



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Vekst, metabolisme og hemming av mugg i surdeigsbrød ved bruk av melkesyrebakterier, propionsyrebakterier og kalsiumpropionat

Growth, Metabolism and Inhibition of Mold in
Sourdough Bread Using Lactic Acid Bacteria,
Propionic Acid Bacteria and Calcium Propionate

Mari Westbye Rygh

Matvitenskap – Produksjon og produktutvikling

Forord

Forsøkene ved denne avhandlingen ble utført ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (Ås, Norge) i løpet av januar-mars 2021. Jeg er takknemlig til mine veiledere Førsteamanuensis Hilde Marit Østlie og Professor Anne Kjersti Uhlen for deres profesjonelle interesse i oppgaven og deres deling av kunnskap. Takk for at dere kom med tips og veiledning ved planlegging og gjennomføring.

Takk til May Helene Aalberg og Kari Olsen for god hjelp til forsøkene på laboratoriet og verdifulle diskusjoner.

Vil også takke min nærmeste familie og kjæreste for støtte og hjelp gjennom arbeidet med masteren.

Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet
Fakultet for Kjemi, Bioteknologi- og Matvitenskap
Ås, 1. august 2021

Mari Westbye Rygh

Sammendrag

Mugg i bakverk er et problem som fører til høyt matsvinn. Innen industriell baking representerer muggghemmende bakteriekulturer et interessant alternativ til kjemiske konserveringsmidler. Baking med surdeig er en gammel tradisjon, og kunnskapen om lengre holdbarhet på brød bakt med surdeig har lenge blitt observert. Likevel er det begrenset kunnskap som utdyper om hemmende effekt mot mugg, og om surdeig tilsatt propionsyrebakterier (PSB) gir økt muggghemmende effekt. PSB er spesielt interessant på bakgrunn av at tidligere forskning viser høy effekt av propionsyre tilsatt som kjemisk konserveringsmiddel for å hemme muggvekst. Hovedmålet for denne masteroppgaven var å undersøke den hemmende effekten av melkesyrebakterier (MSB) og PSB på muggvekst i surdeigsbrød. Den muggghemmende effekten kommer i stor grad av lav pH, organiske syrer og andre spesifikke muggghemmende komponenter produsert av bakteriene.

Innledningsvis ble vekst og metabolisme av ulike MSB (n=9) og PSB (n=10) studert i henholdsvis MRS og natriumlaktatbuljong (SLB). Evnen til å senke pH, omdanne karbohydrater og melkesyre, og produsere organiske syrer ble analysert. Surdeig inokulert med utvalgte stammer MSB og PSB, som produserte høy mengde organiske syrer og senket pH-verdien vesentlig i buljong, ble inkubert ved 30 °C i henholdsvis 24 og 48/168 timer før prøveuttak og analyse. Brød ble bakt med surdeig tilsatt MSB, *Pediococcus (P.) pentosaceus* 12 og *Leuconostoc (L.) citreum* 45 enkeltvis og miks med *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 15D, uten og med kalsiumpropionat. Skivet brød ble inokulert med muggsoppene *Aspergillus niger* ATCC10577, *Penicillium roqueforti*, og *Fusarium* sp., og inkubert og visuelt observert i 3 uker ved 25 °C.

Av de studerte MSB produserte *Lb. plantarum* 15D, *P. pentosaceus* 120, *Lb. fermentum* 314 og *L. citreum* 45 høy mengde melkesyre og eddiksyre henholdsvis analysert til over 7667 og 3711 mg/kg og senket pH til rundt 4,30 i MRS. Av de studerte PSB produserte *Propionibacterium freudenreichii* LMG 3001, ATCC 9616, ISU P50 og LMG 2948 høy mengde propionsyre og eddiksyre henholdsvis over 3060 og 1468 mg/kg og senket pH til rundt 6,20 i SLB. Innholdet av eddiksyre i surdeigsbrødene lå innenfor verdiene 936 til 1145 mg/kg og for melkesyre innenfor verdiene 4005 til 4709 mg/kg. Det ble ikke analysert signifikante forskjeller i innhold av hverken melkesyre eller eddiksyre mellom de ulike surdeigsbrødene. Det var heller ikke mulig å skille visuelt mellom grad av hemming av muggvekst mellom de ulike surdeigsbrødene. De observerte resultatene for hemming av muggvekst i surdeigsbrødene sammenlignet med kontrollbrødet indikerte svak hemming av *A. niger* og *Fusarium* sp. Mens for *P. roqueforti* var det ikke mulig å observere noen forskjeller i muggvekst mellom surdeigsbrødene og kontrollbrødet. Surdeigsbrød tilsatt kalsiumpropionat hemmet alle de undersøkte muggsoppene i høy grad, hvor *P. roqueforti* var mest resistent og vokste fram etter 5 dager inkubering. Resultatene indikerer at en synergistisk effekt mellom surdeig og kalsiumpropionat hemmer mugg godt.

Abstract

Mold in bakery products is a problem that leads to high amounts of food waste. In industrial baking, mold-inhibiting bacterial cultures represent an interesting alternative to chemical preservatives. Baking with sourdough is an old tradition, and has long been known to prolong the shelf life of bread baked with sourdough. Nevertheless, there is limited knowledge regarding the inhibitory effect against mold, and whether propionic acid bacteria (PAB) added to sourdough provides an increased mold-inhibiting effect. PAB is particularly interesting because previous research shows a high effect of propionic acid, when added as a chemical preservative to inhibit mold growth. The main goal of this master's thesis was to investigate the inhibitory effect of lactic acid bacteria (LAB) and PAB on mold in sourdough bread. The mold-inhibiting effect is largely due to low pH, production of organic acids and other specific mold-inhibiting components produced by the bacteria.

Initially, growth and metabolism of different LAB (n=9) and PAB (n=10) were studied in MRS and sodium lactate broth (SLB), respectively. The ability to lower the pH, degrade carbohydrates and lactic acid, and produce organic acids was analyzed. Sourdough inoculated with selected strains of LAB and PAB, which produced high levels of organic acids and lowered the pH considerably in broth, were incubated at 30 °C for 24 and 48/168 hours, respectively, before sampling and analysis. Sourdough bread was baked with three selected LAB, *Pediococcus (P.) pentosaceus* 120 and *Leuconostoc (L.) citreum* 45 singly and in a mix with *Lactobacillus (Lb.) plantarum* 15D, without and with calcium propionate. Sliced bread was inoculated with the fungi *Aspergillus niger* ATCC10577, *Penicillium roqueforti* and *Fusarium* sp., and incubated for 3 weeks at 25 °C.

Of the LAB studied in MRS, *Lb. plantarum* 15D, *P. pentosaceus* 120, *Lb. fermentum* 314 and *L. citreum* 45 produced high amounts of lactic acid and acetic acid, respectively, above 7667 and 3711 mg/kg and lowered pH to around 4.30. Of the PAB studied in SLB, *Propionibacterium freudenreichii* LMG 3001, ATCC 9616, ISU P50 and LMG 2948 produced high amounts of propionic acid and acetic acid, respectively, above 3060 and 1468 mg/kg and lowered the pH to around 6.20. The content of acetic acid in the sourdough breads was in between the values 936 to 1145 mg/kg and for lactic acid in between the values 4005 to 4709 mg/kg. No significant differences in the content of either lactic acid or acetic acid between the different sourdough breads was detected. It was not possible to distinguish visually between the degree of inhibition of mold growth between the different sourdough breads. The observed results of inhibition of mold growth in the sourdough breads compared with control bread indicated weak inhibition of *A. niger* and *Fusarium* sp. With *P. roqueforti* it was not possible to observe any differences in mold growth between the sourdough breads and the control bread. Sourdough bread supplemented with calcium propionate inhibited all the examined fungi to a great extent, where *P. roqueforti* was the most resistant and emerged after 5 days of incubation. The results indicate that the synergistic effect between sourdough and calcium propionate inhibit mold well.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	II
Abstract.....	III
1. Innledning.....	1
1.1 Matsvinn	1
1.2 Ulike måter å hindre muggvekst i brød.....	2
1.2.1 Surdeig	4
1.2.2 Melkesyrebakterier.....	6
1.2.3 Propionsyrebakterier.....	9
1.2.4 Melkesyrebakterier og propionsyrebakterier til hemming av mugg	9
1.3 Problemstilling.....	10
2. Materialer og metoder	11
2.1 Forsøksoppsett	11
2.2 Tillaging av vekstmedier.....	12
2.3 Bakteriestammer	12
2.4 Oppdyrking av MSB og PSB	13
2.5 Tillaging av frysestock.....	13
2.6 Tillaging av sporeløsning.....	14
2.7 Karakteristikk hos surdeigen.....	14
2.8 Kartlegging av melkesyrebakterier og propionsyrebakterier.....	15
2.8.1 Innledende vekstforsøk	15
2.8.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PSB i surdeig.....	15
2.9 pH måling.....	16
2.10 HPLC analyse	16
2.11 Vekst- og metabolismeforsøk av MSB i surdeig	17
2.12 Hemmeforsøk av mugg i brød	18
2.12.1 Brødbaking.....	18
2.12.2 Sporeinokulering av brød.....	19
2.12.3 Analyser av deig og brød	19
2.13 Statistisk analyse.....	19
3. Resultater.....	20
3.1 Kartlegging av MSB og PSB	20
3.1.1 Innledende vekstforsøk	20

3.1.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PSB i surdeig.....	22
3.2 Vekst og metabolisme av MSB i surdeig.....	23
3.3 Hemmeforsøk av mugg i brød	26
3.3.1 Visuell observasjon av muggvekst.....	31
4. Diskusjon.....	35
4.1 Hemming av muggvekst ved bruk av MSB og PSB	35
4.1.1 MSB	36
4.1.2 PSB	36
4.3 Hemming av mugg i brød	38
4.4 Praktiske hensyn og metodologiske utfordringer.....	41
4.4.1 Vekst- og metabolismeforsøk av MSB i surdeig	42
4.4.2 Hemmeforsøk av mugg i brød	42
5. Referanser.....	44

VEDLEGG 1: Rådata innledende vekstforsøk

VEDLEGG 2: Rådata for vekst og metabolisme av MSB i surdeig

VEDLEGG 3: Rådata for hemmeforsøk av mugg i brød

1. Innledning

1.1 Matsvinn

Det kastes ~ 1,3 milliarder tonn mat hvert år, som tilsvarer en tredel av maten som produseres i verden (FAO, 2019). I FN sine 17 bærekraftsmål, plan for bærekraftig utvikling og stoppe klimaendringene innen 2030, blir matsvinn omtalt under bærekraftsmål 12 “Ansvarlig forbruk og produksjon”. Et av målene er «Innen 2030 halvere andelen matsvinn per innbygger på verdensbasis, både i detaljhandelen og blant forbrukere, og redusere svinn i produksjons- og forsyningskjeden, herunder svinn etter innhøsting» (FN-sambandet 2020, Mål 12, punkt 12.3). Matsvinn defineres som reduksjon i mengde eller kvalitet på mat langs forsyningskjeden. Det er viktig å redusere matsvinnet fordi om en produsert råvare eller råstoff ikke blir benyttet fører det til tap av alle ressursene som ble brukt til å produsere den, i tillegg til matsvinnet i seg selv. Den samlede årlige mengden matsvinn i Norge er over 417 000 tonn, hvor husholdningsleddet står for over halvparten av matsvinnet (Stensgård m.fl., 2020). De matvaregruppene som kastes i størst grad hjemme hos forbruker er bakevarer og måltidsrester, mens i dagligvarehandelen kastes det mest av ferske bakevarer, frukt og grønnsaker.

I norske husholdninger kastes det årlig i gjennomsnitt 9,3 kg brød og bakevarer, som tilsvarer 21,9% av total mengde kastet mat per forbruker (Syversen m.fl., 2018). Matsvinnet av brød på grunn av mugg antas å være størst hjemme hos forbruker. I dagligvarehandelen blir brød returnert dagen etter at butikken mottar det og det går da til dyrefor, og blir derfor ikke matsvinn på grunn av mugg (Stensgård m.fl., 2020). Brød hos dagligvarehandelen blir matsvinn fordi ferskt brød i dagligvarehandelen er en destinasjonsvare. Kunder velger å handle i butikker som har ferskt brød gjennom hele åpningstiden, og mange nordmenn ser på brød som en dagsfersk vare. Det å hindre muggvekst i brød vil derfor kunne være med på å redusere matsvinn. Det er også andre kvalitetstap som oppstår i brød som tap av fuktighet. En slik faktor er enklere å gjøre noe med, og alternativt til kasting kan en riste brødet, lage tilslørte bondepiker eller arme riddere. Mens hvis brødet mugner må en kaste det fordi det ikke er noen reversibel prosess og flere muggsopparter produserer skadelige mykotoksiner (Ryan m.fl., 2008). Det er tilnærmet umulig å kunne se hvilke muggsopper som er farlige, samt at muggen er avhengig av flere faktorer for å produsere mykotoksiner. Viktige faktorer

er tilgang på oksygen og næringsstoffer, i tillegg til optimal temperatur og vannaktivitet (a_w), samt tilgang på næringsstoffer og oksygen (Skaar & Torp, 2002). Optimal temperatur for de fleste muggsopper er 25 °C og optimal a_w ligger over 0,90 for de fleste i muggsoppslektene *Aspergillus*, *Penicillium* og *Fusarium* (Mannaa & Kim, 2017). Viktige muggsopper som forekommer i korn i Norge og produserer skadelige mykotoksiner er *Aspergillus*-slekten som produserer aflatoksiner, *Penicillium verrucosum* som produserer ochratoksin A og *Fusarium*-slekten som produserer fusariumtoksiner som tricothecener og zearalenon (FHI, 2015; Skaar & Torp, 2002). Ochratoksiner, aflatoksiner og tricothecener er kreftfremkallende og kan skade arvestoffet (Mannaa & Kim, 2017). Ellers kan både tricothecener og ochratoksiner gi negativ effekt på immunforsvaret. Ved fjerning av selve muggkolonien på matvarer er det viktig å være klar over at de fleste mykotoksiner diffunderer ut i maten og kan være langt utenfor selve muggkolonien (Skaar & Torp, 2002). Hastighet for at mykotoksinene diffunderer ut i matvaren avhenger av matvarens fasthet. Muggvekst endrer smak og lukt på matvaren, mens mykotoksiner gir hverken lukt eller smak og er derfor utfordrende når den diffunderer ut i maten. I tillegg er mykotoksiner resistente til både varme og kjemisk behandling. Derfor er det å hindre muggvekst en viktig problemstilling både med hensyn til matsvinn og mattrygghet.

1.2 Ulike måter å hindre muggvekst i brød

Brød forringes oftest ved at det mister fuktighet, blir hardt og får fremvekst av mugg. I følge Legan (1993) er muggvekst hovedårsaken til forringelse. Dette gir store økonomiske konsekvenser, mye matsvinn og i tillegg at mykotoksiner produsert av mugg utgjør en helserisiko. Det er vanskelig å tallfeste hvor mye matsvinn som oppstår på grunn av muggvekst. Et lavt estimat på 1% vil gi store økonomiske konsekvenser, og dette vil i Storbritannia tilsvare et årlig tap på 20 millioner euro (Magan m.fl., 2012).

Brød har høyt vanninnholdet og høy vannaktivitet, $a_w = 0,94-0,97$, samtidig som det har en pH på rundt 6 (Magan m.fl., 2012). Under disse forholdene vil mange mikroorganismer vokse, deriblant muggsopp. Muggsopper kan vokse ved lavere vannaktivitet enn bakterier og gjær. Noen av de vanligste muggsporene som er isolert fra bakevarer er *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, and *Rhizopus* (Legan, 1993). Kontaminering av bakevarer skjer i stor grad på grunn av muggsporer i luften under prosesseringstrinnene etter steking, fordi muggsporene dør under steking. Det er mange måter

en kan redusere risikoen for kontaminering og hindre muggvekst i brød. Ødeleggelse av sporene kan utføres ved infrarød- eller mikrobølgestråling eller ved bruk av mugghemmende konserveringsmidler som propionsyre, eddiksyre, benzoesyre og etanol (Magan m.fl., 2012; Pateras, 2007). Adskilte produksjonslokaler for prosesseringstrinn før steking og etter steking reduserer sjansen for kontaminering fra melstøv, sammen med overtrykk og luftrenseanlegg for lokalene etter steking, men det er fortsatt vanskelig å kontrollere alle faktorer og det vil fortsatt være risiko for kontaminering etter levering av brødet i butikk. Andre måter en kan hindre muggvekst på, er ved å benytte modifisert atmosfære ved pakking og surdeig med mugghemmende effekt.

I følge Williams & Pullen (2007) er kalsiumpropionat et kjemisk konserveringsmiddel som er effektivt for å kontrollere vekst av mugg og påvirker kvaliteten til brødet i liten grad. Likevel er det behov for vesentlig mengder av propionsyre for å hemme mugg (Hemmer m.fl., 2001). Propionsyre har en ubehagelig lukt og hemmer gjær i noe grad som ikke er optimalt ved gjærbakst. Et effektivt konserveringsmiddel mot mugg som benyttes i bakevarer er sorbinsyre. Sorbinsyre har ingen lukt eller smak, pK_a -verdi 4,8 og er effektiv i produkter som har pH opptil 6. Men fordi sorbinsyre hemmer gjær, kan den kun benyttes i bakverk som benytter andre hevemidler som bakepulver. Benzoesyre og estere av p-hydroksybenzoesyre er effektive mot mugg og deres pK_a -verdier er henholdsvis 4,2 og 8,5. Benzoesyre benyttes i produkter med pH lavere enn 5,5 og estere av p-hydroksybenzoesyre er mest effektiv rundt pH 7.

Den antimikrobielle effektiviteten til organiske svake syrer er sterkt relatert til pH-en i et matsystem, og den udissoierte formen av syren er i stor grad ansvarlig for inhibering av mikroorganismer (Davidson m.fl., 2013) Svake syrer inhiberer mikroorganismer ved at den udissoierte syren diffunderer over cellemembranen og dissosierer inne i cella fordi der er pH-en høyere. Mikroorganismen må pumpe ut H^+ -ioner for å opprettholde pH-en inne i cella, fordi lav pH inne i cella hemmer viktige metabolske enzymer. Dette er en energikrevende prosess og hemmer derfor mikroorganismen sin normale vekst. Grunnen til at virkningen av svake syrer avhenger av pH-en i matsystemet er fordi når pH er høyere enn pK_a -verdien vil mer av syren foreligge i dissoiert form og kan derfor ikke krysse cellemembranen. Eddiksyre, melkesyre og propionsyre er svake organiske syrer med antimikrobielle egenskaper og deres tilhørende pK_a er henholdsvis 4,87, 3,86 og 4,75. Synergistisk effekt oppnås om en har flere av disse syrene sammen i et produkt (Axel m.fl., 2017; Ryan m.fl.,

2008). For eksempel hvis et produkt med pH rundt 4 inneholder disse tre organiske syrene vil melkesyre være den syren som bidrar mest til å senke pH-verdien fordi den foreligger med høyere andel dissosiert syre enn de to andre, og eddiksyre og propionsyre vil ha den mest hemmende effekten fordi de er mer udisosiert. De fleste svake syrene som benyttes som konserveringsmiddel har størst effekt i produkter som har lav pH-verdi fordi 5% av syra må være udisosiert for å gi konserverende effekt (Hemmer m.fl., 2001). Den minimum inhiberende konsentrasjonen (MIC) for kjemiske konserveringsmidler varierer derfor også etter pH-verdien i matsystemet (Le Lay m.fl., 2016a). På grunn av den høye pH-verdien i brød, pH ~ 6, er mengden organiske syrer som skal til for effektivt å hemme muggvekst så høy, at den vil påvirke smaken på brødet negativt (Ryan m.fl., 2008; Zhang m.fl., 2010). Ved kombinasjon av flere konserveringsmidler kan en oppnå additiv effekt, som vil si at effekten av enkeltstoffene summeres (Hemmer m.fl., 2001). Ved bruk av flere mugghemmende komponenter som for eksempel kalsiumpropionat og eddiksyre sammen oppnås en synergistisk effekt. Ved synergistisk effekt er den hemmende effekten større enn summen av effekten til enkeltstoffene. Dette vil altså gjøre at en ikke trenger like mye av det enkelte konserveringsmiddelet og en minimerer påvirkning på smaken i brødet fra den organiske syren (Ryan m.fl., 2008; Zhang m.fl., 2010).

Her blir det i hovedsak sett videre på surdeig med melkesyrebakterier (MSB) og propionsyrebakterier (PSB) som produserer mugghemmende komponenter, fordi flere muggsopparter har utviklet resistens mot kjemiske konserveringsmidler og fordi forbruker ønsker mindre kjemiske tilsetningsstoffer (Axel m.fl., 2017; Garcia m.fl., 2019; Schnürer & Magnusson, 2005). Trendene på markedet i dag peker mot mindre prosessering, mat fri for tilsetningsstoffer, “clean label” merking av mat, samtidig som det kreves høy kvalitet og lengre holdbarhet. Forbruker har større aksept mot eddiksyre som tilsetningsstoff, men det hindrer muggvekst i liten grad ved den pH-verdien som er i brød (Williams & Pullen, 2007).

1.2.1 Surdeig

Baking med surdeig er en gammel tradisjon og har blitt benyttet gjennom historien i flere verdensdeler (Capelle m.fl., 2013). Ved utgravninger i Sveits har det blitt funnet brød som var både hevet og syrnet, og var over 5000 år gammelt. Baking med surdeig kan gi mange positive effekter, både teknologisk og helsemessig, som gir mange spennende bruksområder for surdeig (Galle, 2013). Teknologisk så anvendes surdeig i bakverk for å oppnå blant annet økt vannopptak i deigen, smidigere deig, bedre poring, økt volum, smak og aroma. Noen av

de helsemessige effektene ved surdeigsbrød er økt mineraltilgjengelighet og fordøyelighet (Katina & Poutanen, 2013). Det er også indikasjoner på at surdeigsbrød har lavere glykemisk indeks sammenlignet med brød hevet med gjær, på grunn av den lave pH-verdien i surdeigsbrød. Hvete og rug inneholder prolaminer som i fordøyelsesprosessen frigjør peptider som er ansvarlig for den autoimmune reaksjonen hos cøliakipasienter (Arendt & Moroni, 2013). Spesifikke stammer MSB har evne til å hydrolysere flere av disse peptidene og langvarig fermentering med surdeig vil gjøre brødet mindre skadelig for cøliakipasienter. Dette viser at en potensielt sett kan bake brød av hvete med surdeig som cøliakipasienter kan spise, men det er behov for videre forskning på området.

Surdeig består hovedsakelig av vann og mel, i tillegg til MSB, gjær (hovedsakelig *Saccharomyces cerevisiae*) og enzymer som kommer fra melet (Gobetti, 1998). Mikroorganismene i surdeigen produserer CO₂, etanol, aromakomponenter, melke- og eddiksyre. Aromakomponenter i surdeig er hovedsakelig alkoholer, estere, organiske syrer, aldehyder og ketoner. Eksempler på noen aromakomponenter som har blitt analysert i surdeig med tilhørende lukt: diacetyl (smør), fenyletylalkohol (rose), etylacetat (frukt), sykloheksanon (peppermynte), 1-heptanol (skog) og 2-etylheksanol (sitrus) (Fujimoto m.fl., 2019; Pétel m.fl., 2017). Ved tilsats av vann begynner enzymene i melet, alfa- og beta-amylase, å spalte stivelsen til maltose og glukose (Tronsmo, 2016). Gjæren produserer maltase, invertase og zymase, danner CO₂ og små mengder etanol under fermentering. Under fermentering aktiveres også andre enzymer fra kornet som ekstracellulære proteaser og peptidaser (Fujimoto m.fl., 2019). Disse enzymene øker innholdet av peptider og frie aminosyrer som igjen deltar i Maillard-reaksjoner sammen med karbohydrater under steking av bakevarer. Baking med surdeig vil derfor gi et brød med mer smak og aroma.

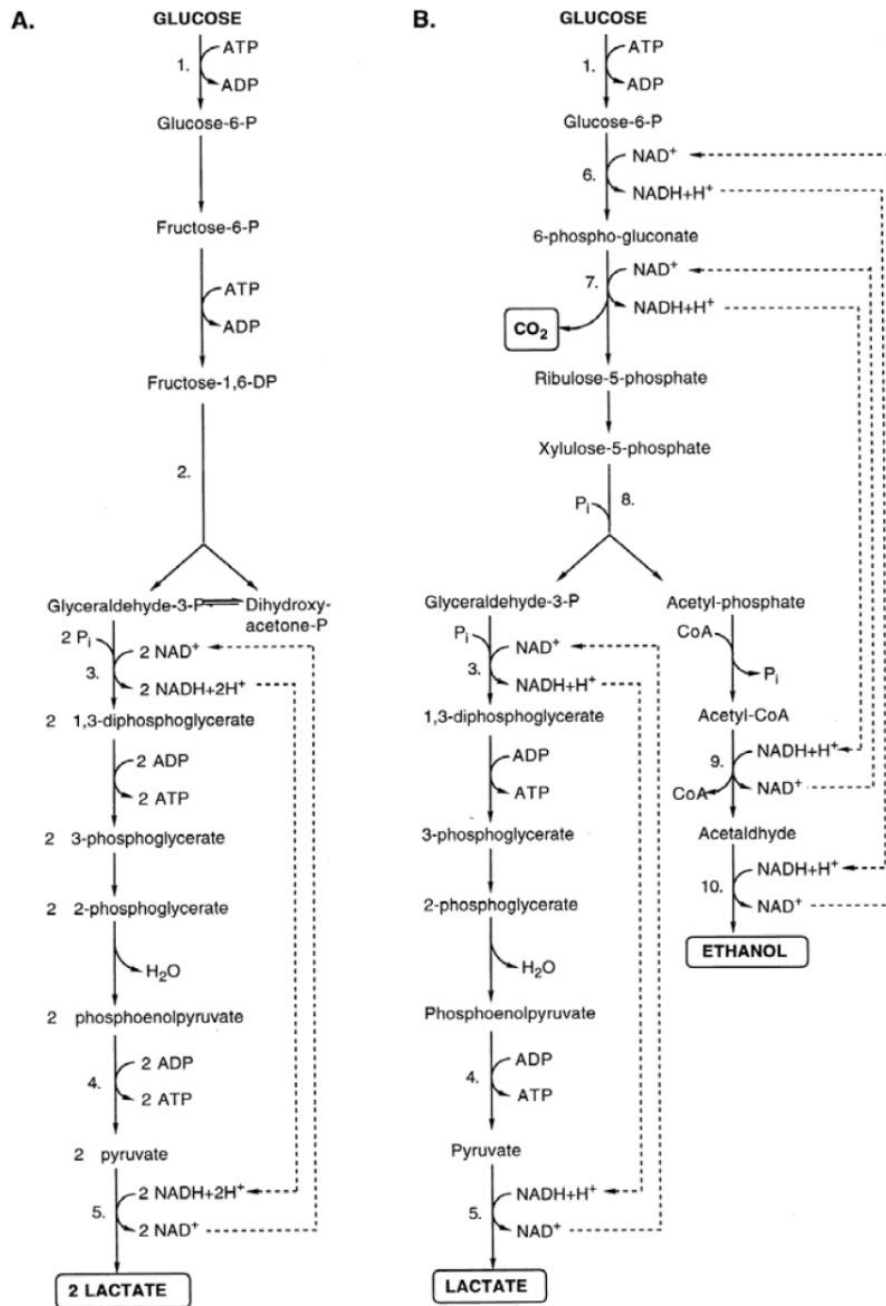
Ulike prosessparametere som temperatur, tid og fasthet (forhold mellom vann og mel) påvirker surdeigen (De Vuyst m.fl., 2014). Forholdet mellom MSB og gjær er normalt 100:1 (Gobetti, 1998). Fermentering av surdeigen ved kort tid (<8 timer) eller lav temperatur (<25 °C) gjør at *S. cerevisiae* dominere i større grad på grunn av raskere metabolisme og vekstrate sammenlignet med MSB, og en vil oppnå mer etanol i surdeigen (Fujimoto m.fl., 2019). Ved høy temperatur (>30 °C) vil MSB fokusere på melkesyreproduksjon, og pH vil senkes raskt som gjør at *S. cerevisiae* hemmes i noe grad (De Vuyst m.fl., 2014). Surdeig fermentert ved lav til moderat temperatur (<30 °C) inneholder ofte *Lactobacillus (Lb.) sanfranciscensis*,

mens de inneholder sjeldent *Lb. fermentum* og *Lb. plantarum* som foretrekker høyere temperaturer (>30 °C). I surdeig fermentert ved 23 °C dominerer *Leuconostoc (L.) citreum*.

Forholdet mellom vann og mel i surdeigen påvirker bufferevnen og mengde syrer produsert (De Vuyst m.fl., 2014). Høy andel mel i forhold til vann vil gi høy produksjon av syre på grunn av større mengde karbohydrater tilgjengelig. I tillegg øker det bufferevnen som gjør at pH-verdien synker saktere. Ved lav pH dominerer *Lactobacillus* fordi de er syretolerante, mens ved høy pH forekommer *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* og *Lactococcus*. Syreproduksjonen bidrar til å gi brødet smak og lav pH-verdi (Galle, 2013). Lav pH-verdi gjør at glutenproteinene denaturerer som gir mindre klissete deig og økt vannbindingsevne. Det gjør også at brødet oppnår et bedre utviklet glutennettverk, glattere snittflate og smuler mindre. I tillegg blir stivelsen mer nedbrutt som også bidrar til økt vannbindingsevne. Lav pH-verdi øker i tillegg den hemmende effekten av kalsiumpropionat, og hemmer i noe grad vekst av mugg og trådtrekkende bakterier (Fujimoto m.fl., 2019; Le Lay m.fl., 2016a; Quattrini m.fl., 2019; Ryan m.fl., 2008). Sammen gir disse egenskapene brødet lengre holdbarhet.

1.2.2 Melkesyrebakterier

MSB er naturlig tilstede i mange fermenterte produkter og blir brukt til å konservere melk, grønnsaker og kjøtt (Narvhus & Axelsson, 2003). Fermentering av mat er en av de eldste konserveringsteknologiene, sammen med tørking og salting. Eksempler på produkter hvor MSB benyttes til konservering er ost, yoghurt, salami og surdeigsbrød. MSB er en heterogen gruppe av grampositive, ikke mobile, ikke sporulerende bakterier som kjennetegnes ved fermentering og produksjon av melkesyre (Huys m.fl., 2013). MSB er syretolerante og er enten kokke- eller stavformet.



Figur 1. Metabolisme via (A) homofermentativ fermentering (Embden-Meyerhof-Parnas reaksjonsvei) og (B) heterofermentativ fermentering (pentosefosfatvei) hos melkesyrebakterier. Utvalgte enzymer er nummerert; 1: glukokinase, 2: fruktose-1,6-difosfat aldolase, 3: glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase, 4: pyruvat kinase, 5: laktat dehydrogenase, 6: glukose-6-fosfat dehydrogenase, 7: 6-fosfoglukonat dehydrogenase, 8: fosfoketolase, 9: acetaldehyd dehydrogenase, 10: alkohol dehydrogenase (Axelsson, 2004).

Ved inndeling av melkesyrebakterier etter metabolismevei skilles det hovedsakelig mellom homofermentativ og heterofermentativ metabolisme, vist i figur 1. Homofermentative MSB fermenterer glukose gjennom Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsveien, hvor endeproduktet er melkesyre (Tronsmo, 2016; Madigan m.fl., 2015; Wright & Axelsson, 2012). MSB som har denne reaksjonsveien er eksempelvis *Streptococcus*, *Lactococcus* og noen *Lactobacillus*. Ved heterofermentativ metabolisme benyttes pentosefosfatvei (PF) og det produseres melkesyre, etanol, eddiksyre og CO₂ som endeprodukter. MSB som har heterofermentativ metabolisme mangler enzymet aldolase som gjør at de ikke kan gjennomføre nedbrytning av fruktose-1,6-difosfat. Eksempler på MSB som har denne type fermentering er *Leuconostoc*, *Weissella* og noen *Lactobacillus*.

Lactobacillus kan deles inn i tre grupper etter reaksjonsvei for glukose: homofermentativ, fakultativ heterofermentativ og obligat heterofermentativ (Axelsson, 2004; Barrangou m.fl., 2012). Obligat homofermentative *Lactobacillus* følger EMP reaksjonsveien fordi de kan hverken omdanne glukonat eller pentoser. Fakultativ heterofermentativ *Lactobacillus* fermenterer heksoser heterofermentativt, men har evne til å omdanne både pentoser og glukonat ved pentosefosfatvei. Ved fermentering av pentoser blir eddiksyre endeprodukt i tillegg til melkesyre. *Lactobacillus* som er obligat heterofermentative fermenterer både pentoser og heksoser ved pentosefosfatvei som gir endeproduktene melkesyre, eddiksyre, etanol og CO₂. Eksempler på ulike *Lactobacillus* arter delt inn etter reaksjonsvei for fermentering av glukose er vist i tabell 1.

Tabell 1. Metabolske kategorier etter reaksjonsvei for fermentering av glukose for *Lactobacillus* (*Lb.*) arter (Barrangou m. fl., 2012).

Homofermentativ	Fakultativ heterofermentativ	Obligat heterofermentativ
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. bunchneri</i>
<i>Lb. helveticas</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>
		<i>Lb. pontis</i>

I tillegg til å fermentere glukose omsetter flere *Leuconostoc* og *Lactobacillus* sitrat ved sitratforgjæring (Wright & Axelsson, 2012). Under sitratforgjæring blir sitronsyre transportert inn i cellen ved hjelp av sitratpermease og deretter brutt ned til eddiksyre og oksaleddiksyre ved hjelp av enzymet sitratlyase. Endeproduktene ved sitratfermentering er eddiksyre, diacetyl, acetoin og CO₂.

1.2.3 Propionsyrebakterier

PSB benyttes som probiotika og som sekundær kultur ved ostemodning (Ouwehand, 2004; Rabah m.fl., 2017). PSB omdanner melkesyre til propionsyre, eddiksyre og CO₂. Under ostemodning bidrar CO₂ til hulldannelsen i Sveitserost. De produserer også prolin ved hjelp av prolin aminopeptidase som bidrar til søt smak i osten og har evne til å konvertere frie aminosyrer til aromatiske forbindelser (Piwowarek m.fl., 2018). PSB karakteriseres som grampositive, saktevoksende, pleomorfe stavformede, ikke mobile og ikke sporulerende bakterier (Ouwehand, 2004; Rabah m.fl., 2017). De fleste PSB er obligat anaerobe, men noen stammer er aerotolerante. For å vokse trenger PSB karbonkilde, nitrogenkilde og flere mikronæringsstoffer. PSB benytter karbohydrater og melkesyre som karbonkilder, nitrogen tar de opp fra peptider, aminosyrer, ammoniumsalter og aminer (Piwowarek m.fl., 2018). De mikronæringsstoffene som de trenger er kobolt, mangan, kobber, magnesium, jern, L-cysteinhydroklorid, aminosyrer, vitamin B7 og B5. PSB er obligat anaerobe og har pH-optimum rundt 7, men de kan vokse i området fra 4,5-8,0. De fleste PSB er mesofile og har optimumstemperatur for vekst ved 30 °C. De tåler en del salt ved pH-optimum, men hemmes ved veldig høy saltkonsentrasjon. PSB har evne til å produsere B12. PSB benyttes i matvarer som konservering (Ouwehand, 2004). Propionsyre hemmer vekst av mikroorganismer gjennom akkumulering inne i cellen, som videre hemmer enzymaktivitet. PSB produserer også andre forbindelser som har konserverende effekt som bakteriosiner, eddiksyre og propansyre (Piwowarek m.fl., 2018).

1.2.4 Melkesyrebakterier og propionsyrebakterier til hemming av mugg

Både MSB og PSB har lenge blitt benyttet som startkultur i næringsmiddelindustrien og derfor er de fleste kvalifisert som trygge til bruk i mat (Le Lay m.fl., 2016a). MSB og PSB produserer mange ulike mugghemmende metabolitter som organiske syrer, sykliske dipeptider, langkjedede fettsyrer, hydrogenperoksid, karbondioksid og bakteriosiner (proteiner/peptider) (Axel m.fl., 2017; Le Lay m.fl., 2016b). Spesifikke eksempler på noen av disse metabolittene er azelainsyre, koffeinsyre, p-kumarsyre, ferulinsyre, 3-fenylmelkesyre

og salisylsyre. *Propionibacterium freudenreichii* LSasi68 produserer hydrogenperoksid og azelainsyre. *Lb. lactis* produserer nisin som er et bakteriosin med antibakteriell virkning. Andre *Lactobacillus* som produserer bakteriosiner er blant annet *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* og *Lb. helveticus* (Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 2004). Flere PSB produserer bakteriosiner, men bare noen enkelte er effektive mot mugg; *P. thoenii* P123 som produserer propionisin PLG-1 og *P. jensenii* DF1 som produserer propionisin SM1 og SM2 (Ouwehand, 2004). Enkelte *Lactobacillus* produserer hydrogenperoksid og siden de mangler enzymet katalase kan det forekomme akkumulering (Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 2004). Ved benyttelse av surdeig med MSB vil mugghemmende metabolitter akkumuleres samtidig som pH reduseres, noe som sammen gir økt mugghemmende effekt (Quattrini m.fl., 2019)

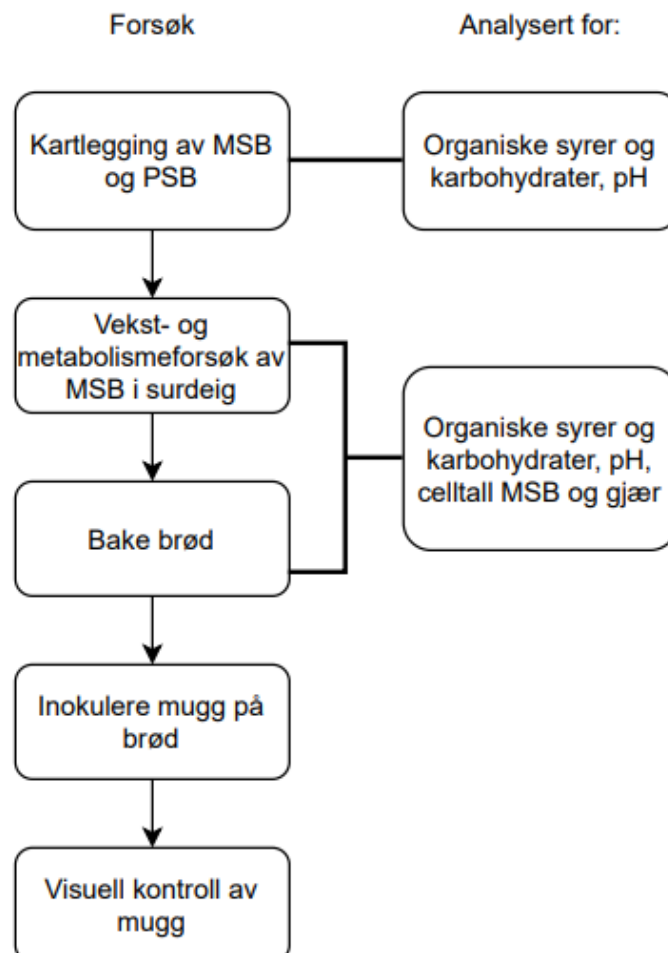
1.3 Problemstilling

Dette masterstudiet hadde som mål å finne ut mer om mulighetene til å hemme muggvekst i brød ved synergistisk effekt ved benyttelse av MSB og PSB sammen i surdeig. Dette ble undersøkt ved å se på evnen til å senke pH og produksjon av organiske syrer hos utvalgte MSB og PSB. I tillegg ble det laget surdeigsbrød tilsatt utvalgte MSB som ble inkubert med muggsporer for å undersøke hemming av muggvekst i brød.

2. Materialer og metoder

2.1 Forsøksoppsett

I dette studiet ble egenskaper hos MSB og PSB undersøkt med fokus på deres evne til å senke pH og produsere organiske syrer, forsøksoppsett figur 2. Deretter ble ulike utvalgte stammer MSB inokulert i surdeig for å kontrollere vekst og metabolisme. På grunnlag av resultatene ble tre stammer MSB valgt ut for å bli inokulert i brød bakt med surdeig, i tillegg ble et brød tilsatt propionsyre. Alle brødene ble sammenlignet opp mot brød bakt uten surdeig (kontroll). Brødene ble oppskåret i skiver og inokulert med sporeløsninger på overflaten, og muggveksten ble observert visuelt.



Figur 2. Forsøksoppsett. Oversikt over de ulike trinnene med aktiviteter og analyser utført i masterstudiet fra forberedelser med kartlegging av melkesyre bakterier (MSB) og propionsyre bakterier (PSB), videre til baking og etterfølgende observasjon av mugg på brødet.

2.2 Tillaging av vekstmedier

Det ble tillaget ulike vekstmedier for å dyrke opp aktive kulturer og bestemme celletall. For MSB ble det tillaget De Man Rogosa og Sharpe medium (MRS) buljong (Merck, Darmstadt, Tyskland) og agar hvor det i tillegg ble tilsatt 15 g/l agar (Oxoid, Basingstoke, England). De vekstmediene som ble tillaget for mugg og gjær var Rose-Bengal agar (RB) (Oxoid) supplementert med kloramfenikol (0,1 g/L) og Rose-Bengal Chloramphenicol agar (RBC) (Merck). For PSB ble det tillaget Natrium-laktatmedium buljong (SLB) som ble laget av 50% Na-laktat 15 g/l (VWR, Lewen, Belgia), Trypton 10 g/l (Oxoid), gjærekstrakt 10 g/l (Oxoid), K₂HPO₄ 0,25 g/l (Merck, Darmstadt, Tyskland), MgSO₄×7H₂O 0,20 g/l (VWR), MnSO₄×H₂O 0,005 g/l (Merck) og 1000 ml destillert vann, pH ble justert til 7,0 ved 22 °C. Natrium-laktatmedium agar (SLA) ble laget tilsvarende som SLB, men i tillegg ble den tilsatt 12 g/l agar (Oxoid).

2.3 Bakteriestammer

Bakteriestammer MSB og PSB valgt ut til innledende vekst- og metabolismeforsøk. Ni ulike MSB og ti ulike PSB ble valgt ut og er vist i tabell 2 og 3.

Tabell 2. Melkesyrebakterier benyttet i innledende forsøk.

Melkesyrebakterie stammer	Opprinnelse
<i>Lactobacillus (Lb.) plantarum</i> 15D	Ost
<i>Lb. paracasei</i> 448	Ost
<i>Weissella confusa</i> 76	Soyabønner ¹
<i>W. cibaria</i> 187	Soyabønner
<i>Lb. fermentum</i> 314	Soyabønner
<i>Lb. brevis</i> 152	Soyabønner
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 120	Soyabønner
<i>Leuconostoc citreum</i> 45	Bygg ²
<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	Bygg

¹ (Ng'ong'ola-Manani m.fl., 2015)

² (Kvam, 2017)

Tabell 3. Propionsyrebakterier benyttet i innledende forsøk.

Propionsyrebakterie stammer
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU P59 (INF-P205/ P10)
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616 (INF-P202/P7)
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 4875 (INF-P101/P2)
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50 (INF-204/P9)
<i>P. freudenreichii</i> ATTC 6207 (INF-201/ P5)
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3032 (INF-P303/P8)
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948 (INF-P213/P16)
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2931 (INF-210/P15)
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001 (INF-215/P18)
<i>P. freudenreichii</i> INF- α /203

2.4 Oppdyrking av MSB og PSB

Før benyttelse i forsøk ble MSB og PSB oppdyrket til aktiv kultur. Oppdyrking til aktiv kultur ble utført ved gjentakende poding og inkubering for både PSB og MSB. PSB stammene ble podet i 10 ml SLB i 10 ml rør for å oppnå tilnærmet anaerobe forhold. Rørene ble inkubert ved 30 °C i 48 timer. MSB stammene ble podet i MRS buljong og inkubert ved 30 °C i 24 timer.

2.5 Tillaging av frysestock

Frysestock-løsninger ble tillaget av MSB stammene *Lb. plantarum* 15D, *L. citreum* 45, og *Pediococcus pentosaceus* 120. Hver bakteriestamme ble podet (1%) i 300 ml MRS-buljong og inkubert i 24 timer ved 30 °C. MSB ble vasket to runder i steril Ringers løsning. Kulturene ble sentrifugert i en Beckman J2-MC Centrifuge (Beckman Instruments, California), ved 10 000 omdreininger/min (o/min) ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble helt av, og pelleten ble resuspendert i 150 ml Ringers løsning. Løsningen med pellet ble igjen sentrifugert ved samme betingelser. Supernatanten ble helt av, og pelleten ble igjen resuspendert i 50 ml Ringers. Løsningen med pellet ble igjen sentrifugert ved samme betingelser. Deretter ble supernatanten helt av og pelleten ble resuspendert i 30 ml Ringers løsning tilsatt 15% (vol/vol) glycerol og pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør (Microtubes MCT-50 C, Axygen®),

Mexico). Disse ble oppbevart i fryser ved -80 °C. Bakteriekonsentrasjonen (kde/ml) ble bestemt etter innfrysning og optining ved fortynning i Ringers løsning og innstøping i MRS agar (Merck (tilsatt 1,5% agar), og inkubering ved 30 °C i 48 timer.

2.6 Tillaging av sporeløsning

Aspergillus niger ATCC10577, *Penicillium roqueforti* (isolert fra Selbu Blå TINE) og *Fusarium* sp. ble podet på potet dekstrose agar (Merck), hvor 20 µl ble påsatt før inkubering i 3 uker. Videre ble det benyttet en podeøse til å ta ut sporer fra de respektive muggsoppartene og laget sporeløsninger med steril Ringers tilsatt 15% glycerol (vol/vol). Antall sporer ble telt ved hjelp av et tellekammer, Bürker hemocytometer (Marienfeld, Tyskland), og fortynnet slik at innholdet av sporer ble på $\sim 1,3-1,4 \times 10^6$ muggsporer/ml. Sporeløsningen ble pipettert over i 1,5 ml eppendorfrør og oppbevart i fryser ved -20 °C.

2.7 Karakteristikk hos surdeigen

Surdeig benyttet i forsøkene var opprinnelig fra Italia. Nåværende eier, Hilde Marit Østlie, har eid den i 5 år. Surdeigen har blitt regelmessig backsloppet (matet) hver 14. dag med siktet hvetemel (Regal, Norge) med forholdet 50 g surdeig, 50 g vann og 100 g siktet hvetemel. Surdeigen har blitt inkubert ved romtemperatur i ~ 16 timer og hadde en deigete konsistens. Aktiv surdeig ble benyttet i alle forsøkene. Etter gjennomføring av første innledende vekstforsøk av propionsyrebakterier i surdeig, ble surdeigen gjort mer flytende og ved backslopping ble det tilsatt mer vann (75 g vann, 100 g mel og 50 g surdeig). Etter gjennomføring av de innledende forsøkene ved kartlegging av MSB og PSB ble surdeigen backsloppet med 100 g vann, 100 g siktet hvetemel og 50 g surdeig som resulterte i at surdeigen hadde flytende konsistens. Hvetemelet (Regal, Norge) som ble brukt til surdeig og brødbaking hadde følgende kjemiske komposisjon: 12% protein, 68% karbohydrat, 2% fett og 2,2% fiber.

Tabell 4. Karakteristikk til surdeigen ved forsøkene og forhold mellom komponentene som ble benyttet ved backslopping. Vekstforsøk for propionsyrebakterier i surdeig ble gjennomført to ganger (P1 og P2).

	Forsøk P1	Forsøk P2	Vekst- og metabolisme- forsøk	Brødbaking
Kombinasjons forhold mellom råmaterialene (mel:vann:surdeig)	2:1:1	2:1,5:1	2:2:1	2:2:1
Fasthet surdeig (subjektiv vurdering)	Høy	Middels	Lav	Lav
Periode med backslopping	5 år			

2.8 Kartlegging av melkesyrebakterier og propionsyrebakterier

2.8.1 Innledende vekstforsøk

Innledende vekstforsøk ble utført for å kartlegge produksjon av organiske syrer og kapasitet til å senke pH hos ulike stammer MSB og PSB. Oversikt over bakteriestammene er henholdsvis i tabell 2 og 3. Aktive kulturer for MSB og PSB ble henholdsvis dyrket fram i MRS buljong i 24 timer ved 30 °C og SLB i 48 timer ved 30 °C. Etter inkubering ble pH målt, og produksjonen av organiske syrer ble målt ved «high performance liquid chromatography» (HPLC).

2.8.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PSB i surdeig

Det ble gjennomført to innledende vekstforsøk for å sjekke om PSB klarte å vokse i surdeigen. Surdeigen ble backsloppet 12 timer og oppbevart ved 23 °C før inokulering med PSB, forholdet mellom råvarene som ble benyttet til backslopping er oppgitt i tabell 4. Evnen til å vokse i surdeig ble testet hos bakteriestammene *Propionibacterium freudenreichii* ISU P50, LMG 2948, LMG 3001 og ATCC 9616. Celletall hos aktive kulturer av PSB stammene ble bestemt i forkant ved utplating på SLA, inkubert anaerobt ved 30 °C i 5 døgn. Kolonier ble telt i området 10-300 og gjennomsnittsverdiene for hvert respektive bakterietall ble beregnet. SLB med celletall $\sim 3 \times 10^9$ (kde/ml) av hver av PSB stammene ble benyttet til vekstforsøkene. Før inokulering ble aktive kultur av oppdyrkede bakterier i 10 ml SLB sentrifugert med Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan) i 10 min ved

3000 o/min før SLB mediet ble helt av. Pelleten ble resuspendert i steril Ringers, 400 µl i første forsøk og 9,9 ml i andre forsøk. I det første vekstforsøket (P1) ble det podet med 10^7 (kde/ml) PSB i 10 g surdeig og inkubert i 50 timer ved 30 °C. I det andre vekstforsøket (P2) ble det podet med 10^8 (kde/ml) i 10 g surdeig og inkubert 168 timer ved 30 °C. pH i surdeig ble målt før tilsats av PSB. Innhold av organiske syrer og karbohydrater i surdeig ble analysert ved HPLC både før tilsats av PSB og etter inkubering. Celletall etter inkubering i 168 timer ble sjekket i det andre vekstforsøket ved utplating på SLA, inkubert anaerobt ved 30 °C i 5 døgn.

2.9 pH måling

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

2.10 HPLC analyse

Det ble analysert innhold av organiske syrer og karbohydrater i prøver av inokulert medium, surdeig, deig og brød. Analysen ble gjennomført ved bruk av high performance liquid chromatography (HPLC) etter en metode beskrevet av Grønnevik m.fl. (2011) med noen modifikasjoner. Prøvene ble blandet godt før 1,00 g ble veid inn i et 10 ml belcorør. Prøvene ble tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) og 8 ml acetonitril (Merck). Deretter ble prøvene satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min ved 45 o/min. Prøvene ble sentrifugert i 15 minutter ved 1470 x g (3500 o/min) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan), i romtemperatur.

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

gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32 °C. Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

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

2.11 Vekst- og metabolismeforsøk av MSB i surdeig

For å sjekke vekst og metabolisme hos ulike MSB stammer inokulert i surdeig, ble organiske syrer, karbohydrater, pH og celletall for både MSB og gjær, undersøkt ved inokuleringstidspunktet og etter 24 timer i surdeig. Forsøket ble gjennomført med tre gjentak. Aktive kulturer av de aktuelle stammene MSB ble dyrket fram i MRS medium i 12 timer ved 30 °C. Surdeigen ble backsloppet (2 mel: 2 vann: 1 surdeig) og oppbevart ved 23 °C, dagen før inokulering slik at en hadde en aktiv surdeig. Ved tidspunkt for inokulering ble surdeig backsloppet og inokulert med 10⁷ kde/ml MSB og deretter inkubert ved 30 °C i 24 timer. Ikke inokulert surdeig ble benyttet som kontrollprøve. Ved 0 timer (T₀) og 24 timer (T₂₄) ble celletall estimert for melkesyrebakterier og gjær ved innstøping på henholdsvis MRS og RB (Oxoid) supplementert med kloramfenikol (0,1 g), det ble målt pH og utført HPLC for organiske syrer og karbohydrater. For estimering av celletall ble 10,0 g surdeig av hver prøve veid ut i steril Stomacherpose (Seward, VWR, Oslo) og tilsatt 90 ml steril Ringers og blandet i Stomacher 400 (Seward) i 2 min på hastighet høy, for å oppnå en homogen løsning. Den homogene løsningen ble seriefortynnet og innstøpt i MRS agar inkubert i 48 timer ved 30 °C, og RB ved 22 °C i 96 timer. Kolonier ble telt i området 10-300 og gjennomsnittsverdiene for hvert respektive bakterietall ble beregnet.

2.12 Hemmeforsøk av mugg i brød

For å evaluere melkesyrebakterier sin evne til å hemme muggvekst ble det bakt brød med surdeig tilsatt ulike MSB stammer, og i tillegg til at det også ble tilsatt propionsyre i et brød. Brød bakt med kun gjær ble brukt som kontroll. Brødene ble skåret opp i skiver og tilsatt sporeløsning og observert muggvekst. Det ble gjennomført 3 gjentak på hemmeforsøket.

2.12.1 Brødbaking

1439 g siktet hvetemel (Regal, Norge), 23,1 g salt, 1000 g vann ble eltet sammen i 5 min i en eltemaskin (Kenwood Major Classic) på hastighet 1. Romtemperatur var på 21 °C. Denne fordeigen ble videre delt opp i 6 emner på 397 g. Hvert emne ble tilsatt 53,5 g aktiv surdeig og MSB tilsvarende 10⁷ (kde/ml) av hver som vist i tabell 5, bortsett fra kontroll. To brød ble tilsatt en miks av de tre MSB stammene (M og MP), hvor den ene ble tilsatt propionsyre (MP) tilsvarende 0,03% av total vekt på MP deigen. Fordeigen og gjenstående ingredienser, se tabell 5, ble eltet inn for hånd i 4 min. Deigene ble formet til brød og overført til aluminiumsformer (20 cm × 7 cm × 6 cm). Deigene ble hevet i 12 timer ved 21 °C og stekt ved 175 °C på varmluft i 70 min (Electrolux). Brødene ble tatt ut av formene og nedkjølt i 4 timer ved romtemperatur (21 °C).

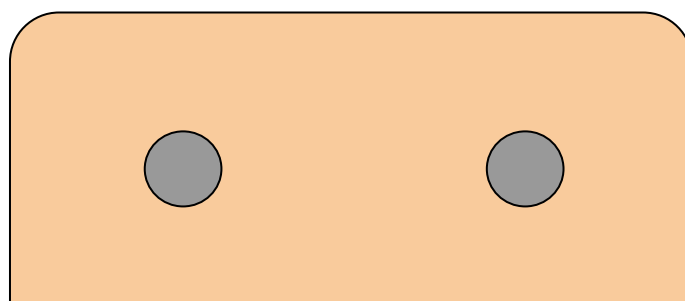
Tabell 5. Ingrediensene i surdeigsbrødene og kontrollbrød benyttet til hemmeforsøk. Brød tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP).

	K	S	L	P	M	MP
Siktet hvetemel (Regal, Norge) (g)	293,5	266,8	266,8	266,8	266,8	266,8
Vann (g)	202,8	176,1	174,8	174,7	173,4	173,4
Salt (g)	3,73	3,73	3,73	3,73	3,73	3,73
Surdeig (g)		53,5	53,5	53,5	53,5	53,5
Gjær (g)	0,55					
Kalsium-propionat (g)						1,5
L-45 ¹ (ml)			1,28		1,28	1,28
P-120 ² (ml)				1,33	1,33	1,33
Lb.-15D ³ (ml)					0,128	0,128
Total vekt (g)	501	500	500	500	500	502

¹ L-45 (*Leuconostoc citreum* 45), ² Lb.-15D (*Lactobacillus plantarum* 15D), ³ P-120 (*P. pentosaceus* 120)

2.12.2 Sporeinokulering av brød

Brødene ble oppskåret i skiver og lagt i petriskål. Brødsnivene ble inokulert på overflaten med 10 µl i to punkter, slik figur 3 viser, av en sporeløsning på $1,31-1,44 \times 10^6$ muggsporer/ml. Brødsnivene ble inkubert i petriskålene ved 25 °C. Muggveksten på brødsnivene ble observert visuelt i en uke.



Figur 3. Inokuleringspunkter for muggløsning på brødsnivene.

2.12.3 Analyser av deig og brød

Prøveuttak ble gjort etter elting (T0) og før steking (T1) av de ulike deigene. Kjemiske analyser som pH og HPLC, i tillegg til mikrobiologiske analyser som utplating på RB og MRS for å estimere antall gjær og melkesyrebakterier ble foretatt. Det ble gjort prøveuttak av brødene etter steking (T2) til HPLC og pH, hvor kun innmaten av brødet ble benyttet. Celletall, pH og konsentrasjon av organiske syrer og karbohydrater ble bestemt som tidligere beskrevet, bortsett fra for pH i stekt brød hvor 5 g brød ble veid inn sammen med 15 g vann i Ola beger, ristet i 30 sek, og målt etter 30 min. Celletall for MSB ble bestemt ved utplating på MRS agar etter inkubering ved 30 °C i 48 timer. Celletall for gjær ble bestemt ved utplating på RBC etter inkubering ved 22°C i 96 timer. Kolonier ble telt i området 10-300 og gjennomsnittsverdiene for hvert respektive bakterietall ble beregnet.

2.13 Statistisk analyse

Det ble utført enveis Analysis of variance (ANOVA) i Excel for å undersøke om det var signifikante forskjeller i innhold av eddiksyre og melkesyre mellom prøver av deig til surdeigsbrød (T1) og av surdeigsbrødene (T2). Parvis sammenligning av gjennomsnittene ble utført ved Tukey's test ved $P < 0,05$.

3. Resultater

3.1 Kartlegging av MSB og PSB

3.1.1 Innledende vekstforsøk

Den første delen av studiet hadde som mål å kartlegge de utvalgte MSB og PSB for å finne ut hvilke stammer MSB og PSB som skulle benyttes videre for å tilsettes i brød for hemming av mugg. Det ble undersøkt pH og innhold av karbohydrater og organiske syrer etter inkubering i 24 timer for de ulike stammene MSB (tabell 6) og 48 timer for stammene PSB (tabell 7). Rådata for organiske syrer og karbohydrater, ligger i vedlegg 1. Ni MSB stammer ble inokulert i MRS buljong som hadde pH 5,76. De målte pH-verdiene varierte fra 3,88 (*Lb. plantarum* 15D) til 4,82 (*Lb. brevis* 152). *Lb. plantarum* 15D og *Lb. paracasei* 448 senket pH mest henholdsvis til 3,88 og 4,00 og produserte størst mengde melkesyre henholdsvis 15177 mg/kg og 11680 mg/kg. *L. pseudomesenteroides* 107 produserte lavest mengde melkesyre med 5329 mg/kg. Sitrat ble fullstendig omsatt av *Lb. plantarum* 15D, *P. pentosaceus* 120, *L. pseudomesenteroides* 107, *W. confusa* 76 og *L. citreum* 45. Konsentrasjonen av eddiksyre i MRS buljong var 3615 mg/kg. De målte konsentrasjonene for eddiksyre varierte fra 3633 mg/kg (*Lb. paracasei* 448) til 4690 mg/kg (*L. citreum* 45). Selv om *Lb. paracasei* 448 senket pH-verdien mye og produserte mye melkesyre ble det valgt å ikke ha den med videre forsøk, fordi den produsert minst eddiksyre. *P. pentosaceus* 120 og *L. citreum* 45 produserte høy mengde eddiksyre og melkesyre, samtidig som de senket pH mye. *Lb. fermentum* 314 produserte høy mengde melkesyre (8709 mg/kg) og senket pH tredje mest (4,29) og var den eneste hvor det ikke ble detektert noe glukose etter 24 timer inkubering, noe som antyder at den har benyttet all glukosen i MRS buljongen. *Lb. plantarum* 15D, *P. pentosaceus* 120, *Lb. fermentum* 314 og *L. citreum* 45 ble valgt til videre forsøk.

Tabell 6. pH og mengde karbohydrater og organiske syrer omsatt og produsert av MBS stammer inokulert i De Man Rogosa og Sharpe (MRS) buljong i 24 timer ved 30 °C. pH etter fermentering av MBS. 0-prøve er MRS buljong.

Stamme/Buljong	pH	Karbohydrat (mg/kg)	Organiske syrer (mg/kg)		
		Glukose	Melkesyre	Eddiksyre	Sitronsyre
MRS buljong	5,76	17098	n.d*	3616	1804
<i>Lactobacillus (Lb.) plantarum</i> 15D	3,88	1481	15177	4379	n.d
<i>Lb. paracasei</i> 448	4,00	6516	11680	3633	1797
<i>Weissella confusa</i> 76	4,53	4206	7475	4546	n.d
<i>W. cibaria</i> 187	4,60	5793	5625	3774	1865
<i>Lb. fermentum</i> 314	4,29	n.d	8709	3712	1849
<i>Lb. brevis</i> 152	4,82	8104	4449	3778	1904
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 120	4,43	3530	7667	4670	n.d
<i>Leuconostoc citreum</i> 45	4,34	1455	8797	4690	n.d
<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	4,72	8153	5329	4607	n.d

*n.d = ikke detektert

Ti PSB stammer ble inokulert i SLB som inneholdt 6099 mg/kg melkesyre og hadde pH 6,99. De målte pH-verdiene varierte fra 5,93 (*P. freudenreichii* ATCC 9616) til 6,40 (*P. acidipropionici* ATTC 6207). De analyserte konsentrasjonene for eddiksyre varierte fra 664 mg/kg (*P. acidipropionici* ATTC 6207) til 1701 mg/kg (*P. freudenreichii* ATCC 9616). *P. freudenreichii* LMG 3001, *P. freudenreichii* ISU P50 og *P. freudenreichii* LMG 2948 produserte henholdsvis eddiksyre i følgende konsentrasjoner 1468, 1494 og 1607 mg/kg. *P. freudenreichii* LMG 3001, ATCC 9616, ISU P50 og LMG 2948 produserte mest propionsyre med konsentrasjoner i området mellom 3060 og 3493 mg/kg og i tillegg ble det ikke detektert noe melkesyre, og ble på grunnlag av det valgt til videre forsøk.

Tabell 7. pH og mengde organiske syrer omsatt og produsert av propionsyrebakterier (PSB) stammer inkubert i Natrium-laktat medium buljong (SLB) i 48 timer ved 30 °C.

Stamme/buljong	pH	Organiske syrer (mg/kg)		
		Melkesyre	Propionsyre	Eddiksyre
SLB	6,99	6099	n.d*	n.d
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU P59	6,31	2940	1469	829,6
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	5,93	n.d	3061	1701
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 4875	6,25	n.d	3128	1395
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	6,28	n.d	3493	1494
<i>P. acidipropionici</i> ATTC 6207	6,40	3299	1209	663,7
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3032	6,11	n.d	2898	1419
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	6,24	n.d	3226	1607
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2931	6,27	n.d	2991	1289
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	6,30	n.d	3222	1468
<i>P. freudenreichii</i> INF- α	6,27	n.d	2857	1431

*n.d = ikke detektert

3.1.2 Innledende vekst- og metabolismeforsøk av PSB i surdeig

PSB sin evne til å vokse i surdeig ble undersøkt. pH i surdeig ble målt til 3,95. Organiske syrer ble analysert ved HPLC og det ble ikke detektert noe propionsyre i noen av surdeigene inokulert med propionsyre. For kontroll ble antall PSB bestemt ved innstøping i SLA, hvor celtallet ble bestemt til å være noe lavere i surdeigen etter inkubering enn antallet som ble inokulert, tabell 8. Dette indikerer også at PSB stammene ikke har vokst i surdeigen.

Tabell 8. Inokulert celletall i surdeig (T0) og celletall etter 168 timer (T168) inkubering ved 30 °C etter innstøping i Natrium-laktatmedium agar.

Propionsyrebakterier	Celletall (log kde/ml)	
	T0	T168
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> LMG 3001	8,08	7,88
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	8,14	7,86
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	8,03	7,86
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	8,08	7,78

3.2 Vekst og metabolisme av MSB i surdeig

Det ble undersøkt celletall for gjær og MSB, pH-utvikling og innhold av karbohydrater og organiske syrer, for å se effekten av fermentering med de ulike MSB i surdeigen, vist i tabell 9. Alle resultater er beregnet ut fra 3 gjentak av fermenteringsforsøket. Enkelte verdier som hadde veldig stort avvik fra andre paralleller, ble utelukket fra beregningen. Alle gjennomsnittsverdier og standardavvik er beregnet fra 2-3 paralleller. Rådata for alle gjentak for celletall, pH, organiske syrer og karbohydrater ligger i vedlegg 2.

Tabell 9. Organiske syrer, pH og karbohydrater i hvetesurdeig fermentert med *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D), *L. citreum* 45 (L-45), *P. pentosaceus* 120 (P-120) og en blanding av de tre (MIX) og referanse surdeig (REF). Alle stammene ble inokulert i surdeigen med ~ 7 log kde/g og prøve ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer inkubering ved 30 °C. Data er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for tre uavhengige forsøk.

		Mengde (mg/kg)									
		REF		Lb.-15D		L-45		P-120		MIX	
		T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24	T0	T24
pH		5,10 \pm 0,05	3,64 \pm 0,01	5,02 \pm 0,07	3,67 \pm 0,04	4,95 \pm 0,03	3,68 \pm 0,02	4,97 \pm 0,03	3,66 \pm 0,03	4,89 \pm 0,05	3,69 \pm 0,05
Organiske syrer	Melkesyre	1381 \pm 117,8	8706 \pm 157,2	1375 \pm 108,3	8685 \pm 160,1	1607 \pm 154,4	8863 \pm 220,2	1583 \pm 163,0	8674 \pm 206,7	1775 \pm 82,7	8851 \pm 143,5
	Eddiksyre	369,4 \pm 126,70	1157 \pm 23,03	352,9 \pm 98,599	1167 \pm 33,51	286,7 \pm 11,02	1293 \pm 30,66	253,6 \pm 6,48	1243 \pm 23,82	359,6 \pm 24,54	1323 \pm 29,90
	Sitronsyre	66,5 \pm 0,51	100,4 \pm 5,08	68,1 \pm 4,74	42,0 \pm 4,97	61,2 \pm 4,91	42,2 \pm 2,49	66,4 \pm 3,00	41,2 \pm 2,91	57,1 \pm 5,91	29,1 \pm 13,9
	Ravsyre	332,9 \pm 54,8	n.d*	463,8 \pm 66,6	112,8 \pm 10,9	522,1 \pm 53,9	155,3 \pm 26,0	511,1 \pm 66,2	180,3 \pm 7,28	458,1 \pm 85,8	181,0 \pm 25,4
Karbohydrater	Glukose	512,6 \pm 124,44	n.d	443,8 \pm 94,86	n.d	481,3 \pm 78,86	n.d	464,2 \pm 69,23	n.d	496,1 \pm 111,56	n.d
	Fruktose	1848 \pm 458,1	n.d	1829 \pm 488,3	n.d	1782 \pm 451,6	n.d	1782 \pm 463,0	n.d	1656 \pm 391,4	n.d
	Maltose	5105 \pm 388,4	96,2 \pm 9,21	4766 \pm 304,0	102,1 \pm 8,42	4874 \pm 178,9	102,9 \pm 15,9	4868 \pm 114,9	111,7 \pm 9,92	4739 \pm 259,2	87,5 \pm 4,93

*n.d = ikke detektert

Trenden for pH-utviklingen var tilnærmet lik for alle de fermenterte surdeigene, pH ved T0 varierte fra $4,89 \pm 0,05$ (MIX) til $5,10 \pm 0,05$ (REF) og ved T24 varierte det fra $3,64 \pm 0,01$ (REF) til $3,69 \pm 0,05$ (MIX). Konsentrasjon av organiske syrer økte mye fra T0 til T24 for alle surdeigene både for eddiksyre og melkesyre. Konsentrasjonen av ravsyre og sitronsyre ble redusert i alle surdeigene fra T0 til T24, bortsett fra REF, hvor konsentrasjonen av sitronsyre økte fra T0 til T24. De analyserte konsentrasjonene for melkesyre ved T24 varierte fra $8863 \pm 220,2$ (L-45) til $8674 \pm 206,7$ mg/kg (P-120). Den høyeste konsentrasjonen av eddiksyre ble funnet i MIX ($1323 \pm 29,90$ mg/kg). Konsentrasjonen av eddiksyre ved T0 varierte fra $253,6 \pm 6,48$ (P-120) til $369,4 \pm 126,70$ mg/kg (REF). Av surdeigene inokulert med MSB produserte *Lb. plantarum* 15D minst eddiksyre og det ble derfor valgt å ikke inokulere den individuelt i hemmeforsøket i brød.

Innholdet av alle karbohydratene minket mye fra T0 til T24 i alle surdeigene. Ved T0 varierte konsentrasjonene for fruktose fra $1656 \pm 391,4$ (MIX) til $1848 \pm 458,1$ mg/kg (REF) og for glukose fra $443,8 \pm 94,86$ (Lb.-15D) til $512,6 \pm 124,44$ mg/kg (REF). Det ble ikke detektert hverken fruktose eller glukose ved T24. Innholdet av maltose ved T0 varierte fra $4739 \pm 259,2$ (MIX) til $5105 \pm 388,4$ mg/kg (REF) og ved T24 varierte det fra $87,5 \pm 4,93$ (MIX) til $111,7 \pm 9,92$ mg/kg (P-120). Innholdet av maltose og glukose ved T0 ble analysert til å være tilnærmet likt for alle prøvene i gjentak 1. Det var også veldig likt i gjentak 2 og 3, men noen forskjeller mellom gjentakene ga stort standardavvik.

Tabell 10. Celletall i hvetesurdeig fermentert med *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D), *L. citreum* 45 (L-45), *P. pentosaceus* 120 (P-120) og en blanding av de tre sistnevnte (MIX) og referanse surdeig (REF) etter innstøping i De Man Rogosa og Sharpe (MRS) og Rose Bengal (RB) agar. Alle stammene ble inokulert med ~ 7 log kde/g og prøve ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer. Data er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

	Celletall (log kde/g)			
	Gjær (RB)		MSB (MRS)	
Prøveuttak	T0	T24	T0	T24
REF	6,79 ± 0,14	7,07 ± 0,30	8,37 ± 0,38	9,03 ± 0,17
Lb.-15D	6,84 ± 0,07	7,06 ± 0,41	8,33 ± 0,21	8,90 ± 0,17
L-45	6,86 ± 0,07	7,18 ± 0,31	8,39 ± 0,20	8,97 ± 0,14
P-120	6,86 ± 0,04	7,30 ± 0,23	8,27 ± 0,29	9,28 ± 0,39
MIX	6,90 ± 0,06	7,30 ± 0,20	8,23 ± 0,13	9,08 ± 0,14

Celletall for gjær og MSB ble bestemt ved innstøping i henholdsvis RB og MRS og er vist i tabell 10. RB uten supplement med kloramfenikol ble benyttet i de to første gjentakene, men siden resultatene for celletall på gjær var veldig like for alle tre gjentakene ble alle benyttet i resultatdelen. Celletallet for gjær ble bestemt til å være tilnærmet likt i alle surdeigene, både ved inokulering og etter 24 timer, økningen var i alle på ~ 0,3 log kde/g. Dette viser at innholdet av gjær er stabilt i surdeigen. Det estimerte celletallet for MSB ved start av fermenteringen varierte fra 8,23 ± 0,13 til 8,39 ± 0,20 log kde/g. På slutten av fermenteringen hadde alle surdeigene et estimert celletall for MSB som varierte fra 8,90 ± 0,17 til 9,28 ± 0,39 log kde/g. Celletallet økte med ~ 0,6 log kde/g for alle, bortsett fra P-120 og MIX som økte henholdsvis med ~ 1 og 0,85 log kde/g.

3.3 Hemmeforsøk av mugg i brød

Hemmeforsøk i brød ble gjennomført for å se nærmere på om utvalgte MSB har ulik grad av hemmende effekt på mugg i brød, ved å se på produksjon av organiske syrer og senkning av pH. Det ble undersøkt celletall for gjær og MSB, pH-utvikling og innhold av karbohydrater og organiske syrer i brød, for å se i sammenheng med hvor lang tid før det ble visuelt observert mugg på de ulike brødene. Rådata for alle gjentak for celletall, pH, organiske syrer og karbohydrater ligger i vedlegg 3.

Tabell 11. Celletall i deig til brødbaking etter innstøping på Rose Bengal (RB) og De Man Rogosa og Sharpe (MRS) agar. Deig tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Alle stammene ble inokulert i deigen ved ~ 7 log kde/g og prøve ble tatt ut rett etter elting (T0) og etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1). Data er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

	Celletall (log kde/g)			
	Gjær (RB)		MSB (MRS)	
	T0	T1	T0	T1
S	6,35 ± 0,10	6,88 ± 0,09	7,87 ± 0,07	9,14 ± 0,07
L	6,28 ± 0,18	6,95 ± 0,13	7,87 ± 0,16	9,21 ± 0,07
P	6,17 ± 0,15	6,94 ± 0,15	7,84 ± 0,14	9,16 ± 0,02
M	6,31 ± 0,08	7,09 ± 0,21	8,04 ± 0,09	9,19 ± 0,09
MP	6,34 ± 0,19	6,52 ± 0,19	8,15 ± 0,14	9,18 ± 0,04
K	5,34 ± 0,23	5,72 ± 0,06	>4*	>5*

*Gjærceller observert ved mikroskopering

Celletall for gjær og MSB i deigene ble bestemt etter innstøping i henholdsvis RB og MRS agar og er vist i tabell 11. Celletallet for gjær ble bestemt til å være tilnærmet likt i alle deigene tilsatt surdeig ved T0 med 6,17-6,34 log kde/g. Celletallet for kontrolldeigen (K) var ~ 1 log kde/g lavere sammenlignet med deigene tilsatt surdeig ved T0 med 6,17-6,34 log kde/g. Deigen tilsatt kalsiumpropionat hadde lavest økning i celletall fra T0 til T1. Celletallet for MSB i surdeigsbrødene rett etter elting varierte fra 7,84 ± 0,14 (P) til 8,15 ± 0,14 (MP) log kde/g. Etter hevingen hadde deigene tilsatt surdeig et celletall for MSB som varierte fra 9,14 ± 0,17 (S) til 9,21 ± 0,07 (L) log kde/g, og celletallet hadde økt med over 1 log kde/g for alle deigene tilsatt surdeig. Utplating av kontrollbrødet i MRS antydte høy mengde MSB, men videre undersøkelse ved mikroskopering av flere av koloniene tilsa at det var gjær.

Tabell 12. Organiske syrer og karbohydrater i deig til brødbaking. Deig tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Prøve ble tatt ut rett etter elting (T0) og etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1). Data er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

		Mengde (mg/kg)						
		Maltose	Glukose	Fruktose	Ravsyre	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre
S	T0	8320 ± 389,6	846,4 ± 160,2	2195 ± 196,5	n.d ¹	n.d	290,3 ± 33,0	n.d
	T1	7375 ± 640,0	267,7 ± 47,9	2214 ± 281,1	164,6 ± 1,87	3748 ± 665,0	752,7 ± 69,8	n.d
L	T0 ²	8320 ± 389,6	846,4 ± 160,2	2195 ± 196,5	n.d	n.d	290,3 ± 33,0	n.d
	T1	7608 ± 1506,7	147,6 ± 17,5	2312 ± 121,4	268,5 ± 31,5	4331 ± 77,0	954,1 ± 28,0	n.d
P	T0 ²	8320 ± 389,6	846,4 ± 160,2	2195 ± 196,5	n.d	n.d	290,3 ± 33,0	n.d
	T1	6729 ± 1098,6	229,7 ± 46,5	2004 ± 232,3	504,8 ± 87,5	3560 ± 564,1	906,2 ± 94,0	n.d
M	T0 ²	8320 ± 389,6	846,4 ± 160,2	2195 ± 196,5	n.d	n.d	290,3 ± 33,0	n.d
	T1	5914 ± 621,7	187,3 ± 34,7	1750 ± 99,6	414,1 ± 53,7	3691 ± 770,0	874,3 ± 142,5	n.d
MP	T0	8618 ± 307,6	870,4 ± 184,4	2105 ± 196,5	n.d	n.d	330,7 ± 26,5	2776 ± 575,7
	T1	6770 ± 789,1	248,2 ± 75,4	2183 ± 76,8	404,6 ± 9,4	3824 ± 749,1	851,4 ± 97,5	2287 ± 482,0
K	T0	7706 ± 654,5	1597 ± 196,7	3218 ± 213,5	n.d	n.d	251,1 ± 8,8	n.d
	T1	7011 ± 730,8	2139 ± 503,3	3217 ± 443,1	n.d	n.d	246,5 ± 53,4	n.d

¹n.d = ikke detektert

²T0: Resultatene for organiske syrer og karbohydrater for S ved T0 blir benyttet som T0 for alle surdeigene; S, L, P og M.

Resultatene for organiske syrer og karbohydrater for S ved T0 blir benyttet som T0 for alle surdeigene, S, L, P og M. De analyserte konsentrasjonene for eddiksyre ved T0 varierte fra 251,1 ± 8,8 for kontrolldeigen (K) til 330 ± 26,47 mg/kg deig tilsatt surdeig og kalsiumpropionat (MP), tabell 12. Innholdet av ravsyre økte i alle surdeigsbrødene fra T0 til T1.

Tabell 13. Organiske syrer og karbohydrater i brød. Brød tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Prøve ble tatt ut etter brødet var nedkjølt etter steking (T2). Data er vist som gjennomsnitt ± standardavvik for tre uavhengige forsøk.

		Mengde (mg/kg)						
		Maltose	Glukose	Fruktose	Ravsyre	Melkesyre	Eddiksyre	Propionsyre
S	T2	9062 ± 1189,5	376,3 ± 127,5	3151 ± 397,9	n.d	4457 ± 411,1	936,1 ± 28,8	n.d
L	T2	8216 ± 865,6	313,6 ± 143,4	3280 ± 251,2	387,6 ± 41,0	4709 ± 246,4	1018 ± 28,8	n.d
P	T2	7680 ± 491,0	276,5 ± 55,4	2968 ± 210,9	690,4 ± 70,0	4488 ± 246,4	988,3 ± 41,3	n.d
M	T2	9371 ± 1712,2	587,6 ± 463,9	3017 ± 267,1	691,4 ± 52,0	4005 ± 877,4	1145 ± 122,0	n.d
MP	T2	9381 ± 599,9	538,7 ± 74,7	3104 ± 327,0	639,7 ± 124,1	4357 ± 646,2	1026 ± 36,2	2920 ± 338,4
K	T2	14279 ± 1390,0	2645 ± 422,7	3874 ± 123,0	n.d	n.d	n.d	n.d

De analyserte verdiene for eddiksyre etter steking (T2) varierte fra $936,1 \pm 28,8$ (S) til $1145 \pm 122,0$ mg/kg (M), vist i tabell 13. For melkesyre varierte innholdet i brødene etter steking fra 4005 mg/kg (M) til $4709 \pm 246,4$ mg/kg (L). Av de analyserte brødene ved T2 hadde L høyest innhold av melkesyre ($4709 \pm 246,4$ mg/kg) og M hadde høyest innhold av eddiksyre ($1145 \pm 122,0$ mg/kg). Konsentrasjonen av eddiksyre og melkesyre økte fra T0 til T1 for alle prøvene bortsett fra kontrollbrødet. Surdeigsbrødene hadde signifikant ($P < 0,05$) høyere konsentrasjon av eddiksyre og melkesyre enn kontrollbrødet både ved T1 og T2. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom innhold av eddiksyre og melkesyre mellom de ulike surdeigsbrødene. MP var den eneste prøven hvor det ble detektert propionsyre. Ravsyre ble detektert i alle surdeigsbrødene bortsett fra S. Ut ifra resultatene for de analyserte karbohydratene, er trenden at innholdet av maltose og glukose minker under fermentering (fra T0 til T1) i alle prøvene. Innholdet av fruktose var tilnærmet lik under fermentering, bortsett fra i M hvor den sank.

Tabell 14. pH målt i deig rett etter elting (T0), etter heving i 12 timer ved $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T1) og i brød (T2), i brød tilsatt kun gjær, kontroll (K), og tilsatt kun surdeig (S) og i tillegg fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Data er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik for tre uavhengige forsøk.

	S	L	P	M	MP	K
Deig (T0)	$5,82 \pm 0,04$	$5,73 \pm 0,09$	$5,88 \pm 0,06$	$5,72 \pm 0,13$	$5,81 \pm 0,08$	$6,02 \pm 0,03$
Etter heving (T1)	$4,25 \pm 0,04$	$4,27 \pm 0,03$	$4,23 \pm 0,06$	$4,19 \pm 0,03$	$4,57 \pm 0,05$	$5,80 \pm 0,05$
Brød (T2)	$4,45 \pm 0,14$	$4,35 \pm 0,06$	$4,36 \pm 0,11$	$4,36 \pm 0,08$	$4,60 \pm 0,05$	$6,18 \pm 0,04$

pH ble målt i deig rett etter elting (T0), etter heving (T1) og i brød (T2), vist i tabell 14.

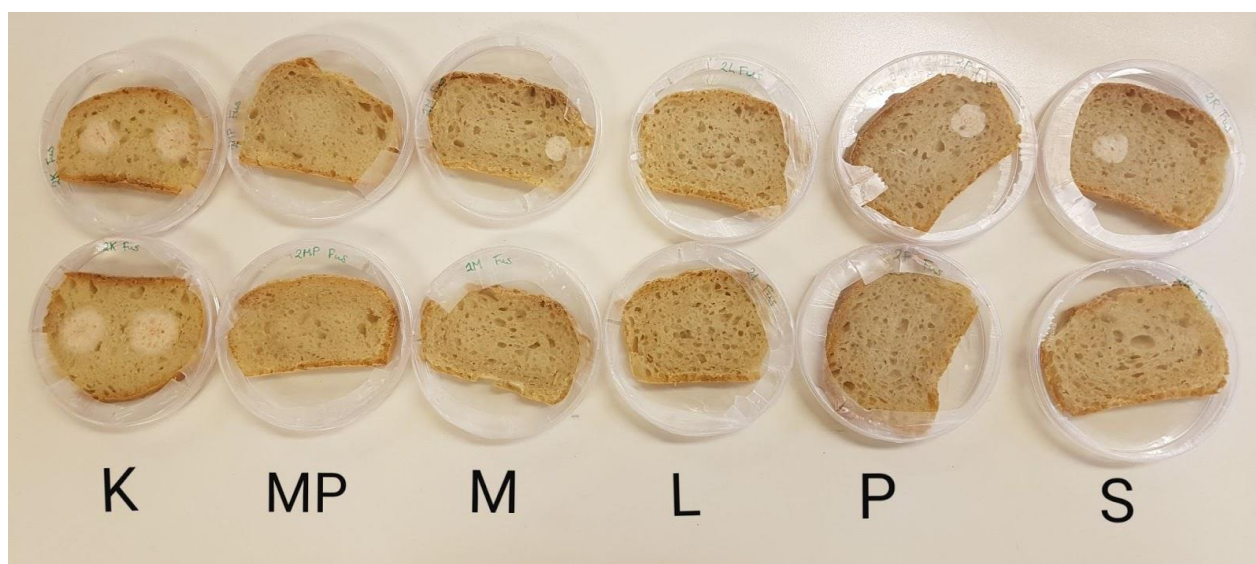
Trenden for alle prøvene er at pH ble senket fra T0 til T1 og øker fra T1 til T2. pH målt i brødene (T2) bakt med surdeig varierte fra $4,35 \pm 0,06$ (L) til $4,45 \pm 0,14$ (S), mens brødet bakt med surdeig og propionsyre hadde litt høyere pH-verdier $4,60 \pm 0,05$ (MP).

Kontrollbrødet hadde høyest pH av alle prøvene ved T0, T1 og T2 henholdsvis $6,02 \pm 0,03$, $5,80 \pm 0,05$ og $6,18 \pm 0,04$. pH for alle deigene tilsatt surdeig ble senket med $\sim 1,5$ pH-enhet i løpet av hevingen (fra T0 til T1).

3.3.1 Visuell observasjon av muggvekst

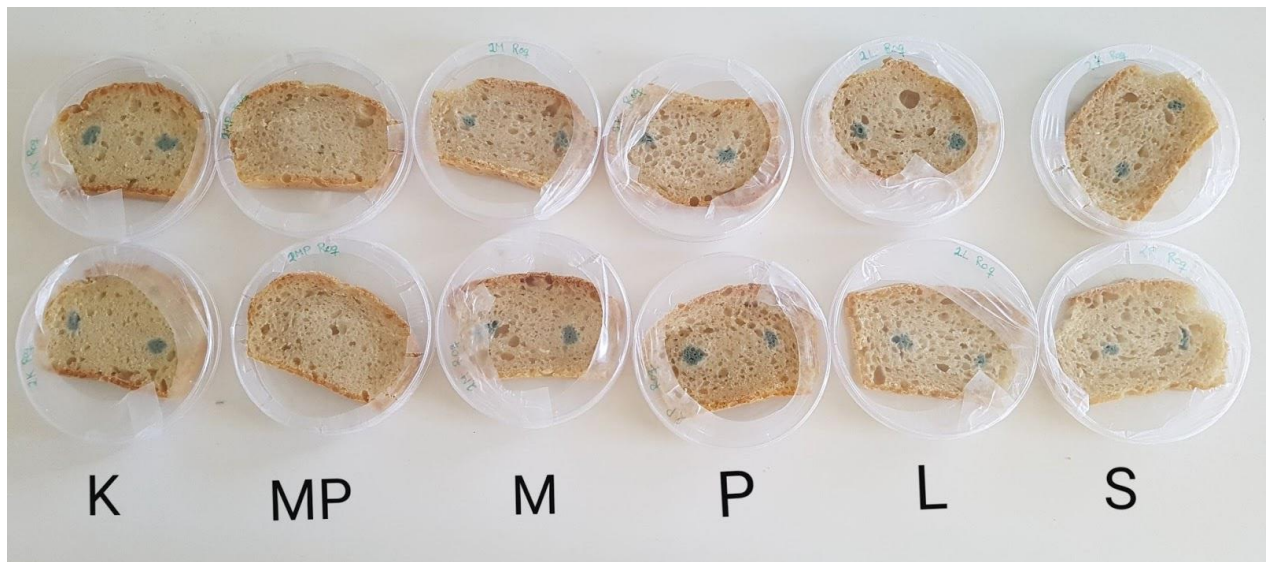
Muggvekst på brødsnivene ble visuelt vurdert i 21 dager etter inkubering ved 25 °C.

Muggvekst ble her definert som både synlig vegetativt mycel og/eller sporedannelse. Det ble observert muggvekst på kontrollbrødsnivene inokulert med *Fusarium* sp. etter 2 ± 0 dager (K). Muggvekst av *Fusarium* sp. ble observert som hvit og rosa “korthåret” vegetativt mycel, figur 4. For surdeigsbrødene uten propionsyre inokulert med *Fusarium* sp. varierte resultatene i stor grad, fra mugg observert etter 2 døgn til etter 15 dager, samtidig som det var mange paralleller hvor det ikke ble detektert mugg.

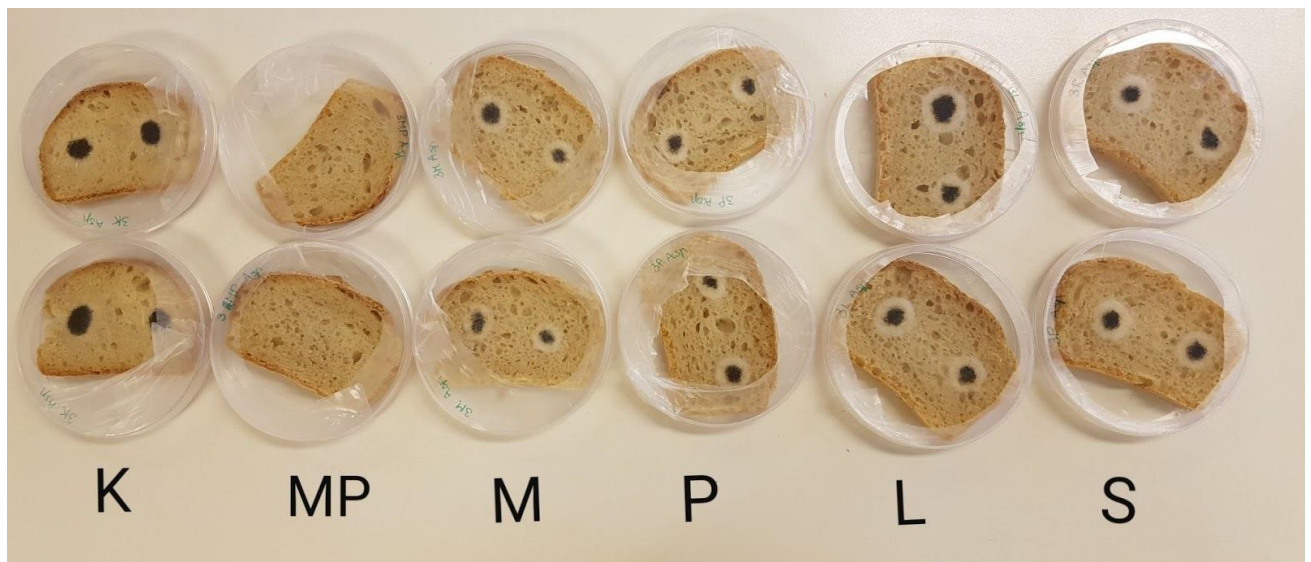


Figur 4. Brødsivener av kontrollbrød (K), surdeigsbrød (S) og surdeigsbrød inokulert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP), inokulert med ~14000 sporer av *Fusarium* sp. i to punkter etter 4 dager inkubering ved 25 °C. Parallelle skåler av prøvene plassert vertikalt.

Etter inkubering i 2 dager ble det observert muggvekst for prøvene inokulert med *P. roqueforti* og *A. niger*, på alle brødsnivene bortsett fra MP, tabell 15. For *P. roqueforti* ble muggveksten observert som blågrønt vegetativt mycel, figur 5. Muggvekst av *A. niger* ble observert som både hvitt vegetativt mycel som lignet bomull og sorte sporer (konodie). Tykkelsen på den hvite vegetative veksten av *A. niger* var høyere på alle surdeigsbrødene, enn for kontrollbrødene, bortsett fra MP hvor det ikke ble observert muggvekst, figur 6. For prøvene inokulert med *A. niger* ble det observert sporer på kontrollbrødsnivene allerede etter 2 dager, mens det for prøvene med surdeig ble det observert sporer dag 3, figur 7.



Figur 5. Brødskiver av kontrollbrød (K), surdeigsbrød (S) og surdeigsbrød inokulert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP), inokulert med ~14000 sporer av *P. roqueforti* i to punkter etter 3 dager inkubering ved 25 °C. Parallele skåler av prøvene plassert vertikalt.



Figur 6. Brødskiver av kontrollbrød (K), surdeigsbrød (S) og surdeigsbrød inokulert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP), inokulert med ~14000 sporer av *A.niger* i to punkter etter 3 dager inkubering ved 25 °C. Parallele skåler av prøvene plassert vertikalt.



Figur 7. Brødskeer av kontrollbrød (K), til venstre, og surdeigsbrød inokulert med *L. citreum* 45 (L) til høyre, inokulert med ~14000 sporer av *A. niger* i to punkter etter 2 dager inkubering ved 25 °C. Parallele skåler av prøvene plassert vertikalt.

Propionsyre hadde sterk hemmende effekt på alle de tre testede muggsoppene. For MP inokulert med *P. roqueforti* ble det observert muggvekst etter $4,7 \pm 0,5$ dager, mens for MP inokulert med *A. niger* og *Fusarium* sp. ble det ikke observert muggvekst i løpet av inkuberingsperioden, som indikerer en holdbarhet på mer enn tre uker med hensyn til muggvekst av de nevnte muggsoppene.

Tabell 15. Observert mugg etter antall dager inkubering av brødsriver med kontrollbrød (K), surdeigsbrød (S) og surdeigsbrød fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP), inokulert med ~14000 sporer av *Fusarium* sp., *A. niger* eller *P. roqueforti* i to punkter. Visuell observasjon i 21 dager, inkubert ved 25 °C.

Muggtype		<i>Fusarium</i> sp.				<i>Penicillium roqueforti</i>				<i>Aspergillus niger</i>			
Parallell skål		I		II		I		II		I		II	
Inokuleringspunkt (Høyre/Venstre)		V	H	V	H	V	H	V	H	V	H	V	H
Prøve	Gjentak	Antall inkubasjonsdager før mugg ble observert											
S	1.	n.d ¹	n.d	n.d ²	n.d ²	2	2	2	2	2	2	2	2
	2.	3	(12) ³	6	(15) ³	2	2	2	2	2	2	2	2
	3.	4	4	4	6	2	2	2	2	2	2	2	2
L	1.	n.d	n.d	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	2.	n.d	n.d	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	3.	2	(12) ³	n.d	7	2	2	2	2	2	2	2	2
P	1.	n.d	n.d	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	2.	(12) ³	3	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	3.	n.d	15	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
M	1.	n.d	n.d	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	2.	(16) ³	3	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
	3.	n.d	n.d	n.d	n.d	2	2	2	2	2	2	2	2
MP	1.	n.d	n.d	n.d	n.d	5	5	5	5	n.d	n.d	n.d	n.d
	2.	n.d	n.d	n.d	n.d	4	5	4	5	n.d	n.d	n.d	n.d
	3.	n.d	n.d	n.d	n.d	4	5	4	5	n.d	n.d	n.d	n.d
K	1.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2.	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	3.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

¹ n.d = ikke detektert mugg

² Observert vekst av blå mugg på undersiden av brødsriver dag 8

³ Mugg fra det andre inokuleringspunktet vokste over dette etter antall dager

4. Diskusjon

Effekten av fermentering med ulike MSB i brød har blitt undersøkt i sammenheng med mugghemmende effekt. Hensikten med oppgaven var å se på metabolisme hos MSB og PSB tilsatt i surdeig og i brød, og observere forskjeller på hemming av mugg. Brød bakt med ulike MSB og tilsatt propionsyre ble sammenlignet med brød bakt med gjær uten MSB for å se om de hadde ulik grad av hemming på ulike muggsopparter. Mugg på brød skaper svinn og store økonomiske tap for bakerier og privathusholdninger (Axel m.fl. 2017), derfor vil lengre holdbarhet som oppnås på grunn av hemming av mugg redusere økonomisk tap i tillegg til potensielt å senke matsvinn. I dette masterstudiet var det ønskelig å teste om tilsats av MSB sammen med surdeig ved brødbaking, kan hemme muggvekst og dermed kunne øke holdbarheten hos brød. Det var også ønskelig å se om noen av de utvalgte MSB stammene hadde mer hemmende effekt alene eller mikset, sett i sammenheng med mengde melkesyre og eddiksyre produsert.

4.1 Hemming av muggvekst ved bruk av MSB og PSB

Surdeig kan tilsettes som naturlig konserveringsmiddel i brød for å øke holdbarheten (Belz m.fl., 2012). Den konserverende effekten av baking med surdeig kan delvis tilskrives reduksjonen av pH-verdien på grunn av produksjonen av organiske syrer produsert av de tilstedeværende MSB. Organiske syrer som hemmer mikrobiell vekst godt er svake syrer som eddiksyre, melkesyre, propionsyre, sorbinsyre og benzoesyre (Davidson m.fl., 2013).

Ved kartlegging av MSB og PSB til benyttelse i surdeig for å hemme muggvekst, ble de stammene som produserte mest av de konserverende organiske syrene; eddiksyre, melkesyre og propionsyre, sammen med stammenes evne til å senke pH-verdien lagt til grunnlag. Den antimikrobielle effekten til svake organiske syrer kommer hovedsakelig av den udissoierte syren sin evne til å diffundere over membranen til cellen, og på grunn av høyere pH inne i cellen vil syren dissosiere som gjør at pH synker (Le Lay m.fl., 2016a; Garcia m.fl., 2019; Schnürer & Magnusson, 2005). Dermed blir pH-likevekten (homeostase) inne i cellen påvirket og bakteriecellen må bruke energi (ATP) for å bli kvitt H^+ -ioner, slik at pH inne i cellen opprettholdes høy. Denne prosessen er energikrevende og gjør at normal vekst hindres. Den antimikrobielle effekten til syren er derfor avhengig av dens pK_a og pH-en i matsystemet den befinner seg i. I tillegg kan viktige metabolske enzymer bli hemmet ved lav pH.

4.1.1 MSB

Blant de vurderte MSB stammene viste *L. citruem* 45, *P. pentosaceus* 120, *Lb. fermentum* 314 og *Lb. plantarum* 15D god evne til å senke pH i tillegg til høy produksjon av eddiksyre og melkesyre, og ble valgt ut til videre forsøk. MSB som ofte dominerer i surdeig er *Lactobacillus*-stammer fordi de er veldig robuste, andre som en ofte finner er stammer av *Pediococcus* og *Leuconostoc* (Montemurro m.fl., 2020). Av de undersøkte stammene ble det ikke detektert sitronsyre i noen av *Leuconostoc* og *Pediococcus* stammene i tillegg til den ene *Weissella*-stammen (*W. confusa* 76) og den ene *Lactobacillus*-stammen (*Lb. plantarum* 15D) som tyder på at disse er sitratforgjærende. I alle de andre stammene var innholdet av sitronsyre tilnærmet likt det som ble analysert i MRS buljongen. Ved sitratforgjæring blir sitronsyre brutt ned til eddiksyre og oksaleddiksyre (Wright & Axelsson, 2012). Diacetyl produseres også ved sitratforgjæring og har antimikrobiell effekt (Mäyrä-Mäkinen & Bigret, 2004), men ble ikke analysert i dette masterstudiet. De fleste *Leuconostoc* er sitratforgjærende og dette stemmer med resultatene. I følge García-Quintáns m.fl., (2008) kan *Lactobacillus plantarum* og noen *Weissella* omdanne sitrat som stemmer med resultatene i dette masterstudiet. Gener involvert i sitratomsetning er ofte lokalisert på plasmidet, noe som gjør at egenskapen er ustabil og lett kan mistes (Mastrigt m.fl., 2018).

For utvelgelse av MSB til brødbaking ble resultater fra metabolismeforsøk i surdeig lagt til grunn. For å evaluere MSB sitt potensiale til å hemme muggvekst ble de valgt ut etter evne til å senke pH og produksjon av eddiksyre og melkesyre. Blant MSB ansvarlig for syreproduksjon i surdeig er *Lactobacillus* slekter høyt representert (Montemurro m.fl., 2020). I surdeiger som blir backsloppet hver dag hvor det er mest heterofermentative MSB dominerer ofte *Lb. plantarum* som er fakultativ heterofermentativ. Dette kommer av at disse er mer robuste. Ved poding av MSB i MRS ble det observert at *Lb. plantarum* 15D hadde høyere celletall enn de andre MSB, som understreker at den vokser godt og er mer robust. Likevel ble det valgt å utelate og inokulere denne alene fordi den produserte mindre eddiksyre enn de andre MSB stammene.

4.1.2 PSB

Tidligere studier hvor det har blitt tilsatt propionsyre sammen med surdeig har vist økt hemming av mugg på grunn av synergistisk effekt (Ryan m.fl. 2008; Zhang m.fl., 2010). Blant de vurderte PSB stammene viste *P. freudenreichii* ISU P50, ATCC 6207, LMG 2948 og LMG 3001 høy produksjon av både propionsyre og eddiksyre i SLB, i tillegg til evne til å

senke pH-verdien, og ble på grunnlag av dette valgt ut til vekstforsøk i surdeig. Ingen av PSB stammene vokste i surdeigen og dette kommer mest sannsynlig av den lave pH-en i surdeigen rundt 3,9. I tidligere studier gjort av PSB sammen med MSB i surdeig ved baking av brød ble det observert langsom eller til og med fraværende vekst av PSB (Javanainen & Linko, 1993; Suomalainen & Mäyrä-Mäkinen, 1999). Det ble ikke utført flere forsøk i dette masterstudiet for å undersøke hvorfor de ikke vokste, men det hadde vært interessant å undersøke videre om de kunne vokst hvis en hadde inokulert PSB samtidig med backslopping av surdeigen fordi da er pH høyere i surdeigen. pH-verdien ved backsloppingstidspunktet av surdeigen lå mellom 4,9-5,1 som ligger innenfor vekstområdet til PSB på 4,5-8,0 (Piwowarek m.fl., 2018), og det hadde vært større sannsynlighet for at PSB hadde vokst ved denne pH-en. PSB vil fortsatt bruke lengre tid i lagfasen, enn MSB som allerede er i surdeigen. MSB vil begynne produksjonen av melkesyre som senker pH-en, som gjør at det hadde vært aktuelt å øke pH-en mer eller benytte en bufferkomponent (Tronsmo, 2016).

pH i surdeigen kan ha vært grunnen til at PSB ikke vokste, men det kan også komme av at det var for mye oksygen tilstede i surdeigen, siden PSB er obligat anaerobe. Ved tidspunktet for inkubering av surdeigen var det noe luftrom over surdeigen, men underveis i inkuberingen ekspanderte surdeigen raskt på grunn av CO₂ produksjonen. Etter over to døgn inkubering ved 25 °C falt surdeigen sammen, men det er grunn til å tro at mye av oksygen var benyttet av MSB og at det fortsatt var høyt innhold av CO₂ inne i rørene som surdeigen ble inkubert i. Så egentlig er det ikke så stor grunn til å tro at oksygeninnhold er grunnen for at PSB ikke vokste, likevel kunne det vært aktuelt å inkubere surdeigen anaerobt. Dette vil påvirke de heterofermentative MSB i surdeigen, fordi de da vil produsere etanol istedenfor eddiksyre (Axelsson, 2004).

Det kunne også vært aktuelt å pode PSB direkte i deig tilsatt surdeig med MSB for å sjekke vekst i brøddeig. Dette ville gitt en mye høyere pH, da pH-en ved inokulering av surdeig (T0) lå i området 5,7-5,9, men da ville PSB fått veldig kort tid til å vokse og siden de er saktevoksende ville de nok ikke klart å produsere nok propionsyre under disse omstendighetene ved 12 timer inkubering ved 21 °C. Da ville det nok vært mer aktuelt å lage en fordeig med mel, vann, PSB og surdeig som får fermentere i 24 timer før selve brøddeigen lages. En annen mulighet vil være å lage en surdeig ved å tilsette spesifikke MSB stammer sammen med PSB stammer i en blanding av vann og mel. PSB er som nevnt tidligere avhengig av melkesyre og derfor kan det være hensiktsmessig å tilsette noe melkesyre hvis en

skal lage en slik surdeig og justere pH til nærmere 7, som er pH-optimum for PSB. pH i brøddeig uten tilsatt surdeig lå i dette forsøket på rundt 6,0, som er mer optimal pH for PSB. I screeningforsøk utført av Le Lay m.fl. (2016a) hadde tilnærmet alle PSB stammene hemmende effekt på mugg dyrket på hvetemelhydrolysat medium. Hvetemelhydrolysat medium med en pH på 5,6 ble benyttet for å etterligne komposisjonen til bakevarer. Med andre medier testet i screeningforsøket viste færre PSB stammer hemmende effekt, noe som tyder på at PSB kan ha god hemmende effekt i brød. Dette tyder på at det er et potensiale for å både inokulere PSB i brød og oppnå hemmende effekt.

En annen potensiell mulighet for å produsere propionsyre i surdeig er ved bruk av spesifikke MSB stammer som sammen produserer propionsyre (Axel m.fl., 2017). I studiene av Zhang m.fl. (2010) og Ryan m.fl. (2008) ble *Lb. buchneri* FUA 3252 og *Lb. diolivorans* DSM14421 inokulert samtidig for å produsere propionsyre i brød. Ved fermentering med disse MSB stammene vil først *Lb. buchneri* omdanne melkesyre til 1,2-propandiol, som *Lb. diolivorans* videre vil omdanne til propionsyre (Axel m.fl., 2017). Surdeig laget med disse MSB stammene ble fermentert i 14 dager for å oppnå høye nok mengder propionsyre (Zhang m.fl., 2010). Den lange fermenteringstiden ga også høye mengder eddiksyre, noe som ga lang holdbarhet på brødet (20% surdeig), men det ga også uønsket lukt og smak (Ryan m.fl., 2008; Zhang m.fl., 2010). Det som er verdt å merke seg er at 20% surdeig hemmet muggvekst bedre enn både brød tilsatt propionsyre og surdeigsbrød med tilsatt av eddiksyre, noe som bekrefter synergieffekten av surdeig og propionsyre sammen.

4.3 Hemming av mugg i brød

I studiet av Montemurro m.fl. (2020) viste *P. pentosaceus* og *L. citreum* stammer optimal senkning av pH og høy produksjon av eddiksyre og melkesyre sammenlignet med de andre undersøkte stammene, og de har tidligere blitt benyttet i surdeig. *P. pentosaceus* OA1 og S3N3 og *L. citreum* PRO17 produserte 1185-1425 mg/kg melkesyre, 302-374 mg/kg eddiksyre og senket pH til 4,2-4,3 i surdeigsbrød. I dette masterstudiet ble det analysert verdier for melkesyre i området 4000-4700 mg/kg og eddiksyre i området 930-1145 mg/kg, mens pH ble senket til 4,35-4,60. Verdiene for både melkesyre og eddiksyre er mye høyere sammenlignet med verdiene i studiet av Montemurro m.fl. (2020). Dette kommer trolig av at i dette masterstudiet ble surdeigsbrødene hevet i 12 timer ved 21 °C, mens i Montemurro ble de hevet i 1,5 time ved 30 °C. I studiet av Montemurro m.fl. (2020) var hovedmålet å undersøke benyttelse av ikke-*Lactobacillus* stammer og resultatene deres viser også at

inokulering med flere MSB sammen ga høyere mengde av både melkesyre og eddiksyre. De vektla ikke å finne MSB stammer for å hemme muggvekst.

Ingen av de undersøkte MSB tilsatt i brød produserte signifikant mer av hverken melkesyre eller eddiksyre og dermed samsvarer det med resultatet om at muggveksten ble observert etter like lang inkuberingstid på alle surdeigsbrødene. Dette gjelder ikke for surdeigsbrød tilsatt kalsiumpropionat (MP). Surdeigsbrødene hadde alle lavere pH og høyere innhold av melkesyre og eddiksyre enn brød bakt uten surdeig, noe som var et forventet resultat (Montemurro m.fl. 2020). Det ble bare detektert propionsyre i MP, som var som forventet fordi det var den eneste prøven hvor det ble tilsatt kalsiumpropionat. I brød som ble tilsatt propionsyre i tillegg til MSB ble det observert muggvekst vesentlig senere på alle de undersøkte muggsoppartene. For å lettere kunne sammenligne hemmeeffekten ville det vært mer optimalt å bake et kontrollbrød tilsatt kun kalsiumpropionat, for å se hvordan effekten hadde vært av denne organiske syren alene. På grunn av kapasitet i ovn og begrenset tid til å bake alle brødene til et gjentak samtidig, ble dette valgt å utelate fordi det allerede er en del forskning på bruk av kalsiumpropionat i bakevarer. Det er også sannsynlig at effekten vil være bedre ved bruk av surdeig og kalsiumpropionat sammen fordi da er pH-verdien i brødet nærmere pK_a -verdien til propionsyre som er på 4,87 (Le Lay m.fl., 2016a). Ved undersøkelse av muggsopp sin resistens mot kjemiske konserveringsmidler av Le Lay m.fl. (2016a) ble det funnet at det var behov for mindre mengde kalsiumpropionat for å hemme mugg ved pH 5 enn ved pH 6. Dette samsvarer med at en pH-verdi nærmere pK_a -verdien vil gjøre at kalsiumpropionat er mindre udisosiert og dermed har bedre effekt mot mugg. I studiet til Quattrini m.fl. (2019) ble det rapportert at metabolittene produsert i surdeigen måtte være 5-10 ganger høyere enn MIC for å hemme muggen, for at de skal ha samme effekt som kjemisk tilsetning av tilsvarende kjemikalie. Det ble også funnet at eddiksyre var mest relevant med hensyn til hemming av mugg fordi MSB i surdeigen produserte mengder tilsvarende MIC verdien av eddiksyre.

Den økte mugghemmende effekten til MSB sammenlignet med tilsats av kjemiske tilsetningsstoffer kommer i stor grad av synergistisk effekt mellom spesifikke mugghemmende metabolitter (Axel m.fl., 2017). Spesifikke mugghemmende metabolitter som produseres av MSB varierer mellom ulike stammer. Eksempelvis produserer *Lb. plantarum* stammene CRL778 og FST1.7 melkesyre, eddiksyre og 3-fenylmelkesyre, i tillegg produserer CRL778 4-hydrokso-fenylmelkesyre, mens FST1.7 produserer sykliske

dipeptider. *Lb. amylovorus* DSM19280 produserer alle de tidligere nevnte metabolittene pluss azelainsyre, florsyre, hydroferulinsyre, 2-hydroksyisokapronsyre, koffeinsyre, p-kumarsyre, ferulinsyre, hydrokoffeinsyre, salisylsyre og vaniljesyre. I studiet av Ryan (2011) hemmet *Lb. amylovorus* DSM19280 muggsoppartene *A. niger*, *F. culmorum*, *P. expansum* og *P. roqueforti* i surdeigsbrød av hvete, mer effektivt enn kalsiumpropionat. I dette masterstudiet ble det ikke analysert for andre muggghemmende metabolitter enn organiske syrer. Likevel kunne det vært mulig å observere synergistisk effekt mellom muggghemmende metabolitter visuelt, ved å se på forskjeller når det ble observert mycel (muggvekst) på brødsnivene inokulert med ulike MSB. Her ble det ikke observert noen forskjeller mellom de ulike MSB og derfor har en ikke grunnlag for å si noe om noen av MSB produserer mer/mindre av de spesifikke muggghemmende komponenter, hverken enkeltvis inokulert eller flere sammen. Ved eventuelt videre studie av de undersøkte MSB ville det vært hensiktsmessig å analysere for andre spesifikke muggghemmende metabolitter, siden det i liten grad er de organiske syrene alene som inhiberer vekst av mugg på brød (Axel m.fl., 2017).

I tidligere studier gjort om hemming av mugg ved tilsats av spesifikke MSB, viste *Lb. plantarum* ITM21B hemmende effekt opptil 7 dager på *A. niger* og *P. roqueforti* og dermed økte holdbarheten til brødet (Lavermicocca m.fl., 2000). I dette masterstudiet ble det observert at eddiksyre og melkesyre produsert av MSB hadde lav hemmende effekt mot *A. niger*, sammenlignet med kalsiumpropionat som viste tydelig hemmende effekt. Selv om det ble observert veldig høy resistens mot eddiksyre og melkesyre produsert av MSB, ble det observert forskjeller mellom kontrollbrød og surdeigsbrød i form av at det ble observert kun vegetativt mycel på brød bakt med surdeig, mens på kontrollbrødene ble det observert vegetativt mycel og sorte sporer allerede etter 2 dager inkubering. Dette tyder på eddiksyren og melkesyren hadde noe hemmende effekt. I studiet av Le Lay m.fl. (2016a) viste *L. citreum* L123 god muggghemmende effekt mot *A. niger* i "milk bread rolls" ved spraying av bakterien på overflaten av baksten etter steking, men ingen effekt ved innblanding av bakterien under elting.

I dette masterstudiet ble det observert at det tok lang tid før mycel vokste opp av *Fusarium* sp., *A. niger* og *P. roqueforti* i surdeigsbrød tilsatt kalsiumpropionat. Mycel av *P. roqueforti* vokste opp etter ~ 5 dager inokulering ved 25 °C, mens for *Fusarium* sp. og *A. niger* ble det ikke observert mycel i løpet av inokuleringsperioden. Disse resultatene tilsier at surdeig fermentert med en miks av MSB sammen med kalsiumpropionat har høy muggghemmende

effekt. Denne synergistiske effekten er tidligere vist i studiene av Ryan m.fl. (2008) og Zhang m.fl. (2010). Den antimikrobielle effekten av kalsiumpropionat har lenge vært kjent (Belz m.fl., 2012).

Resultatene i dette masterstudiet for tidspunkt for synlig mycel av *Fusarium* sp. på surdeigsbrødene varierte mellom de ulike gjentakene og parallellene. Likevel ble det observert at *Fusarium* sp. ble hemmet i større grad i surdeigsbrødene sammenlignet med kontrollbrødet, som indikerer at MSB og surdeig har en hemmende effekt. Selv om *Fusarium* sp. bruker lengre tid på å vokse opp enn de andre muggsoppene undersøkt i dette masterstudiet, er det tydelig indikasjon på at MSB stammene hadde en hemmende effekt sammenlignet med kontrollbrødet.

4.4 Praktiske hensyn og metodologiske utfordringer

Ved kartlegging av PBS og MBS ble det undersøkt pH og innhold av organiske syrer for de ulike stammene for å se hvor mye de produserer av organiske syrer med hemmende effekt og hvor mye pH ble senket sammenlignet med utgangspunktet i henholdsvis SLA og MRS buljong. PSB stammene sin produksjon av organiske syrer og utnyttelse av melkesyre ble bestemt i tillegg til pH, hvor de fire stammene som produserte mest propionsyre og eddiksyre, ble inokulert i surdeig. Det hadde vært mer optimalt å utføre kartlegging av MBS og PBS i et miljø som var mer likt det som skulle bli benyttet i hovedforsøkene (deig/surdeig). Hvetemelhydrolysat som de har benyttet i Le Lay m.fl. (2016a) ville gitt et mer likt miljø og mindre overgang for bakteriene når de inokuleres i deig/surdeig, i stedet for å benytte MRS og SLB mediet. Dette ble ikke utført på grunn av begrenset tid og usikkerhet på grunn av gjentagende nedstenging av laboratorium på grunn av COVID-19.

Metoden for poding av PSB til surdeig ved første innledende vekstforsøk (P1) var unøyaktig fordi PSB ble overført fra et reagensrør og noe av væsken ble igjen i røret, men i dette tilfellet var det ikke så viktig å vite nøyaktig hvor mye PSB en tilsatte fordi hovedhensikten var å kontrollere om PSB vokste. Ved innledende vekstforsøk av PSB i surdeig, ble surdeigen backsloppet med høyere andel vann ved det andre innledende vekstforsøket (P2). Dette ble utført for å gjøre det enklere å utføre prøveuttak til HPLC. Det er ikke grunnlag for å tro at surdeig med høyere vanninnhold vil påvirke PSB sin evne til å vokse.

4.4.1 Vekst- og metabolismeforsøk av MSB i surdeig

pH-verdi og mengde organiske syrer (melkesyre og eddiksyre) varierte noe ved start, fordi MSB ble podet direkte fra MRS mediet inokulert med MSB, og estimert bakteriemengde varierte mellom de ulike MSB, og derfor varierte inokuleringsmengden og dette vil påvirke resultatet i noen grad. 0,28 ml for Lb.-15D, 2,7 ml for L-45, 2,0 ml for P-120 og MIX ble inokulert med alle disse volumene sammen.

MSB ble tilsatt i høyt celletall slik at det skulle utkonkurrere MSB og evt. andre mikroorganismer som var i surdeigen fra før, men det ble ikke utført noen analyser for å finne ut hvilke MSB som befant seg i surdeigen og heller ikke hvilke som var der etter inkubering i 24 timer. Det kunne blitt utført mikrobiota-studier av surdeig før og etter tilsats av MSB ved dybdesequensering med Illumina teknologi Miseq (Morgan & Huttenhower 2012). I dette masterstudiet har en ikke noe garanti for at de tilsatte MSB utkonkurrerte MSB allerede tilstede i surdeigen. Samtidig vil også de tilsatte MSB ha lengre lagfase, siden MSB allerede tilstede i surdeigen alt har tilpasset seg (Tronsmo, 2016).

4.4.2 Hemmeforsøk av mugg i brød

Deigen tilsatt kalsiumpropionat hadde lavest økning i celletall for gjær fra T0 til T1, som tyder på at gjæren kan ha blitt hemmet av kalsiumpropionaten. Det ble også observert mindre heving (lavere volum) på brød tilsatt propionsyre som understøtter hypotesen om at gjæren kan ha blitt hemmet av propionsyren. Propionsyre har god hemmende effekt på mugg, og ut ifra resultatene på celletall ser det ut til å ha en hemmende effekt på gjær også, men hemmer ikke melkesyrebakteriene. I følge Hemmer m.fl. (2001) hemmer propionsyre i noen grad gjær, som stemmer med resultatene. I henhold til «Forskrift om tilsetningsstoffer i næringsmidler» er grenseverdi for tilsats av propionsyre i ferdigpakket skivet brød på 3000 mg/kg (Forskrift tilsetningsstoffer næringsmidler, 2008). Derfor ble det valgt å tilsette 3000 mg/kg i brødet, men her ble det ikke tatt hensyn til vekttap på brødet ved steking. Denne mengden propionsyre i brødet ga en markant ubehagelig lukt på det ferdige brødet. Denne ubehagelige lukten av propionsyre er vanlig (Hemmer m.fl., 2001).

I gjentak to av bakeforsøk ble kalsiumpropionaten tilsatt i feil deig, K (kontroll) istedenfor MP. Da deigen til kontrollbrødet ble laget på nytt, ble den laget uten utgangspunkt i fordeigen. Kalsiumpropionaten i deigen til MP ble tilsatt etter at den var ferdig eltet. Ut ifra resultatene så ser det ikke ut som dette har påvirket resultatene.

Fusarium sp. var den eneste muggsoppen som vokste opp på ulike tidspunkt i inokuleringspunktene på samme brødskive, slik at mycel fra det ene inokuleringspunktet vokste over i det andre. Dette gjorde at det ikke var mulig å observere om mycel vokste opp i begge inokuleringspunktene på disse brødsnivene. For den ene parallellen på brødsnivene fra brød S inokulert med *Fusarium* sp., ble det observert blå mugg (mest sannsynlig *P. roqueforti*) etter 8 dager, som kommer av kontaminering fra omgivelsene. For å unngå kontaminering fra omgivelsene ville det vært mer optimalt å oppbevare brødet og skjære det opp under sterile forhold.

Det ble valgt å inkubere ved 25 °C fordi bakevarer normalt oppbevares ved romtemperatur (Guynot m.fl., 2005). Flere studier som Guynot m.fl. (2005) og Le Lay m.fl. (2016a) har inkubert bakevarer ved 25 °C for å observere hemming av muggvekst. Romtemperatur varierer i noe grad etter årstid, men i Norge er normal romtemperatur rundt 20 °C. I etterkant ble det vurdert at det hadde vært lurt å inkubere de inokulerte brødsnivene ved lavere temperatur for enklere å kunne se om det var forskjeller mellom kontrollbrød og brødene bakt med surdeig. Inokuleringsstemperatur ved 25 °C var litt høyt, siden mycel vokste fram på samme dag for både kontrollbrød og surdeigsbrødene inokulert med *A. niger* og *P. roqueforti*. En kunne derimot se antydning til at muggveksten hadde kommet lengre på kontrollbrød sammenlignet med surdeigsbrødene. *A. niger* hadde dannet sporer på kontrollbrød, men ikke surdeigsbrødene. *P. roqueforti* hadde en anelse tykkere mycel på kontrollbrød sammenlignet med surdeigsbrødene.

Inokulering med 14 000 sporer per inokuleringspunkt per brødskive ble gjort i dette masterstudiet, noe som er mye høyere enn hva som normalt ville kontaminert brødet fra omgivelsene i en produksjon (Axel m.fl., 2017; Quattrini m.fl., 2019; Zhang m.fl., 2010). Tidligere forskning viser at kontaminering av mugg fra omgivelsene er vanskelig å kontrollere, men at de vokser saktere enn i forsøk utført med brød inokulert med mugg. I studie utført av Belz m.fl. (2012) utførte de «challenge test» med muggsoppene *F. culmorum*, *P. expansum* og *A. niger* hvor brødsnivene ble inokulert med 100 muggsporer og inkubert ved 20 °C. De testet ulike saltkonsentrasjoner både i surdeigsbrød og brød tilsatt propionsyre og oppnådde resultater hvor en tydelig kunne se forskjell i andel muggvekst mellom de ulike brødsnivene. Dette indikerer at det ville vært mer hensiktsmessig å inokulere med lavere antall sporer og benytte lavere inkuberingstemperatur.

5. Referanser

Arendt, E.K. & Moroni, V. (2013) Sourdough and Gluten-Free Products, i Gobetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, s. 245-264.

Axel, C., Zannini, E. & Arendt, E.K. (2017) Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), s. 3528-3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>

Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, i Salminen, S., Wright, A.V. & Ouwehand, A.C. (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3. utg, Marcel Dekker, New York, s. 1-67.

Barrangou, R., Sampo, J.L., Fandi, I. & Ouwehand, A.C. (2012) Genus *Lactobacillus*, i Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. & Wright, A.V. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, 4. utg. CRC press, Boca Raton, s. 77-91.

Belz, M.C.E., Mairinger, R., Zannini, E., Ryan, L.A.M., Cashman, K.D. & Arendt, E.K. (2012) The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf life of salt reduced bread. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, s. 493-501. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4052-x>

Capelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M. & Gobetti, M. (2013) History and Social Aspects of Sourdough, i Gobetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, s. 1-10.

Davidson, P. M., Taylor, T. M. & Schmidt, S. E. (2013) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, i Doyle, M.P. & Buchanan, R.L. (red.) *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4.utg ASM Press, Washington, D.C. s. 765-801: American Society of Microbiology.

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, s. 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002>

FAO (2019) *The state of Food and Agriculture – Moving forward on food loss and waste reduction*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FHI (2015) *Mykotoksinforgiftning (muggsoppforgiftning)*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/mykotoksinforgiftning---veileder-fo/> (Hentet: 29. juli 2021).

FN-sambandet (2020) *FNs bærekraftsmål*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/Om-FN/FNs-baerekraftsmaal> (Hentet 29. januar 2021).

Forskrift tilsetningsstoffer næringsmidler (2008) Forskrift om tilsetningsstoffer i næringsmidler. Tilgjengelig fra: https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2011-06-06-668/KAPITTEL_2-1#KAPITTEL_2-1 (Hentet 03. mai 2021).

Fujimoto, A., Ito, K., Narushima, N. & Miyamoto, T. (2019) Identification of lactic acid bacteria of sourdoughs used in Japanese bakeries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127 (5), s. 575-585. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.014>

Galle, S. (2013) Sourdough: A Tool to Improve Bread Structure, i Gobetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, s. 215-228.

Garcia, M.V., Bernardi, A.O. & Copetti, M.V. (2019) The fungal problem in bread production: insight of causes, consequences, and control methods. *Current Opinion in Food Science*, 19, s. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>

García-Quintáns, N.G., Repizo, G., Magni, C., López, P., Mayo, B. and Pérez-Martínez, G. (2008) Citrate Metabolism and Aroma Compound Production in Lactic acid Bacteria, i Mayo B., López P., Pérez-Martínez G., (red.) *Molecular Aspects of Lactic acid Bacteria for Traditional and New Applications*, Research Signpost, Kerala, s. 65-88.

Gobetti, M. (1998) The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Trends in Food Science and Technology*, 9, s. 267-274. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00053-3)

Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J.A. (2011) Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), s. 601-606. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>

Guynot, M.E., Ramos, A.J., Sanchis, V. & Marín, S. (2005) Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of

low pH (4,5-5,5). *International Journal of Food Microbiology*, 101(2), s. 161-168.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>

Hemmer, E., Askim, M., Karlsen, H., Lynum, L., Nordeng, A. & Nybraaten, G. (2001) *Næringsmiddellære - Råstoff-, produksjon- og ferdigvarekunnskap*. Yrkeslitteratur as.

Huys, G., Daniel, H. & De Vuyst, L. (2013) Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria, i Gobetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, s. 105-154.

Javanainen, P., & Linko, Y-Y. (1993) Mixed-culture pre-ferments of lactic and propionic acid bacteria for improved wheat bread shelf-life. *Journal of Cereal Science*, 18, s. 75-88.

<https://doi.org/10.1006/jcrs.1993.1036>

Katina, K. & Poutanen, K. (2013) Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Acid Bacteria and Yeast, i Gobetti, M. & Gänzle, M. (red.) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, s. 229-244.

Kvam, G. (2017) *Vekst, metabolisme og ølbrygging med melkesyrebakterier og gjær*. Masteroppgave. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), s. 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>

Legan, J.D. (1993) Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 32, s. 33–53. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90038-4)

Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Blay, G.L., Barbier, G. & Coton, E. (2016a) In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food control*, 60, s. 247-255.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>

Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.M., Haertlé, T., Choiset, Y., Van Long, N.N., Meslet-Cladière, L. & Mounier, J. (2016b) Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International journal of food microbiology*, 239, s. 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020>

- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015) *Brock Biology of Microorganisms*. 14. utg. Pearson Education Limited
- Magan, M., Arroyo, M. & Alfred, D. (2012) Mould prevention in bread, i Cauvain, S.P. (red.) *Breadmaking – Improving quality*. 2. utg. Woodhead Publishing Limited, s. 481-494.
- Mastrigt, O.V, Stefano, E.D., Hartono, S., Abee, T. & Smid, E. (2018) Large plasmidome of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis FM03P encodes technological functions and appears highly unstable. *BMC Genomics*, 19, 620.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-5005-2>
- Mannaa, M., & Kim, K.D. (2017) Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage. *Mycobiology*, 45(4), s. 240–254. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.240>
- Mäyrä-Mäkinen, A. & Bigret, M. (2004) Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria, i Salminen, S., Wright, A.V. & Ouwehand, A., (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3. utg, Marcel Dekker, New York, s. 175-198.
- Morgan, X.C. & Huttenhower, C. (2012) Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*, 8(12): e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>
- Montemurro, M., Giuseppe, C., De Angelis, M. Gobbetti, M. Rizzello, G.C. & Pontonio, E. (2020) Selection of non-*Lactobacillus* strains to be used as starters for sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 90, 103491. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103491>
- Narvhus, J.A. & Axelsson L. (2003) Lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. utg, s. 3465-3472. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Ng'ong'ola-Manani, T.A., Wicklund, T., Mwangwela, A.M., Østlie, H.M. (2015) Identification and characterization of lactic acid bacteria (LAB) involved in natural and lactic acid bacteria fermentations of pastes of soybeans and soybean-maize blends using culture-dependent techniques and denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Biotechnology*, 29, s. 20-50. <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.996894>

- Ouwehand, A.C. (2004) The Probiotic Potential of Propionibacteria, i Salminen, S., Wright, A.V. & Ouwehand, A.C. (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3. utg, Marcel Dekker, New York, s. 1-67.
- Pateras, I.M.C. (2007) Bread spoiling and staling, i Cauvain, S.P. & Young, L.S. (red.) *Technology of breadmaking*. 2. utg. Springer, s. 275-294.
- Pétel, C., Onno, B. & Prost, C. (2017) Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, s. 105-123.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., & Ścibisz, I. (2018) *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(2), s. 515–538.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>
- Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M.G., Xiang, S., Curtis, J.M., & Gänzle, M. (2019) Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International journal of food microbiology*, 302, s. 8–14.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.007>
- Rabah, H., Rosa do Carmo, F., & Jan, G. (2017) Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics. *Microorganisms (Basel)*, 5(2), 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020024>
- Ryan, L.A.M. & Dal Bello, F. & Arendt, E.K. (2008) The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 125. s. 274-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.013>
- Ryan, L.A.M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P. & Arendt, E.K. (2011) *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 146: s. 276–283.
- Schnürer, J. & Magnusson, J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16, s. 70-78.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Skaar, I. & Torp, M. (2002) Muggsopp i mat og fôr. *Naturen*, 126(3), s. 146–152.

Stensgård, A.E., Prestrud, K. & Callewaert, P. (2020) *Matsvinn i Norge - Rapportering av nøkkeltall 2015-2019*. NORSUS Norsk institutt for bærekraftsforskning

Suomalainen, T.H. & Mäyrä-Mäkinen, A.M. (1999) Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait*, 79:165–174.

Syversen, F., Hanssen, O.J. & Bratland, H. (2018) *Nasjonal beregning av matsvinn på forbrukerleddet*. Avfall Norge.

Tronsmo, A. (2016) *Innføring i mikrobiologi*. Universitetsforlaget. ISBN 978-82-15-02592-6

Williams, T. & Pullen, G. (2007) Functional ingredients, i Cauvain, S.P. & Young, L.S. (red.) *Technology of breadmaking*, 2. utg. Springer. s. 51-92.

Wright, A.V. & Axelsson, L. (2012) Lactic acid bacteria: An introduction, i Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. & Wright A.V. (red.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, 4. utg. CRC press, Boca Raton, s. 1-14.

Zhang, C., Brandt, M.J., Schwab, C. & Gänzle, M.G. (2010) Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food microbiology*, 27(3), s. 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.019>

Rådata for innledende vekstforsøk (organiske syrer og karbohydrater)**Tabell 1.** pH, mengde karbohydrater og organiske syrer omsatt og produsert av MBS stammer inokulert i De Man Rogosa og Sharpe (MRS) buljong i 24 timer ved 30 °C. pH etter fermentering av MBS.

	Citric acid	Glucose	Maltose	Fructose	Pyruvic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
MRS	1804,48	17097,67	421,89	464,03	29,15	n.d	n.d	3615,54	n.d	436,53
<i>Lactobacillus (Lb.) plantarum</i> 15D	n.d	1480,73	n.d.	n.d.	19,47	15177,42	n.d	4378,65	n.d	382,70
<i>Lb. paracasei</i> 448	1797,24	6515,53	n.d.	n.d.	26,47	11679,82	n.d	3633,12	n.d	473,96
<i>Weissella confusa</i> 76	n.d	4205,56	434,86	254,85	n.d	7474,98	n.d	4546,15	n.d	419,62
<i>W. cibaria</i> 187	1864,76	5793,31	424,94	423,41	n.d	5624,57	n.d	3774,27	n.d	450,37
<i>Lb. fermentum</i> 314	1849,17	n.d	437,89	465,34	n.d	8708,61	n.d	3711,90	n.d	444,57
<i>Lb. brevis</i> 152	1903,79	8104,29	422,46	183,17	n.d	4448,61	n.d	3778,28	n.d	426,80
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 120	n.d	3529,56	435,24	280,84	n.d	7667,25	n.d	4670,48	n.d	445,62
<i>Leuconostoc citreum</i> 45	n.d	8153,12	377,94	401,06	n.d	5329,18	n.d	4607,04	n.d	443,45
<i>L. pseudomesenteroides</i> 107	n.d	1454,62	434,00	356,03	n.d	8796,77	n.d	4689,51	n.d	467,71

Tabell 2. Mengde organiske syrer omsatt og produsert av propionsyrebakterier (PSB) stammer inkubert i Natrium-laktat medium buljong (SLB) i 48 timer ved 30 °C.

	Citric acid	Glucose	Maltose	Fructose	Pyruvic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ISU P59	n.d	n.d	316,65	48,83	85,07	2939,68	n.d	829,61	1469,09	345,86
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9616	n.d	n.d	n.d.	n.d.	56,73	n.d	173,67	1700,58	3060,94	348,27
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 4875	n.d	n.d	294,39	32,66	42,85	n.d	n.d	1394,86	3128,21	342,22
<i>P. freudenreichii</i> ISU P50	n.d	n.d	307,61	67,73	26,41	n.d	n.d	1493,67	3493,38	355,95
<i>P. acidipropionici</i> ATTC 6207	n.d	n.d	314,76	77,55	228,39	3299,15	n.d	663,73	1209,08	344,45
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3032	n.d	n.d	24,62	42,47	65,24	n.d	n.d	1418,83	2897,98	346,07
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2948	n.d	n.d	300,93	45,86	43,44	n.d	n.d	1607,23	3226,32	351,74
<i>P. freudenreichii</i> LMG 2931	n.d	n.d	301,62	40,78	55,58	n.d	n.d	1288,93	2990,86	342,80
<i>P. freudenreichii</i> LMG 3001	n.d	n.d	299,65	50,12	55,77	n.d	n.d	1467,57	3221,50	354,05
<i>P. freudenreichii</i> INF- α	n.d	n.d	300,59	52,91	75,82	n.d	n.d	1431,47	2857,00	342,86
SLB	n.d	n.d	299,18	58,51	15,36	6098,56	n.d	n.d	n.d	362,20

Rådata for vekst og metabolisme av MSB i surdeig (Celletall, pH, organiske syrer og karbohydrater)

Tabell 1. Celletall i hvetesurdeig fermentert med *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D), *L. citreum* 45 (L-45), *P. pentosaceus* 120 (P-120) og en blanding av de tre sistnevnte (MIX) og referanse surdeig (REF) etter innstøping i De Man Rogosa og Sharpe (MRS) og Rose Bengal (RB) agar. Alle stammene ble inokulert med ~ 7 log kde/g og prøve ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer. Data for tre gjentak.

	Celletall (log kde/g)											
	MRS						RB					
Gjentak	1		2		3		1		2		3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
REF	8,29	9,14	8,88	9,15	7,95	8,79	6,91	7,39	6,86	7,01	6,60	6,80
Lb.-15D	8,53	9,14	8,42	8,82	8,03	8,75	6,93	7,51	6,83	6,95	6,76	6,71
L-45	8,53	9,15	8,53	8,95	8,11	8,82	6,94	7,39	6,86	7,32	6,78	6,83
P-120	8,63	9,23	8,26	9,78	7,91	8,83	6,92	7,54	6,83	7,27	6,84	7,08
MIX	8,38*	9,25	8,23	9,07	8,07	8,91	6,81	7,51	6,96	7,27	6,93	7,12

Tabell 2. pH i hvetesurdeig fermentert med *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D), *L. citreum* 45 (L-45), *P. pentosaceus* 120 (P-120) og en blanding av de tre (MIX) og referanse surdeig (REF). Alle stammene ble inokulert i surdeigen med ca. 7 log kde/g og prøve ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer inkubering ved 30 °C. Data for tre gjentak.

Gjentak nr.	pH					
	1		2		3	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
REF	5,14	3,65	5,03	3,62	5,12	3,65
Lb.-15D	5,03	3,72	4,94	3,64	5,10	3,65
L-45	4,94	3,71	4,92	3,68	5,00	3,66
P-120	4,93	3,70	5,00	3,64	4,97	3,64
MIX	4,93	3,76	4,82	3,67	4,93	3,64

Tabell 3. Organiske syrer og karbohydrater i hvetesurdeig fermentert med *Lb. plantarum* 15D (Lb.-15D), *L. citreum* 45 (L-45), *P. pentosaceus* 120 (P-120) og en blanding av de tre (MIX) og referanse surdeig (REF). Alle stammene ble inokulert i surdeigen med ca. 7 log kde/g og prøve ble tatt ut etter 0 (T0) og 24 (T24) timer inkubering ved 30 °C. Data for tre gjentak.

	Gjentak nr.	Glucose	Maltose	Fruktose	Citric acid	Pyruvic acid	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid (RI)	DL-pyroglutamic acid
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
REF T0	1	682,28	5651,14	2465,39	67,17	6,15	278,10	1443,48	474,49	20,93
	2	387,39	4884,60	1369,60	65,93	6,32	387,64	1483,34	442,57	14,57
	3	468,00	4779,81	1708,69	66,48	5,91	n.d.	1215,95	191,18	16,55
Lb.-15D T0	1	575,38	5173,50	2488,62	64,64	6,61	530,41	1459,51	423,43	24,71
	2	355,45	4679,55	1322,43	64,83	6,05	397,14	1444,18	421,73	15,18
	3	400,47	4443,93	1675,21	74,78	6,16	n.d.	1222,42	213,45	17,47
L-45 T0	1	588,67	5097,57	2390,51	57,35	6,81	575,97	1698,96	276,88	31,38
	2	413,15	4865,57	1308,02	58,19	6,27	468,18	1731,94	281,12	22,51
	3	441,94	4659,55	1651,85	68,15	6,48	n.d.	1389,18	302,09	24,59
P-120 T0	1	556,75	5005,37	2403,70	70,23	6,80	577,39	1759,45	244,56	27,85
	2	390,28	4873,49	1292,85	66,20	7,08	444,90	1623,92	256,76	21,95
	3	445,51	4724,75	1650,43	62,89	6,63	n.d.	1366,51	259,47	22,56
MIX T0	1	653,84	5081,04	2171,95	53,60	6,46	543,88	1769,87	325,01	35,30
	2	414,56	4683,56	1224,38	52,29	6,90	372,27	1878,02	379,10	32,11

	3	419,88	4453,41	1572,56	65,44	6,54	n.d.	1675,51	374,75	31,20
REF T1	1	n.d.	86,49	413,54	93,53	10,93	n.d.	8754,76	1130,48	15,30
	2	n.d.	93,54	0,00	102,19	6,59	103,24	8868,70	1155,08	12,90
	3	n.d.	108,58	0,00	105,59	5,50	n.d.	8493,26	1186,75	12,48
Lb.-15D T1	1	n.d.	90,76	327,64	46,97	11,44	101,93	8543,65	1128,69	17,07
	2	n.d.	110,86	0,00	37,03	6,58	123,71	8908,76	1160,59	12,29
	3	n.d.	104,79	0,00	n.d.	6,72	n.d.	8602,33	1210,13	14,32
L-45D T1	1	n.d.	91,94	372,82	39,71	11,07	129,28	9055,91	1249,70	28,95
	2	n.d.	125,39	0,00	44,68	6,55	181,34	8978,40	1311,30	23,45
	3	n.d.	91,25	0,00	n.d.	8,96	n.d.	8554,84	1317,72	25,69
P-120 T1	1	n.d.	111,14	318,75	38,25	12,96	172,99	8761,38	1211,96	25,25
	2	n.d.	124,19	0,00	44,06	7,13	187,55	8871,52	1246,28	20,71
	3	n.d.	99,91	0,00	n.d.	10,94	n.d.	8388,55	1269,99	23,95
MIX T1	1	n.d.	84,96	323,12	15,28	12,35	155,61	8833,20	1304,27	38,25
	2	n.d.	83,21	0,00	43,01	6,96	206,45	9035,57	1299,36	29,86
	3	n.d.	94,44	0,00	n.d.	10,28	n.d.	8685,48	1365,09	35,22

Rådata for hemmeforsøk i brød (Celletall, pH, organiske syrer og karbohydrater)

Tabell 1. Organiske syrer og karbohydrater i deig til brødbaking. Deig tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Prøve ble tatt ut rett etter elting (T0), etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1) og etter steking (T2). Data er vist fra tre gjentak

Gjentak	Prøve - uttak	Maltose	Citric acid	Glucose	Fructose	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid (RI)	Propionic acid	DL-pyroglutamic acid
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
1	ST0	8099,73	79,46	891,77	2219,03	n.d.	n.d.	330,22	n.d.	n.d.
2	ST0	8866,97	70,75	1015,90	2423,20	n.d.	n.d.	249,50	n.d.	30,09
3	ST0	7991,88	72,36	631,54	1943,60	n.d.	n.d.	291,27	n.d.	n.d.
1	MPT0	8257,07	54,63	955,77	2140,44	n.d.	n.d.	351,84	2754,25	n.d.
2	MPT0	9008,71	59,78	1041,05	2223,18	n.d.	n.d.	293,35	2082,55	28,44
3	MPT0	8587,90	74,74	614,31	1951,38	n.d.	n.d.	346,84	3492,08	25,91
1	KT0	8203,30	80,78	1873,08	3444,89	n.d.	n.d.	260,53	n.d.	37,90
2	KT0	6780,91	73,64	1486,42	3276,19	n.d.	n.d.	239,40	n.d.	29,70
3	KT0	8132,47	n.d.	1430,75	2931,89	n.d.	n.d.	253,39	n.d.	35,67
1	ST1	6859,28	n.d.	249,15	2414,61	166,48	4303,80	756,31	n.d.	n.d.
2	ST1	8276,74	n.d.	333,48	2411,24	162,74	4127,29	836,30	n.d.	16,46

3	ST1	6989,24	n.d.	220,44	1816,54	n.d.	2813,09	665,55	n.d.	n.d.
1	LT1	5508,31	n.d.	155,89	2143,21	224,97	4415,70	924,07	n.d.	13,16
2	LT1	8970,91	n.d.	123,34	2424,99	281,77	4229,43	946,89	n.d.	17,34
3	LT1	8345,83	n.d.	163,64	2366,25	298,62	4347,36	991,42	n.d.	n.d.
1	PT1	6288,20	n.d.	164,07	2218,11	502,16	4348,71	1002,44	n.d.	14,21
2	PT1	5659,36	n.d.	265,28	1680,81	398,93	3060,39	778,67	n.d.	12,63
3	PT1	8239,79	n.d.	259,80	2111,86	613,21	3271,98	937,57	n.d.	7,32
1	MT1	6384,42	n.d.	235,57	1888,29	463,88	4764,19	1060,89	n.d.	14,44
2	MT1	5035,84	n.d.	155,92	1656,99	339,52	2993,73	714,92	n.d.	11,54
3	MT1	6322,67	n.d.	170,34	1705,42	438,78	3315,73	847,16	n.d.	n.d.
1	MPT1	7288,85	n.d.	290,09	2217,50	394,12	4882,67	987,60	2774,98	n.d.
2	MPT1	5654,54	n.d.	142,29	2076,61	402,82	3316,25	765,14	1631,03	13,44
3	MPT1	7365,28	n.d.	312,15	2255,10	416,93	3272,06	801,30	2455,52	15,73
1	KT1	7771,42	81,78	2102,38	3422,96	n.d.	n.d.	295,59	n.d.	n.d.
2	KT1	6024,37	56,51	1541,46	2601,67	n.d.	n.d.	172,31	n.d.	20,78
3	KT1	7236,00	76,85	2772,69	3626,77	n.d.	n.d.	271,72	n.d.	24,98
1	RT2	7439,92	95,05	214,36	3339,30	263,79	5025,46	851,52	n.d.	26,18

2	RT2	10258,98	95,00	525,91	3515,76	n.d.	4278,41	1065,06	n.d.	41,22
3	RT2	9487,17	89,64	388,71	2597,34	n.d.	4067,21	891,56	n.d.	36,68
1	LT2	7816,60	n.d.	253,07	3373,53	428,62	4887,67	1055,15	n.d.	29,75
2	LT2	9417,32	39,03	511,50	3530,26	n.d.	4360,64	984,91	n.d.	38,99
3	LT2	7412,84	n.d.	176,18	2936,67	346,57	4879,03	1013,93	n.d.	28,14
1	PT2	6993,62	n.d.	214,31	2883,53	632,14	4834,26	1044,17	n.d.	26,68
2	PT2	7928,26	n.d.	348,85	3257,66	650,24	4554,09	975,19	n.d.	31,83
3	PT2	8116,51	n.d.	266,41	2762,07	788,92	4076,30	945,52	n.d.	37,61
1	MT2	7775,81	n.d.	303,12	2740,22	639,34	4526,26	1090,91	n.d.	31,18
2	MT2	11746,20	29,75	1241,80	2932,65	n.d.	2769,63	1029,13	n.d.	62,61
3	MT2	8590,89	n.d.	217,75	3378,03	743,43	4720,25	1313,32	n.d.	36,89
1	MPT2	9172,35	n.d.	433,12	3040,34	483,43	5141,37	1020,00	3118,56	n.d.
2	MPT2	10197,50	46,47	588,88	3532,62	787,05	4370,54	1072,96	2443,54	49,24
3	MPT2	8773,12	67,10	594,22	2739,20	648,53	3558,61	984,87	3197,78	49,80
1	KT2	13123,94	n.d.	2133,28	3792,37	n.d.	n.d.	386,26	n.d.	74,96
2	KT2	16234,35	94,77	2633,44	4048,29	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	86,85
3	KT2	13479,68	105,79	3168,45	3782,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	99,49

Tabell 2. Celletall i deig til brødbaking etter innstøping på Rose Bengal (RB) agar. Deig tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Alle stammene ble inokulert i deigen ved ca. 7 log kde/g og prøve ble tatt ut rett etter elting (T0) og etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1). Data for tre gjentak

Gjentak	Celletall (log kde/g)					
	1	2	3	1	2	3
	T0	T0	T0	T1	T1	T1
S	6,46	6,37	6,22	7,01	6,81	6,81
L	6,53	6,09	6,22	7,11	6,94	6,8
P	6,37	6,11	6,02	7,15	6,86	6,82
M	6,35	6,38	6,19	7,39	6,93	6,94
MP	6,52	6,08	6,42	6,73	6,27	6,55
K	5,27	5,65	5,1	5,74	5,78	5,63

Tabell 3. Celletall i deig til brødbaking etter innstøping på De Man Rogosa og Sharpe (MRS) agar. Deig tilsatt gjær (K), surdeig (S), surdeig fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Alle stammene ble inokulert i deigen ved ca. 7 log kde/g og prøve ble tatt ut rett etter elting (T0) og etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1). Data for tre gjentak.

Gjentak	Celletall (log kde/g)					
	1	2	3	1	2	3
	T0	T0	T0	T1	T1	T1
R	7,89	7,94	7,78	9,12	9,06	9,23
L	8,07	7,85	7,69	9,3	9,15	9,17
P	7,98	7,88	7,65	9,18	9,15	9,14
M	7,97	8,17	7,97	9,32	9,13	9,13
MP	8,18	7,96	8,3	9,21	9,13	9,2
K	>4	>4	>4	>5	>5	>5

Tabell 4. pH målt i deig rett etter elting (T0), etter heving i 12 timer ved 21 °C (T1) og i brød (T2), i brød tilsatt kun gjær, kontroll (K), og tilsatt kun surdeig (S) og i tillegg fermentert med *L. citreum* 45 (L), *P. pentosaceus* 120 (P) og en blanding av de to sistnevnte sammen med *Lb. plantarum* 15D uten (M) og med tilsatt kalsiumpropionat (0,03%) (MP). Data for tre gjentak.

Gjentak	pH								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	T0	T0	T0	T1	T1	T1	T2	T2	T2
S	5,8	5,78	5,87	4,2	4,28	4,28	4,25	4,59	4,5
L	5,63	5,7	5,85	4,3	4,29	4,23	4,27	4,41	4,37
P	5,8	5,88	5,95	4,17	4,22	4,31	4,28	4,51	4,29
M	5,62	5,63	5,9	4,17	4,17	4,23	4,25	4,44	4,38
MP	5,71	5,81	5,9	4,52	4,56	4,64	4,55	4,59	4,67
K	5,98	6,02	6,05	5,73	5,82	5,86	6,13	6,18	6,23



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway