



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2024 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Mikrobiota, vekst og metabolismestudier av private og kommersielle surdeiger

Microbiota, growth and metabolism studies of
private and commercial sourdoughs

Erlend Ødegaard

Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende mastergradsoppgave i matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Jeg vil først rette en takk til min hovedveileder førsteamanuensis Hilde Marit Østlie som alltid har vært tilgjengelig for spørsmål og gitt god veiledning. Jeg vil takke min biveileder førsteamanuensis Davide Porcellato med hjelp til databehandling og bioinformatiske analyser.

Jeg ønsker også å takke senioringeniør Ahmed Abdelghani med hjelp til gjennomføring av Illumina sekvensering og Sanger sekvensering. Jeg vil også takke senioringeniør Kari Olsen for hjelp med HPLC-analyser. Jeg vil til slutt takke May som alltid med et smil har hjulpet til med stort og smått på labben.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Ås, 15. mai 2024

Erlend Ødegaard

Sammendrag

En surdeig kan karakteriseres av et komplekst samspill mellom gjær, melkesyrebakterier og eddiksyrebakterier. For å forstå disse samspillene og hvordan de påvirker en surdeig, har det blitt gjort en rekke studier på mikrobiota og metabolisme i surdeiger de siste tiårene.

I denne oppgaven ble mikrobiota, vekst og metabolisme analysert i 21 private og 10 kommersielle surdeiger, samlet inn fra Ås, Oslo, Vestby og Spydeberg. Surdeigene hadde store forskjeller i mikrobiell sammensetning og det ble identifisert 10 ulike melkesyrebakterieslekter og en eddiksyrebakterieslekt. Disse slektene omfatter *Levilactobacillus*, *Pediococcus*, *Companilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Loigolactobacillus* og *Acetobacter*. Surdeigene hadde lav tilstedeværelse av noen av de mest identifiserte bakteriene i surdeig som *Fructilactobacillus sanfranciscensis* og *Lactiplantibacillus plantarum*. *Levilactobacillus brevis* var den mest identifiserte bakterien, men var i få tilfeller dominant i surdeigene den ble funnet. Surdeigene inneholdt fire ulike gjærslekter og en muggslekt. Slektene inkluderer *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* og *Alternaria*. *Kazachstania* var den dominerende gjæren i seks surdeiger, og i prøvene hvor *Kazachstania* ble funnet ble det identifisert svært liten andel andre slekter. *Saccharomyces* ble funnet i flest surdeiger, men ble funnet sammen med *Alternaria* og *Wickerhamomyces* i mange av surdeigene. *Wickerhamomyces* var dominerende i syv surdeiger, men ingen av disse var kommersielle.

Vekst- og metabolismeforsøkene viste også store forskjeller mellom surdeigene. Melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjonen i surdeigene varierte fra henholdsvis 2750-32511 ppm og 0-5156 ppm. Surdeigene inneholdt ofte lavere konsentrasjon av glukose enn av maltose, og kan tyde på at glukose er foretrukket energikilde i flere surdeiger. Celletallene varierte fra <6-9,8 KDE/g på LBS-agar og fra 5,1-8,4 på YM-agar. pH-målingene viste at surdeigene hadde pH $4 \pm 0,6$. Fire utvalgte surdeiger som ble videre studert hadde stabil metabolisme over tre uker, med små variasjoner i pH, celletall og organiske syrer.

Dette studiet gir et innblikk i forskjeller og likheter mellom surdeiger med ulik historikk. Det ser ut som at surdeigenes ulike opphav har hatt stor påvirkning på den mikrobielle sammensetningen, som igjen har påvirket deres vekst og metabolisme.

Abstract

A sourdough can be characterized by complex interactions between yeast, lactic acid bacteria, and acetic acid bacteria. In order to understand these interactions and how they affect sourdough, numerous studies on microbiota and metabolism in sourdough have been conducted in the recent decades.

In this study, microbiota, growth, and metabolism were analyzed in 21 private and 10 commercial sourdoughs collected in Ås, Oslo, Vestby and Spydeberg. The sourdoughs had big differences in microbial composition, with the identification of 10 different genera of lactic acid bacteria and one genus of acetic acid bacteria. These genera include *Levilactobacillus*, *Pediococcus*, *Companilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Loigolactobacillus* and *Acetobacter*. The sourdoughs had low presence of some of the most commonly identified bacteria in sourdough, such as *Fructilactobacillus sanfranciscensis* and *Lactiplantibacillus plantarum*. *Levilactobacillus brevis* was the most frequently identified bacterium, but was rarely dominant in the sourdoughs where it was found. The sourdoughs contained four different genera of yeast and one genus of mold. These genera include *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* and *Alternaria*. *Kazachstania* was the dominant yeast in six sourdoughs, and in samples where *Kazachstania* was identified, there was a very small proportion of other genera. *Saccharomyces* was found in most sourdoughs, often alongside with *Alternaria* and *Wickerhamomyces*. *Wickerhamomyces* was dominant in seven sourdoughs, but none of these were commercial.

The growth and metabolism studies also showed differences between the sourdoughs. The concentrations of lactic acid and acetic acid in the sourdoughs varied from 2750 to 32511 ppm and 0 to 5156 ppm, respectively. The sourdoughs often contained lower concentrations of glucose than maltose, suggesting that glucose is a preferred energy source in several sourdoughs. Cell counts varied from <6-9.8 log CFU/g on LBS-agar and from 5.1-8.4 on YM-agar. pH measurements showed that the sourdoughs had a pH of 4 ± 0.6 . Four selected sourdoughs that were further studied exhibited stable metabolism over three weeks, with small variations in pH, cell counts, and organic acids.

This study provides insight into the differences and similarities between sourdoughs with different origins. It appears that the various origins of the sourdoughs had a big impact on their microbial composition, which in turn has influenced their growth and metabolism.

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 Hensikt med oppgaven	1
2. Teori	2
2.1 Korn.....	2
2.1.1 Hvete	2
2.1.2 Rug	3
2.2 Surdeig	3
2.2.1 Mikroorganismer i surdeig	4
2.2.1.1 Melkesyrebakterier.....	4
2.2.1.2 Gjær.....	7
2.2.1.3 Eddiksyrebakterier	8
2.3 Genotypisk identifisering ved sekvensering	9
2.3.1 Polymerase-kjedereaksjon (PCR)	9
2.3.2 Sanger sekvensering	10
2.3.3 Illumina sekvensering	11
3. Materialer og metoder	14
3.1 Forsøksoppsett.....	14
3.2 Surdeigskulturer	15
3.3 Isolering og identifisering av gjær og bakterier	16
3.3.1 Vekstmedier	16
3.3.2 Dyrking av melkesyrebakterier og gjær	18
3.3.3 Isolering og rendyrking av melkesyrebakterier og gjær.....	18
3.4 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering.....	19
3.4.1 DNA-ekstraksjon.....	19
3.4.2 PCR og rensing av PCR-produkt	19
3.4.3 Sanger sekvensering	20
3.5 Mikrobiotasammensetning ved Illumina NovaSeq 6000 sekvensering	21
3.5.1 DNA-ekstraksjon.....	21
3.5.2 qPCR	22
3.5.3 Rensing av PCR-produkt og Illumina Index PCR	23
3.5.4 Bioinformatisk analyse.....	25
3.6 Vekst- og metabolismeforsøk.....	26
3.7 HPLC.....	26
3.8 pH-måling.....	27

4. Resultater.....	28
4.1 Innsamling av surdeig	28
4.2 Mikrobiologiske analyser og metabolismestudier av 31 surdeiger	29
4.2.1 Metabolismestudier	29
4.2.2 Mikrobiologiske analyser	32
4.3 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering	33
4.4 Mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering.....	35
4.4.1 Identifisering av soppsamfunn i surdeigene	35
4.4.2 Identifisering av bakteriesamfunn i surdeigene	36
4.4.3 Principal Coordinates Analysis	38
4.5 Vekst- og metabolismestudier av fire utvalgte surdeiger	40
5. Diskusjon.....	45
5.1 Mikrobiologiske analyser og metabolismestudier av 31 surdeiger	45
5.2 Soppsamfunn i surdeigene	48
5.3 Bakteriesamfunn i surdeigene	51
5.4 Interaksjoner mellom sopp og bakterier	53
5.5 Vekst- og metabolismeforsøk av fire utvalgte surdeiger.....	54
6. Oppsummering og videre studier	57
7. Referanser.....	59
8. Vedlegg.....	64

1. Introduksjon

Det første dokumenterte forbruket av surdeigsbrød kan spores tilbake til det gamle Egypt. Egypterne fant ut at ved å la deigen stå over tid kunne deigen øke i volum og gi luftigere brød. Bruken av surdeig fortsatte å være en essensiell del av brødbaking helt slutten av 1800-tallet da surdeig i stor grad ble byttet ut, først med restgjær fra ølproduksjon og senere med industrielt produserte gjærkulturer (*Saccharomyces cerevisiae*) (Cappelle et al., 2013; Huys et al., 2013). I løpet av de siste tiårene har imidlertid interessen for surdeig økt, både i forskingsmiljøet, håndverksbakerier og blant privatpersoner. Dette kommer blant annet som følge av at surdeigfermentering kan gi økt produktkvalitet, lenger holdbarhet, bedre fordøyelighet og fører til nedbryting av komponenter som kan være inflammatoriske hos gluten sensitive personer (D'Amico et al., 2023).

1.1 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke og sammenligne surdeiger fra kommersielle aktører og privatpersoner. Surdeiger fra 9 kommersielle bakerier, en surdeigs produsent og 21 privatpersoner i Oslo, Ås, Spydeberg og Vestby ble samlet inn i løpet av en periode på fire uker. Surdeigene hadde forskjellig historikk med tanke på oppbevaringstemperatur, matingsfrekvens, meltype brukt til mating og alder. Det var derfor av interesse å undersøke forskjeller og likheter i mikrobiell sammensetning, pH og metabolitter mellom de ulike surdeigene. Det vil kunne forventes at den mikrobielle sammensetningen, pH og mengde metabolitter i surdeigene ville bli ulik.

Celletall i de ulike innsamlede surdeigene ble undersøkt og det ble isolert kolonier fra et utvalg av surdeigene for å se på forholdet mellom bakterier og gjær og for å identifisere dem. For å undersøke metabolismen til surdeigene ble det utført analyser av karbohydrater, organiske syrer og målt pH. Mikrobiotaen i alle surdeigene ble undersøkt ved hjelp av Illumina sekvensering. Metabolismen og veksten av mikroorganismer til et utvalg av surdeigene ble undersøkt i dybden over tre uker for å undersøke stabilitet over tid.

2. Teori

2.1 Korn

Korn er en av de viktigste kildene til næring for mennesker og husdyr verden over. Korn tilhører gressfamilien (*Poaceae*) og de viktigste slektene er hvete (*Triticum*), mais (*Zea mays*), ris (*Oryza*), bygg (*Hordeum vulgare*), sorghum (*Sorghum*), hirse (*Panicum*), havre (*Avena sativa*) og rug (*Secale cereale*), som utgjør nærmere 60 % av all dyrket mark i verden (Cappelle et al., 2013).

2.1.1 Hvete

Hvete er en svært viktig matplante for store deler av verdens befolkning og står for rundt halvparten av alle kaloriene spist i verden (Khalid et al., 2023). Hvete kan deles inn i fem arter, heksaploid brødhvete (*Triticum aestivum*), spelthvete (*Triticum aestivum subsp spelta*), tetraploid durumhvete (*Triticum durum*), emmer (*Triticum dicoccon*) og diploid einkorn (*Triticum monococcum*) (Huys et al., 2013).

Brødhvete den mest brukte hvetearten til brødbaking og karakteriseres med gode bakeegenskaper. Brødhvete inneholder mellom 70 og 75 % stivelse, rundt 14 % vann, 10-12 % proteiner, 2-3 % ikke stivelse-polysakkarider (mest arabinoxylans) og 2 % lipider. Under baking gjennomgår hveten komplekse kjemiske, biokjemiske og fysiske forandringer som blir påvirket av de ulike bestanddelene (Goesaert et al., 2005).

Spelt har hatt en oppgang i popularitet i nyere tid som følge av den har god smak, kan spises av hvetesensitive personer og at interessen for lokalproduserte kornprodukter har økt. Spelt gir mindre avlinger enn brødhvete, men den har god motstandsdyktighet mot dårlig vær og passer godt til dyrking uten sprøytemidler. Sammenlignet med brødhvete har spelt høyere proteininnhold, mer løselig kostfiber, høyt vitamin-, mineral- og umettet fettsyreinnhold, samt lavere innhold av fytinsyre. Til tross for at spelt har høyere proteininnhold enn hvete vil deiger laget med spelt være mindre elastiske og mer utflytende. Dette skyldes at speltgluten sammenlignet med hvetegluten, inneholder mindre gluteniner som gir elastisitet, og mer gliadiner som gir strekkbarhet (Frakolaki et al., 2018; Korcari et al., 2020).

2.1.2 Rug

Rug ligner en del på hvete, men den har noen viktige forskjeller i kjemisk sammensetning og teknologiske egenskaper. Rug dyrkes og spises hovedsakelig i Nord-Europa, med Russland, Polen, Tyskland, Hviterussland og Ukraina som største produsenter. Rug inneholder 56-70 % stivelse, 8-13 % proteiner og 2-3 % lipider. Rug har mellom 15 og 21 % fiber hvor mesteparten kommer fra arabinoxylan (8-10 %) (Kamal-Eldin et al., 2008).

I motsetning til bruk av surdeig i hvetebrød, som i stor grad ble byttet ut med industriell gjær på slutten av 1800-tallet, fortsatte bruken av surdeig i rugbrød utover 1900-tallet. Dette skyldes den høye amylaseaktiviteten i rug, som må hemmes gjennom syrning. Uten syrningen vil amylasen kunne bryte ned krummestrukturen til brødet i så stor grad at skorpen løsner fra krummen under steking. Surdeigsfermentering av rug fører også til frigjøring av pentosaner som bidrar til mer vannbinding og økt evne til å holde på gass (Brandt et al., 2023; Cappelle et al., 2023).

2.2 Surdeig

Surdeig er en blanding av mel og vann som etter gjentatte runder med «backslopping» utvikler et samfunn av melkesyrebakterier, eddikesyrebakterier og gjær. Det er betydelig konsensus med hensyn til at surdeig kan ha en positiv effekt på en rekke egenskaper i brød. Dette inkluderer forbedringer innen volum, konsistens, smak, næringsinnhold og holdbarhet (Landis et al., 2021). Mikrofloraen som dannes i en surdeig stammer fra mikroorganismer som finnes på bakerens hender, i vannet, i luft og kanskje viktigst fra mikroorganismene som naturlig finnes i melet (Lau et al., 2021).

En surdeig er karakterisert med stadige forandringer i tilgjengelige næringsstoffer. Amylaser som finnes naturlig i melet vil kontinuerlig frigjøre maltose, glukose og fruktose som videre blir tatt opp av gjær og melkesyrebakterier. Konsentrasjonen av fermenterbare karbohydrater og hastigheten de frigjøres påvirkes av flere faktorer som kornsort, maling av kornet, temperatur og vannaktivitet (Guerzoni et al., 2013). Saktere frigjøring av karbohydrater, enn opptaket fra mikroorganismene i en surdeig, kan føre til en rask nedgang i karbohydratkonsentrasjonen. I surdeiger av hvete kan konkurransen om lave konsentrasjoner av karbohydrater føre til lavere melkesyreproduksjon og redusert syrning. Rugmel har høyere

amylaseaktivitet enn hvetemel og surdeiger av rug vil derfor ha høyere mengde tilgjengelige karbohydrater (Gobbetti, 1998).

2.2.1 Mikroorganismer i surdeig

Frem til nå er det har det minst blitt identifisert 111 ulike MSB-arter og 44 ulike gjærarter i surdeig (De Vuyst et al., 2023; Gastrow et al., 2023). Det er imidlertid kun vanlig å finne tre eller mindre MSB-arter og en til to gjærarter i surdeig laget med «backslopping». Hvilke MSB og gjær som blir funnet påvirkes av et komplekst samspill mellom prosessparametere som temperatur, fermenteringstid og melet som blir brukt, hvor de best tilpassede organismene vil bli igjen. Det er vanlig å finne 10 til 100 ganger mer MSB enn gjær i en surdeig (Comasio et al., 2020; Van Kerrebroeck et al., 2017).

2.2.1.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) er en heterogen gruppe Gram-positive, ikke-sporulerende og melkesyreproduserende bakterier som er en essensiell del av en rekke ulike fermenterte næringsmidler. Melkesyrefermentering er en av de eldste formene for matkonservering og har blitt brukt i flere tusen år. Det er fortsatt svært utbredt bruk av melkesyrefermentering i næringsmidler, og benyttes blant annet i produkter som spekepølse, ost, yoghurt, sauerkraut og kimchi. I surdeigsbrød bidrar melkesyrebakterier til økt kvalitet og bedre holdbarhet, blant annet gjennom produksjon av organiske syrer, eksopolysakkarider (ESP) og enzymer (Arendt et al., 2007; Sionek et al., 2023).

Melkesyrebakteriene tilhører rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og ordenen *Lactobacillales*. De ulike familiene kan deles opp i *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* og *Streptococcaceae* (von Wright & Axelsson, 2019). I surdeig har familiene *Lactobacillaceae* (inkluderer *Leuconostocaceae*), *Enterococcaceae* og *Streptococcaceae* høyest forekomst. På slektsnivå er surdeig klart karakterisert av laktobasillene, men det er vanlig å finne andre slekter som *Weissella*, *Pediococcus* og *Leuconostoc*. *Lactococcus*, *Enterococcus* og *Streptococcus* kan også isoleres fra surdeig, men dette er mer sjeldent (De Vuyst et al., 2023). Det er flere faktorer som er definerende for hvorfor laktobasiller er dominerende i surdeigsmiljøer. De har blant annet en metabolisme som er tilpasset karbohydrater til stede i korn og de har gode stressresponsmekanismer for å

overleve lav pH, høye/lave temperaturer, osmotisk stress, oksidasjon og sult (De Vuyst & Neysens, 2005).

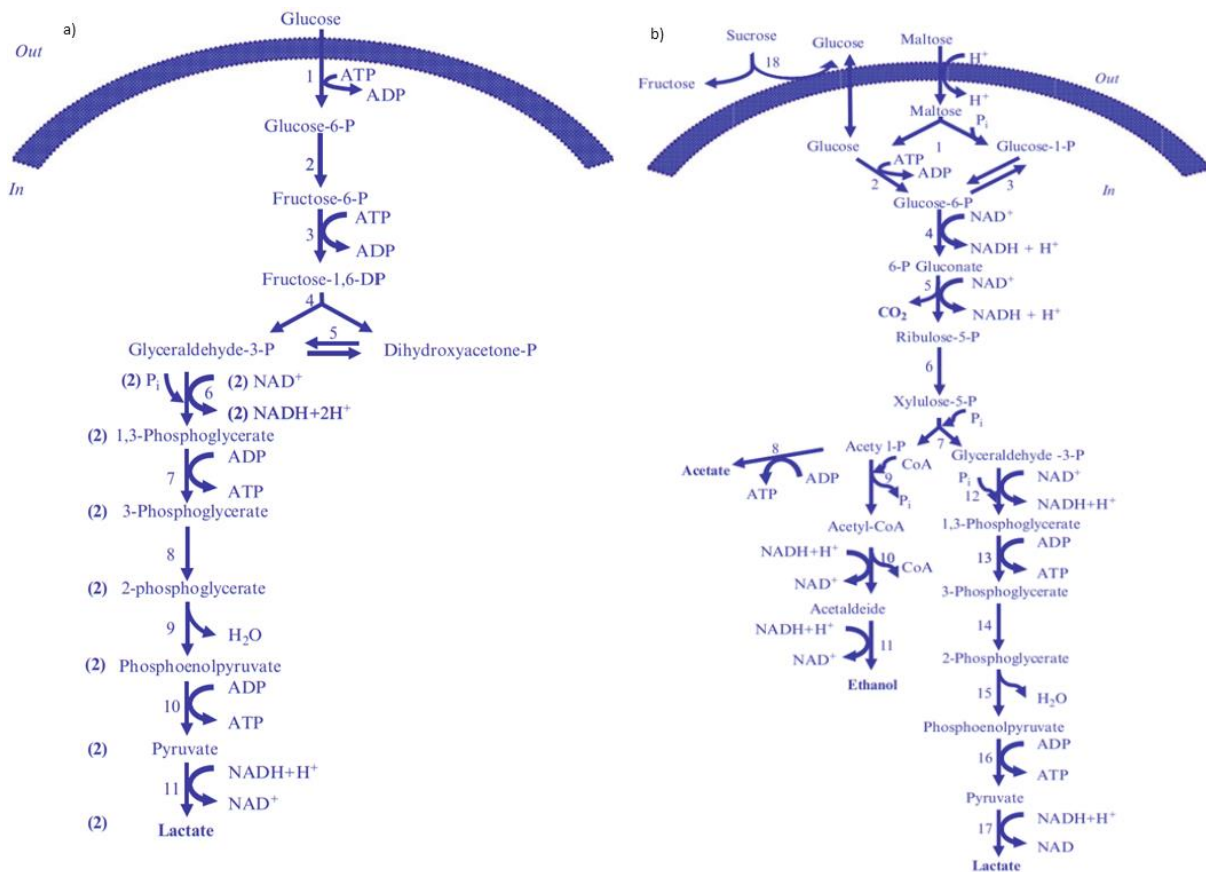
Taksonomi av melkesyrebakterier var tidligere basert på optimal veksttemperatur, sukkermetabolisme, metabolittproduksjon, DNA-DNA hybridisering, mol % G+C og peptidoglykanstruktur i celleveggen. Etter at genotypisk identifisering av bakterier ved hjelp av 16S rRNA ble mer vanlig, ble det oppdaget en mye større genetisk diversitet spesielt hos *Lactobacillus* enn hva som er vanlig å finne innenfor en slekt. I 2020 reviderte Zheng et al. blant annet taksonomien til *Lactobacillus* og det ble foreslått en reklassifisering til 25 slekter, (Zheng et al., 2020). I denne oppgaven vil ny klassifisering bli brukt, men siden en del av litteraturen det blir referert til i denne oppgaven bruker gammel klassifisering, vises en oversikt over relevante tidligere og nåværende navn i tabell 2.1.

Tabell 2.1: Tidligere og nåværende artsnavn i den opprinnelig *Lactobacillus* slekten som omtales i denne oppgaven.

Tidligere navn	Nåværende navn
<i>Lactobacillus rossiae</i>	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>
<i>Lactobacillus graminis</i>	<i>Latilactobacillus graminis</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus spicheri</i>	<i>Levilactobacillus spicheri</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus kimchii</i>	<i>Companilactobacillus kimchii</i>
<i>Lactobacillus paralimentarus</i>	<i>Companilactobacillus paralimentarus</i>
<i>Lactobacillus bobalius</i>	<i>Companilactobacillus bobalius</i>
<i>Lactobacillus chiayiensis</i>	<i>Lacticaseibacillus chiayiensis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>

Metabolismen til MSB kan deles inn i tre kategorier. Obligat homofermentative organismer som metaboliserer heksoser gjennom Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsveien til melkesyre. Obligat heterofermentative organismer som metaboliserer pentoser og heksoser til laktat, etanol, CO₂ og eddiksyre gjennom 6-pentoseglukonat/fosfoketolase (PG/PK) reaksjonsveien. Fakultativt heterofermentative organismer som metaboliserer heksoser gjennom EMP reaksjonsveien og pentoser gjennom 6-PG/PK reaksjonsveien. De obligat

heterofermentative melkesyrebakteriene er dominerende i surdeig, til forskjell fra andre fermenterte næringsmidler hvor obligat homofermentative MSB som regel er viktigst (Gänzle & Gobbetti, 2013). Figur 2.1 viser EMP- og 6-PG/PK reaksjonsveien.



Figur 2.1: a) Homolaktisk fermentering gjennom Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) reaksjonsveien. b) Heterolaktisk fermentering gjennom 6-pentosegluconat/fosfoketolase (PG/PK) reaksjonsveien. Figurene er hentet fra Gänzle & Gobbetti (2013).

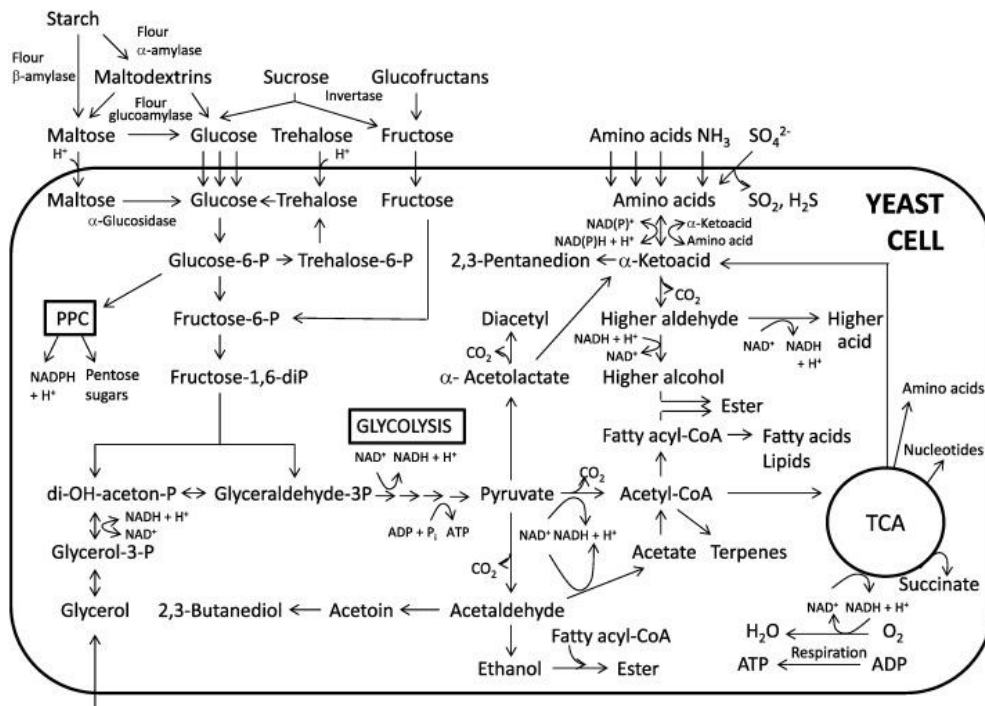
Melkesyrebakterier i surdeig kan ofte metabolisere maltose, glukose, sukrose og fruktose, samt andre karbohydrater som arabinoxylan og arabinogalaktan. En viktig karakteristikk av MSB-arter som finnes i surdeig er at de bruker maltose som preferert energikilde gjennom en dedikert katabolsk reaksjonsvei, noe som blant annet gjelder *F. sanfranciscensis* og *Llb. brevis* (De Vuyst et al., 2009).

Surdeig er et system med høy diversitet og hvor en rekke ulike MSB kan bli funnet. De hyppigst forekommende melkesyrebakteriene i surdeig fra en studie gjort på 500 surdeiger fra hele verden var (fra høy til lav forekomst) *Levilactobacillus brevis*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Pediococcus parvulus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Latilactobacillus sakei*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Pediococcus demnosus/inopinatus* og *Lacticaseibacillus casei* (Landis et al., 2021).

2.2.1.2 Gjær

Gjær er encellede sopp som hovedsakelig formerer seg gjennom aseksuell knoppkyting og seksuell reproduksjon ved sporedanning. Gjær som finnes i surdeig må være tilpasset lav tilgang på næringsstoffer, lav pH og høyt oksidativt-, termisk-, og osmotisk stress (De Vuyst et al., 2016). Disse egenskapene kan hovedsakelig bli funnet hos arter som tilhører familien *Saccharomycetaceae* (Huys et al., 2013). Den viktigste oppgaven gjær har i surdeigsprodukter er heving ved CO₂ produksjon og smaksgivning. Metabolittene gjæren produserer som kan bidra til bedre smak er organiske syrer, diacetyl, høyere alkoholer og estere (De Vuyst et al., 2016). En oversikt over gjærmetabolisme med hovedsubstratomsetning og viktige metabolitter for smak vises i figur 2.2.

Karbohydratmetabolismen til gjær kan deles opp i maltose-negative og maltose-positive gjær, som er en viktig faktor når det gjelder konkurransen om næringsstoffer med MSB. Maltose-negative gjær bruker hovedsakelig glukose som energikilde, og i en surdeig med maltose-positive MSB vil glukose være mer tilgjengelig. Maltose-positive gjær kan som regel metabolisere de fire vanligste karbohydratene i en surdeig (maltose, glukose, fruktose og sukrose), men i visse tilfeller vil den for eksempel kun metabolisere en av karbohydratene som følge av karbonmetabolittundertrykkelse (De Vuyst et al., 2009). *Saccharomyces cerevisiae* kan metabolisere sukrose, glukose og fruktose, men foretrekker maltose som energikilde. Andre gjærarter som *Kazachstania humilis* og *Kazachstania exigua* er maltose negative og observeres derfor ofte i et samspill med en maltose-positiv bakterie, for eksempel *Flb. sanfranciscensis* som foretrekker maltose som energikilde (De Vuyst et al., 2016).



Figur 2.2: Metabolisme hos gjær med hovedsubstratomsetning og metabolittproduksjon viktig for smak gjennom surdeigsfermentering. Hentet fra De Vuyst et al. (2016).

I en studie på 500 surdeiger fra hele verden var de seks vanligste gjærartene (høyest til lavest forekomst) *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis*, *Kazachstania servazzii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranifaciens* og *Kazachstania unispora* (Landis et al., 2021).

2.2.1.3 Eddiksyrebakterier

Eddiksyrebakterier (ESB) er en gruppe Gram-negative bakterier som kan oksidere etanol til eddiksyre. Eddiksyrebakterier er elliptiske til stavformede og vokser kun aerobt.

Optimumstemperatur for vekst er mellom 25 og 30 °C og pH-optimum er 5,0-6,5, men de kan vokse ved lavere pH (Gomes et al., 2018).

Det har vært mest fokus på MSB og gjær i surdeig, men eddiksyrebakteriene kan også bidra positivt i surdeigsprodukter. Eddiksyrebakterier produserer blant annet fruktaner som kan bidra til mykere brød med mindre retrogradering og høyere volum (Jakob et al., 2012). Landis et al. (2021) fant at de mest forekommende slektene av eddiksyrebakterier i surdeig (basert på 500 surdeiger) var *Acetobacter* og *Gluconobacter*. *Komagataeibacter* ble også identifisert i noen surdeiger, men i mye mindre grad enn de to andre (Landis et al., 2021).

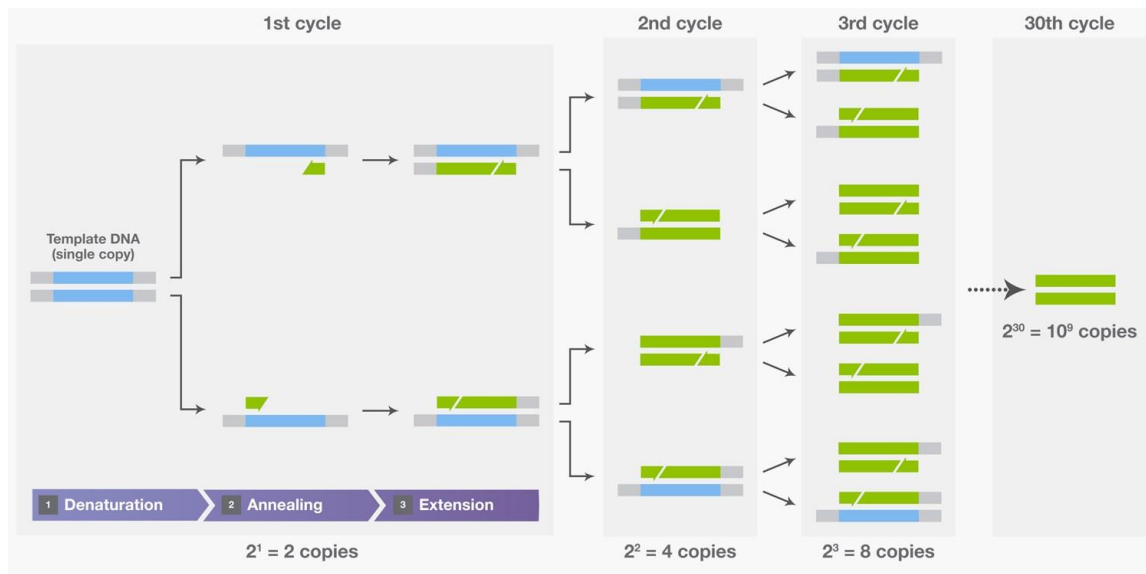
2.3 Genotypisk identifisering ved sekvensering

Identifisering av mikroorganismer har vært en viktig del av forskning, innen blant annet bioteknologi, matmikrobiologi og medisinsk mikrobiologi. Tidligere var fenotypisk klassifisering ved hjelp av blant annet Gram-farging, katalase test, oksidase test og metabolismeundersøkelser eneste identifiseringsmetode. Bruken av genotype metoder til identifisering av bakterier begynte i 1985 samtidig med utviklingen av polymerasekjedereaksjon (PCR) metoden. Siden dette har en rekke nye metoder dukket opp (Franco-Duarte et al., 2019).

16S ribosomal RNA gensekvensering er en av de beste metodene for å taksonomisk identifisere bakterier. Genet inneholder ni variable regioner (V1-V9). Under mikrobiotastudier er det vanlig å kombinere sekvenser fra to eller flere regioner, V3 og V4 blir vanligvis benyttet (López-Aladid et al., 2023). Internt transkribert spacer (ITS) regionen i sopp er den vanligste sekvenserte genetiske markøren i mykologi. ITS-regionen består av to variable spacerområder (ITS1 og ITS2) og ligger på hver sin side av det konservative 5.8S ribosomale genet (Nilsson et al., 2015).

2.3.1 Polymerase-kjedereaksjon (PCR)

PCR er en metode for å amplifisere sekvenser av DNA ved hjelp av en DNA-polymerase. For å gjennomføre en PCR-reaksjon må det være til stede nærvær av DNA-polymerase, primere, deoxynukleotidtrifosfater (dNTP-er) og DNA-templat. Prosessen starter med at DNA-templatet ekstraheres fra prøven som skal undersøkes og kan videre deles opp i tre hovedtrinn: Denaturering, hybridisering og amplifisering. I denatureringstrinnet varmes DNA-et opp til ca. 95 °C for å løsne hydrogenbindingene mellom baseparene slik at DNA-dobbeltråden denaturerer til 2 enkeltråder. Rett etter denatureringen senkes temperaturen til 55-72 °C for hybridisering, hvor temperaturen er avhengig av egenskapene til primerne som blir brukt. Under hybridiseringen fester primerne seg til 3' enden av begge enkeltrådene fra DNA-templatet. I amplifiseringsfasen økes temperaturen til 75-80 °C for optimal DNA-polymeraseaktivitet og DNA-syntese. Polymerasen syntetiserer nye DNA-tråder identiske til templattråden. Disse tre trinnene blir gjentatt i 30 til 40 sykluser og resulterer i store mengder kopiert templat-DNA (Khehra et al., 2023). En illustrasjon av en PCR-reaksjon vises i figur 2.3.



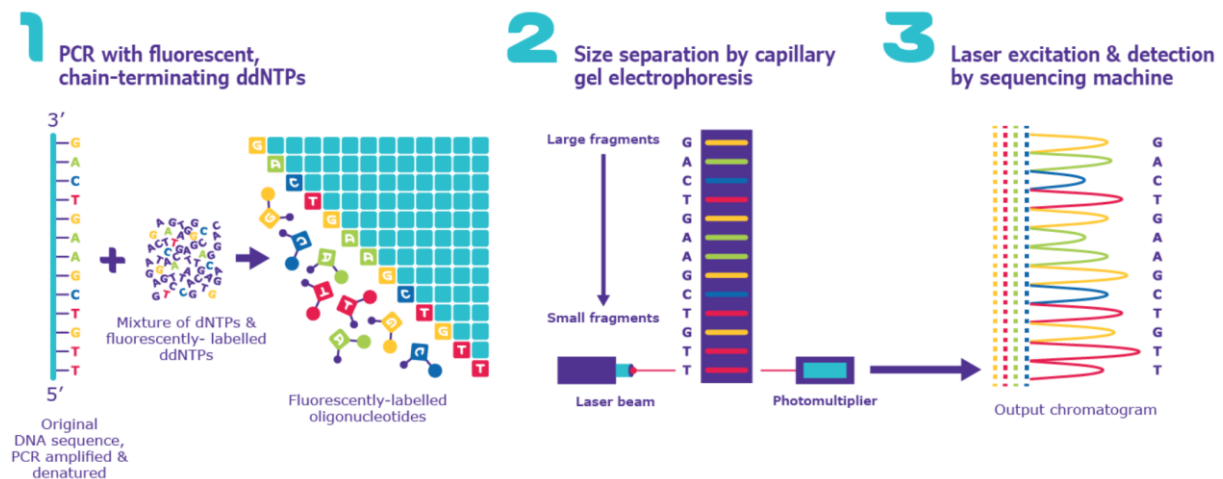
Figur 2.3: Hovedtrinn i en PCR-reaksjon. 1) Denaturering av templat-tråden til to enkeltråder, 2) Hybridisering hvor primere festes til hver DNA-enkeltråd og 3) Elongering av DNA-trådene fra primerne. Hentet fra *PCR Basics* (n.d.).

2.3.2 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering er en førstegenerasjons DNA-sekvenseringsmetode som ble utviklet av Frederick Sanger i 1977. Det er utviklet flere nye sekvenseringsmetoder som er mer effektive, men Sanger sekvensering brukes fortsatt i dag. Den første delen av Sanger sekvensering er en kjedeterminerende PCR. Denne reaksjonen er på mange måter lik en vanlig PCR, en av forskjellene er at det blir tilsatt en liten del modifiserte nukleotider som kalles dideoksyribonukleotider (ddNTP) i tillegg til de vanlige nukleotidene (dNTP). I amplifiseringssteget til kjedeterminerende PCR vil DNA-polymerasen syntetisere nye tråder, men hver gang den tilfeldig innsetter en ddNTP vil tråden termineres. Dette er på grunn av at ddNTP mangler en OH-gruppe på 3' enden og ikke kan danne fosfordiesterbindinger. Resultatet av dette er at det blir dannet opp til milliarder av kopier fra DNA-sekvensen som er terminert ved ulike lengder (*Sanger Sequencing Steps & Method*, n.d.).

I neste steg blir oligonukleotidene separert ved kapillær gel elektroforese. Fragmentene vil bevege seg gjennom gelen med ulik hastighet basert størrelsen de har og blir dermed separert. Det siste steget går ut på å lese av sekvensen fra gelen. I moderne Sangersekvensering er alle ddNTP-ene merket med hvert sitt fluoriserende stoff. En laser vil eksitere det fluoriserende

stoffet som korresponderer til en gitt base og en datamaskin vil registrere hvilken base som ble funnet. Sanger sekvenseringen blir mer effektiv hvis den har tilstrekkelig DNA-templat til stede i PCR-miksen, og det er derfor vanlig å kjøre en vanlig PCR før Sanger sekvenseringen for å amplifisere DNA templatet (*Sanger Sequencing Steps & Method*, n.d.). En illustrasjon av de tre stegene i sangersekvensering vises i figur 2.4.



Figur 2.4: Automatisert Sanger sekvensering i tre steg. 1) PCR med fluoriserende kjedeterminerende ddNTP-er, 2) Separering av oligonukelotider ved kapillær gel elektroforese og 3) Lasereksitering og detektering av fluorescens i sekvenseringsmaskin. Hentet fra *Sanger Sequencing Steps & Method* (n.d.).

2.3.3 Illumina sekvensering

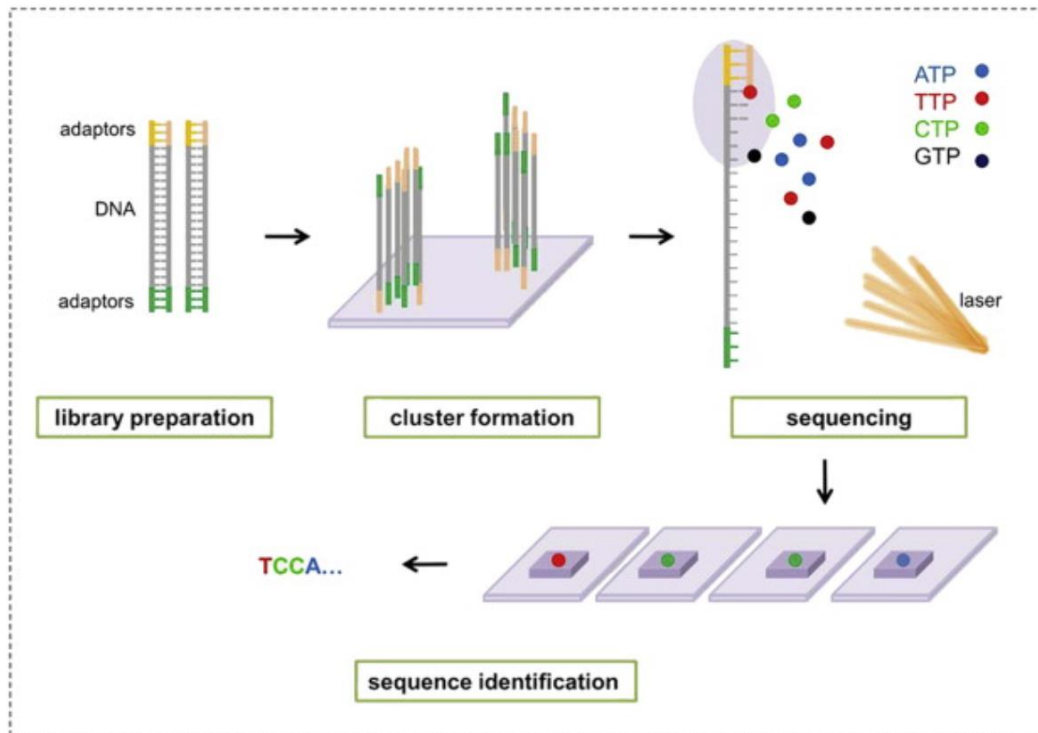
Illumina sekvensering er en neste generasjons DNA-sekvenseringsmetode hvor store mengder sekvenser kan parallellt sekvenseres samtidig. Før Illumina sekvenseringen kan begynne må mål-DNA amplifiseres i en PCR (ofte kalt PCR1) og deretter isoleres og renses. Det er vanlig å inkludere et steg hvor renheten til opparbeidet DNA evalueres (*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*, n.d.).

Neste steg er bibliotekpreparering for å gjøre DNA eller RNA kompatibelt med sekvenseringsmaskinen. For å preparere biblioteket fragmenteres som regel DNA og det blir satt på spesialiserte adaptere på hver ende. Adapterne har komplementære sekvenser som gjør at DNA-fragmentene kan binde seg til flow cellen. Fragmentene blir videre amplifisert ved PCR, ofte kalt PCR2, og renses. For å spare ressurser er det vanlig at flere biblioteker blir blandet sammen og sekvensert sammen. For å kunne gjøre dette må det settes på

indekssekvenser samtidig som adapterne blir satt på, slik at det er mulig å kjenne igjen de ulike bibliotekene (*Understanding the NGS workflow*, n.d.).

I det neste steget blir bibliotekene overført til en flow celle og satt inn i sekvenseringsmaskinen. Samlingen av DNA-fragmenter blir amplifisert i en prosess kalt «cluster generation» hvor flere millioner kopier av enkelttrådet DNA blir laget. Kjemisk modifiserte terminerende nukleotider blir bundet til DNA-templatet i en prosess som kalles sekvensering ved syntese (SBS). Nukleotidene inneholder et fluoriserende stoff hver og en reversibel terminator som hindrer at flere baser blitt satt på. Når et nukleotid blir satt på registreres fluorescensen som avgis fra nukleotidet og nukleotidet blir fjernet, slik at neste kan feste seg. Til slutt brukes en programvare for å identifisere nukleotidene («base calling») (*Understanding the NGS workflow*, n.d.). Hovedtrinnene ved Illumina sekvensering vises i figur 2.5.

Illumina sekvensering produserer store mengder data og effektiv databehandling er derfor viktig. Databehandlingen kan deles opp i tre hovedtrinn: primæranalyse hvor rådatakvaliteten blir undersøkt, noe som vanligvis blir gjort av sekvenseringsmaskinen. Sekundæranalyse av rådata hvor det blant annet kan bli gjort sekvenssammenstilling, kvalitetsfiltrering og sekvensdatabasesøk i programmer som Python, Perl, R eller Bash. Tertiæranalyse hvor behandlet data blir fremstilt med hensyn på formålet med sekvenseringen (*NGS Data Analysis for Illumina Platform—Overview and Workflow*, n.d.).

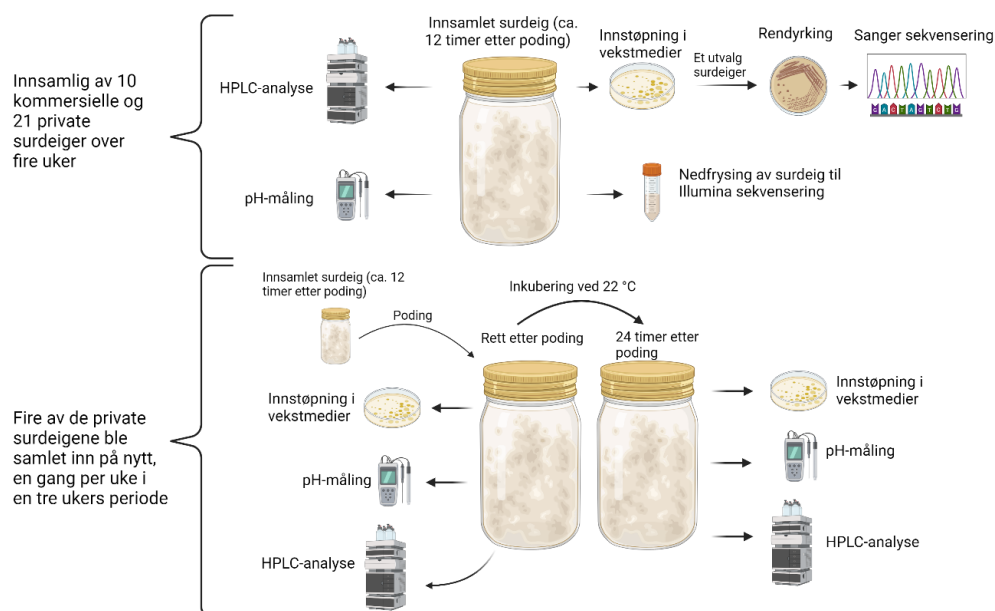


Figur 2.5: Illumina sekvensering i fire hovedtrinn: 1) Bibliotekpreparering hvor det blir satt på spesialiserte adaptere på hver ende av DNA-fragmentet, 2) «Cluster formation» hvor flere millioner kopier med enkeltrådet DNA blir syntetisert, 3) Sekvensering ved syntese hvor terminerende nukleotider avgir fluorescens ved binding til DNA-templatet og deretter fjernes og 4) Identifisering av sekvensen ved hjelp av en programvare i sekvenseringsmaskinen. Hentet fra Raghavendra & Pullaiah (2018).

3. Materialer og metoder

3.1 Forsøksoppsett

Denne studien omfattet innsamling av 10 kommersielle og 21 private surdeiger fra Ås, Oslo, Vestby og Spydeberg over en periode på fire uker. Informasjon om surdeigenes alder, oppbevaringstemperatur, meltype, matefrekvens og blandingsforhold ble registrert samtidig som innsamling av prøvene. Eieren av surdeigen ble instruert om å mate surdeigen slik at den var aktiv ved mottak og når analysene skulle gjennomføres (Ca. 12 timer i romtemperatur før mottak). Hvis det ikke var mulig å gjøre analysene ca. 12 timer etter mating, ble surdeigen oppbevart ved 4°C frem til analysestart. Surdeigene ble ved mottak støpt inn i fem ulike vekstmedier, pH ble målt og «high performance liquid chromatography» (HPLC)-analyser ble utført for bestemmelse av karbohydrater og organiske syrer. I tillegg ble surdeigene nedfrosset til mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering. Det ble rendyrket kolonier fra vekstmediene til Sanger sekvensering. Det ble også utført vekst- og metabolismestudier av 4 utvalgte surdeiger med et uttak per uke i en tre ukers periode. En illustrasjon som viser alle analysene som ble gjort vises i figur 3.1.



Figur 3.1: Illustrasjonen viser de ulike analysene som ble gjennomført i løpet av studiet. 10 kommersielle og 21 private surdeiger ble ved mottak (ca. 12 timer etter poding) støpt inn i vekstmedier, pH ble målt og innholdet av karbohydrater og organiske syrer ble bestemt ved hjelp av HPCL. Prøver fra surdeigene ble i tillegg nedfrosset til mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering. Det ble rendyrket kolonier fra vekstmediene fra utvalgte surdeiger til Sanger sekvensering. Fire private surdeiger ble samlet inn på nytt og pH, celletall, og innhold av organiske syrer og karbohydrater ble undersøkt. Illustrasjonen ble laget i BioRender.

3.2 Surdeigskulturer

Informasjonen som ble samlet inn ved innelevering angående surdeigenes meltype, alder, oppbevaringstemperatur mellom matinger, oppbevaringstemperatur etter mating, matefrekvens og blandeforhold vises i tabell 3.1. De private surdeigene omtales som P1-P21 og de kommersielle surdeigene omtales som K1-K10.

Tabell 3.1: Oversikt over meltype, alder, oppbevaringstemperatur mellom mating, oppbevaringstemperatur etter mating og matingsfrekvens hos de innsamlede private (P) og kommersielle (K) surdeigene.

Surdeig	Meltype	Alder	Oppbevaringstemp. mellom matinger	Oppbevaringstemp. etter mating	Matingsfrekvens	Blandeforhold Surdeig/vann/mel (g)
P1	Sammalt spelt	1 år	KT ^a	KT	1 gang i uka	75/75/75
P2	Sammalt rug og siktet hvete	3,5 år	KT	KT	1 gang i uka	30/100/100
P3	Sammalt rug	5 uker	KT	KT	1 gang i uka	25/55/50
P4	Siktet Hvete	4 måneder	KT	KT	1 gang i uka	NA
P5	Sammalt spelt	2 måneder	KT	KT	1 gang i uka	75/75/75
P6	Sammalt spelt	1 år	KT	KT	1 gang i uka	30/75/75
P7	Siktet Hvete	5 år	KT	RT ^b	Annenhver uke	50/50/100
P8	Siktet hvete og sammalt rug	6 måneder	KT	RT	1 gang i uka	20/40/40
P9	Siktet spelt	1,5 år	RT	RT	Hver dag	10/50/50
P10	Siktet hvete	4 år	KT	RT	1 gang i uka	50/50/50
P11	Sammalt spelt og sammalt hvete	1 år	KT	RT	1 gang i uka	20/40/40
P12	Siktet hvete og sammalt rug	1 år	KT	RT	1 gang i uka	20/40/40
P13	Siktet Hvete, sammalt hvete og sammalt rug	2,5 år	KT	KT	1 gang i uka	25/50/50
P14	Siktet hvetemel	1 år	KT	RT	Annenhver uke	50/50/50
P15	Siktet hvetemel	7 år	KT	RT	1 gang i uka	50/50/50
P16	Spelt	100 år	KT	RT	1 gang i uka	50/110/100
P17	Siktet hvete og sammalt hvete	1,5 år	KT	RT	1 gang i uka	10/20/20
P18	Siktet Hvete, sammalt hvete og sammalt rug	1,3 år	KT	RT	1 gang i uka	20/60/60
P19 ^c	Sammalt hvete og sammalt rug	3 år	RT	RT	Hver dag	NA ^d
P20	Siktet rug	131 år	KT	KT	1 gang i uka	50/125/100
P21	Rug og hvete	10 måneder	RT	RT	1 gang i uka	20/100/100

K1	Sammalt spelt	7 år	RT	RT	Hver dag	NA/5000/6000
K2	Siktet hvete	7 år	RT	RT	Hver dag	NA/5000/6000
K3	Sammalt rug og sammalt hvete	7 år	RT	RT	2 ganger om dagen	100/400/200
K4	Rug	10 dager	-	KT	Mates ikke	NA
K5	Rug	10 dager	-	KT	Mates ikke	NA
K6	Hvete	5 dager	-	KT	Mates ikke	NA
K7	Siktet hvete	6 år	RT/KT ^e	RT	Hver dag	1000/5000/6000
K8	Sammalt rug	6 år	RT/KT	RT	Hver dag	1000/5000/6000
K9	Siktet hvete	13 år	RT/KT	RT	Hver dag	2000/3000/3000
K10	NA	NA	NA	NA	NA	NA

^aKT=Kjøleskaptemperatur.

^bRT=Romtemperatur.

^cTørket surdeig matet hver dag i en uke før analysene.

^dNA=Ikke oppgitt.

^eFørst i romtemperatur, deretter i kjøleskap.

3.3 Isolering og identifisering av gjær og bakterier

3.3.1 Vekstmedier

Det ble benyttet «Plate Count Agar» (PCA), «Potato Dextrose Agar» (PDA), de Man, Rugosa og Sharpe (MRS)-, «Lactobacillus selektiv» (LBS)-, «Yeast and Mold» (YM)-, og «Rose-Bengal Chloramphenicol» (RB)-agar under forsøkene som faste vekstmedier for bakterier og gjær. MRS- og «Glucose, Yeast and Peptone» (GYP)-buljong ble benyttet som flytende vekstmedier. Mediene ble laget i henhold til instruksjoner fra produsenten beskrevet på forpakningen, og alle mediene utenom LBS-agar ble autoklavert ved 121 °C i 15 minutter. En oversikt over blandingsforhold, produsent, inkubasjonstemperatur og forventet vekst vises i tabell 3.2. Mediene ble oppbevart mørkt og ved 4 °C inntil bruk.

Tabell 3.2: Vekstmedier brukt under forsøkene med produsent, blandingsforhold, inkubasjonstemperatur, inkubasjonstid og forventet vekst.

Medie	Produsent	Konsentrasjon (g/L)	Inkubasjonstemperatur (°C)	Inkubasjonstid (dager)	Vekst
de Man, Rugosa og Sharpe (MRS) agar	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland (MRS Buljong), + VWR International, Leuven, Belgia (agar)	52,2 (MRS buljong), 15 (agar)	30	2-4	Melkesyrebakterier
BBL™ <i>Lactobacillus</i> selektiv (LBS) agar ^a	Becton, Dickinsons and Company Sparks, USA	84	30 (anaerobt)	3-4	<i>Lactobacillus</i> ssp.
Plate count agar (PCA)	Merck KGaA	22,5	30	2-4	Totalantall (mesofile bakterier)
Yeast and Mold (YM) agar ^b	Oxoid, Basingstoke, United Kingdom (gjærekstrakt (YE), maltekstrakt, mykologisk pepton), Merck KGaA (glukose), VWR (agar)	3 (YE), 3 (malt-ekstrakt), 5 (mykologisk pepton), 10 (glukose) og 20 (agar).	30	4	Gjær og mugg
Rose-Bengal Chloramphenicol (RB) agar	Merck KGaA	32,2	22	5	Gjær og mugg
Glucose, Yeast and Peptone (GYP) buljong	Oxoid (YE, mykologisk pepton), Merck KGaA (glukose)	20 (glukose), 1,5 (YE), 10 (mykologisk pepton)	30	1-2	Gjær
MRS buljong	Merck KGaA	52,2	30	1-2	Melkesyrebakterier
Potato dextrose agar (PDA)	MP Biomedicals, Solon, USA	39	30	2-4	Gjær

^aLBS ble laget samme dag som den skulle brukes og ble tilsatt 264 µl iseddik per 200 ml agar.

Inkubert i Heraeus Type B 5060 EK/CO₂ (Thermo Fisher Scientific) med 10 % CO₂.

^bJustert til pH 4 før bruk (ca. 1 ml 20% steril melkesyre per 200 ml).

3.3.2 Dyrking av melkesyrebakterier og gjær

For å bestemme antall kolonidannende enheter (KDE) i surdeigene og for å isolere bakterier og gjær ble surdeigene fortynnet og støpt inn i generelle og selektive vekstmedier.

Det ble veid ut 11 g surdeig i en steril Stomacher pose og tilsatt 99 ml Ringers løsning. Prøven ble homogenisert i en Stomacher (Stomacher 400, Seward Ltd, West Sussex, Storbritannia) på maks hastighet i 120 sekunder. Fra denne løsningen ble det laget en fortynningsrekke med fortynningene 10^{-3} , 10^{-5} og 10^{-7} . Prøvene ble støpt inn i MRS-, LBS-agar og PCA med fortynningene 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} og 10^{-8} , og i YM- og RB-agar med fortynningene 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Det ble laget to paralleller av alle fortynningene. Prøvene ble inkubert under betingelsene vist i tabell 3.1. Kolonier ble telt i området 30-300 og gjennomsnittsverdier ble beregnet.

3.3.3 Isolering og rendyrking av melkesyrebakterier og gjær

Etter endt inkubasjon ble det plukket fem kolonier fra MRS-, LBS-, YM- og RB-agar fra utvalgte surdeiger (K1, K2, K3, K9, P6 og P7). Totalt ble det plukket 115 kolonier. Koloniene ble overført ved hjelp av en podenål til rør med 5 ml MRS- eller GYP-buljong basert på om kolonien ble isolert fra MRS- og LBS-agar eller YM- og RB-agar. Rørene ble inkubert ved 30 °C i 24-48 timer. Ved vekst i form av blakket løsning eller bunnfall (etter 24 til 48 timer) ble 750 µl fra røret overført til et kryorør. Det ble deretter tilsatt 250 µl 60 % glyserol for å oppnå 15 % (v/v) glyserol. Kryorørene med isolater ble nedfrosset ved -80 °C inntil videre rendyrking og Sanger sekvensering.

For å sjekke om isolatene var rene ble de strøket ut med podenål på MRS- eller PDA-agar basert på om de kom fra henholdsvis MRS- og LBS-agar eller YM- og RB-agar. Ensartethet til koloniene på skåla ble undersøkt og minst to av koloniene ble mikroskopert for å verifisere om koloniene var like eller ikke. Hvis isolatet ikke var rent, ble det overført en koloni fra skålen til MRS eller GYP buljong, som deretter ble inkubert ved 30 °C over natt for deretter å bli strøket ut på nytt på MRS agar eller PDA agar. Dette ble gjentatt inntil renkultur var etablert. De nye isolatene ble fryst ned i kryorør med MRS- eller GYP-buljong tilsatt glyserol (15 % v/v) avhengig av om de fremstod som MSB eller gjær.

3.4 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering

3.4.1 DNA-ekstraksjon

Det ble valgt ut 38 av 115 isolater som skulle indentifiseres ved Sangersekvensering. Isolatene ble tint og ca. 10 µl ble overført ved hjelp podenål til rør med 5 ml GYP- eller MRS-buljong basert på om det var et gjærisolat eller bakterieisolat. Rørene ble inkubert ved 30 °C inntil vekst ble observert (24-48 timer). Det ble overført 1 ml av kulturen til et 1,5-ml eppendorfrør som ble sentrifugert ved 13.200 RPM i 1 min i Eppendorf 5415D centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Supernatanten ble helt av og pelleten ble oppbevart ved -20 °C frem til DNA-ekstraksjon.

For å ekstrahere DNA ble DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen Hilden, Tyskland) brukt. Ekstraksjonen ble utført som beskrevet i produsentens protokoll (QuickStart protocol, Qiagen, 2017) med noen unntak. Lysering av prøvene ble utført ved hjelp av Fastprep-24™ 5G (MP Biomedicals, Solon, USA) hvor prøvene ble kjørt i 3 sykluser på 30 sekunder med 300 sekunders pause, hastighet 6 m/s. Det ble videre brukt 50 µl elueringsbuffer istedenfor 100 µl. Isolert DNA ble deretter nedfrosset ved -20 °C frem til PCR skulle gjennomføres.

3.4.2 PCR og rensing av PCR-produkt

For å amplifisere DNA fra bakterie og gjærisolatene ble primere som amplifiserer henholdsvis 16S rRNA genet og ITS-området brukt. For 16S rRNA amplifisering ble primerne 1F (5`- GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3`) og 5R (5`- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3`) benyttet. For amplifisering av ITS1-5,8S-ITS2 regioner ble primerne ITS1 (5`- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3`) og ITS4 (5`- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3`) brukt. PCR-reaksjonsblanding benyttet under PCR ble laget i henhold til tabell 3.3.

Tabell 3.3: Reagenser, konsentrasjoner og volum som ble brukt i PCR-reaksjonsblandingen.

Reagens	Initialkonsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per brønn (µl)
Q5 master mix	2x	1x	10
Primer 1	5 µM	0,2 µM	1
Primer 2	5 µM	0,2 µM	1
Evagreen	20x	1x	1
PCR grade H2O			5
DNA-templat			2
Totalt			20

Hver brønn ble tilsatt 18 µl PCR-reaksjonsblanding og 2 µl DNA-templat og kjørt i LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Basel, Sveits) med programmet vist i tabell 3.4. Programmet ble brukt til DNA amplifisering av både gjær og bakterier.

Tabell 3.4: PCR-programmet benyttet under amplifisering av DNA hos bakterier og gjær.

Program	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Sykluser
Innledende denaturering	98	00:30	1
Denaturering	98	00:10	35
Hybridisering	55	00:30	
Syntetisering	72	00:35	
Endelig syntetisering	72	5:00	1
Smeltekurve	65	∞	-
	95		
	37		

Smeltekurven til alle prøvene ble undersøkt for å se om prøven hadde blitt vellykket amplifisert. PCR-produktet ble deretter renset med Macherey-Nagel (MN) Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit (Düren, Tyskland) i henhold til produsentens, protokoll 5.1 PCR clean-up. Protokollen ble fulgt som beskrevet med unntak av punkt 3 hvor silikonmembranen ble vasket to ganger, og ved punkt 5 ble det brukt 20 µl elueringsbuffer.

3.4.3 Sanger sekvensering

DNA-konsentrasjonen i det rensede PCR-produktet ble målt ved hjelp av NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Det var ønsket med en DNA-konsentrasjon på 50-100 ng i en 5 µl løsning av rensed PCR-produkt. Alle prøvene hadde DNA-konsentrasjon innenfor dette. PCR-produkt fra hvert bakterieisolat ble tilsatt i 2 separate 1,5-ml eppendorfrør. Det ene røret ble tilsatt Forward (F)-primer og det andre ble tilsatt Reverse (R)-primer. Med råd fra overingeniør på labben ble PCR-produktet fra hvert gjærisolat tilsatt i et eppendorfrør og bare primer 1` ble tilsatt, da primer i en retning dekket majoriteten av sekvensen. Det ble brukt samme primere som ved PCR-reaksjonen (kapittel 3.4.2). Til hver rør ble det tilsatt 5 µl av den respektive primeren, 3 µl vann («PCR grade H2O») og 2 µl PCR-produkt med et totalvolum på 10 µl.

Eppendorfrørene med primer og PCR-produkt ble sendt til Eurofins Genomics (Köln, Tyskland) hvor Sanger sekvensering ble gjennomført. Sekvensene ble trimmet og F-og R-sekvensene ble satt sammen i Bioedit Sequence Alignment Editor® (versjon 5.0.9). Basic

Local Alignment Search Tool (BLAST®) ble brukt for å søke etter isolatenes antatte identitet. Databasene som ble brukt til ITS sekvenser var Genbank, EMBL DDBJ og PDB. Databasen som ble brukt til 16S rRNA sekvenser var NCBI's Targeted Loci Projects.

3.5 Mikrobiotasammensetning ved Illumina NovaSeq 6000 sekvensering

Mikrobiotaen i surdeigene ble analysert ved hjelp av Illumina sekvensering av deler av 16S rRNA genet for bakterier og ITS-regionen for sopp. Det ble frosset ned 20 g av hver surdeig for oppbevaring samtidig som det ble gjort analyser av celletall, pH, organiske syrer og karbohydrater. Det ble gjennomført Illumina sekvensering på totalt 31 prøver (en for hver surdeig).

Illumina sekvenseringen inneholder flere steg som omfatter DNA-ekstraksjon, «Quantitative PCR» (qPCR), Illumina indexing PCR, rensing av PCR-produkter, normalisering, kvantifisering og databehandling. Disse stegene er beskrevet i 3.5.1 - 3.5.5.

3.5.1 DNA-ekstraksjon

Surdeigene ble tint over natten på kjølerom og 1 g prøve ble veid ut i Falcon rør. Det ble så tilsatt 9 ml Ringers løsning, og surdeigen ble løst opp i væsken ved risting for hånd. Prøvene ble sentrifugert ved 400 RPM (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i 5 minutter ved 22 °C for å fjerne de største melpartiklene. 1 ml av supernatanten ble overført til et 1,5-ml eppendorfrør og ble sentrifugert ved 13 200 RPM i Eppendorf Microcentrifuge 5415D (Eppendorf) i 1 minutt. Supernatanten ble helt av og pelleten ble resuspendert i 1 ml sitratvann (Tri-Sodium citrate dihydrate, Merck, Darmstadt Tyskland) tilsatt 0,2% tween (Tween 20, Merck, Darmstadt, Tyskland). Løsningen ble sentrifugert på nytt, supernatanten helt av og pelleten ble resuspendert i sitratvann. Løsningen ble så sentrifugert en siste gang før supernatanten ble forsiktig pipettert av og pelleten ble nedfrosset ved -20 °C.

DNA-ekstraksjon av pellet ble gjort ved hjelp av DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen). Prøvene ble preparert etter produsentens beskrivelse i som beskrevet i QuickStart Protocol (Qiagen, 2017) med noen unntak. Det ble blant annet tilsatt 10 µl

«cetyltrimethylammonium bromide» (CTAB) buffer før lysering for å fjerne PCR-inhiberende komponenter. Cellene ble lysert ved hjelp av Fastprep-24™ 5G (MP Biomedicals) gjennom 3 sykluser på 30 sekunder, med 300 sekunders pause mellom hver syklus og hastighet 6 m/s. Det ble tilsatt 50 µl elueringsbuffer istedenfor 100 µl. Ekstrahert DNA ble frosset ned ved 20°C inntil videre analyse.

3.5.2 qPCR

For å amplifisere deler av 16S rRNA genet hos bakterier og deler av 18S- og ITS rRNA regionene hos gjær ble LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) benyttet. Etter endt qPCR var ikke resultatene fra prøvene hvor 18S primere var benyttet gode nok. Det var derfor kun prøvene som ble tilsatt 16S og ITS primere som gikk til videre bearbeidelse. Primerne som ble brukt for 16S rRNA amplifisering var IlluminaF (5`-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG AT- 3`) og IlluminaR (5`-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA- 3`). Primerne som ble brukt for ITS-region amplifisering var ITSfunF (5`-ACC TGC GGA RGG ATC A- 3`) og ITSfunR (5`-GAG ATC CRT TGY TRA AAG TT- 3`). PCR-reaksjonsblanding for qPCR ble preparert i henhold til tabell 3.5.

Tabell 3.5: Reagenser, konsentrasjoner og volum som ble brukt i PCR-reaksjonsblanding for 16S rRNA og ITS- region amplifisering.

Reagens	Initialkonsentrasjon	Endelig konsentrasjon	Volum per reaksjon (µl)
Q5 master mix	2x	1x	10
Primer 1	5 µM (16S), 10 µM (ITS)	0,25 µM (16S), 0,5 µM (ITS)	1
Primer 2	5 µM (16S), 10 µM (ITS)	0,25µM (16S), 0,5 µM (ITS)	1
Evagreen	20x	1x	1
PCR grade H2O			5
DNA-templat	1-100 ng/µl	7,5-150 ng	2
Totalt			20

Hver brønn ble tilsatt 18 µl PCR-reaksjonsblanding og 2 µl DNA-templat og kjørt i LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics) med programmet vist i tabell 3.6. Samme PCR-program ble brukt for amplifisering av ITS regioner hos gjær og 16S rRNA hos bakterier.

Tabell 3.6: PCR-program benyttet under amplifisering av DNA hos bakterier og gjær.

Program	Temperatur (°C)	Tid (minutter)	Sykluser
Innledende denaturering	98	00:30	1
Denaturering	98	00:15	35
Hybridisering	53	00:30	
Syntetisering	72	00:20	
Endelig syntetisering	72	5:00	1
Smeltekurve	65	∞	-
	95		
	37		

Smeltekurven til alle prøvene ble undersøkt for å se om prøven hadde blitt vellykket amplifisert. DNA-konsentrasjonen i PCR-produktet ble deretter målt ved hjelp av NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

3.5.3 Rensing av PCR-produkt og Illumina Index PCR

Rensing av PCR-produkt og Illumina Index PCR ble gjennomført av Fiona Valerie Franklin-Alming ved KBM, NMBU.

PCR-produktet ble rensert ved hjelp av AMPure XP kuler (Beckman Coulter, Inc Brea, CA, USA). Det ble tilsatt 14 µl AMPure kuler til hver brønn og innholdet ble blandet 3 ganger før prøvene ble overført til en ren brønnplate. Prøvene ble så inkubert i fem minutter ved romtemperatur, flyttet til en magnet, inkubert videre i to minutter og supernatanten ble kastet. Deretter ble prøvene vasket ved å tilsette 100 µl 80% EtOH og inkubering i 30 sekunder før fjerning av EtOH. Dette vaskesteget ble gjentatt en gang, men denne gangen ble så mye som mulig av EtOH fjernet før prøvene ble lufttørket i 30 minutter. Deretter ble brønnplaten fjernet fra magneten, 20 µl elueringsbuffer (Mag midi, LGC, Teddington, UK) ble tilsatt og prøvene inkubert i to minutter. Platen ble så plassert tilbake på magneten, inkubert i fem minutter og 18 µl av eluatet ble overført til en ny brønnplate som ble frosset ned ved -20°C. Illumina Index PCR ble gjennomført ved bruk av Illumina-indekserte PRK primere. Det ble laget en mastermiks med polymerase, buffer, MgCl₂, dNPTs og vann i henhold til tabell 3.7.

Tabell 3.7: Reagenser, konsentrasjoner og volum som ble brukt i PCR-reaksjonsblanding ved Illumina Index PCR.

Reagens	Startkonsentrasjon	Sluttkonsentrasjon	Volum, μl (1 ml reaksjon)
HotFirePol [®] DNA polymerase	5 U/ μl	1.25 U	0.25
HotFirePol [®] buffer B2	10x	1x	2.5
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2.5
dNTPs	10 mM	200 μM	0.5
Evagreen	20x	1x	1
Index forward primer	5 μM	0.25 μM	1
Index reverse primer	5 μM	0.25 μM	1
Template DNA	5 – 100 ng/ μl	7.5 – 150 ng	4
PCR grade H ₂ O			12.25
Totalt			25

Det ble tilsatt 19 μl master mix, 1 μl index forward primer, 1 μl index reverse primer og 4 μl AMPure-renset DNA til hver brønn. Index PCR ble utført i LightCycler[®] 480 II (Roche Diagnostics) med programmet vist i tabell 3.8.

Tabell 3.8: PCR-programmet benyttet under index PCR.

Program	Temperatur	Tid (minutter)	Kolonne1
Innledende denaturering	95 °C	15:00	1
Denaturering	95 °C	00:30	x 10-15
Hybridisering	55 °C	01:00	
Syntetisering	72 °C	00:45	
Endelig syntetisering	72 °C	7:00	1

PCR-produktet ble rensert og normalisert ved hjelp av Sequalprep™ Normalization kit (Thermo Fisher Scientific). Det ble overført 20 µl PCR-produkt fra hver prøve til en Sequalprep™ brønnplate og tilsatt 20 µl Sequalprep™ Normalization Binding Buffer, som ble blandet godt med pipetten. Brønnplaten ble så inkubert i en time før innholdet i brønnene ble fjernet. Det ble tilsatt 50 µl SequalPrep™ Normalization Wash Buffer til brønnene, som ble blandet ved å pipettere opp og ned. Bufferen fra brønnene ble fjernet og kastet før brønnplaten ble snudd opp ned og trykket mot et papir. Det ble tilsatt 20 µl SequalPrep™ Normalization Elution Buffer til kolonne 1, 5 og 9 og platen inkubert i fem minutter før overføring til neste kolonne. Denne prosessen ble gjentatt til all kolonnene var behandlet. Det normaliserte DNA-eluatet ble til slutt samlet i et rør.

Deretter ble DNA-eluatet rensert med GeneElute™ PCR Clean-Up kit (Sigma Aldrich, Burlington, United States). Det ble tilsatt 0.5 ml Column Preparation Solution til en GenElute plasmid mini spin column og sentrifugert ved 12000 xg i 30 sekunder. Fem volumer av Binding solution ble overført til et volum av rensert og normalisert PCR-produkt og kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 16000 xg. Eluatet ble kastet før det ble tilsatt 0,5 ml Wash solution til kolonnen som ble sentrifugert ved 16000 xg i 1 minutt, og eluatet ble kastet. Kolonnen ble så sentrifugert ved 16000 xg i 2 minutter uten noen reagenser og oppsamlingsrøret ble kastet. Kolonnen ble overført til et nytt oppsamlingsrør og det ble tilsatt 30 µl elueringsbuffer til midten av kolonnen etterfulgt av inkubering ved romtemperatur i 1 minutt. Kolonnen ble sentrifugert ved 12000 xg i 1 minutt og eluatet ble videre oppbevart ved -20 °C.

Det ble gjennomført en høysensitivitets-Qubit kvantifisering før PCR-produktet ble sendt til Illumina NovaSeq 6000 sekvensering ved Novogene, Cambridge, UK.

3.5.4 Bioinformatisk analyse

Rådata fra Illumina sekvenseringen ble kvalitetsfiltrert og sekvensvarianter ble utledet ved hjelp av R-pakken DADA2 (Callahan et al., 2016). Sekvenser som var kortere enn 375 basepar for 16S og 250 for ITS ble fjernet, og slekten til den gitte sekvensen ble bestemt ved hjelp av R-pakken «DECIPHER» (Wright, 2016) opp mot SILVA SSU-databasen for 16S sekvenser (Quast et al., 2013). 16S sekvensene ble normalisert med 3500 sekvenser per prøve og ITS sekvensene med 10 000 sekvenser per prøve. Betadiversiteten til prøvene ble beregnet ved hjelp av Bray-Curtis distanser. Distansene ble brukt i en «Principial Coordinate Analysis» (PCoA) og plottet med R-pakken ggpubR.

3.6 Vekst- og metabolismeforsøk

Vekst og metabolisme til surdeig P2, P3, P6 og P13 ble undersøkt med uttak en gang i uka over tre uker. Disse surdeigene ble undersøkt for celletall, pH, innhold av karbohydrater og organiske syrer rett etter poding (T0) og etter 24 timer (T24). Surdeigene ble inkubert ved 22 °C mellom T0 og T24. Podingen av surdeigene ble gjort ved å blande sammen 50 g vann, 50 g mel og 25 g surdeig fra en aktiv surdeig som var podet ca. 12 t i forkant. For å bestemme celletall av melkesyrebakterier og gjær ble surdeigene støpt inn i henholdsvis MRS- og RB-agar. Fortynningene som ble brukt ved T0 var 10^{-5} , 10^{-6} og 10^{-7} for MRS-agar og 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} for RB-agar. Ved T24 ble fortynningene 10^{-6} , 10^{-7} og 10^{-8} brukt for MRS-agar og 10^{-5} , 10^{-6} og 10^{-7} for RB-agar.

3.7 HPLC

Innhold av organiske syrer og karbohydrater i surdeigene ble analysert etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011), med noen modifikasjoner.

Hver surdeigsprøve ble godt blandet før 1,00 g ble veid ut i et 10-ml rør. Det ble tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann og 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) til prøven. Prøven ble så ristet for hånd slik at surdeigen løste seg opp før det ble tilsatt 8 ml acetonitril (Merck). Prøven ble satt i MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i minimum 30 min. Prøven ble så sentrifugert i 15 min ved 3400 RPM i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Supernatanten ble deretter filtrert med 0,2 mm 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, autosampler, kolonneovn, DAD-UV detektor, og RI-detektor (alle fra Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). Separering av prøven ble gjort ved injeksjon av 25 µl og på en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) med 5 mM H₂SO₄ (Merck) som mobilfase, ved 32 °C kolonnetemperatur og hastighet på 0.4 ml/min. For beskyttelse av

kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories).

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

3.8 pH-måling

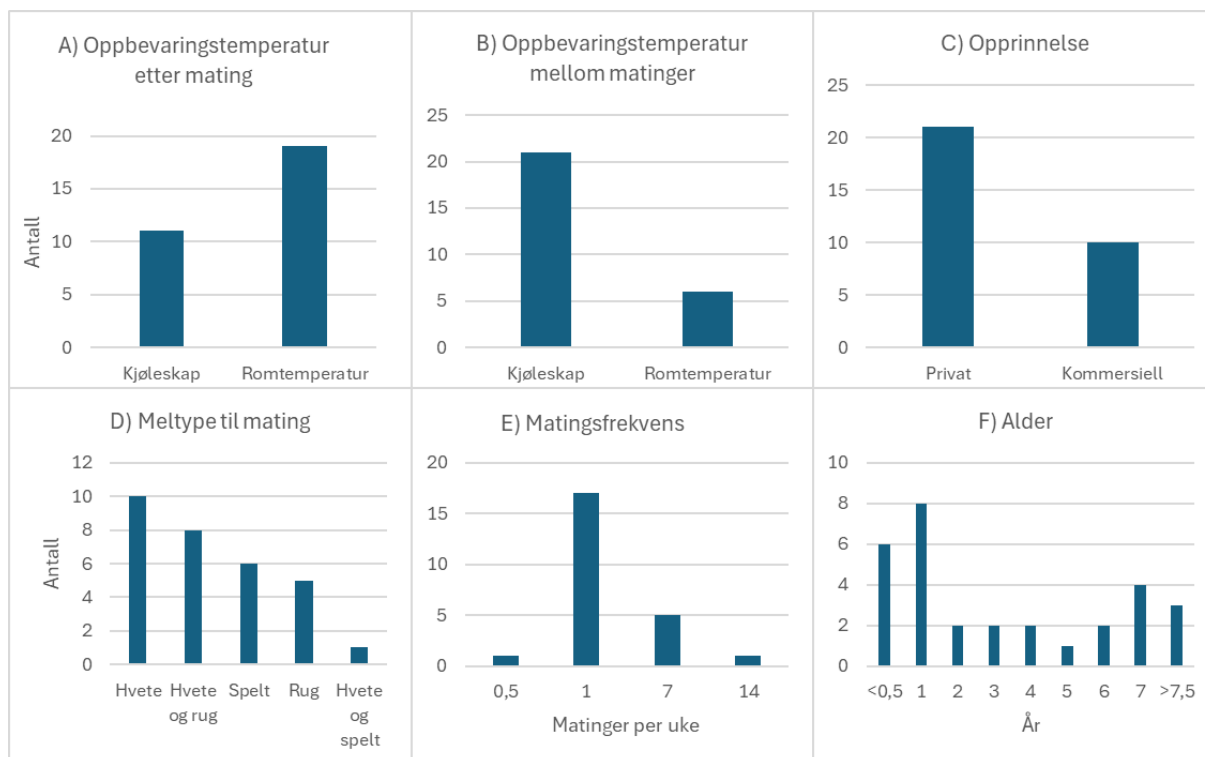
pH-målinger av surdeigene ble gjort ved romtemperatur med PHM 92 Lab pH Meter (København, Danmark). Før bruk ble pH-meteret kalibrert med pH 4 og pH 7 buffere (Merck KGaA) som ble oppbevart ved romtemperatur.

4. Resultater

4.1 Innsamling av surdeig

Det ble totalt samlet inn 31 surdeiger over fire uker fra en surdeigsprodusent, bakerier og privatpersoner fra Ås, Oslo, Vestby og Spydeberg. Ved levering av surdeigen fylte eieren ut et nettskjema vedrørende oppbevaringstemperatur etter mating, oppbevaringstemperatur mellom matinger, opprinnelse, matingsfrekvens, melsorter brukt til mating og alder på surdeigen. En oversikt over disse variablene er vist i figur 4.1. Alderen til surdeigene ble rundet av til nærmeste hele år.

Det ble samlet inn 21 surdeiger fra privatpersoner og 10 fra kommersielle aktører. De fleste surdeigene ble oppbevart i kjøleskap mellom matingene (21) og seks surdeiger ble oppbevart i romtemperatur mellom matingene. Flesteparten av surdeigene som ble oppbevart i romtemperatur både mellom og etter matinger var kommersielle (K1, K2, K3, K7, K8 og K9), men det var også to private (P19, P21). Det var flere private surdeiger som ble oppbevart i romtemperatur etter mating (P7-P12, P14-P19 og P21). Surdeigene som kun ble oppbevart i kjøleskaptemperatur var P1-P6, P13, P20, K4, K5 og K6. Surdeigene ble matet fra annenhver uke (P7 og P14) til to ganger om dagen (K3). Alle 17 surdeigene som ble matet 1 gang i uka var private surdeiger. Hvetemel og en blanding av hvetemel og rugmel var brukt i flest surdeiger, henholdsvis 10 og 8. Spelt og rug ble brukt i henholdsvis 6 og 5 surdeiger. Flest surdeiger var ca. 1 år gamle (8) og under et halvt år (6). De kommersielle surdeigene var alle seks år eller eldre, utenom K4, K5 og K6 som var de yngste undersøkte surdeigene.



Figur 4.1: *Prosessvariabler til 31 innsamlede surdeiger. A) Oppbevaringstemperatur etter mating, B) oppbevaringstemperatur mellom matinger, C) Opprinnelse, kommersiell eller privat, D) Meltype til mating, E) Matingsfrekvens og F) Alder på surdeigene.*

4.2 Mikrobiologiske analyser og metabolismestudier av 31 surdeiger

4.2.1 Metabolismestudier

Det ble gjennomført HPLC for å bestemme innhold av karbohydrater og organiske syrer i surdeigene og målt pH i alle de innsamlede surdeigene. Konsentrasjonen av maltose, glukose, melkesyre og eddiksyre i de kommersielle (K) prøvene er vist i tabell 4.1, og konsentrasjonen i de private (P) surdeigene er vist i tabell 4.2.

Maltosekonsentrasjonen i prøvene hadde stor spredning og varierte fra ingen detekterbar konsentrasjon av maltose i surdeig K5, K8 og K10 og til 17417 ppm i K6. Halvparten av prøvene (K1, K2, K3, K6 og K10) hadde ikke detekterbar konsentrasjon av glukose. Den høyeste konsentrasjonen av glukose ble observert i surdeig K4 (12131 ppm).

Melkesyrekonsentrasjonen varierte fra 4223 ppm hos surdeig K9 til 32511 ppm hos surdeig K4. Eddiksyrekonsentrasjonen var jevnt over lavere enn melkesyrekonsentrasjonen. Den høyeste observerte eddiksyrekonsentrasjonen var 5156 ppm i surdeig K4 og den laveste var på 454,3 ppm i surdeig K9.

Tabell 4.1: Maltose-, glukose-, melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjon i de kommersielle surdeigene analysert i aktiv surdeig.

Karbohydrater og organiske syrer (ppm)				
Surdeig	Maltose	Glukose	Melkesyre	Eddiksyre
K1	61,1	n.d. ^a	9981	1592
K2	1809	n.d.	6852	1264
K3	11,5	n.d.	6798	1089
K4	3700	12131	32511	5156
K5	n.d.	69,2	13219	2194
K6	17417	n.d.	12534	1260
K7	5577	216,2	5591	1026
K8	n.d.	688,4	7486	2011
K9	8792	1937	4223	454
K10	n.d.	n.d.	5172	1597

^an.d. = not detected

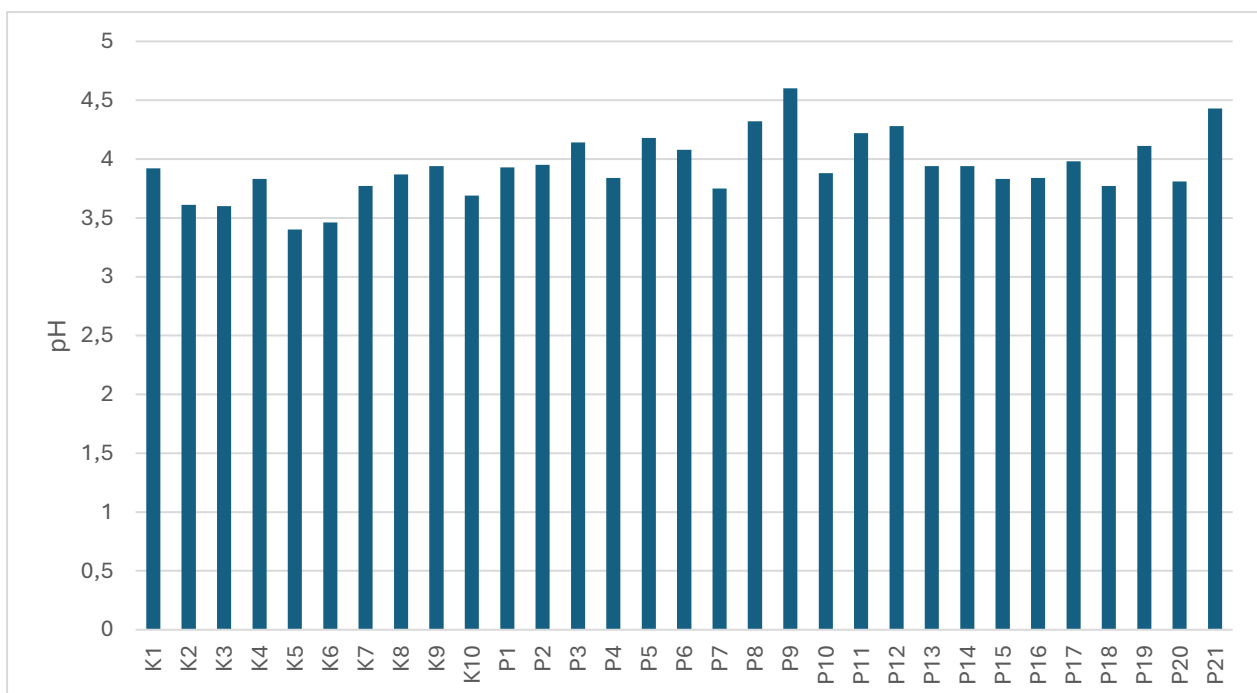
Maltosekonsentrasjonen i de private surdeigene varierte fra 10 441 ppm i P4 til rundt 0 i P2, P8, P10, P16, P18, og P19. De fleste surdeigene hadde en maltosekonsentrasjon på under 4000 ppm, utenom to surdeiger (P4 og P21). Det var ingen detekterbar glukose i majoriteten av de private surdeigene. Prøvene som inneholdt glukose var P17, P18, P20 og P21 med henholdsvis 411, 955, 8610 og 2593 ppm glukose. Melkesyrekonsentrasjonen varierte mye i surdeigene, hvor den høyeste konsentrasjonen var i P1 med 11698 ppm og den laveste var i P9 med 2749 ppm. Eddiksyrekonsentrasjonen var lavere enn melkesyrekonsentrasjonen i alle surdeigene. Prøvene varierte fra 0 i P1, P8 og P14 til 2849 ppm eddiksyre i P5. De fleste prøvene inneholdt mellom 600 og 2000 ppm eddiksyre.

Tabell 4.2: Konsentrasjonen av maltose, glukose, melkesyre og eddiksyre i de private surdeigene analysert i aktiv surdeig.

Surdeig	Maltose (ppm)	Glukose (ppm)	Melkesyre (ppm)	Eddiksyre (ppm)
P1	2082	n.d.	11698	n.d.
P2	n.d.	n.d.	5515	740,0
P3	2503	n.d.	5530	1838
P4	10441	n.d.	2850	160,0
P5	992,4	n.d.	7521	2849
P6	2016	n.d.	8618	1227
P7	2029	n.d.	7747	1343
P8	113,1	n.d.	3034	n.d.
P9	2849	n.d.	2750	291,1

P10	75,3	n.d.	4295	246,5
P11	3017	n.d.	4998	281,8
P12	604,2	n.d.	2861	1544
P13	764,3	n.d.	4609	804,1
P14	55,4	n.d.	4589	n.d.
P15	1565	n.d.	6867	1653
P16	227,5	n.d.	4830	824,1
P17	3806	411,2	5749	1622
P18	n.d.	955,1	8849	1597
P19	n.d.	n.d.	5515	740,0
P20	3412	8610	7612	599,0
P21	5545	2593	2852	780,3

pH i de kommersielle og private surdeigene vises i figur 4.2. Alle de kommersielle surdeigene lå under pH 4 og varierte fra pH 3,94 i surdeig K9 til 3,4 i surdeig K5. Det var større spredning mellom de private surdeigene som varierte fra 3,75 i P7 til 4,6 i P9. Rundt halvparten av de private surdeigene lå under 4 i pH, surdeig P6, P19, P3, P5, P11, P12, P8, P21 og P9 lå over.



Figur 4.2: pH i de kommersielle og private surdeigene målt i aktiv surdeig.

4.2.2 Mikrobiologiske analyser

Celletall i de kommersielle og private surdeigene ble analysert på fem ulike vekstmedier og er presentert henholdsvis i tabell 4.2 og 4.3. LBS- og MRS-agar benyttet til å bestemme celletall av henholdsvis presumptivt *Lactobacillus* spp. og melkesyrebakterier. PCA ble brukt for å bestemme mesofilt aerobt totalantall i surdeigene. YM- og RB-agar ble benyttet for å bestemme antall gjær og mugg til stede i prøvene.

Surdeig K2 hadde laveste celletallene på LBS og PCA med henholdsvis 7,79 og 6,80 log KDE/g. Surdeig K7 hadde lavest celletall på MRS, med 7 log KDE/g. K4 hadde de høyeste celletallene på LBS, MRS og PCA med henholdsvis 9,84, 9,82 og 9,72 log KDE/g.

Celletallene på YM-agar varierte mellom 5,91 (K9) og 8,24 (K3) log KDE/g. På RB-agar var høyeste celletall 7,54 log KDE/g (K1) og laveste 6,1 log KDE/g (K5 og K9).

Tabell 4.3: Celletall (log KDE/g) i de kommersielle surdeigene analysert i aktiv surdeig ved mottak. LBS-agar ble benyttet for å anslå antall presumptivt *Lactobacillus* spp., MRS-agar for melkesyrebakterier, PCA-agar til å anslå totalantall, mesofile aerobe bakterier og YM- og RB-agar for å anslå antall gjær.

Celletall (log KDE/g)					
Surdeig	LBS	MRS	PCA	YM	RB
K1	7,88	7,54	7,36	7,48	7,54
K2	7,79	7,42	6,80	6,94	6,89
K3	8,67	8,08	8,00	8,24	7,40
K4	9,84	9,82	9,72	6,99	6,98
K5	9,26	9,27	9,35	6,00	6,07
K6	9,51	9,56	9,56	6,48	6,46
K7	8,86	7,00	7,15	7,04	7,09
K8	8,29	7,01	7,11	7,04	7,10
K9	8,42	7,24	7,29	5,91	6,06
K10	9,07	8,83	8,78	7,76	7,53

Celletallet i de private surdeigene varierte mye på alle mediene. På PCA, MRS- og LBS-agar varierte celletallene henholdsvis fra <6 (P7) til 9,55 (P5), fra 7,25 (P15) til 9,46 (P5), og fra <6 (P7) til 9,52 (P5) log KDE/g. Celletallene på YM- og RB-agar var henholdsvis 5,13 (P4) – 8,4 (P3) og 5,12 (P4) og 8,11 (P10) log KDE/g.

Tabell 4.4: Celletall (log KDE/g) i de private surdeigene analysert i aktiv surdeig ved mottak. LBS-agar ble benyttet for å anslå antall presumptivt *Lactobacillus* spp., MRS-agar for melkesyrebakterier, PCA-agar til å anslå totalantall, mesofile aerobe bakterier og YM- og RB-agar for å anslå antall gjær.

Celletall (log KDE/g)					
Surdeig	LBS	MRS	PCA	YM	RB
P1	8,50	8,53	7,29	7,10	7,25
P2	8,88	8,92	8,95	7,87	7,94
P3	9,25	9,25	9,09	8,40	7,15
P4	8,65	8,71	8,78	5,13	5,12
P5	9,52	9,46	9,55	6,99	6,96
P6	8,67	8,70	8,59	8,25	7,55
P7	<6	7,71	<6	5,57	7,54
P8	8,64	8,55	8,66	7,48	7,26
P9	7,96	7,83	7,87	5,83	5,94
P10	8,79	8,65	8,73	7,85	8,11
P11	9,12	9,05	9,07	5,81	7,56
P12	8,66	8,65	8,61	7,45	7,40
P13	9,46	9,36	8,76	7,62	7,58
P14	9,08	9,02	7,99	7,78	7,78
P15	8,98	7,25	7,53	7,31	7,25
P16	9,04	9,10	9,01	7,24	7,15
P17	9,29	9,29	8,57	7,16	7,11
P18	9,51	8,99	8,75	7,04	6,74
P19	9,05	9,06	9,03	8,08	8,04
P20	9,05	9,06	9,02	5,29	5,66
P21	8,81	8,81	8,77	6,62	6,69

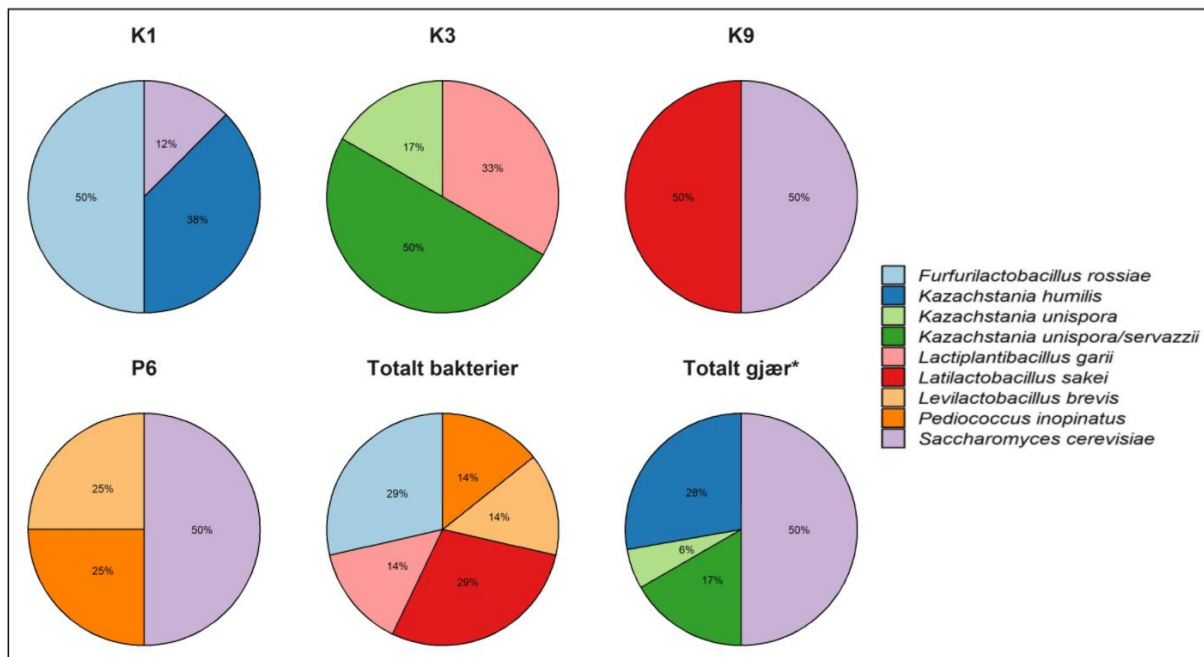
4.3 Genotypisk identifisering av renkulturer ved Sanger sekvensering

Det ble valgt ut 38 rendyrkede isolater til Sanger sekvensering isolert fra fem surdeiger, hvorav fire kommersielle og en privat. Av disse ble 32 (14 bakterieisolater og 18 gjærisolater) isolater vellykket identifisert på artsnivå ved hjelp av søkeverktøyet BLAST®. Fra surdeig K1, K9 og P6 ble det identifisert 8 isolater fra hver, og fra K3 og K2 ble det identifisert henholdsvis 6 og 2 isolater. Fordelingen av gjær og bakterier med antatt identitet er vist i figur 4.3. De to isolatene fra surdeig K2 ble identifisert som *Kazachstania humilis* og er ikke presentert som eget sektordiagram i Figur 4.3, men vises som en del av totalt gjær i figuren.

Fra bakterieisolatene ble det identifisert fem ulike arter med MSB (*Furfurilactobacillus rossiae*, *Lactiplantibacillus garii*, *Latilactobacillus sakei*, *Levilactobacillus brevis* og

Pediococcus inopinatus). I surdeig K1 og K9 ble bakterieisolatene bestemt til henholdsvis *F. rossiae* og *L. sakei* med fire isolater av hver. I K3 ble begge bakterieisolatene bestemt til *L. garii*. Bakteriene som ble identifisert i prøve P6 var *P. inopinatus* og *Llb. brevis* med to isolater av hver. Totalt utgjorde *F. rossiae* og *L. sakei* størst andel av bakterieisolatene med 29 % (4 isolater) hver. *Lactiplantibacillus garii*, *P. inopinatus* og *Llb. brevis* utgjorde minst andel med 14 % (2 isolater) hver.

Fra gjærisolatene ble det identifisert to ulike gjærsllekter (*Kazachstania* og *Saccharomyces*). I surdeig K9 og P6 ble fire gjærisolater fra hver identifisert som *Saccharomyces cerevisiae*. Gjærisolatene fra K1 ble identifisert som *K. humilis* (tre isolater) og *Saccharomyces cerevisiae* (et isolat). I K3 ble et isolat identifisert som *Kazachstania unispora* og tre som *Kazachstania unispora/servazzii*. Totalt utgjorde *S. cerevisiae* den største andelen av gjærisolatene med 50 % (ni isolater). *Kazachstania humilis* utgjorde 28 % (fem isolater). Den minste andelen av gjærisolatene kom fra *K. unispora/servazzii* og *K. unispora* med henholdsvis 17 % (tre isolater) og 6 % (et isolat).



Figur 4.3: Oversikt over 14 bakterieisolater og 18 gjærisolater identifisert ved hjelp av sanger sekvensering og BLAST®. K1, K9 og P6 viser 4 bakterieisolater og 4 gjærisolater hver. K3 viser 4 gjærisolater og 2 bakterieisolater. Totalt bakterier og totalt gjær viser fordelingen alle bakterie- og gjærisolatene. *To gjærisolater (*K. humilis*) av 18 kommer fra surdeig K2 og er en del av total gjær.

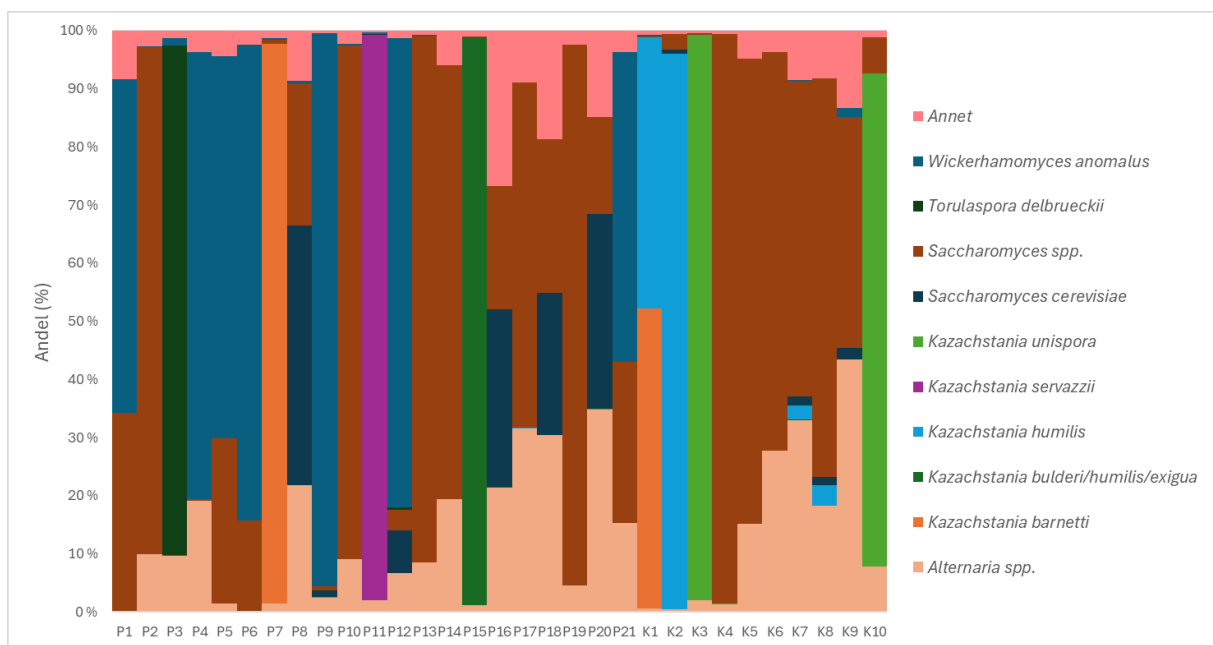
4.4 Mikrobiota analyse ved Illumina sekvensering

For å identifisere bakterier og sopp som var til stede i surdeigene ble det benyttet Illumina sekvensering av 16S-rRNA og ITS-regionen. Det ble tatt uttak av alle surdeigene samtidig som mikrobiologiske og metabolismeanalyser ble foretatt, det vil si av aktiv surdeig ved mottak. BLAST® ble brukt for å bestemme identiteten til sekvensene som ble funnet. Sekvensvarianter som fikk treff på samme art med kun små forskjeller i sekvensen ble slått sammen.

4.4.1 Identifisering av soppfunn i surdeigene

Det ble identifisert fem ulike slekter av sopp i surdeigene. Relativ fordeling av sopp i surdeigene er vist i Figur 4.4. Gjær utgjorde 81,8 % av soppforekomsten og mugg (*Alternaria* spp.) stod for 12,9 %. Det ble funnet flere ulike arter av *Saccharomyces* og *Alternaria* som ikke var mulig å differensiere med tilgjengelige sekvenser, disse ligger under *Saccharomyces* spp. (*S. cerevisiae/paradoxus/bayanus/boulardii/uvarum*) og *Alternaria* spp. (*A. dactylidicola/infectoria/ethzedia/caespitosa/poaceicola*).

Saccharomyces spp. hadde høyest forekomst og utgjorde 35,8 % av soppforekomsten i alle surdeigene, og utgjorde den største andelen i 11 surdeiger. *Saccharomyces cerevisiae* var den arten som på det meste utgjorde 44,6 % i P8 og rundt 30 % i P16, P18 og P20. *Kazachstania* var slekten med nest høyest forekomst med 21,7 % og var dominerende (>50 %) i mange av surdeigene den ble funnet i. I surdeig K3 og K10 utgjorde *K. unispora* henholdsvis 97,2 % og 84,7 %. *Kazachstania barnetti*, *K. servazzii*, *K. bulderi/humilis/exigua* og *K. humilis* utgjorde henholdsvis 96,2 % i P7, 97,2 % i P11, 97,6 % i P15 og 95,5 % i K2. I surdeig K1 utgjorde *K. barnetti* og *K. humilis* til sammen 98,1 %. *Wickerhamomyces anomalus* utgjorde 16,6 % av soppforekomsten i surdeigene og var den dominerende soppen i sju surdeiger (P1, P4, P5, P6, P9, P12 og P21). *Alternaria* spp. ble funnet i de fleste av surdeigene, men i de fleste prøvene utgjorde den små andeler (på det meste 43,3 % i K9). Surdeig P3 var den eneste surdeigen med høy til stedevarsel av *Torulaspora delbrueckii* (87,6 %).



Figur 4.4: Relativ fordeling av sopp ved ITS rRNA sekvensering. av 21 private surdeiger (P1-P21) og 10 kommersielle surdeiger (K1-K10). Prøver til sekvensering ble tatt av aktiv surdeig (ca. 12 timer etter mating).

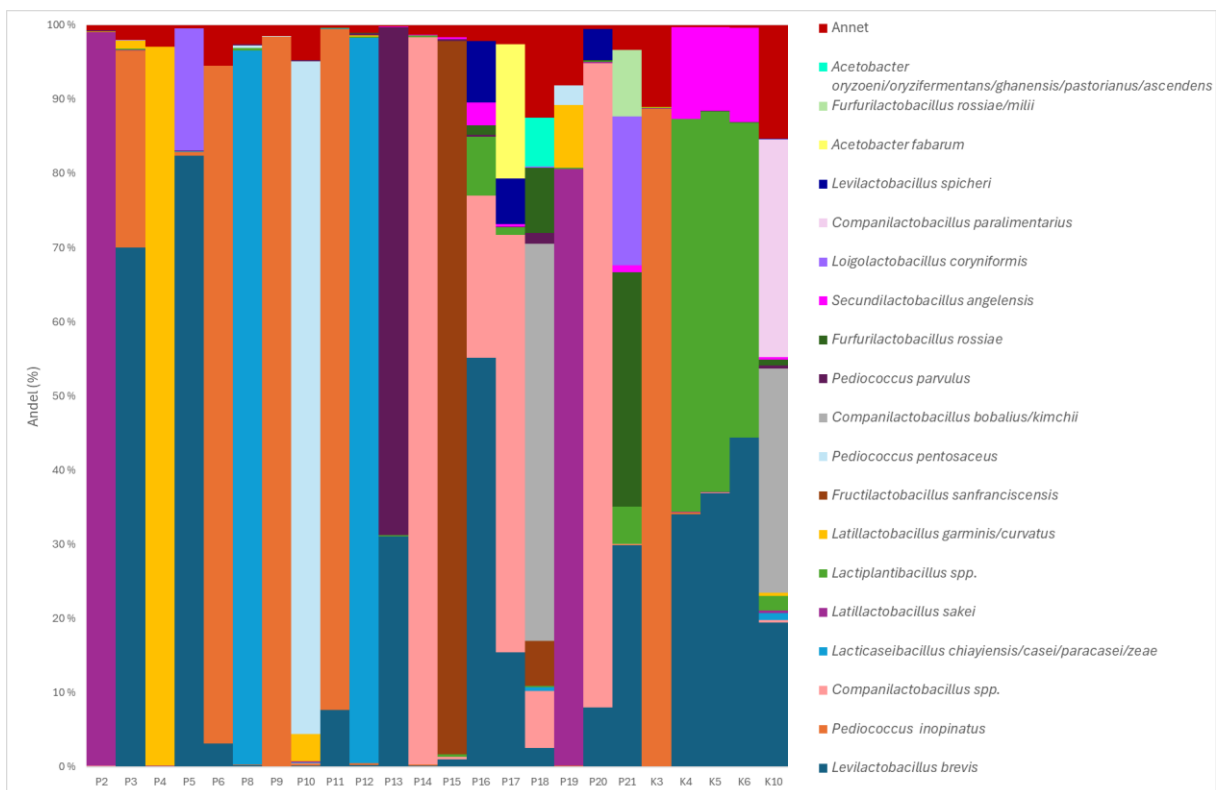
4.4.2 Identifisering av bakteriesamfunn i surdeigene

Illumina sekvenseringen ga ikke tilstrekkelig med sekvenser for surdeigsprøve P1, P7, K1, K2, K7, K8 og K9, disse vises derfor ikke i figur 4.5. Sekvenseringsdataene viste at det var store forskjeller mellom de ulike surdeigene. Det ble identifisert 10 ulike slekter av melkesyrebakterier og en slekt med eddiksyrebakterier i surdeigene. Melkesyrebakteriene utgjorde 95,6 % av bakteriene og eddiksyrebakterier utgjorde 1 %, med tilstedeværelse i kun to surdeiger (P17 og P18). Det ble funnet flere ulike arter av *Lactiplantibacillus* og *Companilactobacillus* som ikke var mulig å differensiere med tilgjengelige sekvenser, disse ligger under *Lactiplantibacillus* spp. (*L. pingfangensis/plantarum/fabifermentans/pentosus/paraplantarum*) og *Companilactobacillus* spp. (*C. musae/pabuli/nuruki/huachuanensis/formosensis/farciminis/heilongjiangensis*).

Levilactobacillus brevis ble funnet i alle surdeigene og utgjorde 18,4 % av bakteriene. I de fleste prøvene hvor *Llb. brevis* var til stede var den ikke dominant. *Pediococcus inopinatus* utgjorde nest størst andel av bakteriene i surdeigsprøvene med 17,2 %. Arten *P. inopinatus* ble funnet i færre surdeiger enn *Llb. brevis*, men var den dominerende bakterien i flere av prøvene hvor den ble funnet, den utgjorde 91,4 %, 98,3 %, 91,8 % og 88,6 % i henholdsvis P6, P9, P11 og K3. *Lacticaseibacillus chiayiensis/casei/paracasei/zeae* utgjorde kun små eller ingen andel i de fleste surdeigene utenom P8 og P12, hvor den stod for henholdsvis 92,2 % og 98 %. *Latilactobacillus garminis/curvatus*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Pediococcus parvulus* og *Pediococcus pentosaceus* var den dominerende bakterien i en surdeig hver, men

hadde liten til stedevarrelse ellers, de utgjorde henholdsvis 96,9 % i P4, 96,1 % i P15, 68,5 % i P13 og 90,7 % i P10.

Companilactobacillus spp. var den dominerende bakterien i tre surdeiger. Den utgjorde 98 % i P14, 56 % i P17 og 86,8 % i P20. *Latilactobacillus sakei* utgjorde den største andelen av bakteriene i surdeig P2 med 99 % og i P19 80,4 %. I surdeig K4, K5 og K6 utgjorde *Lactiplantibacillus* spp. rundt halvparten, *Llb. brevis* mellom 34-45 % og *S. angelensis* mellom 11,3-12,7 % av bakteriene identifisert. Ut over dette utgjorde *Lactiplantibacillus* og *S. angelensis* små andeler i de andre surdeigene. P18 og K10 var de eneste surdeigene hvor *Companilactobacillus bobalius/kimchii* ble funnet, og i P18 var det den dominerende bakterien (53,6 %). *Companilactobacillus paralimentarius* ble kun funnet i surdeig K10 (30,2 %). Surdeigene P17 og P18 var alene om å inneholde eddiksyrebakterier hvor de utgjorde henholdsvis 18,1 % (*Acetobacter fabarum*) og 6,6 % (*Acetobacter oryzoeni/oryzifermentans/ghanensis/pastorianus/ascendens*). *Loigolactobacillus coryniformis*, *Furfurilactobacillus rossiae/milli* og *Levilactobacillus spicheri* ble funnet i flere surdeiger, men utgjorde små andeler (<20,1 %).

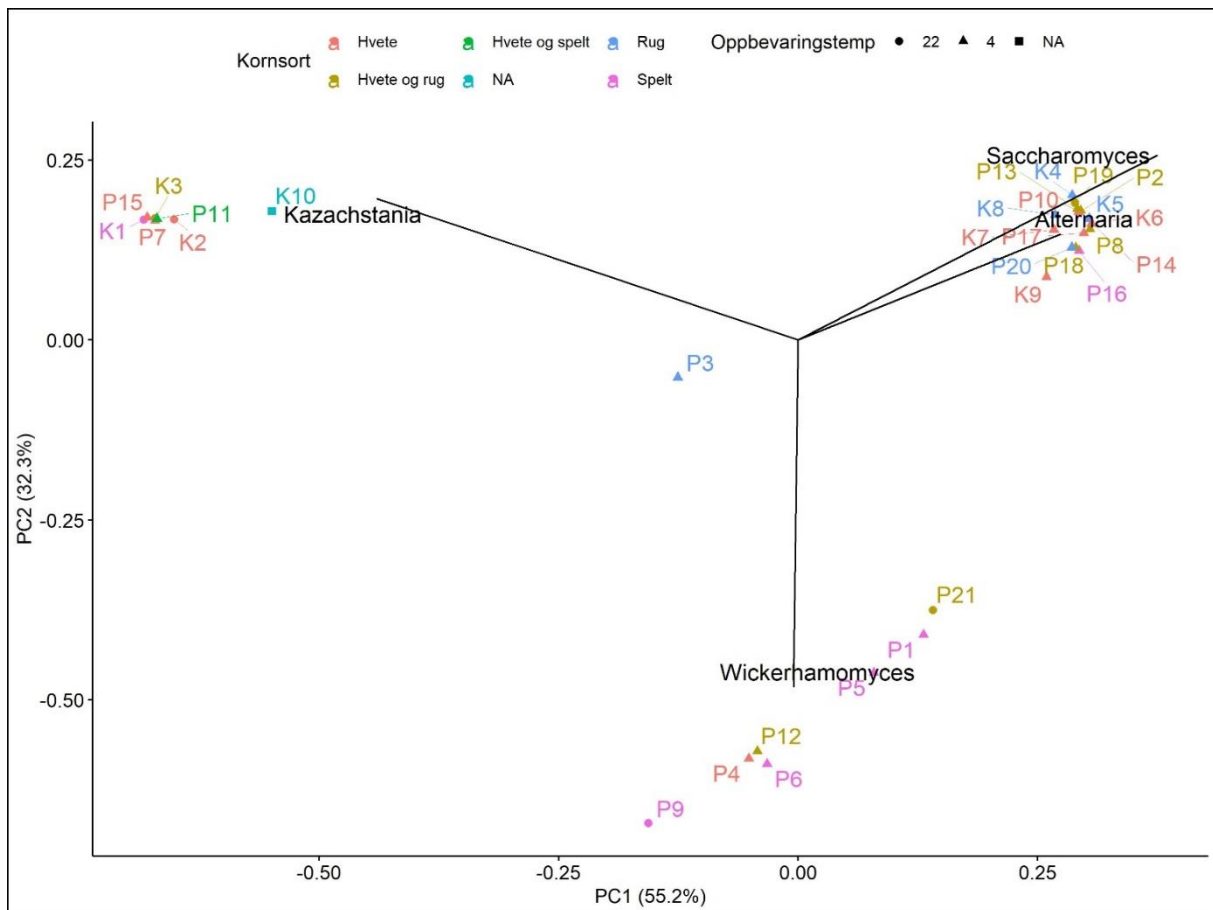


Figur 4.5: Relativ fordeling av bakterier i surdeigene basert på 16S rRNA sekvensering av 19 private surdeiger (P2-P6, P8-P21) og 5 kommersielle surdeiger (K3-K6, K10). Prøver til sekvensering ble tatt av aktiv surdeig (ca. 12 timer etter mating).

4.4.3 Principal Coordinates Analysis

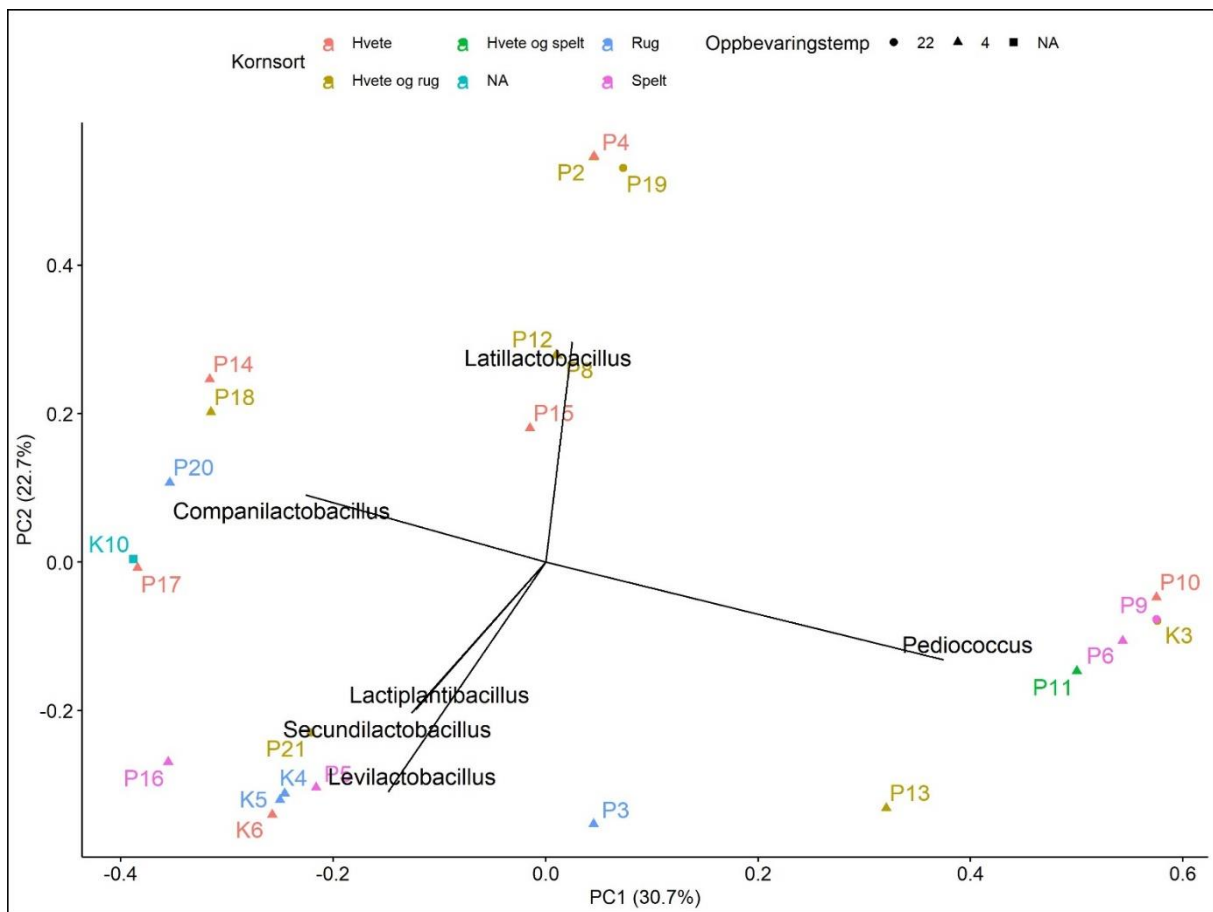
For å se på likheter mellom surdeigene med hensyn til bakterie- og soppselektene som ble funnet, ble det gjort en «Principal Coordinates Analysis» (PCoA) basert på Bray-Curtis avstander. Principal komponent 1 (PC1) forklarer 55,2 % av variansen og PC2 forklarer 32,3 % av variasjonen i datasettet for soppselektene. Når det gjelder bakterieslektene så forklarer PC1 30,7 % av variansen og PC2 22,7 % av variansen i datasettet. Figur 4.6 viser et PCoA-plot basert på avstander mellom soppselekter og Figur 4.7 viser et PCoA-plot basert på bakterieslekter. Hva slags mel surdeigene var basert på og oppbevaringstemperatur mellom matinger vises i figurene.

I PCoA-plottet for sopp er det tre klare grupperinger med surdeigsprøver rundt de ulike soppselektene. Surdeig K1, K2, K3, K10, P7, P11 og P15 danner en gruppe rundt *Kazachstania*. Ved *Wickerhamomyces* ligger det en gruppe med private surdeiger som inneholder P1, P4, P5, P6, P9, P12 og P21. Denne gruppen har litt spredning, hvor noen av surdeigene ligger litt nærmere *Saccharomyces* og *Alternaria* (P1, P5 og P21). Prøve P3 ligger alene i midten av alle gruppene. Resten av prøvene ligger i en tett gruppe rundt *Saccharomyces* og *Alternaria*. Ingen av surdeigene som kun inneholdt rug ligger ved *Kazachstania* eller *Wickerhamomyces*.



Figur 4.6: Principal Coordinates Analysis (PCoA-plot) basert på Bray-Curtis avstander for soppselektene i prøvene. Fargen på punktene representerer hva slags mel surdeigen ble basert på og formen på punktene viser oppbevaringstemperatur mellom matinger.

Det er mindre klare grupperinger i PCoA-plottet for bakteriene. Bakterieselektene som vises på plottet er valgt ut med en p-verdi på $< 0,05$ i R, så det er ikke mulig å se alle slektene som påvirker punktene. Det er en gruppering med P6, P9, P10, P11 og K3 som ligger til høyre for *Pediococcus*, og P13 ligger under. I toppen av plottet ligger det en gruppering med P2, P4 og P19 i retning av *Latilactobacillus*. Ved *Latilactobacillus* ligger de tre surdeigene P8, P12 og P15. Det er en gruppe som ligger til venstre i plottet ved *Companilactobacillus* (P14, P17, P18, P20 og K10). Nede til venstre i plottet og til venstre for *Lactiplantibacillus*, *Secundilactobacillus* og *Levilactobacillus* ligger det en gruppe med P5, P16, P21, K4, K5 og K6. Surdeig P3 ligger mellom *Pediococcus* og gruppen med *Lactiplantibacillus*, *Secundilactobacillus* og *Levilactobacillus*, men ligger nærmere sistnevnte gruppe. Tre av surdeigene som inneholdt spelt ligger ved *Pediococcus*.



Figur 4.7: "Principal Coordinates Analysis" (PCoA-plot) basert på Bray-Curtis avstander for bakterieslektene i prøvene. Fargen på punktene representerer hva slags mel surdeigen ble basert på og formen på punktene viser oppbevaringstemperatur mellom matinger.

4.5 Vekst- og metabolismestudier av fire utvalgte surdeiger

Stabiliteten til fire utvalgte surdeiger, samt deres vekst og metabolisme ble undersøkt hver uke gjennom en tre ukers periode. Det ble analysert for celletall, pH, karbohydrater og organiske syrer. Analysene ble gjort rett etter poding (T0) og etter 24 timer inkubering (T24). Det ble gjort tre gjentak med en ukes mellomrom.

Celletall i surdeigene ved T0 og T24 er vist i tabell 4.5. Det var høyere celletall på MRS-agar enn på RB-agar for alle prøver ved både T0 og T24. Ved T0 var det mellom $8,3 \pm 0,11$ og $8,8 \pm 0,04$ log KDE/g på MRS-agar og mellom $6,9 \pm 0,2$ og $7,11 \pm 0,14$ på RB-agar. Ved T24 hadde MRS-agar $9,17 \pm 0,08$ til $9,57 \pm 0,1$ log KDE/g og RB-agar hadde $7,1 \pm 0,03$ til $8,31 \pm$

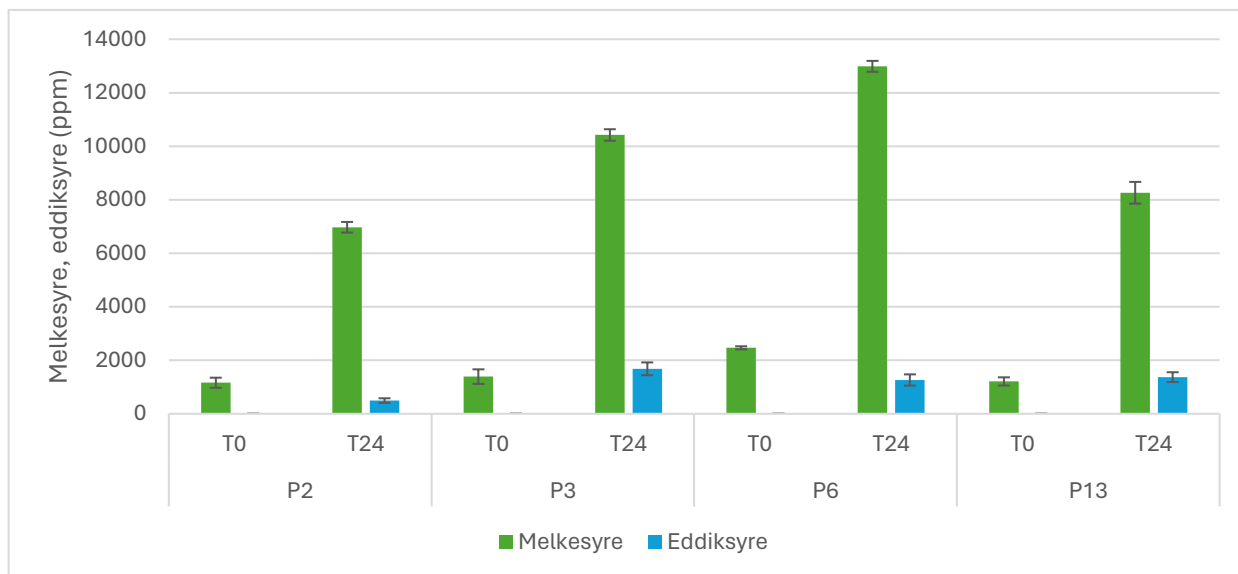
0,08 log KDE/g. Alle prøvene hadde en økning i celletall fra T0 til T24. For MRS-agar var det P3 som hadde den største økningen hvor celletallet økte fra $8,3 \pm 0,11$ til $9,57 \pm 0,10$ log KDE/g, det vil si en økning på 1,27 log KDE/g fra T0 til T24, etterfulgt av P2, P13 og P6 med henholdsvis 0,83, 0,72 og 0,46 log KDE/g økning. På RB-agar var det surdeig P2 som hadde størst økning fra $7 \pm 0,2$ til $8,26 \pm 0,05$ log KDE/g som vil si en økning på 1,26 log KDE/g i løpet av 24 timer, etterfulgt av P3, P13 og P6 med henholdsvis 1,2, 0,88 og 0,13 log KDE/g økning.

Tabell 4.5: Gjennomsnittlig celletall (log KDE/g) med standardavvik i surdeigene fra tre uttak ved T0 og T24. MRS-agar ble benyttet for å selekere melkesyrebakterier og RB-agar for å selekere gjær.

Celletall (log KDE/g)				
Prøve	MRS		RB	
	T0	T24	T0	T24
P2	$8,34 \pm 0,12$	$9,17 \pm 0,08$	$7,00 \pm 0,20$	$8,26 \pm 0,05$
P3	$8,30 \pm 0,11$	$9,57 \pm 0,10$	$7,11 \pm 0,14$	$8,31 \pm 0,08$
P6	$8,80 \pm 0,04$	$9,26 \pm 0,16$	$6,97 \pm 0,01$	$7,10 \pm 0,03$
P13	$8,61 \pm 0,15$	$9,33 \pm 0,05$	$6,90 \pm 0,20$	$7,78 \pm 0,04$

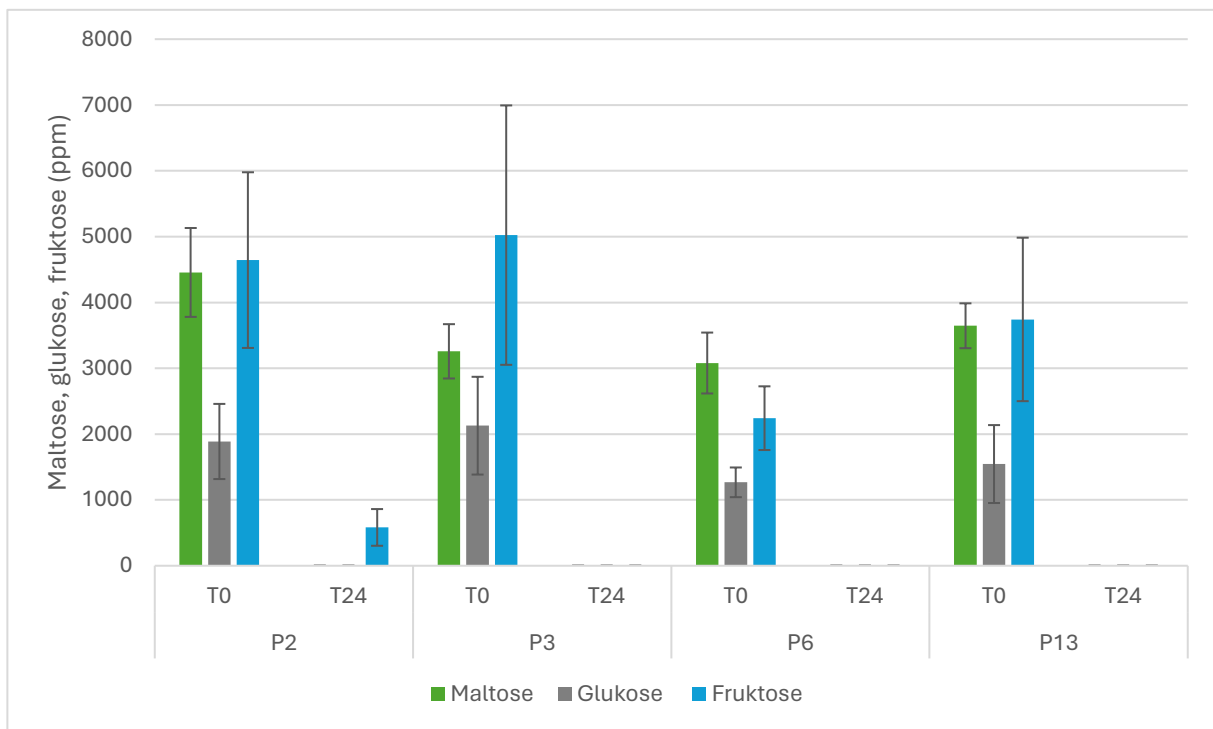
Konsentrasjonen av melkesyre og eddiksyre hos surdeigene ved T0 og T24 er vist i Figur 4.8. Alle surdeigene hadde en økning av melkesyre og eddiksyre etter 24 timer fermentering. Den høyeste melkesyreproduksjonen ble observert hos prøve P6 og P3 på henholdsvis 10521 og 9032 ppm fra T0 til T24. Surdeigene P13 og P2 hadde noe lavere produksjon av melkesyre med henholdsvis 7053 og 5812 ppm. Surdeigene P6, P3, P13 og P2 hadde henholdsvis $12\,986 \pm 205$, $10\,421 \pm 214$, 8262 ± 405 og 6971 ± 200 ppm melkesyre ved T24.

Ingen av prøvene hadde målbar eddiksyrekonsentrasjon ved T0. Surdeig P3 hadde den høyeste eddiksyrekonsentrasjonen ved T24 med 1681 ± 239 ppm. Surdeigene P13 og P6 hadde noe lavere eddiksyreproduksjon med henholdsvis 1369 ± 184 og 1263 ± 210 ppm eddiksyre ved T24. Derimot den laveste eddiksyrekonsentrasjonen ved T24 med 493 ± 86 ppm ble målt i surdeig P2.



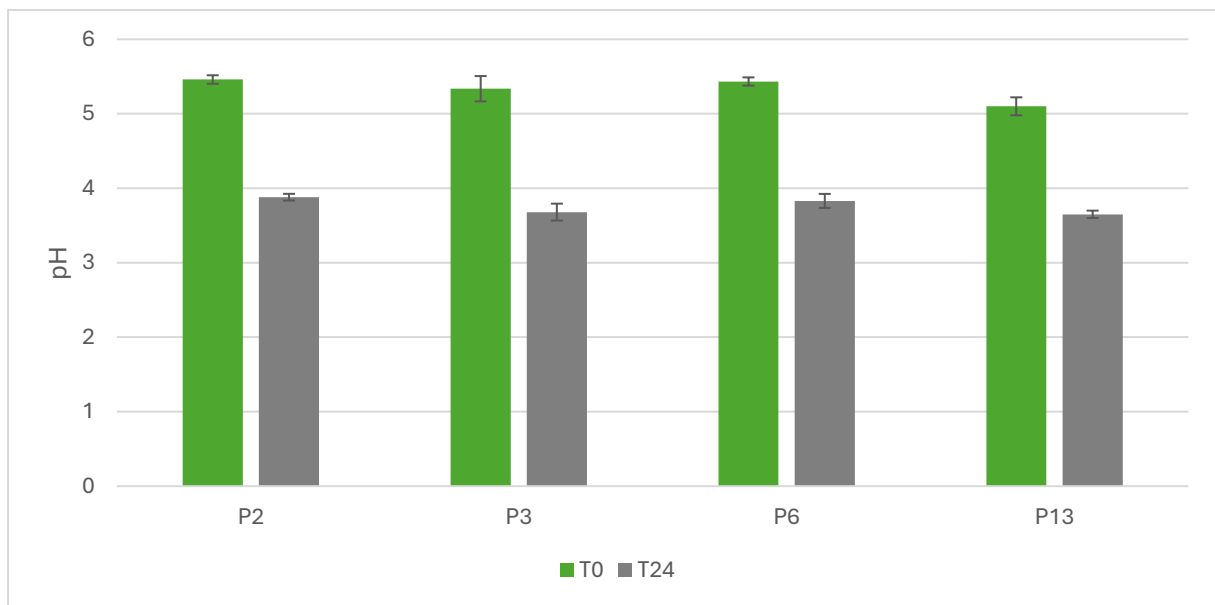
Figur 4.8: Gjennomsnittlig melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjon i surdeigene fra tre uttak ved T0 og T24. Vertikale linjer angir standardavvik.

Konsentrasjonen av maltose, glukose og fruktose ved T0 og T24 er vist i figur 4.9. Alle surdeigene hadde fullstendig omsatt i de analyserte karbohydratene ved T24, utenom for fruktose i prøve P2 hvor det var igjen 582 ± 278 ppm. For prøvene hvor karbohydratene var fullstendig omsatt, vil ikke omsetning være påvirket av startkonsentrasjonen av karbohydratene. Surdeig P6 hadde den laveste konsentrasjonen av maltose, glukose og fruktose ved T0 med henholdsvis 3080 ± 462 , 1267 ± 225 og 2242 ± 484 ppm. Surdeig P2 hadde den høyeste konsentrasjonen av maltose ved T0 med 4456 ± 675 ppm, etterfulgt av P13 og P3 som hadde henholdsvis 3646 ± 340 og 3258 ± 412 ppm. Den høyeste startkonsentrasjonen av glukose og fruktose ble observert i prøve P3 med henholdsvis 2128 ± 743 og 5023 ± 1970 ppm. Surdeig P2 og P13 har noe lavere konsentrasjon av fruktose med henholdsvis 4643 ± 1334 og 3742 ± 1242 ppm fruktose, og 1888 ± 571 og 1545 ± 592 ppm glukose.



Figur 4.9: Gjennomsnittlig konsentrasjon av maltose, glukose og fruktose i surdeigene fra tre uttak ved T0 og T24. Vertikale linjer angir standardavvik.

Det ble gjort pH-målinger ved T0 og T24 for de fire surdeigene og resultatene er presentert i figur 4.10. Alle surdeigene hadde en nedgang i pH fra T0 til T24. Surdeigene P2, P3 og P6 hadde tilnærmet lik pH reduksjon i løpet av fermenteringstiden med en pH nedgang på 1,58-1,66. Nedgangen hos prøve P13 var noe lavere med 1,45. Det var lite variasjoner i pH ved T0 for prøve P6, P3 og P2, som hadde henholdsvis en pH-verdi på $5,43 \pm 0,06$, $5,34 \pm 0,17$ og $5,46 \pm 0,06$. Surdeig P13 hadde en noe lavere start-pH med $5,1 \pm 0,12$ ved T0. pH ved T24 var tilnærmet lik for surdeigene, alle lå under pH 4 og de lå mellom 3,65 til 3,88.



Figur 4.10: Gjennomsnittlig pH i surdeigene fra tre uttak ved T0 og T24. Vertikale linjer angir standardavvik.

5. Diskusjon

5.1 Mikrobiologiske analyser og metabolismestudier av 31 surdeiger

Celletall, pH, og innhold av organiske syrer og karbohydrater ble analysert i alle 31 surdeigene. Konsentrasjonen av karbohydrater og organiske syrer varierte mye i de ulike surdeigene. En trend som ble observert var at glukose var brukt opp i flere surdeiger enn maltose. Det kan derfor se ut som at mange av surdeigene foretrekker glukose som energikilde. Siden det kun ble gjort analyser etter 12 timer er det vanskelig å si hvordan startkonsentrasjonen av karbohydrater har påvirket disse resultatene.

Surdeig K4, K5 og K6 skiller seg en del fra de andre kommersielle surdeigene. Disse surdeigene hadde høy melkesyrekonsentrasjon og eddiksyrekonsentrasjon med henholdsvis 12534-32511 ppm og 1260-5156 ppm, hvor K4 hadde den høyeste konsentrasjonen av både melkesyre- og eddiksyre. Grunnen til dette kan være at disse surdeigene kun har blitt matet en gang da de ble laget, slik at konsentrasjonen av organiske syrer har bygget seg opp over tid. Surdeig K4 og K6 hadde også svært høye verdier av henholdsvis glukose og maltose, mens K5 viste omtrent fullstendig omsetning av de nevnte karbohydratene. Det ble funnet samme gjær (*Saccharomyces* spp.) og melkesyrebakterier (*Llb. brevis*, *Lactiplantibacillus* spp. og *S. angelensis*) i surdeigene, så det ville vært naturlig å tenke at de metaboliserte de samme karbohydratene. En forskjell mellom surdeigene var at K4 og K5 ble laget på rug og K6 ble laget på hvete, noe som kan ha påvirket innholdet av de ulike karbohydratene.

Surdeig K9 var den kommersielle surdeigen som produserte minst eddiksyre og melkesyre med henholdsvis 454 og 4223 ppm. Det lave eddiksyreinnholdet kan mulig forklare av at den eneste identifiserte bakterien i surdeigen er en homofermentativ MSB (*L. sakei* fra sanger sekvensering), men ikke den lave melkesyreproduksjonen. Det ble også observert betydelige mengder maltose og glukose (hhv. 8792 og 1936 ppm). Dette kan tyde på at det lave nivået av organiske syrer kommer av at surdeigen ikke var ferdig å metabolisere karbohydratene på tidspunktet den ble undersøkt. pH i surdeigen var imidlertid lav (3,94), det kan derfor også hende at den metabolske aktiviteten har blitt hemmet som følge av dette. Surdeig K10 hadde det nest laveste innholdet av melkesyre blant de kommersielle surdeigene med 5172 ppm,

men hadde det fjerde høyeste innholdet av eddiksyre med 1596 ppm. Dette kan skyldes at surdeig K10 inneholder 19,5 % *Llb. brevis* som er heterofermentativ. Sammenlignet med surdeig K10 hadde K3 lavere eddiksyreinnhold og høyere melkesyreinnhold, noe som mulig kan forklares av at det tilnærmet kun ble funnet *P. inopinatus* (homofermentativ) i K3 ved Illumina sekvensering. Det kan imidlertid ut som at flere faktorer enn om hvorvidt prøven inneholder en heterofermentativ eller homofermentativ bakterie styrer produksjonen av organiske syrer. I surdeig K1 ble alle isolatene fra Sangersekvenseringen identifisert som *F. rossiae* (heterofermentativ), men prøven hadde både høyere melkesyrekonsentrasjon og eddiksyrekonsentrasjon enn K3. I dette tilfellet kan forskjellen skyldes lavere metabolsk aktivitet i surdeig K3.

Det er mulig å finne enkelte trender i de private surdeigene med tanke på produksjon av organiske syrer og forbruk av karbohydrater. Det kan være vanskelig å si noe sikkert om disse prøvene siden de fleste har blitt oppbevart mye i kjøleskap, noe som kan føre til at de har ulik metabolsk aktivitet. De private surdeigene med høyest eddiksyrekonsentrasjon var P3, P5 og P15 med 1653-2849 ppm. Dette kan forklares av at dette også var de tre surdeigene hvor det ble funnet høyest andel heterofermentative bakterier, med 70 % og 82,4 % *Llb. brevis* (hhv. P3 og P5), og 96,1 % *F. sanfranciscensis*. Det kan se ut som at i flere tilfeller har surdeigene med høy andel homofermentative har lav eddiksyre. Dette gjelder spesielt surdeig P4, P8, P9, P10 og P11 som inneholdt mellom ingen detekterbar eddiksyre (P8) og 291 ppm (P9) eddiksyre. Disse surdeigene inneholdt mellom 94,4 % og 98,3 % homofermentative MSB. Konsentrasjonen av både melkesyre og eddiksyre er imidlertid lav i surdeig P4 (hhv. 2850 og 160 ppm) og P9 (hhv. 2750 og 291 ppm) i forhold til de fleste andre surdeigene, noe som kan tyde på at den metabolske aktiviteten er lavere i disse surdeigene.

I en studie gjort av Comasio et al. (2020) på blant annet melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjon i 17 ulike surdeiger, var melkesyrekonsentrasjonen mellom 2479 og 10843 ppm, og eddiksyrekonsentrasjonen mellom 728 og 3426 ppm. Det kan derfor se ut som at flesteparten av surdeigene som ble undersøkt i dette masterstudiet ligger rundt hva som kan forventes i forhold til melkesyrekonsentrasjon, men en del av surdeigene ligger lavere enn forventet i forhold til eddiksyrekonsentrasjon.

En surdeig ligger vanligvis på rundt 4 i pH etter fermentering (De Vuyst et al., 2009), dette stemmer i stor grad med pH-verdiene målt i de undersøkte surdeigene, som hadde pH $4 \pm 0,6$. Surdeigene varierte en del i pH, noe som kunne forventes med tanke variasjonen i melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjon. Surdeigene med lav pH hadde i flere tilfeller høy konsentrasjon av

melkesyre og eddiksyre, men det er en del unntak. Surdeig K4 hadde 3,83 i pH og klart høyest innhold av melkesyre og eddiksyre (hhv. 32511 og 5156 ppm), likevel hadde for eksempel P4 tilnærmet lik pH (3,84), selv med mye lavere konsentrasjon av melkesyre og eddiksyre (hhv. 2850 og 160 ppm). Et annet eksempel er surdeig P1 (pH 3,93) som hadde 12534 ppm med melkesyre og ingen eddiksyre kontra P14 (pH 3,94) som hadde 4589 ppm melkesyre og ingen eddiksyre. En forklaring på at det ikke er samsvar mellom konsentrasjon av melkesyre og eddiksyre, og pH kan være at melet som ble brukt i surdeigene har ulik bufferkapasitet. Funnene til De Angelis et al. (2019) om at sammalt mel har høyere bufferkapasitet enn siktet mel, da P1 og P14 er laget på henholdsvis sammalt spelt og siktet hvete. Surdeig P8 (pH 4,32), P9 (pH 4,6) og P21 (4,43) var for eksempel mer som forventet, med lave verdier av melkesyre og eddiksyre (hhv. 2750-3034 ppm og 0-780 ppm). Dette også tydelig i surdeig K5 (pH 3,4) og K6 (pH 3,46) med 12534-13219 ppm melkesyre og 1260-2194 ppm eddiksyre.

Celletallene som ble funnet i de private og kommersielle surdeigene var i flere tilfeller som forventet, sammenlignet med funnene som ble gjort av Comasio et al. (2020), hvor det ble observert 8,7-9,7 log KDE/g med presumptivt MSB og 4,5-8,1 log KDE/g med presumptivt gjær på surdeigene de undersøkte. Det ble observert større variasjon mellom surdeigene i dette masterstudiet, hvor det var <6-9,84 og 7-9,82 log KDE/g på henholdsvis LBS- og MRS-agar. For presumptivt gjær var det mindre variasjoner mellom surdeigene sammenlignet med Comasio et al. (2020), med 5,13-8,40 og 5,12-8,11 log KDE/g på henholdsvis YM- og RB-agar. Et annet interessant funn var at celletallet i surdeigene var høyere eller tilnærmet likt på LBS-agar sammenlignet med PCA-agar og MRS-agar, med unntak av surdeig P7. Dette kan skyldes at mange av prøvene inneholder laktobasiller, som trives best på LBS-agar.

Tidligere studier har funnet at det kan være mellom 1 og 4 log KDE/g mer MSB enn gjær i en surdeig (Comasio et al., 2020; Lhomme et al., 2015). Forskjellen mellom gjær og MSB i disse studiene er noe større enn det som ble observert i dette masterstudiet. Den største og minste forskjellen som ble gjort på for eksempel LBS- og YM-agar var 3,76 log KDE/g i surdeig P20 og 0,39 log KDE/g i surdeig K1. Flesteparten av prøvene ligger likevel mellom 1 og 4 log KDE/g. Unntakene på MRS- og YM-agar er P19, P10, P3, P6, P7, K1, K2 og K3.

5.2 Soppsamfunn i surdeigene

Soppen som ble funnet i surdeigene tilhører de fem slektene *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Torulasporea* og *Alternaria*. De fire førstnevnte er noen av de vanligste gjærslæktene å finne i surdeig (De Vuyst et al., 2016; Gastrow et al., 2023; Landis et al., 2021), og utgjorde 81,8 % av soppen i de undersøkte surdeigene. Muggslækten *Alternaria* utgjorde 12,9 % av soppen i surdeigene, denne slekten er det få eller ingen studier som har identifisert. I de fleste surdeigene ble det identifisert en til to gjærslækter.

Resultatene fra Illumina sekvenseringen viste at *Saccharomyces* spp. utgjorde størst andel av soppen funnet i surdeigene. Det var ikke mulig å identifisere spesifikk art, men Sanger sekvenseringen gjort i dette studiet tyder på at det kan være *S. cerevisiae*. I surdeig P6 og K9 ble det identifisert en betydelig andel *Saccharomyces* spp. (hhv. 16 og 40 %) ved Illumina sekvensering, og alle gjærisolatene fra hver av disse prøvene ble identifisert som *S. cerevisiae* ved Sanger sekvensering. I tillegg har *S. cerevisiae* vært den mest identifiserte arten i tidligere studier som ser på mikrobiota i surdeig (Comasio et al., 2020; Landis et al., 2021). Det er ikke mulig å si noe sikkert om prøvene hvor det ikke ble gjort Sanger sekvensering med henhold til *Saccharomyces* art, men ut fra publisert litteratur kan det likevel tyde på at noen av *Saccharomyces* spp. er *S. cerevisiae*, da dette som nevnt ofte er den dominerende arten.

Kazachstania er en av de vanligste gjærslæktene å finne i surdeig og syv arter av *Kazachstania* som har blitt identifisert i surdeig (Gastrow et al., 2023). De fleste av disse artene er representert i de undersøkte surdeigene i denne oppgaven, hvor det ble funnet *K. humilis*, *K. unispora*, *K. servazzii*, *K. barnetti* og *K. bulderi/humilis/exigua*. En interessant observasjon som ble gjort var at *K. humilis* og *K. unispora* kun ble funnet i de kommersielle surdeigene. *Kazachstanina humilis* utgjorde henholdsvis 46,6 og 95,5 % i surdeigene K1 og K2, og *K. unispora* ble identifisert i K3 og K10, hvor den henholdsvis utgjorde 97,3 og 84,7 %. En forklaring på dette kan være *K. humilis* har optimumstemperatur for vekst ved 27 °C (Gänzle et al., 1998), noe som er nærmere oppbevaringstemperaturen til de kommersielle surdeigene (romtemperatur for K1 og K2) enn mange av de private. Det er imidlertid ikke bare optimumstemperatur som påvirker tilstedeværelsen av de ulike gjærartene.

Saccharomyces arter har vanligvis en optimumstemperatur på 28-33 °C (Lip et al., 2020), som er en del høyere enn *K. humilis*, men ble likevel blitt funnet i flere av surdeigene som ble oppbevart og matet ved 4 °C. Det er også mulig at gjærstammene som har blitt funnet i denne

undersøkelsen har ulik toleranse for lave temperaturer, og at dette påvirker hvilke surdeiger de ble identifisert i. Lip et al. (2020) har funnet at enkelte stammer av *S. cerevisiae* vokser best ved 12 °C. Surdeiger som oppbevares mye i kjøleskap kan mulig ha selektert for slike stammer.

Et annet påfallende funn som ble gjort i dette studiet var at *Kazachstania* hadde svært høy tilstedeværelse i mange av surdeigene den ble identifisert. Dette gjelder surdeig K1, K2, K3, P7, P11 og P15, hvor *Kazachstania* utgjorde 95,5-98,1 %. En studie gjort av Meroth et al. (2003) viste at surdeiger med *Flb. sanfranciscensis* og *K. humilis* som blir inokulert med 1 % *S. cerevisiae* ikke fører til dominans av *S. cerevisiae* etter fermentering ved 25 °C. Det kan derfor se ut som at *K. humilis* er godt tilpasset surdeig og ikke vil bli utkonkurrert hvis den først har blitt etablert. Hvis dette også gjelder de andre artene av *Kazachstania*, kan dette derfor være med på å forklare den høye forekomsten. Videre var mange av surdeigene hvor *Kazachstania* ble identifisert også eldre surdeiger mellom 5 og 7 år (K1, K2, K3, P7, P15). Noe som mulig skyldes at *Kazachstania* kan utkonkurrere andre gjærsllekter over tid.

Soppen med tredje størst forekomst i de studerte surdeigene var gjæren *W. anomalus*, noe som også var et forventet funn. *Wickerhamomyces anomalus* er en gjærart som stadig blir funnet i surdeiger, som følge av at den blant annet naturlig finnes i mel, og at den tåler svingninger i osmotisk trykk og lav pH (Daniel et al., 2011; Landis et al., 2021).

Et annet interessant funn fra Illumina sekvenseringen, er at det ikke ble funnet betydelig mengde *W. anomalus* i de kommersielle surdeigene (<1,5 %). Blant de private surdeigene var imidlertid *W. anomalus* den dominerende soppen i en tredjedel av surdeigene. En forklaring på dette kan være at surdeiger laget på et bakeri kan ha større sjanse for å bli kontaminert av *S. cerevisiae*, siden det er denne gjærarten som blir brukt i mange bakevarer. *Saccharomyces cerevisiae* til stede i bakerimiljøet kan derfor etableres i kommersielle surdeiger på et tidlig tidspunkt og utkonkurrere *W. anomalus*. En studie gjort av Vrancken et al. (2010) fant at majoriteten av isolatene fra spontant fermenterte laboratoriesurdeiger med mel som eneste ikke-sterile komponent var *W. anomalus*, men i surdeiger fra belgiske bakerier var størst andel av isolatene *S. cerevisiae*, noe som kan styrke antydningen om at *S. cerevisiae* i de kommersielle surdeigene kan komme fra miljøet.

Alternaria spp. ble funnet i de fleste surdeigene og utgjorde 12,9 % av sopp til stede i surdeigene. Dette var et noe uventet resultat siden store studier som omhandler mikrobiota i surdeig (Arora et al. (2021) og Landis et al. (2021)) ikke omtaler funn av *Alternaria*. Om

mangelen på omtale i litteraturen kommer av at *Alternaria* ikke har blitt funnet eller om fokuset ligger på gjærsopp er vanskelig å si.

Alternaria er en sopp finnes over hele verden og kan være en plantepatogen på blant annet korn, oljevekster, grønnsaker og frukt (Somma et al., 2019). Siden det er vanlig å finne *Alternaria* på korn og plantemateriale er det naturlig at den kan følge med videre til surdeig ved mating, noe som kan forklare en del av forekomsten i prøvene. Dette forklarer likevel ikke høye forekomster på opp mot 43,3 % (K9), som kan tyde på at *Alternaria* kan vokse i surdeig. Dette kan være problematisk siden *Alternaria* er kjent for å produsere en rekke mykotoksiner (Somma et al., 2019), men det er nødvendig med mer forskning på *Alternaria* i surdeig for å si noe mer sikkert.

Torulaspora delbrueckii er ikke uvanlig å finne i surdeig og var den dominante gjæren i en av surdeigene (P3). Dette kan forklares av at den finnes en rekke steder i naturen (bl.a. planter og jord), samt at den har høy toleranse for osmotisk trykk, og kan metabolisere maltose og laktat (stammeavhengig) (De Vuyst et al., 2016).

PCoA-plottet viste tydelige grupperinger for soppen som ble funnet ved Illumina sekvenseringen, noe som viser at surdeigene var forskjellige med tanke på sopp sammensetning. De fleste surdeigene ligger i en gruppe rundt *Alternaria* og *Saccharomyces*. Alle surdeigene som kun inneholdt rug utenom P3 ligger også i denne grupperingen. Det kan derfor se ut som at *Wickerhamomyces* og *Kazachstania* ikke er like vanlige i surdeiger laget på rug, basert på dette lille utvalget. Ingen av de kommersielle surdeigene ligger ved *Wickerhamomyces* gruppen, men er fordelt mellom de to andre gruppene.

Alternaria og *Saccharomyces* er de to eneste slektene som ligger sammen i en gruppe, men *Alternaria* ble også funnet i flere av prøvene som ikke inneholdt *Saccharomyces*. Det er derfor vanskelig å si om denne grupperingen kommer av at disse slektene kan ha en fordel av å opptre sammen, eller om det høye antallet prøver av *Saccharomyces* forårsaker grupperingen.

5.3 Bakteriesamfunn i surdeigene

Melkesyrebakteriene var klart dominerende i de undersøkte surdeigene og utgjorde 95,6 % av bakteriene, mens eddiksyrebakterier utgjorde 1 %. Det ble identifisert 10 ulike MSB-slekter og en eddiksyrebakterieslekt i surdeigene. De fleste surdeigene inneholdt en til tre ulike slekter, men det ble funnet flere i enkelte surdeiger (P16, P17, P18 og P21). Bakterieslektene som ble identifisert i surdeigene fra dette studiet var *Levilactobacillus*, *Pediococcus*, *Companilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Loigolactobacillus* og *Acetobacter*, hvor alle tidligere har blitt identifisert i surdeig (De Vuyst et al., 2023; Landis et al., 2021).

Det ble gjort flere interessante funn i forhold til bakteriesammensetningen i surdeigene. Et av disse var fraværet av en av de mest observerte melkesyrebakteriene i surdeiger gjennom tidene. *Fructilactobacillus sanfranciscensis* er en av bakterieartene som det er identifisert oftest i surdeig (Arora et al., 2021; De Vuyst et al., 2023), men *Flb. sanfranciscensis* ble bare funnet i to surdeiger i denne oppgave, hvor den var dominerende med 96,1 % i den ene surdeigen (P15) og utgjorde kun 6 % i den andre surdeigen (P18).

Tidligere studier viser en tre stegs etableringsprosess med «backslopping» i 10 dager ved 30 °C når surdeiger etableres (De Vuyst et al., 2023). Den første fasen domineres av bakterier som *Enterococcus* og *Lactococcus*. I den andre fasen vil det begynne å etablere seg arter av surdeigsspesifikke bakterier som *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* og *Weissella*. Til slutt vil sterkt tilpassede surdeigsbakteriearter som *L. fermentum* og *L. plantarum* dominere (De Vuyst et al., 2023). I de undersøkte surdeigene i denne oppgaven ble det ikke funnet *L. fermentum* i noen av surdeigene, mens *L. plantarum* muligens var til stede under *Lactiplantibacillus* spp. i noen surdeiger, men hvis dette er tilfellet vil *L. plantarum* på det meste utgjøre 6,9 % av bakteriene. *Pediococcus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus* utgjorde derimot 55 % av alle bakteriene som ble funnet og var de dominerende slektene i 12 surdeiger. Det kan dermed se ut som at mange av de undersøkte surdeigene i denne oppgaven har blitt værende i andre etableringstrinn. En forklaring på dette kan være at etableringsprosessene ble utført ved 30 °C, mens den høyeste temperaturen surdeigene fra dette studiet ble oppbevart eller aktivert ved var romtemperatur, noe som kan ha påvirket sammensetningen i surdeigene. Denne

forklaringen kan støttes av funnene til Vrancken et al. (2011) i en studie hvor de sammenlignet mikrobiota i surdeiger som hadde 10 dager med «backslopping» ved 23 °C, 30 °C og 37 °C. Her var *Leuconostoc citreum* den dominerende arten ved 23 °C, ved 30 °C var *L. fermentum* og *L. plantarum* dominerende, og ved 37 °C var *L. fermentum* dominerende. Disse funnene tyder på at det kreves høyere temperaturer enn det som var tilfellet hos de undersøkte surdeigene i denne oppgaven for å etablere de sterkt tilpassede nevnte surdeigsbakteriene.

Et annet uventet funn som ble gjort var at *P. inopinatus* utgjorde 17,2 % av alle bakteriene funnet i surdeigene og var den dominerende bakterien i fire surdeiger med 91,4 % (P6), 98,3 % (P9), 91,8 % (P11) og 88,6 % (K3). I en oppsummering av bakteriene funnet i 1364 surdeiger fra ulike studier ble denne arten kun funnet i én surdeig (De Vuyst et al., 2023). I en studie gjort av Landis et al. (2021) på 500 surdeiger utgjorde imidlertid *P.*

damnosus/inopinatus 3,1 % av de identifiserte melkesyrebakteriene. Hvis noen av disse er *P. inopinatus* er muligens ikke *P. inopinatus* i surdeig så sjelden som funnene De Vuyst et al. (2023) antyder. Sanger sekvensering utført på 2 av de 4 nevnte surdeigene (P6 og K3) bekrefter innholdet av *P. inopinatus* i surdeig P6, men resultatene herfra kan tyde på at det ikke er like høy andel *P. inopinatus* som Illumina sekvenseringen viser. To av fire tilfeldig plukkede kolonier ble identifisert som *Llb. brevis* ved Sanger sekvensering selv om *P. inopinatus* utgjorde 91,3 % av bakteriene i surdeigen ifølge Illumina sekvenseringen. I surdeig K3 viser Illumina sekvenseringen at 88,6 % av bakteriene i prøven var *P. inopinatus*, mens bakterieisolatene (2 av 2) som ble undersøkt ved Sanger sekvenseringen ble identifisert som *L. garii*. Selv om innholdet av *P. inopinatus* muligens er noe lavere enn hva som ble funnet ved Illumina sekvenseringen, er det likevel betydelige funn som ble gjort av en uvanlig *Pediococcus* art. Det er vanskelig å si hva som kan forårsaket dette siden det ikke ble funnet noen spesielle fellesnevner blant de 4 surdeigene, utenom at tre av surdeigene inneholdt speltmel. Det kreves derfor mer forskning for å finne ut hva som kan være mulige medvirkende faktorer til etablering og vekst av *P. inopinatus* i surdeig.

Companilactobacillus spp. var den dominerende bakterien i tre surdeiger med 98 % (P14), 56,3 % (P17) og 86,8 % (P20). Dette kunne forventes da flere ulike arter av *Companilactobacillus* har blitt funnet i surdeig tidligere. Det er imidlertid kun to av artene som ble funnet under *Companilactobacillus* spp. som er vanlige surdeigsbakterier. Det kan derfor tenkes at det enten er *C. farciminis* eller *C. heilongjiangensis* som er til stede i disse surdeigene (De Vuyst et al., 2023).

Illumina sekvenseringen viste også at surdeigene inneholdt flere ulike melkesyrebakterier både med hensyn til slekter og arter. Noen hadde en tydelig dominant art, mens andre hadde flere arter som utgjorde mindre andeler. De Vuyst and Neysens (2005) gjorde en studie hvor de så på biodiversiteten hos surdeiger med ulikt opphav. De fant at det var mange surdeiger hvor homofermentative MSB og heterofermentative MSB opptrådte sammen, noe som ble observert i flere av surdeigene i dette masterstudiet. Blant annet ble *Llb. brevis* (heterofermentativ) funnet sammen med de homofermentative bakteriene *P. inopinatus* (P3, P6 og P11), *L. coryniformis* (P5) og *P. parvulus* (P13). En mulig forklaring på at disse blir funnet en del sammen kan være at det er mindre konkurranse om karbohydrater mellom homofermentative og heterofermentative MSB. Noe som kan forklares av at homolaktisk fermentering foregår med glukose som foretrukket karbohydrat, og at metabolismen av andre karbohydrater blir undertrykt når glukose er til stede. Under heterolaktisk fermentering er sukrose, maltose og fruktose foretrukne karbonkilde, men glukose kan også brukes med et lavt energiutbytte (Gänzle, 2015). Basert på resultatene fra dette studiet ser det likevel ut som at samspillet mellom homofermentative og heterofermentative MSB ikke er nødvendig, siden det er flere eksempler på surdeiger som inneholder tilnærmet kun homofermentative bakterier (P2, P4 og P9). Dette kan kanskje uansett gi grunnlag for at enkelte MSB oftere opptrer sammen.

PCoA-plottet viser at det er store forskjeller mellom de ulike surdeigene i forhold til bakteriesammensetning. Det er mulig å observere flere ulike grupperinger av surdeigene, men de er i de fleste tilfellene ikke lokalisert tett på hverandre. Dette kan skyldes at mange av prøvene inneholder opp til flere ulike bakterieslekter, som vil gjøre at noen av punktene også vil trekkes mot andre bakterier. For eksempel P3 og P13 ligger mellom *Pediococcus* og *Levilactobacillus*, siden de inneholder en blanding av disse to slektene.

5.4 Interaksjoner mellom sopp og bakterier

Det ble observert mange interessante mulige interaksjoner mellom gjær og MSB i de ulike surdeigene. *Kazachstania humilis* eller *K. exigua* er blant annet vanlig å finne sammen med *F. sanfranciscensis*. Dette ble muligens observert i en av de undersøkte surdeigene (P15), med forbehold om at den inneholder *K. humilis* eller *K. exigua* og ikke *K. bulderi*. Grunnen til at disse ofte opptrer sammen er på bakgrunn av at de prefererer ulike energikilder, *K. humilis*/*K.*

exigua er vanligvis maltose negativ og *F. sanfranciscensis* er maltose positiv. Maltose positive MSB vil ikke bare bidra til mindre konkurranse med maltose negativ gjær, den vil i tillegg frakte maltose inn i cellen via en maltose/H⁺ symport og hydrolysere den til glukose og glukose-1-fosfat. Glukosen blir videre transportert ut av cellen, noe som resulterer i mer tilgjengelig glukose for den maltose negative gjæren (De Vuyst et al., 2016).

Et annet påfallende funn som ble gjort er at majoriteten av surdeigene som tilnærmet kun inneholdt homofermentative MSB, ble observert sammen med maltose positiv gjær. Dette gjelder i surdeig P2, P4, P8, P9, P10, P12, P14 og P19. Når det gjelder *Kazachstania* som ofte rapporteres å være en maltose negativ gjær, ble den også i de fleste tilfellene funnet sammen med heterofermentative MSB, noe som gjelder i surdeig P11, P15, K1 som inneholder henholdsvis *Llb. brevis*, *Flb. sanfranciscensis* og *F. rossiae* (Sanger sekvensering) og *Llb. brevis* hos surdeig K10. Surdeig K3 utgjør imidlertid et unntak fra dette, siden den inneholder *K. unispora* og den homofermentative *P. inopinatus* (De Vuyst et al., 2023; De Vuyst et al., 2016; Johansson et al., 2021; Korcari et al., 2021). Basert på disse observasjonene kan det tenkes at noen interaksjoner mellom gjær og MSB oppstår på bakgrunn av ulik preferanse for karbohydrater.

På den andre siden gjorde Carbonetto et al. (2020) en studie der de så på interaksjoner mellom MSB og *K. humilis* i surdeig, hvor verken glukose, maltose eller fruktose var helt brukt opp etter seks timer med fermentering ved 28 °C. Dette gjelder også for maltose i flere av de kommersielle og private surdeigene undersøkt i dette studiet. Glukose var i større grad brukt opp. Dette kan uansett tyde på at den kontinuerlige frigjøringen av karbohydrater fra amylaseaktivitet fra melet i surdeigen fører til at det ikke vil bli konkurranse om karbohydratene mellom gjær og MSB ved kortere tids fermentering (Carbonetto et al., 2020).

5.5 Vekst- og metabolismeforsøk av fire utvalgte surdeiger

Det er vanlig å observere over log 8 KDE/g MSB i en surdeig med rundt 100 ganger mindre gjær (De Vuyst & Neysens, 2005; Gobbetti, 1998). Det ble observert over log 9 KDE/g på MRS-agar for alle surdeigene og over log 7 KDE/g på RB-agar for alle surdeigene. Celletallene var derfor som forventet med ca. 1 til 2 log KDE/g MSB enn gjær i surdeigene.

Melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjonen ved T24 i varierte en del i de ulike surdeigene (hhv. 5812-10521 ppm og 493-1681 ppm), men alle surdeigene produserte både melkesyre og eddiksyre som følge av metabolsk aktivitet. Den høyeste konsentrasjonen av melkesyre ved T24 ble observert i prøve P6 og kan mulig forklares av at denne er dominert av den homofermentative bakterien *P. inopinatus*. Det som er et mer uforklarlig resultat, er at surdeig P2 som også domineres av en homofermentativ MSB (*Llb. sakei*), hadde den laveste melkesyreproduksjonen. En forklaring på dette kan være at P2 hadde et lavt celletall på MRS-agar, men omtrent det høyeste på RB-agar ved T24. Det er derfor en mulighet at gjær stod for større deler av metabolismen i surdeigen, eller at gjæren har hemmet melkesyrebakteriene ved produksjon av for eksempel etanol. Dette kan ha resultert i at det ble produsert mindre organiske syrer i denne surdeigen.

Surdeigene hadde pH-verdier på 3,65 (P13), 3,68 (P3), 3,83 (P6), og 3,88 (P2) ved T24, noe som er i samsvar med forventningene, ettersom surdeig vanligvis har en pH i underkant av 4 (De Vuyst et al., 2009). Et interessant funn som ble gjort var at surdeig P6 og P2 hadde henholdsvis 4724 og 2159 ppm høyre melkesyrekonsentrasjon enn P13, men begge hadde fortsatt høyere pH. En mulig forklaring kan være at buffer kapasiteten til meltypene som ble brukt i surdeigene er ulik. De Angelis et al. (2019) påpeker at sammalt mel har høyere bufferkapasitet enn siktet mel. Noe som kan stemme med at surdeig P6 og P2 er utelukkende laget med sammalt mel (hhv. spelt og rug) og surdeig P13 er laget med en blanding av sammalt rug og siktet hvete.

Eddiksyreinnholdet i de ulike prøvene er i stor grad som forventet ut fra forventet metabolisme hos melkesyrebakteriene. Illumina sekvenseringen viste at prøve P3, P6 og P13 inneholdt *Llb. brevis* i ulike mengder henholdsvis 70 %, 3 % og 31 % og siden *Llb. brevis* er en heterofermentativ bakterie vil den produsere melkesyre, etanol, CO₂ og eddiksyre. Den høyeste konsentrasjonen av eddiksyre ble observert i surdeig P3, og kan forklares av at det var prøven som hadde høyest andel *Llb. brevis*. I resten av surdeigene ble det observert samme trend, hvor høyere andel *Llb. brevis* resulterte i høyere eddiksyrekonsentrasjon.

I alle surdeigene ble maltose, glukose og fruktose metabolisert. Konsentrasjonen av maltose, glukose og fruktose ved T0 var lavest i surdeig P6, noe som kan komme av at P2, P3 og P13 inneholder rug, som er kjent for å ha høy amylaseaktivitet (De Vuyst et al., 2023). Surdeig P2 var den eneste som hadde igjen karbohydrat ved T24. Det er vanskelig å si hvorfor det ble værende igjen en liten mengde fruktose. Startkonsentrasjonen av fruktose var betydelig høyere enn sluttkonsentrasjonen, så organismene til stede i surdeigen kan metabolisere

fruktose. En mulig forklaring kan være at *Saccharomyces* spp. som er funnet i surdeigen kan ha maltose som prefererte energikilde (De Vuyst et al., 2016) og at *L. sakei* prefererer glukose gjennom homolaktisk fermentering (Gänzle, 2015). Det kan derfor hende at organismene ikke rakk å metabolisere all fruktosen i løpet av fermenteringstiden.

Alle fire surdeigene hadde god stabilitet gjennom de tre ukene analysene pågikk med tanke på celletall, organiske syrer og pH. Dette kan tyde på at disse surdeigene ikke endret seg mye over tre uker. Når det gjelder karbohydratkonsentrasjonen i surdeigene ved T0, var denne mer variabel. Siden alle de andre analysene hadde svært små variasjoner, kan det se ut som at det varierende karbohydratinnholdet ikke påvirket surdeigen nevneverdig i forhold til metabolisme og vekst. Det er mulig at variasjonene skyldes naturlige forskjeller i karbohydratinnhold i mel.

6. Oppsummering og videre studier

Mikrobiotaen i de undersøkte surdeigene varierte mye. Melkesyrebakteriene var dominerende i surdeigene med 10 ulike identifisert slekter. Eddiksyrebakteriene hadde mye lavere forekomst med bare en slekt. Slektene som ble funnet var *Levilactobacillus*, *Pediococcus*, *Companilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Loigolactobacillus* og *Acetobacter*. Fraværet av noen av de mest identifiserte artene i surdeig som *Flb. sanfranciscensis* og *L. plantarum* var noe overraskende. Den lave forekomsten av *L. plantarum* kan mulig skyldes lavere oppbevaringstemperatur i de undersøkte surdeigene, sammenlignet med temperaturen noen av surdeigene hvor *L. plantarum* er identifisert tidligere ble holdt ved. Til videre studier kunne det vært spennende å inkubere surdeiger ved ulike temperaturer for å se hvordan dette vil påvirke den mikrobielle sammensetningen. Det ville da vært mulig å se om noen av de mindre vanlige surdeigsbakteriene som for eksempel *P. inopinatus* ville hatt et fortrinn.

Soppslektene som ble identifisert i surdeigene var *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* og *Alternaria*. *Saccharomyces* ble funnet i flest surdeiger, noe som var forventet siden den svært ofte blir funnet i surdeig. *Kazachstania* var den dominerende gjæren i seks surdeiger, og i prøvene hvor *Kazachstania* ble funnet var det identifisert en svært liten andel andre slekter. Dette kan mulig forklares av at *Kazachstania* er en konkurransedyktig slekt i surdeig. *Wickerhamomyces* var dominerende i syv surdeiger, men ingen av disse var kommersielle. *Alternaria* ble identifisert i mange av prøvene, men er ikke mulig å finne andre studier som omtaler funn av *Alternaria* i surdeig. Til videre studier kunne det vært interessant å se i hvor stor grad *Alternaria* vokser i surdeig og om det er mulig å finne mykotoksiner i surdeiger hvor *Alternaria* har blitt identifisert.

Vekst- og metabolismeundersøkelsene viste store variasjoner mellom surdeigene. Melkesyre- og eddiksyrekonsentrasjonen varierte henholdsvis fra 2750 til 32511 ppm og fra 0 til 5156 ppm. Surdeigene viste generelt lavere glukosekonsentrasjon sammenlignet med maltose, og kan tyde på at glukose er foretrukket energikilde i flere surdeiger. Celletall varierte fra <6 til 9,8 KDE/g på LBS-agar og fra 5,1 til 8,4 KDE/g på YM-agar. pH i de undersøkte surdeigene var $4 \pm 0,6$ i surdeigene. De fleste surdeigene lå uansett innenfor hva som har blitt observert ved tidligere studier med tanke på celletall, pH og produksjon av organiske syrer.

En svakhet ved vekst- og metabolismestudiene som først ble gjort på de 31 surdeigene var at veldig mange parametere varierte samtidig. Det blir derfor vanskelig å vite om et høyere melkesyreinnhold i en surdeig skyldes mikrobiotaen, blandeforholdet, temperaturen på kjøkkenbenken til personen eller matingsfrekvens. Det at parameterne ikke var mer standardiserte kan imidlertid være en positiv ting når det gjelder mikrobiotaundersøkelsene. Siden det vil kunne gi et bedre bilde på hva slags mikroorganismer som finnes i for eksempel en privat surdeig med de betingelsene den har. Det hadde uansett vært interessant med analyser rett etter poding slik at det var mulig å danne et mer helhetlig bilde over metabolismen.

De fire utvalgte surdeiger som ble analysert, viste stabil metabolisme over tre uker med små variasjoner i pH, celletall og innhold av organiske syrer. Det var kun karbohydratinnholdet som varierte fra uke til uke, noe som kan skyldes naturlige forskjeller i melet. Til videre studier hadde det vært spennende å se hvordan metabolismen ville endret ved ulike parametere. For eksempel hvor mye metabolismen i samme surdeig ville forandret seg over tid med oppbevaring ved to ulike temperaturer.

7. Referanser

- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. (n.d.). Illumina. Retrieved 11.05.2024 from https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- Arendt, E. K., Ryan, L. A. M., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24(2), 165-174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.011>
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>
- Brandt, M. J., Loponen, J., & Cappelle, S. (2023). Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Application. In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 67-80). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_4
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M., & Gobbetti, M. (2013). History and Social Aspects of Sourdough In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 109-160). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_1
- Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M., & Gobbetti, M. (2023). History and Social Aspects of Sourdough. In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 1-13). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_1
- Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenc, S., Perez, M., Segond, D., & Sicard, D. (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020240>
- Comasio, A., Verce, M., Van Kerrebroeck, S., & De Vuyst, L. (2020). Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins. *Frontiers Microbiology*, 11, 1212. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01212>
- D'Amico, V., Gänzle, M., Call, L., Zwirzitz, B., Grausgruber, H., D'Amico, S., & Brouns, F. (2023). Does sourdough bread provide clinically relevant health benefits? *Frontiers in Nutrition*, 10, 1230043. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1230043>
- Daniel, H.-M., Moons, M.-C., Huret, S., Vrancken, G., & De Vuyst, L. (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 63-73. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9517-2>
- De Angelis, M., Minervini, F., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2019). Wholemeal wheat flours drive the microbiome and functional features of wheat sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 35-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.009>
- De Vuyst, L., González-Alonso, V., Wardhana, Y. R., & Pradal, I. (2023). Taxonomy and Species Diversity of Sourdough Lactic Acid Bacteria. In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 97-160). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_6
- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 239, 26-34.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018>
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 43-56.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012>
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., & Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26(7), 666-675. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.012>
- Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., & Tzia, C. (2018). Chemical characterization and breadmaking potential of spelt versus wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 79, 50-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.08.023>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Śtepien, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Gastrow, L. v., Gianotti, A., Vernocchi, P., Serrazanetti, D. I., & Sicard, D. (2023). Taxonomy, Biodiversity, and Physiology of Sourdough Yeasts. In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 161-212). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_7
- Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), 267-274.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00053-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00053-3)
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 12-30.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.011>
- Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinoso, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology & Biotechnology*, 56(2), 139-151.
<https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), 601-606.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>
- Guerzoni, E., Serrazanetti, D. I., Vernocchi, P., & Gianotti, A. (2013). Physiology and Biochemistry of Sourdough Yeasts In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 109-160). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_1
- Gänzle, M., & Gobbetti, M. (2013). Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 109-160). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_1
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gänzle, M. G., Ehmann, M., & Hammes, W. P. (1998). Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Applied in Environmental Microbiology*, 64(7), 2616-2623.
<https://doi.org/10.1128/aem.64.7.2616-2623.1998>

- Huys, G., Daniel, H. M., & Vuyst, L. D. (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria In M. Gobbetti & M. Gänzle (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (pp. 109-160). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_1
- Jakob, F., Steger, S., & Vogel, R. F. (2012). Influence of novel fructans produced by selected acetic acid bacteria on the volume and texture of wheat breads. *European Food Research and Technology*, 234(3), 493-499. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1658-7>
- Johansson, L., Nikulin, J., Juvonen, R., Krogerus, K., Magalhães, F., Mikkelsen, A., Nuppenen-Puputti, M., Sohlberg, E., de Francesco, G., Perretti, G., & Gibson, B. (2021). Sourdough cultures as reservoirs of maltose-negative yeasts for low-alcohol beer brewing. *Food Microbiology*, 94, 103629. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103629>
- Kamal-Eldin, A., Aman, P., Zhang, J. X., Knudsen, K. E. B., & Poutanen, K. (2008). 11 - Rye bread and other rye products. In B. R. Hamaker (Ed.), *Technology of Functional Cereal Products* (pp. 233-260). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845693886.2.233>
- Khalid, A., Hameed, A., & Tahir, M. F. (2023). Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1053196. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1053196>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.
- Korcari, D., Ricci, G., Capusoni, C., & Fortina, M. G. (2021). Physiological performance of *Kazachstania unispora* in sourdough environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 88. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03027-0>
- Korcari, D., Ricci, G., Quattrini, M., & Fortina, M. G. (2020). Microbial consortia involved in fermented spelt sourdoughs: dynamics and characterization of yeasts and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 70(1), 48-54. <https://doi.org/10.1111/lam.13241>
- Landis, E. A., Oliverio, A. M., McKenney, E. A., Nichols, L. M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., Shell, L. K., Madden, A. A., Shapiro, L., Sakunala, S., Drake, K., Robbat, A., Booker, M., Dunn, R. R., Fierer, N., & Wolfe, B. E. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.61644>
- Lau, S. W., Chong, A. Q., Chin, N. L., Talib, R. A., & Basha, R. K. (2021). Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355>
- Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno, B., & Gobbetti, M. (2015). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 161-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015>
- Lip, K. Y. F., García-Ríos, E., Costa, C. E., Guillamón, J. M., Domingues, L., Teixeira, J., & van Gulik, W. M. (2020). Selection and subsequent physiological characterization of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during continuous growth at sub- and supra optimal temperatures. *Biotechnology Reports (Amst)*, 26, e00462. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00462>
- López-Aladid, R., Fernández-Barat, L., Alcaraz, V., Bueno-Freire, L., Vázquez, N., Pastor-Ibáñez, R., Palomeque, A., Oscanoa, P., & Torres, A. (2023). Determining the most

- accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. *Scientific Reports*, 13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30764-z>
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied in Environmental Microbiology*, 69(12), 7453-7461. <https://doi.org/10.1128/aem.69.12.7453-7461.2003>
- NGS Data Analysis for Illumina Platform—Overview and Workflow*. (n.d.). Thermo Fisher. Retrieved 11.05.2024 from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/next-generation-sequencing/ngs-data-analysis-illumina.html>
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., Porter, T. M., Bengtsson-Palme, J., Walker, D. M., de Sousa, F., Gamper, H. A., Larsson, E., Larsson, K. H., Kõljalg, U., Edgar, R. C., & Abarenkov, K. (2015). A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. *Microbes Environment*, 30(2), 145-150. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14121>
- PCR Basics*. (n.d.). Thermo Fisher. Retrieved 02.05.2024 from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>
- Qiagen. (2017). QuickStart Protocol. In.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Raghavendra, P., & Pullaiah, T. (2018). Chapter 7 - Pathogen Identification Using Novel Sequencing Methods. In P. Raghavendra & T. Pullaiah (Eds.), *Advances in Cell and Molecular Diagnostics* (pp. 161-202). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813679-9.00007-5>
- Sanger Sequencing Steps & Method*. (n.d.). Sigma Aldrich. Retrieved 02.05.2024 from <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>
- Sionek, B., Szydłowska, A., Küçüköz, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food. *Fermentation*, 9(12), 1019. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/12/1019>
- Somma, S., Amatulli, M. T., Masiello, M., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2019). *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology*, 293, 34-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- Understanding the NGS workflow*. (n.d.). Illumina. Retrieved 02.05.2024 from <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>
- Van Kerrebroeck, S., Maes, D., & De Vuyst, L. (2017). Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 152-159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016>
- von Wright, A., & Axelsson, L. (2019). Lactic Acid Bacteria An Introduction. In G. Vinderola, A. Ouwehand, S. Salminen, & A. v. Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (5th Edition ed.). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780429057465>

- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., & Daniel, H.-M. (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Research*, 10(4), 471-481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x>
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2011). Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Applied in Environmental Microbiology*, 77(8), 2716-2726. <https://doi.org/10.1128/aem.02470-10>
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

8. Vedlegg

8.1 Celletall og HPLC

Vedlegg 1: *Celletall på PCA, MRS-, LBS-, YM- og RB-agar med paralleller, fortynninger og log KDE/g.*

Prøve	Medie	Antall 1. parallell	Antall 2. parallell	Gjennomsnitt	Fortynning	Log KDE/g
K1	LBS	71	79	75	10 ⁻⁶	7,88
K1	MRS	30	39	34,5	10 ⁻⁶	7,54
K1	PCA	264	192	228	10 ⁻⁵	7,36
K1	YM	34	27	30,5	10 ⁻⁶	7,48
K1	RB	38	31	34,5	10 ⁻⁶	7,54
K2	LBS	59	65	62	10 ⁻⁶	7,79
K2	MRS	28	25	26,5	10 ⁻⁶	7,42
K2	PCA	71	54	62,5	10 ⁻⁵	6,80
K2	YM	105	71	88	10 ⁻⁵	6,94
K2	RB	79	75	77	10 ⁻⁵	6,89
K3	LBS	49	45	47	10 ⁻⁷	8,67
K3	MRS	103	139	121	10 ⁻⁶	8,08
K3	PCA	104	96	100	10 ⁻⁶	8,00
K3	YM	158	188	173	10 ⁻⁶	8,24
K3	RB	247	254	250,5	10 ⁻⁵	7,40
K4	LBS	66	71	68,5	10 ⁻⁸	9,84
K4	MRS	69	62	65,5	10 ⁻⁸	9,82
K4	PCA	51	54	52,5	10 ⁻⁸	9,72
K4	YM	93	102	97,5	10 ⁻⁵	6,99
K4	RB	102	90	96	10 ⁻⁵	6,98
K5	LBS	186	178	182	10 ⁻⁷	9,26
K5	MRS	181	190	185,5	10 ⁻⁷	9,27
K5	PCA	221	223	222	10 ⁻⁷	9,35
K5	YM	97	102	99,5	10 ⁻⁴	6,00
K5	RB	123	113	118	10 ⁻⁴	6,07
K6	LBS	32	33	32,5	10 ⁻⁸	9,51
K6	MRS	40	32	36	10 ⁻⁸	9,56
K6	PCA	44	29	36,5	10 ⁻⁸	9,56
K6	YM	33	28	30,5	10 ⁻⁵	6,48
K6	RB	28	30	29	10 ⁻⁵	6,46
K7	LBS	72	72	72	10 ⁻⁷	8,86
K7	MRS	92	107	99,5	10 ⁻⁵	7,00
K7	PCA	125	157	141	10 ⁻⁵	7,15
K7	YM	105	112	108,5	10 ⁻⁵	7,04
K7	RB	106	140	123	10 ⁻⁵	7,09
K8	LBS	176	210	193	10 ⁻⁶	8,29
K8	MRS	94	111	102,5	10 ⁻⁵	7,01
K8	PCA	132	125	128,5	10 ⁻⁵	7,11
K8	YM	116	105	110,5	10 ⁻⁵	7,04
K8	RB	132	117	124,5	10 ⁻⁵	7,10
K9	LBS	279	242	260,5	10 ⁻⁶	8,42
K9	MRS	170	177	173,5	10 ⁻⁵	7,24
K9	PCA	196	194	195	10 ⁻⁵	7,29

K9	YM	82	81	81,5	10 ⁻⁴	5,91
K9	RB	107	125	116	10 ⁻⁴	6,06
K10	LBS	126	107	116,5	10 ⁻⁷	9,07
K10	MRS	70	65	67,5	10 ⁻⁷	8,83
K10	PCA	59	62	60,5	10 ⁻⁷	8,78
K10	YM	57	58	57,5	10 ⁻⁶	7,76
K10	RB	38	30	34	10 ⁻⁶	7,53
P1	LBS	324	305	314,5	10 ⁻⁶	8,50
P1	MRS	353	317	335	10 ⁻⁶	8,53
P1	PCA	191	195	193	10 ⁻⁵	7,29
P1	YM	131	121	126	10 ⁻⁵	7,10
P1	RB	159	193	176	10 ⁻⁵	7,25
P2	LBS	87	63	75	10 ⁻⁷	8,88
P2	MRS	80	88	84	10 ⁻⁷	8,92
P2	PCA	90	88	89	10 ⁻⁷	8,95
P2	YM	93	55	74	10 ⁻⁶	7,87
P2	RB	88	87	87,5	10 ⁻⁶	7,94
P3	LBS	175	179	177	10 ⁻⁷	9,25
P3	MRS	176	180	178	10 ⁻⁷	9,25
P3	PCA	117	129	123	10 ⁻⁷	9,09
P3	YM	288	212	250	10 ⁻⁶	8,40
P3	RB	138	146	142	10 ⁻⁵	7,15
P4	LBS	45	44	44,5	10 ⁻⁷	8,65
P4	MRS	57	45	51	10 ⁻⁷	8,71
P4	PCA	55	66	60,5	10 ⁻⁷	8,78
P4	YM	147	125	136	10 ⁻³	5,13
P4	RB	140	124	132	10 ⁻³	5,12
P5	LBS	36	30	33	10 ⁻⁸	9,52
P5	MRS	30	28	29	10 ⁻⁸	9,46
P5	PCA	44	27	35,5	10 ⁻⁸	9,55
P5	YM	91	104	97,5	10 ⁻⁵	6,99
P5	RB	97	86	91,5	10 ⁻⁵	6,96
P6	MRS	55	46	50,5	10 ⁻⁷	8,70
P6	LBS	47	47	47	10 ⁻⁷	8,67
P6	PCA	35	43	39	10 ⁻⁷	8,59
P6	YM	205	150	177,5	10 ⁻⁶	8,25
P6	RB	38	33	35,5	10 ⁻⁶	7,55
P7	MRS	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶			<6
P7	LBS	47	55	51	10 ⁻⁶	7,71
P7	PCA	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶			<6
P7	YM	36	39	37,5	10 ⁻⁴	5,57
P7	RB	37	33	35	10 ⁻⁶	7,54
P8	LBS	47	40	43,5	10 ⁻⁷	8,64
P8	MRS	37	34	35,5	10 ⁻⁷	8,55
P8	PCA	47	45	46	10 ⁻⁷	8,66
P8	YM	28	33	30,5	10 ⁻⁶	7,48
P8	RB	163	205	184	10 ⁻⁵	7,26
P9	LBS	82	99	90,5	10 ⁻⁶	7,96
P9	MRS	63	73	68	10 ⁻⁶	7,83
P9	PCA	76	72	74	10 ⁻⁶	7,87
P9	YM	73	62	67,5	10 ⁻⁴	5,83
P9	RB	78	97	87,5	10 ⁻⁴	5,94
P10	LBS	58	66	62	10 ⁻⁷	8,79
P10	MRS	36	53	44,5	10 ⁻⁷	8,65
P10	PCA	53	55	54	10 ⁻⁷	8,73
P10	YM	75	67	71	10 ⁻⁶	7,85
P10	RB	133	122	127,5	10 ⁻⁶	8,11
P11	LBS	118	143	130,5	10 ⁻⁷	9,12

P11	MRS	110	115	112,5	10 ⁻⁷	9,05
P11	PCA	113	122	117,5	10 ⁻⁷	9,07
P11	YM	63	66	64,5	10 ⁻⁴	5,81
P11	RB	36	37	36,5	10 ⁻⁶	7,56
P12	LBS	47	45	46	10 ⁻⁷	8,66
P12	MRS	42	48	45	10 ⁻⁷	8,65
P12	PCA	35	46	40,5	10 ⁻⁷	8,61
P12	YM	32	25	28,5	10 ⁻⁶	7,45
P12	RB	236	264	250	10 ⁻⁵	7,40
P13	LBS	31	27	29	10 ⁻⁸	9,46
P13	MRS	231	228	229,5	10 ⁻⁷	9,36
P13	PCA	52	63	57,5	10 ⁻⁷	8,76
P13	YM	42	42	42	10 ⁻⁶	7,62
P13	RB	35	41	38	10 ⁻⁶	7,58
P14	LBS	134	105	119,5	10 ⁻⁷	9,08
P14	MRS	98	111	104,5	10 ⁻⁷	9,02
P14	PCA	98	97	97,5	10 ⁻⁶	7,99
P14	YM	64	57	60,5	10 ⁻⁶	7,78
P14	RB	58	62	60	10 ⁻⁶	7,78
P15	LBS	91	102	96,5	10 ⁻⁷	8,98
P15	MRS	185	172	178,5	10 ⁻⁵	7,25
P15	PCA	36	31	33,5	10 ⁻⁶	7,53
P15	YM	219	189	204	10 ⁻⁵	7,31
P15	RB	166	190	178	10 ⁻⁵	7,25
P16	LBS	108	112	110	10 ⁻⁷	9,04
P16	MRS	115	134	124,5	10 ⁻⁷	9,10
P16	PCA	107	97	102	10 ⁻⁷	9,01
P16	YM	167	181	174	10 ⁻⁵	7,24
P16	RB	144	137	140,5	10 ⁻⁵	7,15
P17	LBS	193	194	193,5	10 ⁻⁷	9,29
P17	MRS	196	192	194	10 ⁻⁷	9,29
P17	PCA	43	31	37	10 ⁻⁷	8,57
P17	YM	151	141	146	10 ⁻⁵	7,16
P17	RB	134	125	129,5	10 ⁻⁵	7,11
P18	LBS	36	28	32	10 ⁻⁸	9,51
P18	MRS	97	97	97	10 ⁻⁷	8,99
P18	PCA	55	57	56	10 ⁻⁷	8,75
P18	YM	105	116	110,5	10 ⁻⁵	7,04
P18	RB	54	55	54,5	10 ⁻⁵	6,74
P19	LBS	113	110	111,5	10 ⁻⁷	9,05
P19	MRS	116	114	115	10 ⁻⁷	9,06
P19	PCA	109	105	107	10 ⁻⁷	9,03
P19	YM	132	107	119,5	10 ⁻⁶	8,08
P19	RB	122	96	109	10 ⁻⁶	8,04
P20	LBS	110	117	113,5	10 ⁻⁷	9,05
P20	MRS	112	117	114,5	10 ⁻⁷	9,06
P20	PCA	112	96	104	10 ⁻⁷	9,02
P20	YM	248	145	196,5	10 ⁻³	5,29
P20	RB	50	41	45,5	10 ⁻⁴	5,66
P21	LBS	66	63	64,5	10 ⁻⁷	8,81
P21	MRS	67	63	65	10 ⁻⁷	8,81
P21	PCA	63	55	59	10 ⁻⁷	8,77
P21	YM	43	40	41,5	10 ⁻⁵	6,62
P21	RB	61	37	49	10 ⁻⁵	6,69

Vedlegg 2: Organiske syrer og karbohydrater funnet ved HPLC.

Prøve	Maltose	Glucose	Fructose	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid (RI)	Uric acid	DL-pyrogutamic acid	Citric acid
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
P1	2081,687	1110,952	n.d.		11698,192	n.d.	n.d.	26,401	n.d.
P2	101,64	n.d.	778,51	n.d.	5570,43	326,41	n.d.	40,08	n.d.
P3	2503,41	4050,52	6183,59	n.d.	5530,05	1837,72	n.d.	73,85	n.d.
P4	10440,79	1151,42	2358,89	n.d.	2850,01	159,96	n.d.	4,51	n.d.
P5	992,41	n.d.	2199,99	n.d.	7520,75	2848,92	n.d.	87,13	n.d.
P6	2015,68	n.d.	n.d.	n.d.	8617,94	1227,25	n.d.	43,5	n.d.
P7	2028,75	n.d.	2634,95	n.d.	7746,88	1343,05	n.d.	11,69	n.d.
P8	113,13	n.d.	n.d.	n.d.	3034,37	n.d.	n.d.	38,36	n.d.
P9	2848,81	2589,96	2361,94	n.d.	2749,94	291,06	n.d.	77,39	30,13
P10	75,33	n.d.	n.d.	n.d.	4295,41	246,53	n.d.	53,1	66,7
P11	3016,93	n.d.	247,24	183,51	4998,15	281,82	n.d.	11,74	115,57
P12	604,15	n.d.	n.d.	n.d.	2861,09	1543,97	n.d.	44,31	180,64
P13	764,28	n.d.	578,45	n.d.	4609,49	804,1	n.d.	17,29	166,06
P14	55,43	n.d.	64,71	n.d.	4588,7	n.d.	n.d.	8,8	n.d.
P15	1564,68	n.d.	1935,08	n.d.	6867,14	1652,66	n.d.	10,22	114,75
P16	227,484	n.d.	600,76	192,656	4830,38	824,103	n.d.	n.d.	n.d.
P17	3805,51	411,23	1168,4	98,44	5748,83	1622,09	n.d.	11,35	n.d.
P18	n.d.	955,06	4600,82	n.d.	8848,82	1597,02	n.d.	19,49	n.d.
P19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5515,466	739,972	n.d.	20,728	n.d.
P20	3412,479	8610,028	4807,093	n.d.	7612,437	599,048	n.d.	28,269	n.d.
P21	5545,444	2593,075	2938,416	n.d.	2851,618	780,287	n.d.	16,532	n.d.
K1	61,07	n.d.	4195,2	n.d.	9981,43	1592,25	8,82	17,58	n.d.
K2	1808,45	211,62	4522,61	n.d.	6851,83	1264,38	n.d.	4,69	n.d.
K3	11,48	274,3	4336,11	n.d.	6797,57	1088,52	n.d.	30,45	n.d.
K4	3669,623	12130,763	1358,51	n.d.	32510,582	5155,745	n.d.	n.d.	n.d.
K5	n.d.	69,187	2379,58	n.d.	13219,318	2193,87	n.d.	64,62	n.d.
K6	17417,407	n.d.	942,6	n.d.	12533,962	1259,989	n.d.	12,305	n.d.
K7	5577,43	216,17	3141,71	n.d.	5590,65	1025,59	n.d.	6,94	n.d.
K8	n.d.	688,38	7044,51	n.d.	7485,74	2010,5	n.d.	54,58	n.d.
K9	8792,44	1936,55	2275,2	n.d.	4222,92	454,34	n.d.	4,94	n.d.
K10	n.d.	n.d.	n.d.	112,881	5172,448	1596,743	n.d.	17,427	n.d.

8.2 Vekst- og metabolismestudier langsgående

Vedlegg 3: Organiske syrer og karbohydrater ved T0 og T24 igjennom 3 uker.

	Sample name	Maltose	Glucose	Fructose	Succinic acid	Lactic acid	Acetic acid (RI)	Uric acid	DL-pyrogutamic acid	Citric acid
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Uke1	P6 T0	3701,42	1543,48	2861,96	n.d.	2384,25	n.d.	n.d.		n.d.
	P3 T0	3488,62	2425,21	5768,03	n.d.	1053,31	n.d.	n.d.	78,07	271,67
	P13 T24	3471,11	1777,76	4696,81	n.d.	1190,67	n.d.	n.d.	40,74	176,02
	P2 T0	4122,8	1988,92	5363,51	n.d.	1028,86	n.d.	n.d.	44,92	180,91
	P6 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12829,63	1307,11	n.d.	51,13	n.d.
	P3 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10610,5	1847,71	n.d.	94,04	305,27
	P13 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8834,31	1584,85	n.d.	60,37	n.d.
	P2 T24	n.d.	n.d.	772,82	n.d.	6739,91	562,31	n.d.	62,51	n.d.
Uke 2	P2 T0	5397,52	1143,72	2772,68	n.d.	1427,04	n.d.	n.d.	40,65	140,63
	P13 T0	4122,51	732,29	1988,32	n.d.	1405,26	n.d.	n.d.	28,26	151,64
	P3 T0	3606,03	1106,77	2324,96	n.d.	1392,76	n.d.	n.d.	61,29	281,76
	P6 T0	2946,24	991,02	1680,81	n.d.	2512,82	n.d.	n.d.	29,01	n.d.
	P2 T24	n.d.	n.d.	188,22	n.d.	6945,22	546,14	n.d.	35,84	n.d.
	P13 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8016,34	1386,96	n.d.	26,79	n.d.
	P3 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10121,14	1851,85	n.d.	62,55	309,23
	P6 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13276,4	1494,45	n.d.	24,51	n.d.
Uke 3	P13 T0	3345,08	2125,26	4541,91	n.d.	1032,18	n.d.	n.d.	31,76	172,36
	P3 T0	2678,28	2851,79	6975,94	n.d.	1721,02	n.d.	n.d.	82,31	267,21
	P6 T0	2592,42	1267,64	2183,69	n.d.	2497,8	n.d.	n.d.	61,01	138,16
	P2 T0	3847,75	2530,95	5794,13	n.d.	1021,73	n.d.	n.d.	45,97	145,39
	P13 T24	n.d.	n.d.	1516,84	n.d.	7935,82	1135,56	n.d.	41,89	n.d.
	P3 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10532,12	1342,85	n.d.	117,92	321,22
	P6 T24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12852,81	986,75	n.d.	62,26	118,72
	P2 T24	n.d.	n.d.	786,03	n.d.	7228,01	372,01	n.d.	71,37	n.d.

Vedlegg 3: pH ved T0 og T24 igjennom 3 uker.

	Uke 1		Uke 2		Uke 3			
	pH		pH		pH			
	T0	T24	T0	T24	T0	T24		
P6	5,51	3,92	P6	5,41	3,7	P6	5,38	3,87
P3	5,42	3,77	P3	5,1	3,75	P3	5,49	3,52
P13	5,03	3,68	P13	5	3,69	P13	5,27	3,58
P2	5,51	3,94	P2	5,38	3,87	P2	5,49	3,83

Vedlegg 4: Celletall på PCA, MRS-, LBS-, YM- og RB-agar med paralleller, fortynninger og log KDE/g

Surdeig	Medie	PAR1	PAR 2	Gjennomsnitt	Fortynning	Log KDE/g
P6 T0	MRS	53	75	64	10 ⁷	8,81
P3 T0	MRS	28	28	28	10 ⁷	8,45
P13 T24	MRS	67	65	66	10 ⁷	8,82
P2 T0	MRS	172	166	169	10 ⁶	8,23
P6 T0	RB	94	94	94	10 ⁵	6,97
P3 T0	RB	86	90	88	10 ⁵	6,94
P13 T24	RB	128	139	133,5	10 ⁵	7,13
P2 T0	RB	136	139	137,5	10 ⁵	7,14
P6 T24	MRS	135	128	131,5	10 ⁷	9,12
P3 T24	MRS	47	43	45	10 ⁸	9,65
P13 T24	MRS	195	202	198,5	10 ⁷	9,30
P2 T24	MRS	127	142	134,5	10 ⁷	9,13
P6 T24	RB	128	128	128	10 ⁵	7,11
P3 T24	RB	171	191	181	10 ⁶	8,26
P13 T24	RB	61	71	66	10 ⁶	7,82
P2 T24	RB	190	201	195,5	10 ⁶	8,29
P2 T0	MRS	33	31	32	10 ⁷	8,51
P13 T0	MRS	40	32	36	10 ⁷	8,56
P3 T0	MRS	172	159	165,5	10 ⁶	8,22
P6 T0	MRS	66	74	70	10 ⁷	8,85
P2 T24	RB	138	135	136,5	10 ⁵	7,14
P13 T24	RB	85	87	86	10 ⁵	6,93
P3 T24	RB	184	198	191	10 ⁵	7,28
P6 T24	RB	98	84	91	10 ⁵	6,96
P2 T24	MRS	119	130	124,5	10 ⁷	9,10
P13 T24	MRS	208	186	197	10 ⁷	9,29
P3 T24	MRS	43	39	41	10 ⁸	9,61
P6 T24	MRS	31	30	30,5	10 ⁸	9,48
P2 T24	RB	151	159	155	10 ⁶	8,19
P13 T24	RB	50	56	53	10 ⁶	7,72
P3 T24	RB	267	262	264,5	10 ⁶	8,42
P6 T24	RB	130	143	136,5	10 ⁵	7,14
P6 T0	MRS	62	50	56	10 ⁷	8,75
P3 T0	MRS	164	169	166,5	10 ⁶	8,22
P13 T24	MRS	285	295	290	10 ⁶	8,46
P2 T0	MRS	187	195	191	10 ⁶	8,28
P6 T0	RB	99	86	92,5	10 ⁵	6,97
P3 T0	RB	128	134	131	10 ⁵	7,12
P13 T24	RB	50	35	42,5	10 ⁵	6,63
P2 T0	RB	61	44	52,5	10 ⁵	6,72
P6 T24	MRS	159	141	150	10 ⁷	9,18
P3 T24	MRS	265	275	270	10 ⁷	9,43
P13 T24	MRS	247	246	246,5	10 ⁷	9,39
P2 T24	MRS	189	197	193	10 ⁷	9,29
P6 T24	RB	108	125	116,5	10 ⁵	7,07
P3 T24	RB	186	172	179	10 ⁶	8,25
P13 T24	RB	58	69	63,5	10 ⁶	7,80
P2 T24	RB	186	217	201,5	10 ⁶	8,30

8.3 Sanger sekvensering

Vedlegg 5: Sanger sekvensering og brukt av BLAST for identifisering av bakterieisolater.

Surdeig	% treff	Identifisert art
P6	99.79	Levilactobacillus brevis
	99.93	Pediococcus inopinatus
	100	Pediococcus inopinatus
	99.86	Levilactobacillus brevis
K1	99.93	Furfurilactobacillus rossiae
	99.93	Furfurilactobacillus rossiae
	99.93	Furfurilactobacillus rossiae
	99.93	Furfurilactobacillus rossiae
K3	99.63	Lactiplantibacillus garii
	99.44	Lactiplantibacillus garii
K9	99.93	Latilactobacillus
	99.93	Latilactobacillus
	99.93	Latilactobacillus
	99.93	Latilactobacillus

Vedlegg 5: Sanger sekvensering og brukt av BLAST for identifisering av gjærisolater.

Surdeig	% identitet	Identifisert art
P6	99,87	Saccharomyces cerevisiae
	100	Saccharomyces cerevisiae
	100	Saccharomyces cerevisiae
	99,75	Saccharomyces cerevisiae
K1	98,67	Saccharomyces cerevisiae
	98,62	Kazachstania humilis
	98,63	Kazachstania humilis
	98,63	Kazachstania humilis
K2	98,66	Kazachstania humilis
	98,8	Kazachstania humilis
K3	100	Kazachstania unispora/servazzii
	99,83	Kazachstania unispora/servazzii
	100	Kazachstania unispora/servazzii
	99,71	Kazachstania unispora
K9	99,62	Saccharomyces cerevisiae
	98,96	Saccharomyces cerevisiae
	99,5	Saccharomyces cerevisiae
	99,46	Saccharomyces cerevisiae



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway