syrer ved tilføring av pentopan til prøvene med NRRL B-4538. Vedlegg 8 viser innholdet av de frie fenoliske syrene p-CA, CA, FA og SA som gir grunnlaget figur 4.6.

5 Diskusjon

Hovedmålet med denne oppgaven var i hovedsak å studere effekten av surdeigsfermentering med FAE positive MSB starterkulturer på innholdet av total frie fenoliske syrer. På bakgrunn av dette ble spontane surdeigsfermenteringer med ulike parametere laget for å identifisere og karakterisere MSB som videre ble screenet for FAE aktivitet. Et utvalg av FAE positive MSB isolater ble benyttet som starterkultur i fermentering med havre (Mathilda, Jæren) og bygg (Ottadalen, Mølle) for å studere effekten på frigjøringen av total frie fenoliske syrer.

5.1 Spontan surdeigsfermentering

Surdeigsfermentering med ulike parametere; kornarter (bygg, havre, hvete, spelt, rug og emmer), kornsorter, nymalt vs ferdigmalt, og temperatur ble preparert og fulgt i 3-4 dager. Den bakterielle sammensetningen under fermenteringsprosessen ble undersøkt med både dyrkningsbasert metode (16S rRNA koloni screening) og ikke-dyrkningsbasert metode (Illumina dybdesequensering).

5.1.1 pH og celletall

Selvom det var små variasjoner mellom surdeigene gjennom fermenteringsprosessen nådde de lavest pH og celletall etter dag 3 og 4. Ved dag 3 nådde MSB til stede i alle surdeigene en bakteriepopulasjon på 10^8 - 10^9 cfu g^{-1} . Tidligere studier med spontan surdeig av rug og havre viste at celletallet var rundt 10^9 når pH lå mellom 3 og 4. (Arendt et al. 2007). I surdeig av nymalt og ferdigmalt korn økte bakteriepopulasjonen ca 4 -5 log cfu g^{-1} fra fermenteringsstart. I starten av fermenteringen vil det være generell konkurransevne som gjør at bakteriepopulasjonen øker og etterhvert dominerer. Syreproduksjonen skjer ikke før i slutten av denne vekstfasen, så pH vil bare delvis påvirke celletallet (Axelsson 2004).

De spontane surdeigene resulterte hovedsakelig i en slutt pH mellom 4-5 i alle prøvene og det ble observert en raskere pH nedgang i surdeig ved 37°C enn ved 22°C. Disse resultatene er i samsvar med tidligere studier med surdeig (Charalampopoulos et al. 2002). Forklaringen på den raske pH nedgangen er i hovedsak tilstedeværelsen av MSB som finnes naturlig til stede på kornet eller melet, og deres evne til å fermentere glukose gjennom EMP eller 6-PG/PK reaksjonsveien. Endeprodukt i fermenteringen er i hovedsak melkesyre eller andre organiske syrer som syrliggjør produktet og senker pH (Axelsson 2004).

Spontan surdeig med bygg hadde generelt en høyere slutt pH ved dag 3 sammenlignet med de andre surdeigene. Dette kan muligens forklares ved at den mikrobielle sammensetningen på

byggkornet eller i melet skiller seg fra de andre korntypene, eller at tilgjengeligheten på næringsstoffer som for eksempel enkle sukkerarter i kornet skiller seg fra de andre kornartene (Valmorri et al. 2006)

5.1.2 Karakterisering av MSB under spontan surdeigsfermentering

Målet i for denne delen var å oppnå en stammesamling av ulike MSB. Den bakterielle sammensetningen i surdeig er påvirket av flere faktorer, som kornart, kornsort, temperatur, pH og enzym aktivitet. Kornart og sortens opphav er en viktig kilde til ulike MSB stammer som er metabolsk aktive eller inaktive under fermenteringsprosessen. (De Vuyst & Vancanneyt 2007)

Isolering av MSB er avhengig av vekstmedie og vekstforhold som pH, temperatur og oksygentilgang. I denne oppgaven ble koloni screening og 16S rRNA sekvensering utført på kolonier isolert fra MRS skåler. MRS er et vanlig medium for MSB, ikke veldig selektiv, men kan være hemmende mot andre bakterier som for eksempel enterobakterier. Sekvenseringen ble utført med hensyn på V3-V4 regioner på isolater fra surdeig med nymalt korn, og V1-V4 fra surdeig med ferdigmalt korn. Dette resulterte i flere dårlige sekvenser og lite informasjon om art. Tidligere studier på hvete surdeig klassifiserte og karakteriserte flere arter ved hjelp av 16S rRNA sekvensering (De Vuyst & Vancanneyt 2007). Klassifisering av MSB på artsnivå er vanligvis gjort ved å sekvensere de variable regionene V1, V2 og V6 av 16S rRNA genet (Balcázar et al. 2007). Dette samsvarer ikke helt med resultatene oppnådd i denne oppgaven, da flere av isolatene bare ga informasjon om genus. Grunnen til at sekvenseringen ikke alltid ga vellykket PCR produkt kan være at koloni – screeningsmetoden ikke var god nok på disse isolatene, med tanke på lysing av celler for å frigjøre DNA eller mengde koloni som ble benyttet. Sammen med dårlige sekvenser og få identifiserte isolater kan feil identifisering ha oppstått. Med hensyn på at det i hovedsak ble identifisert få isolater fra hver surdeig, vil følgene avsnitt diskuteres i henhold til tendensen av MSB, da det er vanskelig å konkludere noe om dominans og hva som er typisk for hver enkelt surdeig.

I hovedsak ble isolatene karakterisert som *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus* og *Pediococcus* fra de ulike surdeigene. I en oversikt av De Vuyst & Neysens (2005) kommer det frem at i tillegg til *Lactobacillus*, er surdeig også assosiert med *Leconoctoc* spp, *Weissella* spp., *Pediococcus* spp, og *Enterococcus* spp. Funnene i denne oppgaven viste at de identifiserte isolatene er i samsvar med flere av de vanlige surdeigsbakteriene.

I surdeig med nymalt bygg (flere sorter) ble det påvist *Enterobacter* og *Enterococcus* etter dag 3 ved både 22°C og 37°C. *Enterococcus* innehar egenskaper som gjør at de tåler høy pH sammenlignet med andre MSB. Enterokokker kan også ha en annen metabolisme enn mange av laktobacillene som gjør at de produserer andre endeprodukter i tillegg til melkesyre (Axelsson 2004), dette kan være en mulig forklaring da slutt pH i disse surdeigene generelt var høyere enn for de andre fermenteringene. Tilstedeværelsen av *Enterobacteriaceae* har blitt funnet i spontan surdeigsfermentering, men blir ofte utkonkurrert og dominert av MSB etter tid (De Vuyst & Neysens 2005). Isolatene identifisert som *Enterobacter* kan derimot være et resultat av at MSB ikke har klart å dominere i sluttproduktet.

Surdeigsfermentering med ferdigmalt korn av bygg ga i hovedsak dominanse av *Enterococcus* ved fermenteringsslutt. Dette stemmer overens med resultatene oppnådd fra nymalt korn.

Havresurdeig med flere sorter av nymalt mel (22°C) påviste en mer divers samling bakterier av *Lactobacillus* og *Lactococcus* ved dag 2 og *Enterococcus* og *Enterobacter* ved dag 3. Fermentering ved 37°C påviste derimot dominans av enterokokker, laktobaciller og pedokokker. En studie av Hüttner et al. (2010) identifiserte *Leconocstoc*, *Pediococcus* og *Weissella* fra hvete surdeig ved 28°C, mens *Lactobacillus* dominerte ved 37°C. Dette samsvarer ikke med funnene fra surdeig ved 22°C. Dominansen av laktobaciller ved 37°C stemmer overens med Hüttner et al. (2010) sine funn. Hvilke bakterier som dominerer under fermenteringen er avhengig av flere faktorer, som temperatur, pH, redoks potensiale, fermenteringstid, kornart og kornsort, samt endogene og enzymatiske faktorer (Corsetti & Settanni 2007). I havresurdeig med sorten Nes (Jæren) ble det påvist en dominans av *Weissella* ved 22°C. *Weissella* spiller mulignes en rolle under den første fasen av fermenteringen, men blir ofte dominert av andre MSB (De Vuyst & Neysens 2005)

Hvetesurdeig av nymalt korn påviste ved begge temperaturene *Enterococcus* ved dag 2 og *Lactobacillus* ved dag 3. Disse surdeigene viste lavest pH, som skyldes melkesyren dannet fra Laktobaciller gjennom fermenteringen av glukose. Laktobacillene tar trolig over og dominerer over enterokokkene (Axelsson 2004).

I surdeig med ferdigmalt korn av hvete ble det i hovedsak observert en dominans av *Pediococcus* ved dag 2. Dette kan være samme tendens som ble observert i Hüttner et al. (2010). De resterende surdeigene med spelt, rug og emmer hadde hovedsakelig dominans av *Pediococcus*. I et tidligere studie med surdeig av rug, ble det vist at *Pediococcus pentosaceus* dominerte etter fermenteringsdag 2. Dominansen ble i et senere fermenteringsstadiet tatt over

av *Lactobacillus*. Slike resultater er også funnet i surdeigsfermenteringer av hvete og spelt (Weckx et al. 2010). Et annet studie viste derimot dominans av *Pediococcus* ved fermenteringsslutt (De Vuyst & Neysens 2005). Det er derfor vanskelig å gi en konkret diskusjon på hvilke MSB som dominerer, da dominans er avhengig av flere ulike faktorer.

5.1.3 Karakterisering av surdeigsmikrobiota fra spontan surdeigsfermentering med Illumina Miseq

Målet med dette forsøket var å utfylle de begrensede resultatene fra koloni screeningen og for å sammenligne disse. Karakterisering av surdeigsmikrobiota viste hovedsakelig at *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* og *Lactobacillales_other* dominerte i varierende grad mellom de ulike kornartene, sortene og temperatur.

I surdeig med byggmel dominerte *Enterococcus* ved dag tre, den samme tendensen ble også observert ved 16S rRNA koloniscreeningen. I beta diversitesanalyse plottene kommer det også tydelig frem at Enterococcene kan være den bakterien som drar ut variasjonen, og de skiller seg mest ut fra bakteriesammensetningen i hvete, spelt, emmer og rug. I fermentering med havre dominerte *Weissella*, dette samsvarer ikke med resultatene oppnådd ved 16S rRNA koloniscreeningen. Det er derfor vanskelig å gi noe konkret forklaring på hvorfor disse resultatene ikke stemmer overens. En mulig forklaring kan være at isolatene fra kolonisekvenseringen ikke ga riktig informasjon om hvilke bakterie som dominerte i slutfasen, da resultatet var basert på for isolater per genus. *Weissella* er kjent å være tilstede under den første fasen av fermenteringen, de fermenterer både heksosier og pentosier gjennom 6-PG/PK reaksjonsveien, som danner melkesyre, og etanol eller eddiksyre (Axelsson 2004). I surdeigsmikrobiota av hvete, spelt, rug og emmer var det *Pediococcus* som dominerte, dette samsvarer med funnene fra koloniscreeningen.

5.2 Screening av surdeigsstammesamling for FAE aktivitet

Av totalt 48 isolater screenet for FAE aktivitet viste 10 isolater frigjøring av ferulsyre (FA) i varierende grad. Screeningsmetoden ble først utført av Dongahy et al. (1998), hvor det ble detektert FAE aktivitet i 7 MSB stammer; en *L. fermentum* stamme og seks *Bacillus subtilis* stammer. I dette studiet ble samme metode, med noen modifikasjoner utført. For å oppnå et vellykket resultat ble først bakteriekultur av MSB som tidligere har vist FAE aktivitet spottet på MRS-EF agar. Resultatet fra denne testrunden var ikke i samsvar med resultatene beskrevet av Hole et al (2012). En grunn til dette kan være at konsentrasjonen av

bakteriekulturen var for lav slik at frigjøringen av FA fra substratet ikke ble detektert. I andre testrunde ble kolonier fra renkultur inokulert direkte på MRS-EF skålen. Ved å bruke enkelt koloni ble FAE aktiviteten detektert. FAE har evnen til å spalte ferulsyre (FA) fra arabinoksyllankjeden slik at de blir mer tilgjengelig for human metabolisme (Szwajgier & Jakubczyk 2011). En ulempe ved metoden er at konsentrasjonen av bakteriekoloni er ukjent, som igjen kan påvirke størrelse på de ulike sonene som blir dannet.

Av isolatene viste *L. amylovorus* MF146 og *L. reuteri* CBN2 størst frigjøring av FA. I dag er de fleste FAE aktive mikroorganismene blitt identifisert fra sopp, og det mangler fortsatt informasjon om FAE identifisert i andre organsimer. FAE aktivitet er funnet i flere lactobacilli, inkludert *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. leichmanni* og *L. farcimins*, men genene som koder for FAE er ikke identifisert. (Lai et al. 2012). Til tross for positive resultater oppnådd i dette studiet, er det vanskelig å undersøke samsvar med tidligere studier da det mangler mye informasjon på dette feltet.

FAE aktiviteten hos *Lactobacillus amylovorus* stammene MF146 og MF150 var en interessant observasjon da det ikke er gjort lignende studier på stammer av denne arten tidligere.

Selv om de positive MSB isolatene hadde FAE aktivitet i screeningassayet, trenger ikke denne aktiviteten å være funksjonell under fermenteringsprosessen. Aktiviteten kan være avhengig av pH, fermenteringstemperatur og prøvemateriale. Bakteriell FAE aktivitet kan i samspill med xylanaser hydrolysere ester bundet FA og diFA syre fra celleveggen i plantebaserte produkter. (Topakas et al. 2007). Dette vil videre bli diskutert i avsnittet surdeigsfermentering med FAE positive MSB.

5.3 Frie fenoliske syrer i havre og bygg

Effekten av fermentering med havre (Mathilda, Jæren) og bygg (Ottadalen Mølle) og tilsatte FAE aktive MSB starterkulturer samt pentopan på frie fenoliske syrer ble studert i denne oppgaven.

I et studie av Hole et al. (2012) ble det påvist at den spontanfermenterte kontrollen hadde en økning på det totale innholdet av frie fenoliske syrer i både havre og bygg. I dette forsøket viste spontan surdeig med havre et spesielt høyt innhold av total frie fenoliske syrer på 75,05 $\mu\text{g g}^{-1}$. Det høye nivået i havresurdeigen kan muligens være et resultat av aktivering av

endogene enzymer eller av andre mikroorganismer enn MSB som er naturlig tilstede på kornet, som bidrar til frigjøringen (Hole et al. 2012)..

Spontan surdeig med byggmel viste også en signifikant effekt på innholdet av total frie fenoliske syrer, som videre viste en stor nedgang i innholdet etter 24 timer. En mulig forklaring på denne nedgangen kan være dannelsen av andre metabolitter som et resultat av dekarboksyleringen av hydroksykanelsyrer (Hole et al. 2012).

Spontanfermentert kontroll med eddiksyre ble også inkludert for å kontrollere at de observerte effektene var grunnet fermentering med de ulike MSB stammene. I syrekontrollen med havre ble det detektert en frigjøring etter 24 timer. En slik økning i syrekontrollen er også blitt vist tidligere studier (Svensson et al. 2010). Fermentering med byggmel og eddiksyre ga derimot ingen økning i total frie fenoliske syrer sammenlignet med ufermentert prøve.

De frie fenoliske syrene i fermentering med byggmel resulterte i en lavere frigjøring av total frie fenoliske syrer enn i havre. Dette resultatet er i samsvar med Hole et.al (2012) sine funn, da det er kjent at havre inneholder høyere innhold av frie fenoliske syrer.

Den probiotiske stammen *L. reuteri* SD2112 i fermentering med havre har tidligere påvist en økning i frie fenoliske syrer på grunn av den bakterielle FAE aktiviteten til stammen (Hole et al. 2012). Dette er i samsvar med funnene i dette forsøket. Fermentering av havre med MSB stammene *L.reuteri* SD2112 og *L.reuteri* 6475 ga størst økning i total frie fenoliske syrer, og i byggmel hadde fermentering med stammene 6475 og *L. reuteri* CBN3 størst frigjøring. Grunnet det høye nivået av frie fenoliske syrer i den spontane havre prøven kan frigjøringen i prøvene med MSB startere SD2112 og 6475 være et resultat av aktiveringen av både endogene enzymer og esteraseaktiviteten hos bakteriene.

I surdeig av bygg og FAE positive MSB startere inkludert pentopan viste også her *L.reuteri* 6475 størst frigjøring av total frie fenoliske syrer, hvor det meste av økningen var det høye innholdet ferulsyre (FA). Pentopan har enzymatiske egenskaper med evne til å øke innholdet av frie fenoliske syrer i korn. Disse enzymene bistår i degraderingen av arabinoxylan som fører til en frigjøring av de frie fenoliske syrene (Lappi et al. 2013). Kløyvingen av arabinoksykan kjeder kombinert med nedbrytingen av andre bestanddeler kan ligge til grunn for økningen av fri FA. Effekten av pentopan kan også ha økt ved samspillet mellom de bakterielle FAE enzymene og xylanaser (Sancho et al. 1999). Behandling med pentopan ga

en signifikant økning i frigjøreren av total frie fenoliske syrer i alle surdeigsfermenteringene, bortsett fra prøven med *L.amylovorus* NRRL B-4538.

Fermentering med *L. amylovorus* NRRL B-4538 ga totalt sett ingen frigjøring av frie fenoliske syrer i både havre og bygg, selvom den påviste størst FAE aktivitet under screeningen. En mulig forklaring kan være at de fenoliske syrene har blitt dekarboksylert av andre MSB som finnes naturlig tilstede på kornet (Rodríguez et al. 2010) eller at *L. amylovorus* NRRL B-4538 selv har dekarboksylingsaktivitet, Det vil si at etter spalting bruker bakterien opp de frigitte syrene i sin egen metabolisme. I en studie av Cavin et. al (1997) ble det påvist at *L. plantarum* har to induserbare fenoliske syre dekarboksylaser, hvor en av dem er kalt p-kumarinsyre decarboksylase (PDC). *L. plantarum* har evnen til å metabolisere bare p-kumarin og kaffesyre. Det finnes en mulighet at *L. amylovorus* NRRL B-4537 innehar en lignede egenskap.

Kromatogrammet fra analysen av de frie fenoliske syrene ble studert for å undersøke om andre metabolitter fra en mulig dekarbokylering kunne identifiseres. Det ble detektert en uidentifisert topp i kromatogrammet. Toppsymmetri og spekter for standard og prøve ble sammenlignet og en av de uidentifiserte toppene var antatt å være m-kumarinsyre. Dette ble ikke undersøkt videre.

En annen mulig forklaring er at selv om *L. amylovorus* NRRL B-4538 viste FAE aktivitet under screeningen, er det ikke sikkert at stammen har evnen til å spalte substratet i kornet under fermenteringsforholdene. Med de mulige forklaringene tatt i betraktning er det vanskelig å komme til en bestemt konklusjon om hvorfor denne stammen ga en negativ innvirkning på de frie fenoliske syrene. Dette må studeres videre.

6 Konklusjon og videre arbeid

I dette arbeidet ble det påvist at ulike melkesyrebakterier finnes naturlig tilstede i surdeigsmikrofloraen, og deres evne til å dominere under fermenteringen er påvirket av flere ulike parametere. Surdeigsfermentering med ferulsyreesterase aktive melkesyrebakterie starterkulturer har en positiv effekt ved å øke innholdet av de frie fenoliske syrene.

- Spontan kornfermentering med påvirkning av flere parametere, ga surdeiger med ulike mikrobielle sammensetningen
- Illumina Miseq dybdesekvensering gir god informasjon om det mikrobiologiske mangfoldet under surdeigsfermentering og for å identifisere nye interessante surdeigsstammer.
- Stammer av *L.reuteri* og *L.amylovorus* hadde ferulsyreesterase aktivitet, og dermed evnen til å frigjøre ferulsyre fra korn.
- Fermentering med melkesyrebakterier med ferulsyreesterase aktivitet økte biotilgjengeligheten av frie fenoliske syrer, hvor *L.reuteri* stammer viste størst frigjøring i både havre og bygg.
- Surdeigsfermentering med melkesyrebakterier og tilførsel av kommersiell xylanase (pentopan) hadde en signifikant effekt på frigjøringen av frie fenoliske syrer i bygg.
-

Som en fortsettelse av dette arbeidet kunne de spontane surdeigsfermenteringene satt opp i flere biologiske forsøk for å danne et bedre bilde av dominans og hvilke bakterier som er «typisk» for hver enkelt kornsort. På grunn av tid ble ikke dette gjennomført.

Det hadde vært interessant å studert *Lactobacillus* stammen *L. amylovorus* nærmere. *L. amylovorus* viste en stor FAE aktivitet, men ingen effekt på de frie fenoliske syrene. Ved videre arbeid kunne stammen blitt undersøkt med hensyn på om den innehar en eventuell p-kumarinsyre decarboksylase (PDC) som en mulig forklaring på at ingen frie fenoliske syrer ble frigjort.

Referanseliste

- Arendt, E. K., Ryan, L. A. M. & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24 (2): 165-174.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid bacteria: Classification and physiology*. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc New York 1-66 s.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Gironés, O. & Muzquiz, J. L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30 (2): 111-118.
- Banu, I., Vasilean, I. & Aprodu, I. (2010). Effect of Lactic Fermentation on Antioxidant Capacity of Rye Sourdough and Bread. *Food Science and Technology Research*, 16 (6): 571-576.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K. & Gordon, J. I. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7 (5): 335-336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N. & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (Supplement 1): 4516-4522.
- Cavin, J.-F., Barthelmebs, L. & Divies, C. (1997). Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Applied and environmental microbiology*, 63 (5): 1939-1944.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S. & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1–2): 131-141.
- Coda, R., Cagno, R. D., Gobbetti, M. & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37 (0): 51-58.
- Corsetti, A. & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40 (5): 539-558.
- De Vuyst, L. & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1–3): 43-56.
- De Vuyst, L. & Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24 (2): 120-127.
- 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 (0): 11-29.
- Dykes, L. & Rooney, L. W. (2007). Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. 7.
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Mancheño, J. M., de Las Rivas, B. & Muñoz, R. (2013). Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 79 (17): 5130-6.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872-879.
- FAOSTAT. *Food And Agriculture Organization Of The United Nations*. Tilgjengelig fra: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor> (lest 15.05).
- Faulds, C. B. (2009). What can feruloyl esterases do for us? *the phytochemical society of europe*, 9: 121-132.
- Fazary, A. E. & Ju, Y. H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39 (11): 811-28.
- Fossum, S. & Dissen, E. (2009). *Polymerasekjedereaksjon*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <http://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A. & Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1–3): 57-69.

- Gold, R. S., Meagher, M., Hutkins, R. & Conway, T. (1992). Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. *Journal of industrial microbiology*, 10 (1): 45-54.
- Gänzle, M. G., Zhang, C., Monang, B.-S., Lee, V. & Schwab, C. (2009). Novel metabolites from cereal-associated lactobacilli – Novel functionalities for cereal products? *Food Microbiology*, 26 (7): 712-719.
- Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37 (0): 2-10.
- Haard, N. F., Odunfa, S. A., Lee, C.-H., Quintero-Ramirez, D. R., Lorence-Quiñones, D. A. & Wachter-Radarte, D. C. (2009). Fermented Cereals. A global Perspective. I: Rome, F. a. A. O. o. t. U. N. (red.) *Chapter 1-cereals: Rationale for fermentation*. Rome, Italy.
- Hansen, A. & Schieberle, P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1): 85-94.
- Hole, A. S., Grimmer, S., Naterstad, K., Jensen, M. R., Paur, I., Johansen, S. G., Balstad, T. R., Blomhoff, R. & Sahlstrøm, S. (2009). Activation and inhibition of nuclear factor kappa B activity by cereal extracts: role of dietary phenolic acids. *J Agric Food Chem*, 57 (20): 9481-8.
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J. & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 60 (25): 6369-75.
- Holtekjølen, A. K., Kinitz, C. & Knutsen, S. H. (2006). Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (6): 2253-2260.
- Hoseney, R. C. (1994). *Principles of cereal science and technology*: American Association of Cereal Chemists (AACC).
- Hüttner, E. K., Dal Bello, F. & Arendt, E. K. (2010). Identification of lactic acid bacteria isolated from oat sourdoughs and investigation into their potential for the improvement of oat bread quality. *European Food Research and Technology*, 230 (6): 849-857.
- Illumina. *Miseq: Sequencing Chemistry Training Course*. Tilgjengelig fra: http://support.illumina.com/training/sequencing_training.ilmn (lest 24.06).
- Inmaculada, N. G., Alvaro, S. F. & Francisco, G. C. (2013). Overexpression, purification, and biochemical characterization of the esterase Est0796 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Mol Biotechnol*, 54 (2): 651-60.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45 (9): 2761-2764.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (1–2): 216-222.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K. H., Autio, K., Flander, L. & Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1–3): 104-112.
- Kent, N. L. & Evers, A. (1994). *Kent's Technology of Cereals: An introduction for students of food science and agriculture*: Elsevier.
- Koehler, P. & Wieser, H. (2013). Chemistry of Cereal Grains. I: *Handbook on Sourdough Biotechnology*, s. 11-45: Springer.
- Lafiandra, D., Riccardi, G. & Shewry, P. R. (2014). Improving cereal grain carbohydrates for diet and health. *Journal of Cereal Science*, 59 (3): 312-326.
- Lai, K.-K., Vu, C., Valladares, R. B., H., P. A. & Gonzalez, C. F. (2012). Identification and Characterization of Feruloyl Esterases Produced by Probiotic Bacteria. I: Ahmad, R. (red.) *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology - "Protein Purification"*.
- Lappi, J., Aura, A. M., Katina, K., Nordlund, E., Kolehmainen, M., Mykkanen, H. & Poutanen, K. (2013). Comparison of postprandial phenolic acid excretions and glucose responses after ingestion of breads with bioprocessed or native rye bran. *Food Funct*, 4 (6): 972-81.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2): 67-78.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46 (3): 207-219.

- Marcia, M. d. O. (2009). Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Molecular plant*, 2 (5): 861-872.
- Mellen, P. B., Walsh, T. F. & Herrington, D. M. (2008). Whole grain intake and cardiovascular disease: A meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18 (4): 283-290.
- Messens, W. & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72 (1): 31-43.
- Morgan, X. C. & Huttenhower, C. (2012). Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*, 8 (12): e1002808.
- Newman, R. K. & Newman, C. W. (2008). *Barley for food and health: science, technology, and products*: John Wiley & Sons.
- Norgesfôr. Kornarter. Tilgjengelig fra: <http://www.norgesfor.no/nf/medlem/rov/Produkter/Korn/Kornarter/> (lest 10.06).
- Norsk institutt for skog og landskap. (2008). De fire kornslagene våre. Tilgjengelig fra: <http://www.skogoglandskap.no/artikler/2008/korn> (lest 17.04).
- Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 (5): 270-278.
- Pomeranz, Y. (1987). *Modern Cereal Science and Thechnology*. Inc., New York: VCH Publishers.
- Poutanen, K., Flander, L. & Katina, K. (2009). Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 26 (7): 693-699.
- Rathore, S., Salmerón, I. & Pandiella, S. S. (2012). Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology*, 30 (1): 239-244.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27 (1): 1-11.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M. & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (2-3): 79-90.
- Rodríguez, H., Angulo, I., de las Rivas, B., Campillo, N., Páez, J. A., Muñoz, R. & Mancheño, J. M. (2010). p-Coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78 (7): 1662-1676.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. & Riceevans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322 (2): 339-346.
- Sancho, A. I., Faulds, C. B., Bartolome, B. & Williamson, G. (1999). Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (3): 447-449.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. & Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43 (2): 152-159.
- Shahidi, F. & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*: CRC press.
- Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36 (1): 1-29.
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D. L., Schieber, A. & Gänzle, M. G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (16): 9214-9220.
- Szwajgier, D. & Jakubczyk, A. (2011). Production of extracellular ferulic acid esterases by *Lactobacillus* strains using natural and synthetic carbon sources. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*, 10.
- Topakas, E., Vafiadi, C. & Christakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*, 42 (4): 497-509.
- Valmorri, S., Settanni, L., Suzzi, G., Gardini, F., Vernocchi, P. & Corsetti, A. (2006). Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (central Italy). *Letters in applied microbiology*, 43 (3): 343-349.

- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (10): 4113-4117.
- Von Wright, A. & Axelsson, L. (2011). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Lactic Acid Bacteria: An introduction*: 15.
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P. & De Vuyst, L. (2010). Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology*, 27 (8): 1000-1008.

Oversikt over tabeller og figurer

Figurer

Figur 2.1 F.V Bygg (<i>Hordeum vulgare</i>), Hvete (<i>Triticum aestivum</i>), Havre (<i>Avena sativa</i>) og Rug (<i>Secale cereale</i>). (Norgesfôr).	3
Figur 2.2 Generell struktur av et korn med hovedkomponentene frøhus, frøkappe, kim og endosperm. Frøkappen er omsluttet av et ytre skalL.	5
Figur 2.3 Reaksjonsveien for glukose, A) Homolactic fermentering (Glykolyse, EMP reaksjonsveien), B) Heterolactic fermentering (6-PG/PK reaksjonsveien)(Axelsson 2004)	9
Figur 2.4 Oversikt over A) kjemisk struktur av de vanligste syrene p-kumarinsyre, kaffeinsyre, ferulsyre og sinapinsyre (Rodríguez et al. 2009). B) kanelsyrederivater og deres funksjonelle grupper (Liu 2007).....	11
Figur 2.5 A) Ferulsyre bundet som en ester til O-5 posisjonen av arabinosekjeden i arabinosylan. B) β -1,4-linket xylan skjelett. C) α -1,2-linket L-arabinose. (Marcia 2009)	12
Figur 3.1 Oversikt over 10 x fortynningsrekke	25
Figur 3.2 Oversikt over forsøksoppsettet. * Illumina sekvensering av spontan surdeigsmikrobiota	27
Figur 3.3 Bakteriestammer med FAE aktivitet.....	35
Figur 3.4 Frie fenoliske syrer i surdeig med havre og bygg som har gjennomgått metanol og etylacetatekstraksjon. Gul pil peker ut de interessante komponentene CA, p-CA, FA og S.....	37
Figur 4.1 pH endring i spontan surdeig med nymalt korn av bygg og havre, ved 22 °C (A) og 37°C (B). ..	39
Figur 4.2 pH endring i spontan surdeig med ferdigmalt korn av hvete, spelt, rug og emmer ved 37°C.	40
Figur 4.3 Beta diversitetsanalyse (uvektet) av Lactobacillales surdeigsmikrobiotaen ved dag 3. A) Temperatur (rød, 22°C; blå, 37°C), B) Kornart (rød, bygg; grønn sirkel, havre; grønn boks, hvete; mørkeblå, spelt; lyseblå, rug; gul, emmer).	46
Figur 4.4 pH endringer under surdeigsfermentering av havre med FAE positive MSB ved 37 °C i 48 timer.	49
Figur 4.5 Total frie fenoliske syrer i surdeigsfermentering med FAE positivite MSB starterkulturer.....	51
Figur 4.6 Total frie fenoliske syrer i surdeigsfermentering med FAE positive MSB starterkulturer inkludert pentopan. Standardaviket er indikert.....	53

Tabeller

Tabell 3.1 Materialer benyttet i denne oppgaven	17
Tabell 3.2 Kjemikalier benyttet i denne oppgaven.....	19
Tabell 3.3 Kits benyttet i denne oppgaven	20
Tabell 3.4 Programvare benyttet i denne oppgaven	21
Tabell 3.5 Kjemikalier benyttet i tillaging av MRS-FA agar.....	23

Tabell 3.6 Stammer av <i>Lactobacillus</i> brukt i oppgaven	24
Tabell 3.7 Oversikt over kornart, opprinnelse og sort, og hvilke forsøk de har blitt brukt i.	26
Tabell 3.9 Oversikt over behandling av surdeig med havre (Jæren, Mathilda) og MSB starterkultur, temperatur og tidsuttak til ulike analyser.	29
Tabell 3.10 Oversikt over behandling av bygg (Ottadalen Mølle), MSB starterkultur, temperatur og tidsuttak til ulike analyser.....	30
Tabell 3.11 Oversikt over primersekvenser og hvilke posisjon på 16S rRNA de starter hybridiseringen	31
Tabell 3.12 oversikt over 5 Prime Mastermiks med mangala primere benyttet i PCR-reaksjon.....	32
Tabell 3.13 Oversikt over 5 Prime Mastermiks med 27F og 907R primere benyttet i PCR-reaksjon.....	32
Tabell 3.14 Oversikt over QiaGen Mastermiks med 27F og 907R primere benyttet i PCR-reaksjon.	32
Tabell 3.15 Oversikt over Big-Dye Mastermiks benyttet for innmerking av PCR produktet	33
Tabell 3.16 Tillaging av de fire eksterne standardene og sluttkonsentrasjon på standardrekke.....	36
Tabell 4.1 Oversikt over hvilke surdeig kolonier var isolert fra og hvilke mastermiks og primersett som ble benyttet i PCR.	41
Tabell 4.2 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (22°C) med nymalt korn av bygg og havre og hvetemel ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V3-V4 primere. Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift	42
Tabell 4.3 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (37°C) med nymalt korn av bygg og havre og hvetemel ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V3-V4 primere. Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift	43
Tabell 4.4 Oversikt over bakterier identifisert fra spontan surdeig (37°C) med ferdigmalt korn av bygg, hvete, spelt, rug og emmer ved hjelp av 16S rRNA kolonisekvensering. Kolonier sekvensert med V1-V4 primere Antall isolater per genus er indikert. >2 er merket med fet skrift	44
Tabell 4.5 Oversikt over prosent Lactobacillales genera detektert av total mikrobiotaen ved dag 3 i utvalgte surdeigsprøver ved hjelp av 16S rRNA Illumina dybdesekvensering . Kun Lactobacillales genera >1 % er inkludert. Dominerende genus ved dag 3 indikert med fet skrift.	45
Tabell 4.6 Oversikt over hvilke isolater som er testet for FAE aktivitet. Tabellen viser også fra hvilke temperatur, meltype og kornart isolatene stammer fra.	47
Tabell 4.7 FAE aktiviteten for positive stammer av MSB, Sonene er målt i mm etter 7 dager Hvor 10 mm > + , 10-20 mm ++ og 20 mm > +++	48

Vedleggsliste

- 1) Karakterisering av surdeigsmikrobiota med 16S rRNA dybdesekvensering
- 2) Tallmateriale som ligger til grunn for figurer
- 3) Gelbilder fra agarose gel elektroforese av PCR produkter
- 4) Ikke-dyrkningsbasert karakterisering-16S rRNA Illumina sekvensering (dag 1 og 2)
- 5) Eksempel på utregnet mengde fenoliske komponenter i prøven
- 6) pH og celletall for surdeigsfermentering av bygg
- 7) Frie fenoliske syrer, CA, p-CA, FA og SA i fermentering med havre
- 8) Frie fenoliske syrer, CA, p-CA, FA og SA i fermentering med bygg

1. Karakterisering av surdeigsmikrobiota med 16S rRNA gen dybdesequensering (Illumina sekvensering, Miseq)

Isolering av total DNA

Sudeigsprøvene ble tint før alt prøvemateriale ble overført til 50 ml senterifugerør med 10 ml peptonvann. Prøverørene ble skylt med noe av peptonvannet for å få med alt av prøvene. Sentrifugerørene ble vortexet i 20 sekunder før de ble spunnet ned for å sedimentere ved 400 x g i 4 min. 8 ml av supernatanten ble overført til 15 ml sentrifugerør og pelleterte prøvene ved 13000 xg i 5 min. All supernatant ble fjernet og pelleten ble fryst ved -20⁰C frem til neste dag.

Isolering av DNA ble utført med MP FastDNA-96 Fecal kit med Matrix E. Protokollen fra leverandøren ble fulgt, med modifiseringer av MP-96 Inhibitor Removal Plate. Til Pelleten ble det tilsatt 400 µl lysisbuffer fra kitet. Alle prøvene ble overført til Lysing Matrix E rør i rack, og kjørt i Fastprep 3 x 60 sek ved 1600 rpm med 2 min på is mellom hver gang. Rørene ble spunnet ned ved 4000 x g i 5 min. 250 µl av supernatanten ble overført til en Deep-Well Plate og tilsatt 750 µl Fecal DNA Binding Solution før brettet ble forseglet med foile, vortexet i 2 min og spunnet ned ved 4000 x g i 5 min. En MP-96 Binding Plate ble plassert i en Collection Plate, til platen ble 500 µl av prøvene tilsatt og spunnet ned som over. Flow-throug ble kastet og gjentatt en gang til. Til MP-96 binding Plate ble det tilsatt 200 µl Binding Plate Pre-Wash buffer, brettene ble spunnet ned ved 4000 x g i 5 min. For vask ble 500 µl Fecal DNA Wash Buffer tilsatt og brettene ble spunnet ned som over. MP-96 Binding Platen ble plassert på en Elution Plate og tilsatt 100 µl Elution Buffer direkte til matrixen og spunnet ned igjen. Platen ble plassert på en ny Elution Plate og eluladet fra punktet over ble overført til Inhibitor Removal Plate og spunnet ned ved 4000 xg i 5 min. DNA ble oppbevart ved -20⁰C frem til Miseq Analyse.

DNA konsentrasjon (NanoDrop)

NanoDrop ble benyttet til å måle DNA konsentrasjonen etter DNA isolering. For å kalibrere instrumentet ble først 1 µl dH₂O tilsatt poden, og deretter 1 µl buffer. Valg av buffer er avhengig av hvilke buffer som ble benyttet under isoleringen. Etter kalibreringen ble 1 µl av det isolerte DNA applisert på poden og DNA konsentrasjonen ble lest av.

16S rRNA PCR amplifisering med barkedede primere

Basert på protokollen fra Costello et al. (2009) med noen modifiseringer. DNA fra isoleringen ble tint og pippetert over i respektive brønner på et PCR Brett. Hver DNA prøve ble kjørt i triplikate PCR'er. Til PCR brettene ble 25 µl MiSeq mastermiks tilsatt brønnene (Tabell 1). Revers primer

som er benyttet består av en unik barcode på 12 bp, og ble derfor ikke direkte tilsatt mastermiksen.

Tabell 1 Miseq MasterMiks tilsatt prøvene for å lage triplikater

Miseq Mastermix	Volum
5' Prime HotMasterMix	10 µl
515 Forward primer (10 µM)	0,5 µl
Revers primer med unik barcode (5 µM) *	1 µl
DNA (ufortynnet)	1 µl
Molecular grade H ₂ O	12,5 µl

* Revers primer ble ikke blandet direkte i mastermiksen, men ble tilsatt i en og en prøve ettersom den inneholder unike nukleotider.

PCR betingelser; 94 °C i 3 min, (94°C i 45 sek, 50°C i 60 sek, 72°C i 90 sek) x 35 , 72°C i 10 min og 4°C ∞

Etter amplifiseringen ble PCR-produktet testet på 0,7% agarose geL. Gelen ble kjørt ved 100 V i 30 min. Triplikatene ble slått sammen i pool triplikater for å unngå feil fra PCR reaksjonen. Dette ble gjort for å utjevne eventuelle feil.

Rensing av PCR produktet

Etter at triplikatene er slått sammen ble PCR produktet rensert med AMPure XP (Agencourt A63881). Protokollen fra AMPure XP for 96-brønners plate ble fulgt som beskrevet av leverandøren. 50 µl PCR produkt ble tilsatt 90 µl AMPure XP i en 96-brønners plate, hver brønn ble mikset 10 ganger med en multikanalpipette. AMPure XP inneholder magnetiske kuler som fjerner 50-100 bp av uønskete nukleotider fra PCR-produktet. Platene ble inkubert ved romtemperatur i 5 min, og plassert på en 96- Magnet plate i 2 minutter. Løsningen på toppen ble fjernet fra reaksjonsplaten og kastet. Til hver brønn ble det tilsatt 200 µl 70% etanol (EtOH) for vask før platene ble inkubert ved romtemperatur i 30 sek. EtOH ble fjernet og kastet. Under vaskeprosessen ble platene holdt på magnetplaten hele tiden, dette ble gjentatt to ganger til. Det var viktig å få med all EtOH etter siste vask. Løsningen ble eluert i 40 µl 10 nM Tris-acetate buffer (pH 8,0), platen ble fjernet fra magneten og mikset 10 ganger. Eluladet ble overført til en ny plate.

Kvantifisering av renset PCR produkt

Kvatifiseringen ble gjort ved hjelp av Quant-iT Picogreen ds DNA Assay (Invitrogen P11496). Denne kvatifiserings metoden eskulderer ss DNA slik at bare ds DNA kan bli målt. Det ble laget 1xTE buffer fra 20 xTE stock. Deretter ble det laget en standardkurve for konsentrasjon av hver prøve og kvantifiserings plate. Rør 1 ble tilsatt 594 µl 1xTE buffer og rør 2-8 ble tilsatt 300 µL. Til rør 1 ble det deretter tilsatt 6 µl DNA standard (100 ng/ µl), som ble benyttet i serie fortyninger. 300 µl fra rør 1 over i rør 2, 300 µl fra rør 2 over i rør 3, frem til rør 7. Rør 8 ble brukt som en kontroll, og inneholdt ikke DNA. Til en 96-brønners svart fluorometer plate ble det tilsatt 100 µl fra hver standard i duplikater. Brønnene ble tilsatt 99 µl 1xTE og 1 µl PCR renset PCR produkt-duplikater. Brønnene ble blandet ved å pipettere 4 ganger. Det ble deretter tilsatt 100 µl Picogreen (fortynnet 1:200) til hver brønn, og mikset som over. Brettene ble inkubert ved romtemperatur i mørket, før duplikatene ble målt med et fluorometer.

Pooling av prøvene i ekvivalente konsentrasjoner

Det ble tatt ut x µl av hver prøve tilsvarende 50 ng DNA-pool av prøvene med unike barcoddes i ekvivalente konsentrasjoner.

Renset pool med AMPure XP

Protokollen ble fulgt som beskrevet av leverandør (Agencourt 96-brønners plate). 50 µl PCR produkt ble tilsatt 90 µl AMPure XP. Løsningen ble eluert i 40 µl Tris-acetate med pH 8,0. Deretter ble produktet renset med magnetiske kuler som beskrevet over. NanoDrop ble benyttet for å få 260/280 ratio, og sjekke renheten av prøven. Verdiene burde ligge mellom 1,8 – 2,0. Dersom de er lavere enn 1,8 er prøvene urene.

Kvatifisering av renset pool med Quant-iT Picogreen ds DNA – duplikater

Fortynnet renset pool til 4nM og fulgte Illumina protokoll for start av Miseq analyse. Det ble brukt 7 pM prøve og 10 % PhiX spike (kontroll DNA for å øke diversiteten i samplepool). Sekvenserings primere benyttet var Read1-seq.primær, Read2-seq.primær og Index_seq.primær. (Caporosa et al. The ISME journal 2012). (se avsnitt 2.7.2 for mer detaljer om hva som skjer under sekvenseringen)

Prosessering av data (beskrevet på engelsk)

PCR was performed in triplicates and paired end sequencing (2×150bp) were performed using the protocol presented in Caporaso et al. (2010). Briefly, the V4 region of the 16S rRNA gene was

amplified with region-specific primers that included the Illumina flowcell adapter sequences. The reverse amplification primer also contained a twelve base barcode sequence that supports pooling of different samples. After cluster formation on the MiSeq (Illumina) instrument, the amplicons were sequenced with custom primers. These sequencing primers were designed to be complimentary to the V4 amplification primers to avoid sequencing of the primers, and the barcode is read using a third sequencing primer in an additional cycle. In addition to the experimental samples, the MiSeq run also contained a control library made from PhiX Control v3 which, in this run, accounted for 10% of reads. The phiX control was used because of the limited sequence diversity among the 16S amplicons.(Caporaso et al. 2011)

The forward and reverse reads were joined in QIIME version 1.7.0 and then demultiplexed allowing zero barcode errors and a quality score of 30 (Q30). Chimeric sequences were removed in QIIME using ChimeraSlayer. Reads were assigned to their respective bacterial id using an open-reference OTU (operational taxonomic units) picking protocol using the QIIME toolkit (Caporaso et al. 2010b), where uclust (Edgar et al 2010) was applied to search sequences against the Greengenes database (gg_13_8). Reads that did not match a reference sequence were discarded. The total number of counts per sample after filtration was 7,741,059. The median number of counts per sample was 134,165 (max 162167; min 100,001). Beta diversity analysis was performed with the QIIME software, whereas further taxonomic analysis was performed with OTU tables in Excel, with taxonomic results including information at the genus level. Limited results were obtained at the species level. (Caporaso et al. 2010)

2 . Tallmateriale som ligger til grunn for figurer

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 4.1

Prøve	Dag 1		Dag 2		Dag 3		Dag 4	
	22°C	37°C	22°C	37°C	22°C	37°C	22°C	37°C
Bygg (Olve) ¹	5,94	5,78	5,78	4,98	5,59	4,93	5,29	4,76
Bygg (Magdalena) ¹	5,99	5,85	5,85	5,25	5,50	5,10	4,84	4,93
Bygg (Olve) ²	*	5,79	5,96	4,43	5,28	4,36	4,38	4,34
Bygg (Marigold) ³	*	5,69	5,76	4,70	4,82	4,68	4,69	4,63
Havre (Mathilda) ⁴	6,34	5,27	4,87	4,31	4,51	4,03	4,51	3,98
Havre (Nes) ⁴	*	5,24	4,60	4,71	4,12	4,70	4,03	4,66
Havre (Nes) ⁵	*	5,84	5,68	4,87	4,75	4,86	4,49	4,86
Hvete (Regal)	6,39	5,42	4,78	4,19	4,09	4,06	3,98	4,05

¹ Landvik, ² Tyskland, ³ Aspevold, ⁴ Jæren, ⁵ Ottadalen . * pH ikke målt i disse surdeigs prøvene ved dag 1.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 4.2

Prøve	Start (0 tid)	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Bygg (Skjåkmel)	6,51	6,16	4,50	4,38
Bygg (Läntmannen Mills)	6,35	5,98	4,64	4,44
Hvete (Norges Møllene)	6,84	5,38	4,08	3,81
Hvete (Kvelde Mølle)	6,81	4,94	3,84	3,71
Emmer (Holli Mølle)	6,70	5,63	4,16	4,05
Spelt (Holli Mølle)	6,52	6,17	4,04	3,87
Spelt (Kvelde Mølle)	6,55	4,65	4,00	3,89
Rug (Regal)	7,03	5,17	3,89	3,81
Rug (Møllerens)	6,97	4,86	3,89	3,79

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 4.4

Prøve	0 t	8 t	24 t	48 t
Spontan 37°C	6,41	6,32	4,9	4,01
<i>L.reuteri</i> CBN1	6,36	4,41	3,99	
<i>L.reuteri</i> CBN2	6,39	4,53	3,97	
<i>L.reuteri</i> CBN3	6,4	4,45	4	
<i>L.amylovorus</i> NRRL B-4538	6,39	4,93	3,71	
<i>L.reuteri</i> 6475	6,38	4,78	4,01	
<i>L.reuteri</i> SD2112	6,39	4,54	4,02	

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 4.5

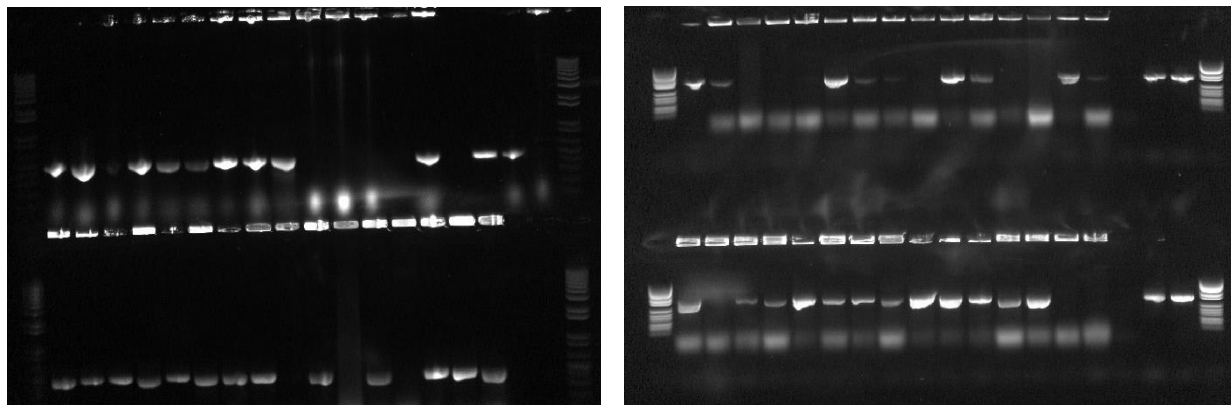
Prøve	0 timer	8 timer	24 timer	48 timer
Ufermentert	27,78			
Spontan		75,05	5,62	17,40
Spontan+syre		27,59	45,46	
CBN1		50,95	65,79	
CBN2		50,69	66,51	
CBN3		49,30	60,91	
6475		65,88	80,95	
SD2112		54,60	81,80	
NRRL B-4538		5,00	2,37	

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 4.6

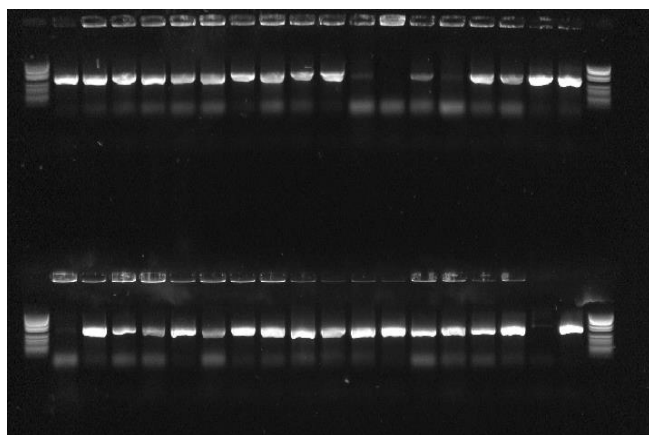
Prøve	Uten pentopan	Med pentopan	UP std	MP std
Ufermentert (0t)	2,81	4,56	0,70	0,95
Spontan	10,00	16,12	1,89	6,31
Spontan + syre	3,02	4,16	1,19	0,57
CBN2	18,12	30,43	2,53	3,27
CBN3	20,51	29,48	1,31	0,47
6475	24,94	40,92	3,05	0,71
SD2112	19,39	27,72	0,48	5,15
NRRL B-4538	0,19	0,13	0,26	0,19

3. Gelbilder

Figurene nedenfor viser gel bilder fra PCR produkt etter amplifisering på PCR.



Figur 1 Første bilde (f.v): PCR produkt fra tilfeldig utvalgte PCR produkt fra nymalt korn. På isolatene ble 5` HotMastermiks med Mangala primere benyttet. **Andre bilde:** PCR produkt fra tilfeldig utvalgte PCR produkt fra ferdigmalt korn. På isolatene ble 5` HotMastermiks med 27F/907R primere benyttet. Standard VI ble brukt som kontroll. Ingen bånd er resultatet av dårlig lysing av DNA.



Figur 2 PCR produkt fra tilfeldig utvalgte PCR produkt fra surdeig av havre (Mathilda, Jæren). På isolatene ble Qiagen mastermiks og 27F/907R primere benyttet. Standard VI ble brukt som kontroll. Ingen bånd er resultatet av dårlig lysing av DNA.

4. Ikke-dyrkningsbasert karakterisering-16S rRNA Illumina sekvensering (dag 1 og 2)

Tabell 2. Oversikt over prosent *Lactobacillales* genera detektert av total mikrobiotaen i utvalgte surdeigsprøver ved hjelp av 16S rRNA Illumina dybdesekvensering. Kun *Lactobacillales* genera >1 % er inkludert.

Kornart	Sort, opprinnelse	Temp.	Dag 1	Dag 2
Bygg ^a	Olve, Tyskland	22	<i>nd</i>	<i>na</i>
Bygg ^a	Olve, Tyskland	37	Enterococcus (1), Streptococcus (1)	Enterococcus (23), Streptococcus (10)
Bygg ^b	Lantmannen Mills	37	<i>nd</i>	Enterococcus (52)
Bygg ^b	Skjåkmel	37		Enterococcus (47)
Havre ^a	Nes, Jæren	22	Enterococcus (5), Weissella (1)	Weissella (80)
Havre ^a	Nes, Jæren	37	<i>nd</i>	<i>Nd</i>
Havre ^a	Mathilda, Jæren2	22	Pediococcus (4), Weissella (2), Lactococcus (2)	Weissella (45), Lactococcus (20), Leuconostoc (7), f_Leuconostocaceae_other (2)
Havre ^a	Mathilda, Jæren2	37	Pediococcus (1)	Pediococcus (63)
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	22	<i>nd</i>	f_Lactobacillales_other (28), Lactococcus (23), o_Lactobacillales_other (6)
Hvete ^a	Sammalt fin, Regal	37	Lactococcus (10), f_Lactobacillales_other (5), Enterococcus (1)	f_Lactobacillales_other (50), Lactococcus (4), o_Lactobacillaceae_other (1)
Hvete ^b	Norges Møllene	37	Weissella (27)	Weissella (20), Pediococcus (9)
Hvete ^b	Kvelde Mølle	37	f_Lactobacillales_other (3), Lactococcus (2), Pediococcus (2)	Pediococcus (34), Lactobacillus (11), f_Lactobacillales_other (8)
Spelt ^b	Holli Mølle	37	Pediococcus (5)	Pediococcus (34)
Spelt ^b	Kvelde Mølle	37	Weissella (3), f_Lactobacillales_other (2)	Pediococcus (29), Weissella (5), f_Lactobacillales_other (5)
Rug	Mølleren	37	Pediococcus (26), Weissella (8)	Pediococcus (44), Weissella (3)
Emmer	Holli Mølle	37	Enterococcus (22), Pediococcus (2)	Pediococcus (39), Enterococcus (12)

nd, ikke påvist *Lactobacillales* genera, *na*, ikke analysert, ^a Surdeigsprøve basert på nymalt korn, ^b Surdeigsprøve basert på ferdigmalt korn.

5. Eksempel på utregnet mengde fenoliske komponenter i prøve

Identifisering av syrene ble gjort på bakgrunn av retensjonstid, toppsymmetri og UV-spekter med kjente standarder.

I dette regneeksempelet brukes ferulsyre, 20 mg/L. Det ble veid inn 1,0 g frysetørket prøve som ble ekstrahert med metanol og etylacetat. Ekstraktet ble deretter dampet inn i speed vac og reløst i 1 ml 25% MeOH.

Innholdet av ferulsyre blir videre regnet om til mg/kg ved hjelp av formel 1.

mg/L er resultatet fra RSLC, 20 mg/l, **ml** er fortynningsvolumet, 1 ml og **g** er innveid materiale, 1000 mg

(1)

$$\text{mg/kg} = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} * l * 10^3}{g}$$

$$\text{mg/kg} = \frac{20 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 1 * 10^3}{1000} = 20$$

Mengde ferulsyre ble videre omgjort til µg/g. Prøven inneholdt 20 µg/g ferulsyre.

6. pH og celletall for surdeigsfermentering med byggmel

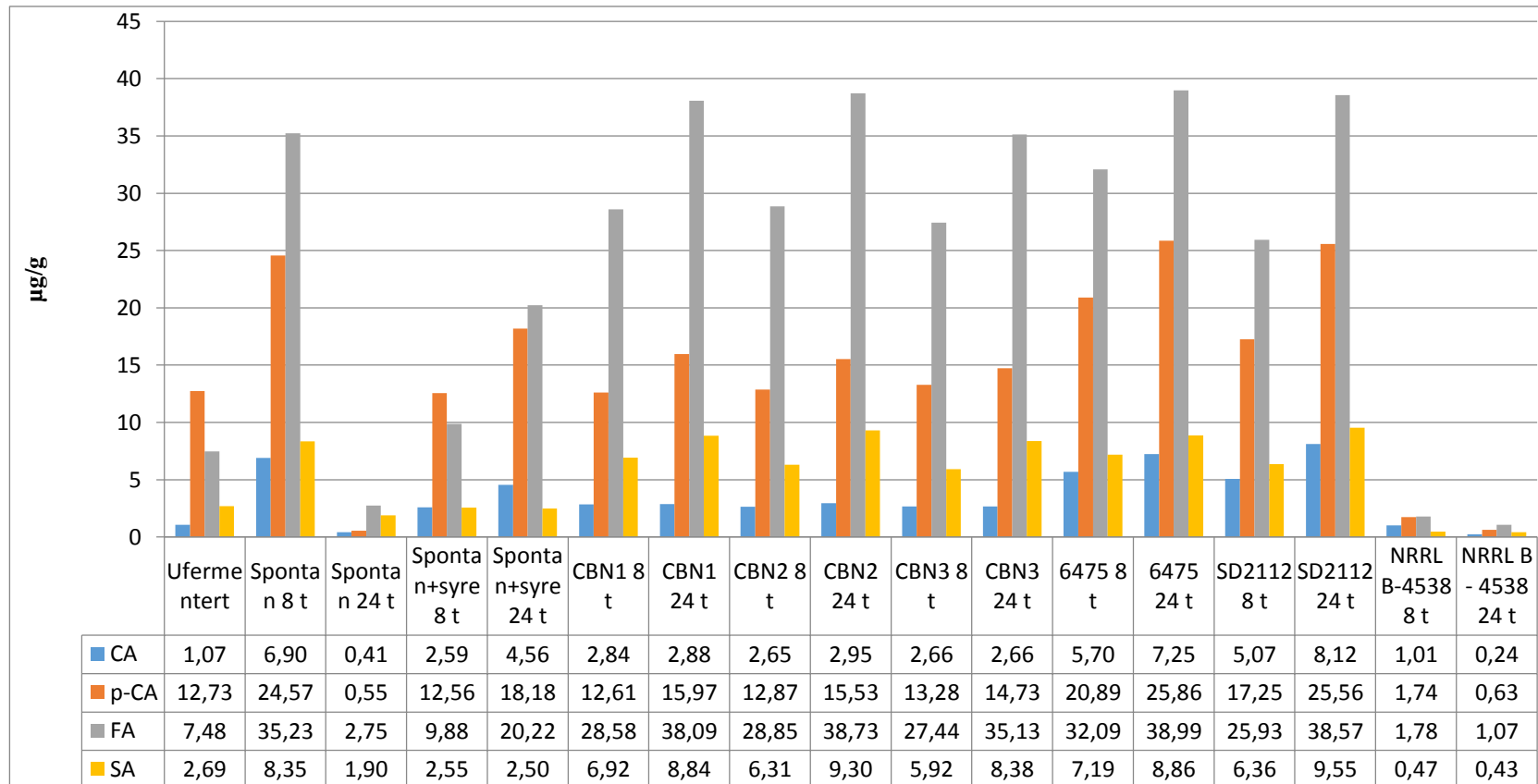
Tabell 2: oversikt over pH før og etter fermentering

Prøve	pH f. F	pH e. f
Start (0 tid)	5,85 ± 0,42	
Spontan 37°C	5,87 ± 0,14	5,815 ± 0,00
Spontan +eddiksyre 37°C	3,83 ± 0,56	3,835 ± 0,035
L. Reuteri (CBN2)	5,885 ± 0,00	3,685 ± 0,21
L. Reuteri (CBN3)	5,905 ± 0,49	3,67 ± 0,14
L. Amylovorures (NRRL B-4538)	5,84 ± 0,28	3,565 ± 0,00
L.reuteri (6475)	5,89 ± 0,42	3,83 ± 0,14
L.reuteri (SD2112)	5,875 ± 0,21	3,65 ± 0,02

Tabell 3: Oversikt over celletallet etter fermentering

prøve	CFU/ml
Start (0 tid)	0,00E+00
Spontan 37°C	1,13E+08
Spontan +eddiksyre 37°C	1,47E+09
L. Reuteri (CBN2)	2,43E+09
L. Reuteri (CBN3)	4,40E+08
L. Amylovorures (NRRL B-4538)	1,53E+09
L.reuteri (6475)	3,03E+09
L.reuteri (SD2112)	0,00E+00

7. Nivået av de frie fenoliske syrene p-CA, CA, FA og SAsom ligger til grunn for figur 4.5



8. Nivået av de frie fenoliske syrene p-CA, CA, FA og SA som ligger til grunn for figur 4.6

