



LUNDS UNIVERSITET

Institutionen för Livsmedelsteknik

---

# Mjölksyrabakterier i suröl

---

Fredrik Andersson och Sandy Koleszar

Examensarbete för högskoleexamen  
i livsmedelsteknik, 15 hp

2019

Examinator: Olena Prykhodko  
Handledare: Elin Oscarsson

## Abstract

Sour beer is rapidly gaining popularity among people that have an interest in craft beer and the microbrewing scene. This leads to breweries starting to venture outside their comfort zones regarding the more traditional brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* and instead have started experimenting with different kinds of bacteria and yeast that in a normal process is regarded as spoilage bacteria, such as Lactobacilli and wildyeast. *Lactobacillus*, which also could be regarded as probiotic, has shown promising benefits when administered in relation to health related problems and surgery. The *Lactobacillus* used in sour beer converts glucose to lactic acid, carbon dioxide and ethanol. It is with the help of *Lactobacillus plantarum* 299v and two different strains of *Lactobacillus brevis* that the beer from South Plains Brewery gets parts of its acidic character. The purpose of this thesis is to evaluate if lactic acid bacteria survives in the final product, and if so, in what capacity and what specific strains.

Samples from the starter culture and bottled beer were cultivated in vitro and a measurement of the pH-levels were conducted. The cultivated bacteria were isolated from agar containing a range of 30 to 300 colonies, and the DNA was extracted from these. PCR and gel electrophoresis were conducted on the samples before sending them to a laboratory in Germany for sequencing. By sequencing the DNA, we could see that the added lactic acid bacteria *L. plantarum* 299v and *L. brevis* with high probability did not survive in the finished beer, instead we found a strain of *Lactobacillus paracasei*.

The total potential amount of living lactic acid bacteria in the selected beer is much lower than the amounts used in other commercial products designed specifically to be advertised as probiotic. The beer can thus be considered as having low or non-existing probiotic properties.

## Sammanfattning

Suröl är en dryck som ökat i popularitet, speciellt bland folk med stort intresse för hantverksöl och mikrobryggerier. Allt fler bryggerier vågar nu att gå utanför sin trygghetszon med att använda jäst av typen *Saccharomyces cerevisiae* och istället börjar experimentera med bakterier och jäst som tidigare ansetts vara produktförstörande, till exempel olika mjölksyrabakterier och vildjäst. Genom forskningsstudier har man sett att mjölksyrabakterier, även kallat probiotika, har agerat hälsofrämjande när det administrerats i samband med sjukdomar och operationer. Stammarna av *Lactobacillus* som tillsätts i suröl omvandlar glukos till mjölksyra, CO<sub>2</sub> och etanol. Det är med hjälp av mjölksyrabakterierna *Lactobacillus plantarum* 299v samt två olika stammar av *Lactobacillus brevis* som ölen från South Plains Brewery får sin syrliga karaktär.

Syftet med detta examensarbete är undersöka om mjölksyrabakterier överlever i surölen från vårt lokala mikrobryggeri, i vilken volym och vilka specifika bakteriestammar det handlar om.

Prover från starterkultur samt färdig öl odlades upp i petriskålar och en mätning av pH-värde utfördes. Bakterier isolerades från kolonier som hade ett antal högre än 30, men mindre än 300, och DNA extraherades. PCR och gelelektrofores genomfördes innan proverna skickades till ett laboratorium i Tyskland för sekvensering. Genom sekvenseringen av proverna fick vi fram att de tillsatta mjölksyrabakterierna *L. plantarum* 299v och *L. brevis* med stor sannolikhet inte överlevt i den färdigbryggda ölen, utan i själva verket var det *Lactobacillus paracasei* som dominerade.

Den totala mängden potentiella levande mjölksyrabakterier hos den utvalda ölen är mycket lägre än den som återfinns i produkter som marknadsförs som probiotiska. Ölen får därmed anses ha svaga eller obefintliga probiotiska egenskaper.

## Förord

Under vårterminen 2019 var det dags för oss studerande på Livsmedelsteknisk Högskoleutbildning att skriva våra examensarbeten. Vi har sedan höstterminen diskuterat eventuella forskningsämnen och kom fram till att probiotika och öl var något vi båda gärna fördjupar oss i, och då gärna i kombination. Valet föll ganska enkelt på opastöriserad suröl då den i många fall får sin karaktäristiska smak från just mjölksyrabakterier som oftast förekommer när man pratar om probiotika. Själva arbetet utfördes i laboratorium tillhörande institutionen för livsmedelsteknik på kemikentrum i Lund.

Först och främst vill vi passa på att tacka Jeffrey Scott Brown på South Plains Brewing Company i Malmö som har tillhandahållit oss med starterkultur och öl till våra laborationer, samt information och kunskap gällande hans bryggteknik och processteg.

Vi vill också ge ett stort tack till Elin Oscarsson för all hjälp och stöttning som handledare under arbetets gång, där hon bidragit med ovärderlig kunskap, tid och laboratorievana.

Slutligen vill vi tacka programledningen, lärare och föreläsare på institutionen för livsmedelsteknik, i synnerhet Charlott Håkansson för hennes engagemang och vilja rörande vår utbildning och framtid.

# Innehållsförteckning

Inledning .....	1
Syfte .....	1
Bakgrund.....	2
Mikroorganismer i öl.....	2
Probiotika .....	3
Bryggprocess.....	4
Material .....	5
Odling av bakterier.....	5
Polymerase chain reaction.....	6
Metod .....	6
Beredning av agar och peptonvatten .....	6
pH-mätning.....	7
Odling av bakterier.....	7
Isolering av bakterier.....	8
Extraktion av DNA.....	9
Polymerase chain reaction.....	9
Gelelektrofores .....	10
Sekvensering .....	10
Resultat .....	11
pH-mätning.....	11
Bakterieinnehåll i starterkultur och öl.....	11
Sekvensering .....	14
Diskussion och slutsatser .....	15
Referenser .....	17
Bilagor.....	19

## Inledning

Det läggs stor vikt på hälsa i det moderna samhället och intresset för forskning och nya produkter ökar ständigt. Mjölksyrabakterier har under väldigt lång tid använts till mat och dryck världen över för exempelvis konservering, men det är inte förrän i modern tid som forskningen har haft möjlighet att besvara vad det är för mikroorganismer samt deras funktionella egenskaper.

Det råder i dagsläget delade meningar om mjölksyrabakterier har en hälsofrämjande effekt vid intag, vilket då kallas för probiotika, och får för nuvarande inte användas som ett hälsopåstående vid marknadsföring enligt EU-kommissionen [1]. Det finns dock underlag som tyder på att probiotika har en rad hälsofördelar för människans tarmsystem och är därmed värt att forska vidare på [2]. Suröl är den äldsta typen av öl och kan beroende på tillverkningen innehålla stor mängd mjölksyrabakterier [3], men det finns idag väldigt lite publicerat forskningsmaterial. Det är därmed intressant att utföra mikrobiella tester på opastöriserad suröl och se om den innehåller "levande mikroorganismer som, när de administreras i adekvata mängder, ger en gynnsam hälsoeffekt", vilket enligt WHO och FAO är definitionen på probiotika [4].

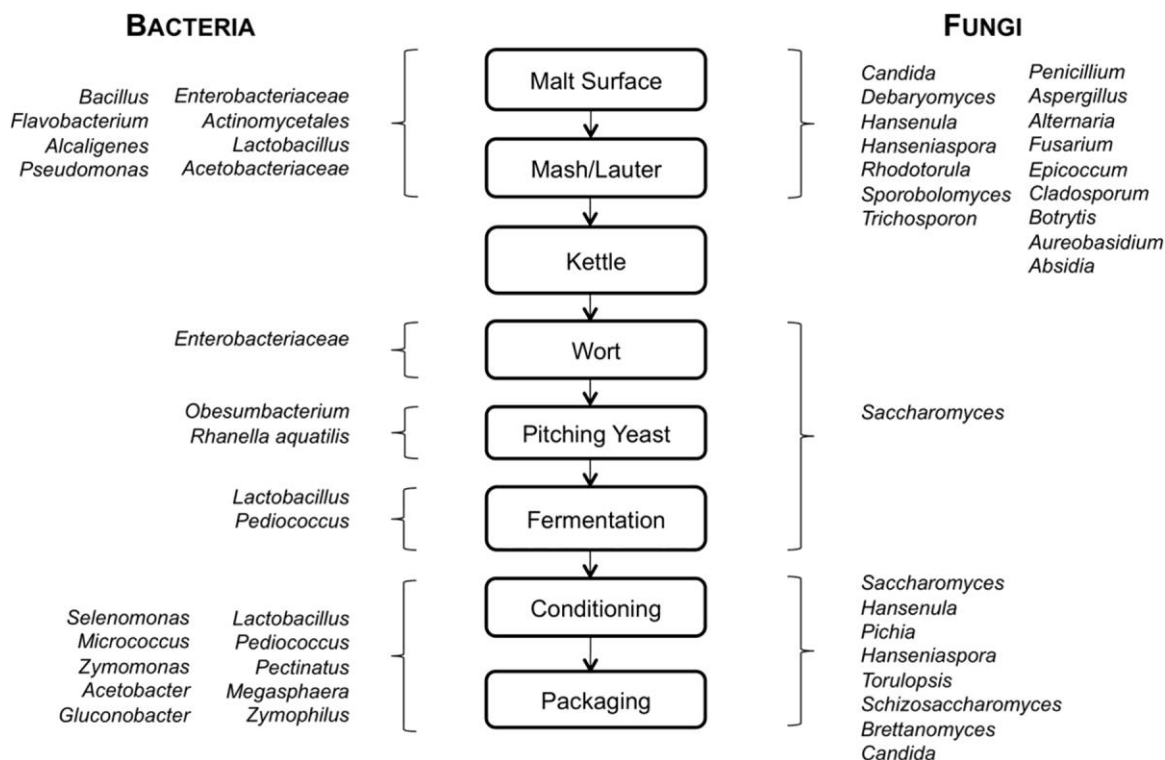
## Syfte

Målet med detta arbetet var att undersöka förekomsten av mjölksyrabakterier i opastöriserad suröl från South Plains Brewery i Malmö.

# Bakgrund

## Mikroorganismer i öl

Öl, liksom många andra fermenterade produkter, skapas och formas till sin slutprodukt med hjälp av mikroorganismer. Listan över mikroorganismer i de olika stegen vid öltillverkning är lång och kan ses i figur 1.



Figur 1: mikroorganismer i de olika processtegen vid ölbrygning. [5]

I vanlig öltillverkning räknas mjölksyrabakterier som produktförstörande och kan ge upphov till smak och doftförändring, exempelvis kan de skapa svavelväte vars doft kan beskrivas som ruttna ägg [6]. I fallet med suröl introduceras däremot mjölksyrabakterier med flit just för att komma åt den syrliga karaktären som man kämpar emot vid vanlig ölbrygning, och jästen kan i många fall bytas från *Saccharomyces* till en vildjäst som *Brettanomyces*, vilket är fallet i den suröl som produceras hos South Plains Brewery i Malmö [7]. Kriterierna som ska uppfyllas för att en bakterie ska klassas som en mjölksyrabakterie är att vara gram-positiv, ha förmågan att fermentera sockerarter till mestadels mjölksyra, vara katalas-negativ, inte kunna skapa endosporer, inte särskilt rörlig, icke-patogen samt att bakterien ska kunna tillväxa vid låg pH [8].

*Lactobacillus* kan delas in i tre funktionella grupper beroende på deras metabolism, obligat homofermentativa, obligat heterofermentativa och fakultativ heterofermentativa [9].

*Lactobacillus* kallas homofermentativa om de kan omvandla glukos till mjölksyra, medan de kallas heterofermentativa om de omvandlar glukos till mjölksyra, CO<sub>2</sub> och etanol.

*Lactobacillus* är även indelad i sex olika grupper: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. plantarum* och *L. casei* [8]. Mjölksyrabakterierna som bryggaren använder är *Lactobacillus plantarum* 299v samt två olika stammar av *Lactobacillus brevis* [7].

För att starta en mjölksyräjäsning krävs att en råvara som är naturligt rik på sockerarter, till exempel korn vid öltillverkning, förvaras i en anaerob miljö. Bakterier och jäst reproduceras snabbt, vilket ger en ökning av CO<sub>2</sub> då syret används upp samt pH sänks. Lägsta pH för tillväxt av bakterier i livsmedel är >3,0 och *Lactobacillus* är den mest motståndskraftiga bakteriestammen mot lågt pH. I mjölksyrade livsmedel brukar pH vara mellan 3,5–4, vilket ger syrade livsmedel en konserverande effekt eftersom de flesta bakterier inte överlever vid lågt pH. Förutom lågt pH så skapar mjölksyrabakterier en ogynnsam livsmiljö för andra bakterier, genom en framställning av karboxylsyror, väteperoxid, kväveoxid och ”baktericider”. Syrorna sänker inte bara pH utan har även en antimikrobiell effekt. Väte- och kväveoxid oxiderar själva och ger också en mikrobiell effekt. Olika mjölksyrabakterier tillverkar olika baktericider, dessa är ofta peptider med antibiotisk effekt [8].

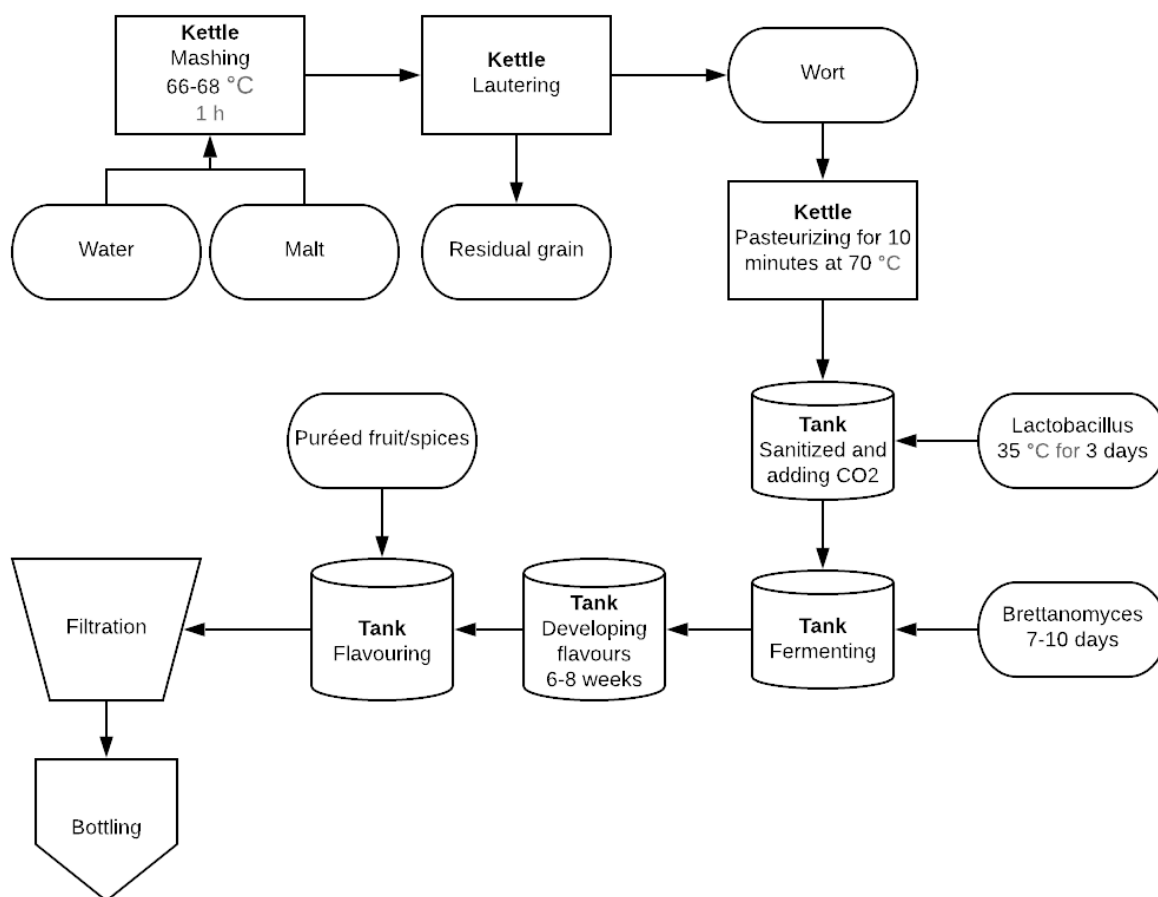
## Probiotika

Idag säger Livsmedelverket följande angående probiotika ”Uttrycket probiotika är ett allmänt hälsopåstående, eftersom själva definitionen av ordet innebär att ämnet eller kombinationen av ämnen har en hälsoeffekt. Idag finns det inga godkända specifika hälsopåståenden för någon av de bakterier eller svampar som brukar betecknas probiotika och därmed är uttrycket inte heller tillåtet i märkning och marknadsföring av livsmedel.” [1]. Teorier om att förbättra hälsan genom att konsumera mat innehållandes vissa bakterier och förändra tarmfloran började på tidigt 1900-tal [10], men fick inte något större genomslag. Det är inte förrän i modern tid som forskning inom ämnet har fått ordentligt med momentum, och många forskningsrapporter finns nu att läsa. Tyvärr är forskare inte överens, och det finns rapporter som både påvisar och förkastar probiotikans effekter. Enligt en publikation från 2016 anser man att probiotika exempelvis kan hjälpa till att upprätthålla en önskvärd tarmflora, konkurrera ut oönskade bakterier, stimulera immunsvaret med mera [11].



## Bryggprocess

Bryggaren Jeffrey Scott Brown på South Plains Brewing Company odlar själv upp sina bakteriekulturer. De köps in från olika ställen, bland annat Humlegården [12]. Vissa kulturer är dock uppodlade från öl som bryggaren provsmakat, sparad, och anser har en god smak eller karaktär.



Figur 2: Figuren visar bryggprocessen för den suröl som är representerad i arbetet [7]. Illustration av Fredrik Andersson och Sandy Koleszar.

Bryggprocessen, som kan ses i figur 2, går till enligt följande: Vatten blandas med pilsner- och vetemalt och mäskas genom att hettas upp till 66–68 °C. Efter en timme omvandlas maltstärkelse till maltsocker. Dravet silas bort och den kvarvarande vätskan, vörten, sätts i bryggverket för att pastöriseras i 10 minuter på 70 °C. Vörten får då en söt smak. En andel av vörten tas åt sidan för att kylas ner och används som näring till bakteriekulturer. De rostfria tankarna som används vid fermenteringen saneras och fylls med CO<sub>2</sub> för att minska mängden tillgängligt syre. Detta för att syre och *Brettanomyces* senare utvecklar ättiksyra, vilket ger

ölen vinägersmak som bryggaren inte eftersträvar. Då ölen inte låts komma i kontakt med syre, så utvecklas istället en sur ananas/citron smak. När vörten överförs till den rostfria fermenteringstanken så tillsätts vatten och mjölksyrabakterier, därefter syras det i tre dagar på 35 °C till pH 3,7. Till tusen liter färdig produkt används 60 liter kultur av mjölksyrabakterier. Alla enskilda bakterie- och jäststammar hålls i separata tankar och ej tillsammans för att olika stammar konkurrerar ut varandra. Starterkulturen med mjölksyrabakterier och jäst blandas varje gång en ny omgång öl ska göras. Därefter tillsätts de olika jäststammarna med *Brettanomyces* och fermenterar i 7–10 dagar vid 20–25 °C. Därefter får det stå i samma temperatur i 6–8 veckor för att utveckla smakerna som bryggaren strävar efter. När smakerna har utvecklats så tillsätts puread frukt och kryddor för smaksättning. Efter 2–3 veckor med smaksättningen så silas frukten bort med ett partikelfilter och den färdiga ölen tappas upp på flaska. Om pH inte är minst 3,7 och har rätt syrlighet så kan det justeras genom att tillsättas fosfor- eller mjölksyra [7].

## Material

### Odling av bakterier

TSA (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), MA (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), MRS (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), VRBD (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), sterila plaströr á 45 ml, vattenbad (Lauda A120S, Tyskland), autoklav (Certoclav, tisch-autoclav, Tyskland), våg (Mettler toledo PB1502, Schweiz), skedar, magnetloppa, värmemagnetomrörare (Heidolph MR 3001 K, Tyskland), glasflaskor 500 ml, e-kolv 1000 ml, destillerat vatten, natriumklorid (Sodium chloride, VWR Chemicals), pepton (LP0037 Bacteriological peptone av Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), etanol, engångshandskar, dragskåp (Holten LaminAir model 1,2, Danmark), sterila petriskålar, provrör á 9 ml, vortex (Kebo-Lab REAX 2000, Tyskland), pipetter, sterila pipettspetsar, fryspåsar, inkubationsskåp (Termaks, Norge), sterila glaskulor á 5 mm, ph-mätare (Kebo-Lab 744 pH meter, Schweiz)

## Polymerase chain reaction

Sterila glaskulor á 2 ml, mikrorör 1,5 ml, Milli-Q vatten, pipetter, sterila pipettspetsar, inoculation loop 10 µl, mixer (Eppendorf, mixer 5432, Tyskland), centrifug (Thermo Scientific, Heraeus Pico 21 centrifuge, Tyskland), kylbox av frigolit, krossad is, fryspåse, provrörshållare, sterilisator (Genlantis CoolCLAVE plus personal sterilizer, USA), PCR vatten, sterila plaströr á 0,2 ml, centrifug (Eppendorf Mini Spin, Tyskland), (Eppendorf Mastercykler gradient, Tyskland), ENV<sub>1</sub> (Eurofins, Tyskland) ENV<sub>2</sub> (Eurofins, Tyskland), TOPTAQ (Qiagen, Danmark), dNTP (Qiagen, Danmark), Buffert (Qiagen, Danmark) våg (Mettler toledo PB1502, Schweiz), sked, Agarose (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), TAE buffert, magnetloppa, Värmemagnetomrörare (Heidolph MR 3001 K, Tyskland), GelRed Nucleic Acid Stain 10,000x (VWR), Bio-rad Powerpac 300 med tillbehör (Bio-rad, USA), vortex (Kebo-Lab REAX 2000, Tyskland), markeringstejp, Orange DNA loading dye (6x) (Thermo Scientific), parafilm, UV Transilluminator (UVP, inc, USA), Gel pilot 100 bp Plus ladder (Qiagen, Danmark)

## Metod

### Beredning av agar och peptonvatten

Torrsubstans för VRBD blandades med destillerat vatten och kokades upp på en värmemagnetomrörare med loppa och läts sjuda i en minut. VRBD blandningen placerades i ett 50 °C vattenbad. Torrsubstans för TSA, MRS och MA samt destillerat vatten blandades samman var för sig i 500 ml flaskor och placerades i autoklaven. De mängder som användes till att göra agarblandningar kan ses i tabell 1. För peptonvatten blandades torrsubstans och destillerat vatten samman i en 500 ml glasflaska och torrsubstansen löstes upp med hjälp av en värmemagnetomrörare med värmen avstängd så att enbart magnetloppan rörde runt lösningen. För 300 ml peptonvatten användes 300 ml destillerat vatten, 2,55 g natriumklorid och 0,3 g pepton. Magnetloppan plockades bort från glasflaskan och peptonvattnet portionerades upp i provrör á 9 ml. Agarblandningarna och provrören med peptonvatten autoklaverades. Flaskorna med agar placerades i vattenbadet och peptonvattnet fick svalna till rumstemperatur för att sedan kylas till 4 °C i kylrum. Dragskåpet spritades och med sterila handskar placerades sterila petriskålar i dragskåpet. Agarn portionerades upp i petriskålar och tilläts stelna. Plattorna förvarades senare i kylrum i max 4 veckor före användning.

Tabell 1: Tabellen visar receptet för att blanda de olika agar som använts i arbetet.

<b>Volym</b>	<b>TSA (g)</b>	<b>MRS (g)</b>	<b>MA (g)</b>	<b>VRBD (g)</b>
<b>200 ml</b>	8	13,64	10	7,9
<b>400 ml</b>	16	27,28	20	15,8

## pH-mätning

De 6 provrören med starterkultur, samt de 6 flaskor med öl som inhämtades vid omgång 2 genomgick en pH-mätning. Starterkulturen och ölen höll en temperatur på 18,7 °C vid mättillfället. Starterkulturens volym var 45 ml, och ölen mättes direkt ur flaska och således var volymen 330 ml. pH- mätaren kalibrerades och mätproben fördes sedan ner i proverna. Proben fick vara kvar i provet tills det uppvisade värdet stabiliserat sig. Proben sköljdes sedan med avjoniserat vatten inför nästa mätning.

## Odling av bakterier

Starterkultur och öl inhämtades från South Plains Brewery. 6 styck sterila plaströr á 45 ml fylldes med starterkultur på plats i bryggeriet och förvarades sedan i kylskåp med en temperatur på 4 °C medan de 6 ölen förvarades i rumstemperatur.

Starterkultur och öl vortexades grundligt innan 1 ml av vätskorna pipetterades till respektive provrör med 9 ml peptonvatten, från provröret pipetterades sedan 1 ml av den vätskan till nästa provrör i spädserien. Detta gjordes tills korrekt spädserie var nådd enligt tabell 2.

Plattorna med agar markerades upp med de förutbestämda spädserierna som var relevanta att odla upp och fick torka i dragskåpet. 0,1 ml vätska pipetterades från respektive provrör i den utvalda spädserien till respektive platta, ca 10 sterila glaskulor hälldes i och spreds runt med en svepande handrörelse. Glaskulorna hälldes av och plattorna paketerades och inkuberades vid respektive temperatur och tid enligt tabell 3. Efter inkubering räknades antalet kolonier på plattorna.

Sammanlagt gjordes 3 olika försök med ny starterkultur och öl. Försök 2 och 3 utfördes direkt efter upphämtning och starterkulturen förvarades således inte i kyla vid dessa tillfällen.

Tabell 2: Tabellen visar de spädserier som använts vid odling av starterkultur och öl på de olika agarsorterna vid olika omgångar.

	Spädserier starterkultur			Spädserier öl		
<b>Omgång 1</b>						
TSA	-5	-6	-7	-1	-2	-3
MRS	-5	-6	-7	-3	-4	-5
VRBD	0	-1	-2	0	-1	-2
Malt	-5	-6	-7	-1	-2	-3
<b>Omgång 2</b>						
TSA	0			0		
MRS	0			0		
VRBD	0			0		
Malt	0			0		
<b>Omgång 3</b>						
TSA	-3	-4	-5			
MRS	-3	-4	-5			
VRBD	0					
Malt	-3	-4	-5			

Tabell 3: Tabellen visar tid och temperatur för inkubation av de olika agarsorterna.

Agar	Inkubationstemperatur	Tid	Påvisar
TSA	30 °C	72 timmar	Totalantal bakterier
MA	Rumstemperatur	7 dygn	Jäst och mögel
MRS	37 °C	72 timmar	<i>Lactobacillus sp.</i>
VRBD	37 °C	24 timmar	<i>Enterobacteriaceae</i>

## Isolering av bakterier

Efter inkubation valdes de plattor vars spädserie som visade ett koloniantal som var högre än 30, men mindre än 300. Från dessa plattor skrapades en så isolerad koloni som möjligt upp med hjälp av en loop och överfördes på nya plattor av samma agartyp som ursprungsplattan genom att strykas ut. Varje prov gjordes i replikat, och för att spara på plattor markerades dessa med en tvärgående linje på utsidan som effektivt delade upp ytan på två halvor.

Därefter inkuberades de i respektive tid och temperatur, se tabell 3. Proceduren upprepades därefter ytterligare en gång. Då VRBD inte visade några resultat och malt påvisar jäst och mögel uteslöts dom från den här delen.

### Extraktion av DNA

Mikrorör á 1,5 ml fylldes med 8 till 10 sterila glaskulor á 2 mm. 1 ml autoklaverat Milli-Q vatten pipetterades till vardera mikrorör. Cirka en halv loop skrapades upp från kolonier som odlats fram vid isolering av bakterier och placerades i mikrorören som sedan vortexades. Mikrorören placerades sedan i en skak i 30 minuter för att frigöra DNA. Efter 30 minuter placerades mikrorören i en centrifug där rören centrifugerades i 14 800 varv per minut (rpm), i en minut.

### Polymerase chain reaction

En kylbox av frigolit fylldes med krossad is och en provrörshållare för små rör á 0,2 ml placerades uppe på isen. Provrör och pipetter steriliserades med hjälp av UV-ljus i en sterilisator och rören placerades i provrörshållaren. En masterblandning tillverkades enligt receptet i tabell 4. 22,5 µl av masterblandningen samt 2,5 µl prov innehållande extraherat DNA från mikrorören pipetterades i rören á 0,2 ml. 2,5 µl PCR vatten pipetterades till ett provrör märkt N för att agera negativ kontroll. Rören centrifugerades i centrifug i sju sekunder. Rören placerades i PCR-maskin, där programmet för 25 cykler (TOPTAQ25) användes.

Tabell 4: Tabellen visar receptet för 1x masterblandning som användes vid PCR.

Ingrediens	Volym (µl)	Förvaring
Nukleasfritt vatten	18,375	Rumstemperatur
Buffert	2,5	Frys
dNTP	0,5	Frys
ENV <sub>1</sub>	0,5	Frys
ENV <sub>2</sub>	0,5	Frys
Toptaq (Enzym)	0,125	Frys

## Gelelektrofores

För att se om PCR reaktionen fungerat skapades en gel bestående av 0,75 g Agarose samt 50 ml TAE buffert. Blandningen kokades under 1 minut och omrördes med hjälp av en magnetloppa, och fick därefter svalna till 50 °C. En gjutform för ändamålet tejpad på långsidorna och en kam placerades. Gelen hölls i formen och eventuella bubblor och partiklar plockades bort med en steril pipettspets. Efter cirka 10 minuter hade gelen stelnat och tejpens avlägsnades från gjutformen. Vannan fylldes till hälften med TAE-buffert och gelen placerades i tanken, ytterligare TAE-buffert hölls i för att täcka gelen och kameran avlägsnades. 1,5 µl av Gel pilot 100 bp Plus laddar pipetterades och placerades i den första brunnen av 20 i gelen. Prickar av 1 µl Orange DNA loading dye (6x) placerades på parafilm. 2,5 µl prov blandades med en prick av Orange DNA loading dye (6x) för att sedan pipetteras ned i brunnarna i gelen. Detta steget upprepades för samtliga prov och den negativa kontrollen. Tanken förseddes med lock och tillhörande sladdar kopplades in i en Bio-rad Powerpac 300. Enheten ställdes in på 120 volt i 60 minuter och startades. Efter 60 minuter kopplades sladdarna bort, locket avlägsnades och gelen plockades upp för avrinning. Gelen togs till ett mörkrum där den placerades i ett färgbad innehållandes 100 ml destillerat vatten och 30 µl GelRed Nucleic Acid Stain 10,000x i 15 minuter. Därefter placerades gelerna i en UV Transilluminator för att se om PCR reaktionen hade fungerat eller ej och en bild togs med den tillhörande kameran, se figurerna 7, 8, 9 och 10 i bilagan. De proverna som visade resultat pipetterades från sina 0,2 µl rör till en platta med 96 brunnar och skickades med post till Eurofins Genomics laboratorium i Tyskland för sekvensering.

## Sekvensering

Resultaten från sekvenseringen inkom genom e-post med tillhörande filer. Filerna öppnades i mjukvaran BioEdit Sequence Alignment Editor, ett program som används för att granska och redigera de DNA-sekvenser som finns i resultatfilerna. De 15 första basparen, samt de som översteg 600 klipptes bort. Med hjälp av ett webbaserat verktyg, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [13], analyserades sekvenserna i de 16 proverna för att bestämma vilka bakterier de innehöll, vilket kan ses i tabell 6. När programmet analyserat färdigt sekvensen presenteras en lista som visar sannolikhet i procent på olika bakterier. Är procentandelen högre än 95 % så är det med stor säkerhet den bakterien i provet.

## Resultat

### pH-mätning

Den färdigbryggda ölen ska enligt bryggmästare Jeffrey Scott Brown ha ett högsta pH-värde på 3,7. Vid mätning av ölen var snittet 3.16 ( $\pm 0,029$ ), och mätning på starterkulturen 3.08 ( $\pm 0,0082$ ). Se tabell 5 för mätningarna.

Tabell 5: Tabellen visar de pH-värden som uppmätts från 6 olika prover av starterkultur och öl.

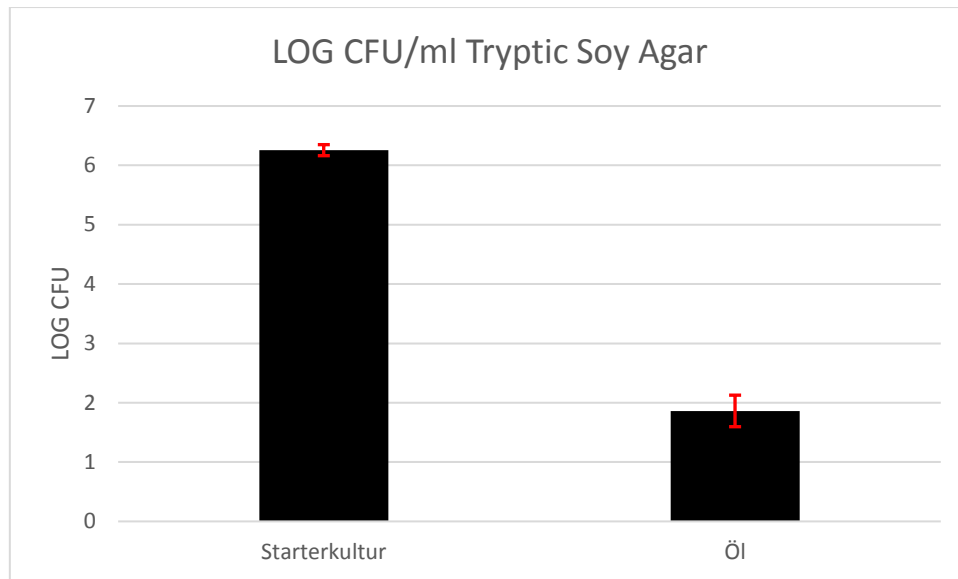
Öl		Starterkultur	
Prov	pH-värde	Prov	pH-värde
1	3,16	1	3,09
2	3,17	2	3,07
3	3,18	3	3,07
4	3,18	4	3,08
5	3,10	5	3,08
6	3,18	6	3,09

### Bakterieinnehåll i starterkultur och öl

De planerade spädserierna uppvisade för lite tillväxt av bakterier vid omgång 1, och korrigerades tills ett önskvärt resultat uppnåts i omgång 2 och 3, dessa spädserier kan ses i tabell 2.

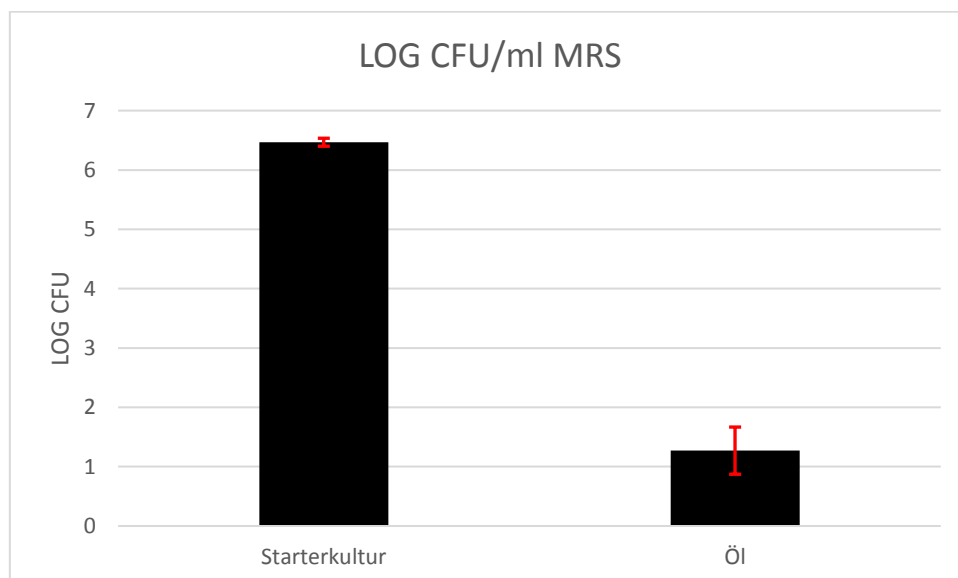
Merparten av tillväxten på plattor med Tryptic Soy Agar var små till medelstora runda prickar, hade till stor del beige färgning, och några få hade en orange eller gul ton. En av plattorna hade en koloni med mögel. Antalet räknade kolonier för varje platta kan ses i tabellerna 8, 12 och 15 i bilagan. Antalet log (CFU/ml) beräknades för starterkulturen vid en spädning på 10 000 gånger och fick då ett medelvärde på 6.25 ( $\pm 0,092$ ) log (CFU/ml), och för ölen beräknades antalet utan spädning och medelvärdet blev 1.86 ( $\pm 0,27$ ) log (CFU/ml) vilket kan ses i figur 3.





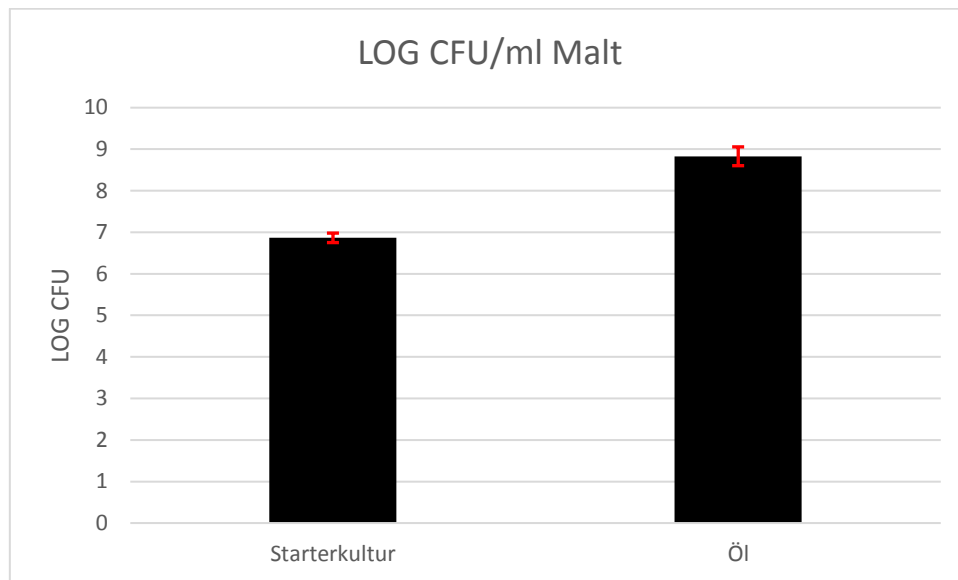
Figur 3: Figuren visar LOG CFU per ml i starterkultur respektive suröl odlad på plattor med Tryptic Soy Agar

Likt TSA så var tillväxten på plattorna med MRS mestadels små till medelstora runda prickar med beige färg, och ett litet antal med gula eller orangea prickar. Tre av plattorna innehöll även 1 till 3 kolonier med mögel. Antalet kolonier på plattorna kan ses i tabellerna 9, 13 och 16 i bilagan. Antalet log (CFU/ml) för starterkulturen beräknades vid en spädning på 10 000 gånger och medelvärdet hamnade på  $6.47 (\pm 0,067)$  log (CFU/ml), och för ölen beräknades antalet utan spädning och medelvärdet blev  $1.27 (\pm 0,40)$  log (CFU/ml) vilket kan ses i figur 4.



Figur 4: Figuren visar LOG CFU per ml i starterkultur respektive suröl odlad på plattor med MRS

På plattorna med malt-agar var kolonierna även här små till medelstora runda prickar med beige färg, det förekom även i mindre utsträckning mögel på två av plattorna. Antalet kolonier på plattorna kan ses i tabellerna 7, 11 och 15 i bilagan. Antalet log (CFU/ml) för starterkulturen beräknades vid en spädning på 10 000 gånger och medelvärdet hamnade på  $6.86 (\pm 0,11)$  log (CFU/ml), och för ölen beräknades antalet vid en spädning på 1 000 000 gånger och medelvärdet blev  $8.83 (\pm 0,22)$  log (CFU/ml) vilket kan ses i figur 5.



Figur 5: Figuren visar LOG CFU per ml i starterkultur respektive suröl odlad på plattor med Malt Agar

Plattorna med VRBD visade ingen tillväxt av *Enterobacteriaceae*.

## Sekvensering

Av de 44 proverna var det bara 16 som visade band efter sammanlagt 5 separata försök av PCR och gelelektrofores. Resultatet från sekvensering av dessa 16 prov kan ses i tabell 6. Endast 7 av de 16 proven hade tillräckligt många baspar,  $\geq 600$ , för att ge ett tillförlitligt resultat. 2 av resultaten gick inte att öppna i BioEdit.

Tabell 6: Tabellen visar vilken sannolikhet i procent att det är den namngivna bakterien i provet enligt BLAST [12]. \* = Baspar

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)			
Prov	Agar	Bakterie	Sannolikhet
Öl 1-1	TSA	Bp* <600	
Öl 1-2	TSA	<i>Paenibacillus</i>	100,00 %
Öl 2-1	TSA	<i>Lysinibacillus odysseyi</i>	100,00 %
Öl 2-2	TSA	Bp* <600	
Öl 3-1	TSA	<i>Bacillus sp</i> (Bp* <600)	88,13 %
Öl 3-2	TSA	Bp* <600	
Öl 4-1	TSA	Ingen data	
Öl 4-2	TSA	Bp* <600	
Öl 5-1	TSA	Ingen data	
Öl 6-2	TSA	<i>Bacillus simplex</i>	99,83 %
Starter 1	TSA	<i>Bacillus sp</i> (Bp* <600)	100,00 %
Öl 1-1	MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,49 %
Öl 1-2	MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97,61 %
Öl 1-3	MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99,32 %
Öl 3-1	MRS	<i>Bacillus sp</i> (Bp* <600)	100,00 %
Öl 3-2	MRS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	98,80 %

## Diskussion och slutsatser

Suröl är en väldigt gammal produkt, till och med den äldsta om man ser till öl [3]. Det har länge varit stor skillnad på praktisk och teoretisk kunskap om själva bryggprocessen och vilka mikroorganismer som är inblandade. I Sverige har surölen fram tills nu haft låg popularitet jämfört med andra ölsorter, vilket bland annat beror på att bryggerierna är rädda att kontaminera sin utrustning och förstöra andra produkter. Med framfarten av mikrobryggerier har dock scenen förändrats och allt fler sorters öl och andra drycker tar sin plats i hyllorna på Systembolaget. Tack vare ett ökat utbud och större tillgänglighet fick vi chansen att undersöka den mikrobiologiska sidan av suröl. När man studerar resultaten från laborationerna kan man se att antalet bakterier och framförallt mjölksyrabakterierna sjunker i antal i färdig produkt gentemot starterkulturen, medan andelen jäst ökar. Anledningen till detta kan bero på ett flertal faktorer, exempelvis att jästen äter upp näring och konkurrerar ut bakterierna samt att pH-värdet och alkoholhalten är en ogynnsam miljö för tillväxt. Det låga pH-värdets effekt på tillväxt kan dock ses som något positivt ur en hygiensynpunkt då ett pH-värde under 4 även kan förhindra att skadliga bakterier får chans att växa och i sin tur påverka hälsan negativt hos konsumenten. På plattorna med VRBD såg det till en början ut att vara någon form av tillväxt, vilket varken handledare eller andra tillfrågade kunde förklara. De misstänka kolonierna skrapades därefter och försökte odlas upp på nya plattor men visade ingen tillväxt. Detta fenomen visade sig varje gång ospädda prover lades på plattorna (se fig 6 i bilaga). I slutändan räknades alla plattor som ingen tillväxt, vilket kan ses i tabellerna 10, 14 och 16 i bilagan. Andelen potentiella mjölksyrabakterier i surölen,  $1.27 (\pm 0,40) \log$  (CFU/ml), får anses som låg när man jämför de mängder som används i forskningsstudier på probiotika, där doseringen till deltagarna är mycket högre [14]. Vid det första odlingsförsöket hade starterkulturen förvarats i kylskåp under en veckas tid, något vi senare förstod var ogynnsamt och kunde påverka resultaten, av den anledningen hämtades nya prover som användes samma dag utan förvaring i kyla. Inför extraktionen av DNA från plattor med MRS så tillsattes inte vatten på anaerokultplattan som skall placeras inuti den anaeroba behåller där proverna förvaras under inkubationen. Detta kan i sin tur ha påverkat tillväxten negativt, men tillväxten såg bra ut och valdes efter rådgivning att användas. Vid försöken att få ut mer DNA ur våra prover, PCR, så misslyckades detta ett antal gånger, något som syns på gelerna efter elektrofores och i tabellerna 17–21 i bilagan. Först trodde vi att det var ett handhavandefel, men efter två misslyckade försök började vi fundera på om vi gjort något misstag vid tillverkningen av masterblandning, eller om reagenterna på något sätt inte

längre fyllde sin funktion på grund av ålder, förorening eller andra orsaker. Efter ytterligare två misslyckade försök där reagenterna inte längre ansågs ansvariga drogs slutsatsen att 28 av de 44 proverna som inte visat resultat kan ha varit jäst, eller att koncentrationen DNA efter utförd PCR inte var tillräcklig. Endast 7 av de 16 proverna som sekvenserades hade tillräckliga data för att ge en bra analys. Det som får anses väldigt intressant är de proverna som var tagna från öl och odlade på MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar, ämnad för *Lactobacilli*), här visade 4 av 5 prov att bakterien var *Lactobacillus paracasei*, och inte *Lactobacillus plantarum* 299v, eller *Lactobacillus brevis* som bryggaren tillsätter i processen. Vad detta beror på kan vi inte mer än spekulera i utan att utöka arbetet med fler laborationer, men en möjlighet är att *L. paracasei* kommer från någon av de öl som bryggaren sparar och använt som vi nämner i avsnittet bryggprocess. Kanske har *L. paracasei* bättre förmåga att överleva i den aktuella miljön, eller så är antalet prover för liten för att ge ett rättvist svar rent statistiskt, kanske hade vi sett andra stammar om antalet sekvenseringar varit högre. Då vi inte kan vara säkra på att alla kolonier som räknats på exempelvis MRS plattorna faktiskt är mjölksyrabakterier så kan resultaten i rapporten vara ännu lägre än det som rapporterats. Då halten av levande mjölksyrabakterier är mycket lägre än de mängder som återfinns i produkter som marknadsförs som probiotiska, eller används vid forskningsstudier kan vi sannolikt konstatera att eventuella probiotiska egenskaper för surölen i denna rapport får anses svag eller obefintlig.

## Referenser

1. Livsmedelsverket. *Hälsopåståenden, Probiotika*. (2019-02-13)  
<https://www.livsmedelsverket.se/produktion-handel--kontroll/livsmedelsinformation-markning-och-pastaenden/halsopastaenden/halsopastaenden#H%C3%A4lsop%C3%A5st%C3%A5enden%20m%C3%A5ste%20vara%20godk%C3%A4nda%20av%20EU-kommissionen> (2019-05-14)
2. Yongzhi Yang et al. *The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a randomized controlled trial*. *Oncotarget*, Vol.7, No.7.
3. Science Meets Food. *A brief history of sour beer*. <http://sciencemeetsfood.org/science-sour-beer/?fbclid=IwAR1QXQ7rPk3AZOdDpRiP25TrvzdV3LWA9BbY05hTiFsRLaE7csMEdxI3zOE> (2019-05-16)
4. FAO Food and Nutrition Paper. *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. (2006) <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> (2019-05-16)
5. Bokulich NA, Bamforth CW, Mills DA. 2012. *A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70:150–162.
6. Pierre-Edouard Fournier et al. *Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of Mycobacterium species*. *New Microbes New Infect.* 2018 Mar; 22: 24–29.
7. Jeffrey Scott Brown på South Plains Brewing i Malmö.
8. Göran Molin. *Lectures in probiotics. Physiologic & physiopathologic effects of the human microbiota*. (2013) <https://molinsbocker.files.wordpress.com/2015/12/pdf-lectures-in-probiotics.pdf> (2019-05-23)
9. Valérie Coeuret et al. *Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products*. *Le Lait*, INRA Editions, 2003, 83 (4), pp.269-306. 10.1051/lait:2003019. hal-00895504

10. Metchnikoff, E. (1908). *The Prolongation of Life. Optimistic Studies*. New York: G.P. Putnam's sons.
11. U.S. Department of Health and Human Services. *Probiotics: In Depth*. (2018-07-18)  
<https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm> (2019-05-22)
12. Humlegårdens Ekolager. <https://shop.humle.se/> (2019-05-14)
13. U.S. National Library of Medicine. *Standard Nucleotide BLAST*.  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (2019-05-22)
14. Prabha Sawant et al. *Clinical trial: Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome*. World J Gastroenterol 2012 August 14; 18(30): 4012-4018

## Bilagor

Tabell 7: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen malt.

		Starterkultur 1				Öl A	
Agar	Malt			Agar	Malt		
Replikat	1	2		Replikat	1	2	
Spädning				Spädning			
1 -5	2	0		1 -1	300+	300+	
1 -6	0	0		1 -2	96	81	
1 -7	0	0		1 -3	1	0	
2 -5	0	0		2 -1	300+	300+	
2 -6	0	1		2 -2	152	104	
2 -7	0	0		2 -3	4	5	
3 -5	1	0		3 -1	300+	208	
3 -6	0	0		3 -2	35	25	
3 -7	0	0		3 -3	2	5	
4 -5	1	0		4 -1	300+	300+	
4 -6	0	0		4 -2	58	46	
4 -7	0	0		4 -3	2	1	
5 -5	1	3		5 -1	300+	300+	
5 -6	0	0		5 -2	300+	300+	
5 -7	0	0		5 -3	46	57	
6 -5	0	1		6 -1	300+	300+	
6 -6	0	0		6 -2	96	72	
6 -7	0	0		6 -3	1	4	



Tabell 8: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen TSA.

Starterkultur 1			Öl A		
Agar	TSA		Agar	TSA	
Replikat	1	2	Replikat	1	2
Spädning			Spädning		
1 -5	0	0	1 -1	1	2 + 1
1 -6	0	0	1 -2	1	0
1 -7	0	0	1 -3	0	0
2 -5	0	1	2 -1	1	0
2 -6	0	0	2 -2	0	0
2 -7	0	0	2 -3	1	0
3 -5	0	0	3 -1	0	0
3 -6	0	1	3 -2	0	0
3 -7	0	0	3 -3	0	0
4 -5	0	3	4 -1	0	2
4 -6	0	0	4 -2	0	0
4 -7	0	0	4 -3	0	0
5 -5	0	0	5 -1	0	0
5 -6	0	0	5 -2	0	0
5 -7	0	0	5 -3	0	0
6 -5	0	0	6 -1	1	1
6 -6	0	0	6 -2	1	0
6 -7	0	1	6 -3	0	23

Tabell 9: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen MRS.

Starterkultur 1			Öl A		
Agar	MRS		Agar	MRS	
Replikat	1	2	Replikat	1	2
Spädning			Spädning		
1 -5	0	0	1 -3	0	0
1 -6	0	0	1 -4	0	0
1 -7	0	0	1 -5	0	0
2 -5	0	0	2 -3	0	0
2 -6	0	0	2 -4	0	0
2 -7	0	0	2 -5	0	0
3 -5	0	0	3 -3	0	0
3 -6	0	0	3 -4	0	0
3 -7	0	0	3 -5	0	0
4 -5	0	0	4 -3	0	0
4 -6	0	0	4 -4	0	0
4 -7	0	0	4 -5	0	0
5 -5	0	0	5 -3	0	0
5 -6	0	0	5 -4	0	0
5 -7	0	0	5 -5	0	0
6 -5	0	0	6 -3	0	0
6 -6	0	0	6 -4	0	0
6 -7	0	0	6 -5	0	0

Tabell 10: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen VRBD.

Starterkultur 1			Öl A		
Agar	VRBD		Agar	VRBD	
Replikat	1	2	Replikat	1	2
Spädning			Spädning		
1 -0	0	0	1 -0	0	0
1 -1	0	0	1 -1	0	0
1 -2	0	0	1 -2	0	0
2 -0	0	0	2 -0	0	0
2 -1	0	0	2 -1	0	0
2 -2	0	0	2 -2	0	0
3 -0	0	0	3 -0	0	0
3 -1	0	0	3 -1	0	0
3 -2	0	0	3 -2	0	0
4 -0	0	0	4 -0	0	0
4 -1	0	0	4 -1	0	0
4 -2	0	0	4 -2	0	0
5 -0	0	0	5 -0	0	0
5 -1	0	0	5 -1	0	0
5 -2	0	0	5 -2	0	0
6 -0	0	0	6 -0	0	0
6 -1	0	0	6 -1	0	0
6 -2	0	0	6 -2	0	0



Figur 6: Figuren visar en VRBD platta med misstänkt tillväxt, efter rådfrågning bedömdes det som missfärgning och reaktion mellan agar och prov.

Tabell 11: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen malt.

Starterkultur 2			Öl B			
Agar	Malt		Agar	Malt		
Replik	1	2	Replik	1	2	
Spädning			Spädning			
1 -0	300+	300+	1 -0	300+	300+	
2 -0	300+	300+	2 -0	300+	300+	
3 -0	300+	300+	3 -0	300+	300+	
4 -0	300+	300+	4 -0	300+	300+	
5 -0	300+	300+	5 -0	300+	300+	
6 -0	300+	300+	6 -0	300+	300+	

Tabell 12: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen TSA.

		Starterkultur 2				Öl B	
Agar	TSA			Agar	TSA		
Replikat	1	2		Replikat	1	2	
Spädning				Spädning			
1 -0	1	1		1 -0	14	12	
2 -0	1	0		2 -0	5	12	
3 -0	1	0		3 -0	15	4	
4 -0	1	0		4 -0	9	5	
5 -0	2	2		5 -0	2	0	
6 -0	2	0		6 -0	11	5	

Tabell 13: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen MRS.

		Starterkultur 2				Öl B	
Agar	MRS			Agar	MRS		
Replikat	1	2		Replikat	1	2	
Spädning				Spädning			
1 -0	300+	300+		1 -0	18	1	
2 -0	300+	300+		2 -0	1	0	
3 -0	300+	300+		3 -0	2	1	
4 -0	300+	300+		4 -0	2	2	
5 -0	300+	300+		5 -0	0	0	
6 -0	300+	300+		6 -0	1	0	

Tabell 14: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur och öl odlade på agartypen VRBD.

		Starterkultur 2				Öl B	
Agar	VRBD			Agar	VRBD		
Replikat	1	2		Replikat	1	2	
Spädning				Spädning			
1 -0	0	0		1 -0	0	0	
2 -0	0	0		2 -0	0	0	
3 -0	0	0		3 -0	0	0	
4 -0	0	0		4 -0	0	0	
5 -0	0	0		5 -0	0	0	
6 -0	0	0		6 -0	0	0	

Tabell 15: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur odlade på agartypen malt och TSA.

		Starterkultur 3				Starterkultur 3	
Agar	Malt			Agar	TSA		
Replikat	1	2		Replikat	1	2	
Spädning				Spädning			
1 -3	340	296		1 -3	111	72	
1 -4	49	45		1 -4	21	19	
1 -5	9	3		1 -5	5	4	
2 -3	232	8		2 -3	114	76	
2 -4	58	55		2 -4	11	16	
2 -5	4	5		2 -5	2	2	
3 -3	240	236		3 -3	126	115	
3 -4	80	84		3 -4	13	23	
3 -5	5	10		3 -5	5	3	
4 -3	436	452		4 -3	179	144	
4 -4	96	87		4 -4	21	17	
4 -5	5	14		4 -5	2	3	
5 -3	472	556		5 -3	121	145	
5 -4	85	90		5 -4	18	20	
5 -5	11	14		5 -5	5	2	
6 -3	548	400		6 -3	115	141	
6 -4	99	82		6 -4	23	19	
6 -5	6	17		6 -5	5	3	

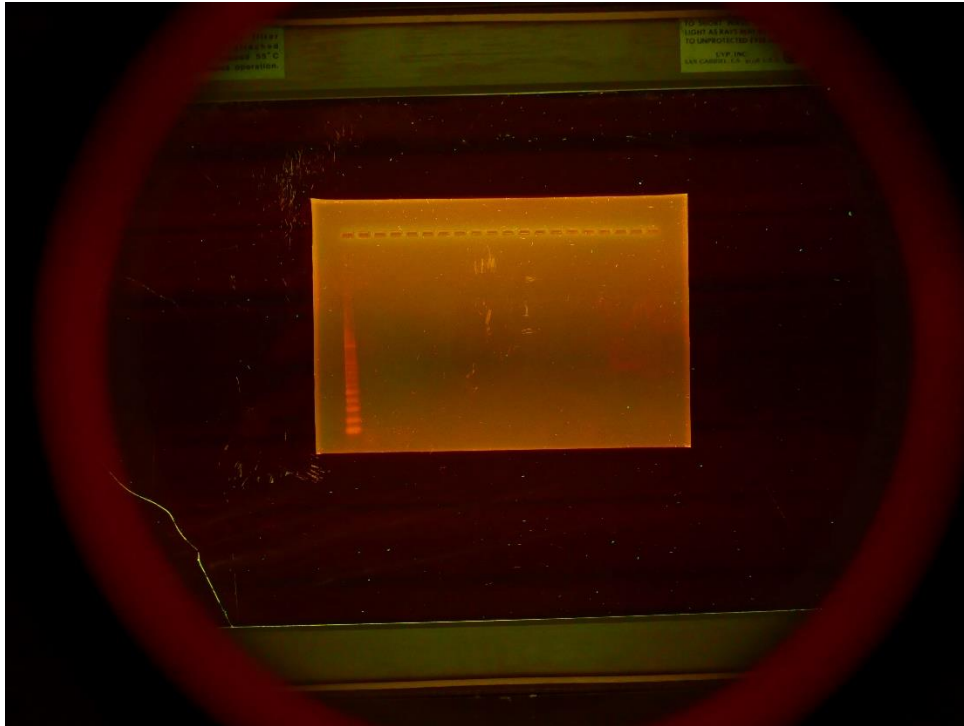
Tabell 16: Tabellen visar antalet räknade kolonier vid olika spädserier, i replikat, för plattor med starterkultur odlade på agartypen MRS och VRBD.

		Starterkultur 3				Starterkultur 3	
Agar		MRS		Agar		VRBD	
Replikat		1	2	Replikat		1	2
Spädning				Spädning			
1 -3		252	272	1 -0		0	0
1 -4		30	33	2 -0		0	0
1 -5		27	1	3 -0		0	0
2 -3		300+	300+	4 -0		0	0
2 -4		24	30	5 -0		0	0
2 -5		3	5	6 -0		0	0
3 -3		300+	300+				
3 -4		41	28				
3 -5		3	5				
4 -3		300+	300+				
4 -4		24	30				
4 -5		5	9				
5 -3		300+	300+				
5 -4		28	36				
5 -5		2	3				
6 -3		300+	300+				
6 -4		25	27				
6 -5		1	2				



Tabell 17: Tabellen visar negativt (-) eller positivt (+) resultat vid gelelektrofores för gel 1,2 och 3.

PCR och gelelektrofores för S (Starter) och Ö (Öl) från TSA och MRS						
Brunn	Gel 1	Resultat	Gel 2	Resultat	Gel 3	Resultat
1	Stege	+	Stege	+	Stege	+
2	TSA S 1-1	-	MRS S 1-1	-	TSA Ö 1-1	-
3	TSA S 1-2	-	MRS S 1-2	-	TSA Ö 1-2	-
4	TSA S 2-1	-	MRS S 2-1	-	TSA Ö 2-1	-
5	TSA S 2-2	-	MRS S 2-2	-	TSA Ö 2-2	-
6	TSA S 3-1	-	MRS S 3-1	-	TSA Ö 3-1	-
7	TSA S 3-2	-	MRS S 3-2	-	TSA Ö 3-2	-
8	TSA S 4-1	-	MRS S 4-1	-	TSA Ö 4-1	-
9	TSA S 4-2	-	MRS S 4-2	-	TSA Ö 4-2	-
10	TSA S 5-1	-	MRS S 5-1	-	TSA Ö 5-1	-
11	TSA S 5-2	-	MRS S 5-2	-	TSA Ö 6-1	-
12	TSA S 6-1	-	MRS S 6-1	-	TSA Ö 6-2	-
13	TSA S 6-2	-	MRS S 6-2	-		
14			MRS Ö 6	-		
15			MRS Ö 4- 2	-		
16	MRS Ö 1-1	-	MRS Ö 4- 1	-		
17	MRS Ö 1-2	-	MRS Ö 3- 1	-		
18	MRS Ö 1-3	-				
19	MRS Ö 2	-				
20	MRS Ö 3-2	-				

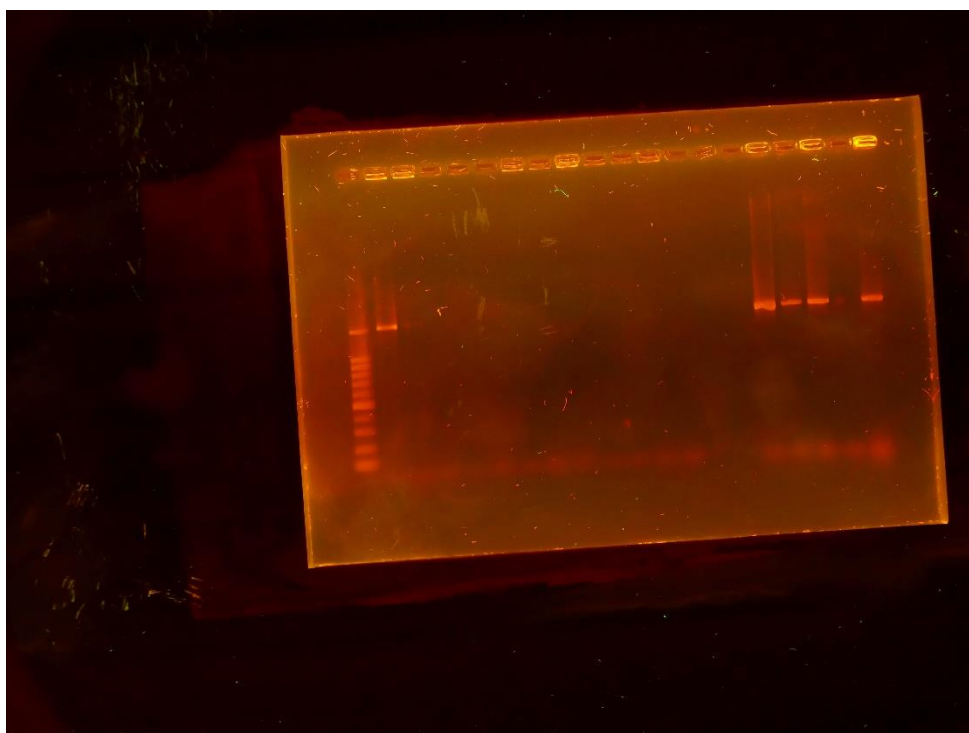


Figur 7: Figuren visar en gel efter gelelektrofores i en transilluminator, på bilden syns endast banden på stegen till vänster i brunn 1, och inga band i de resterande brunnarna.

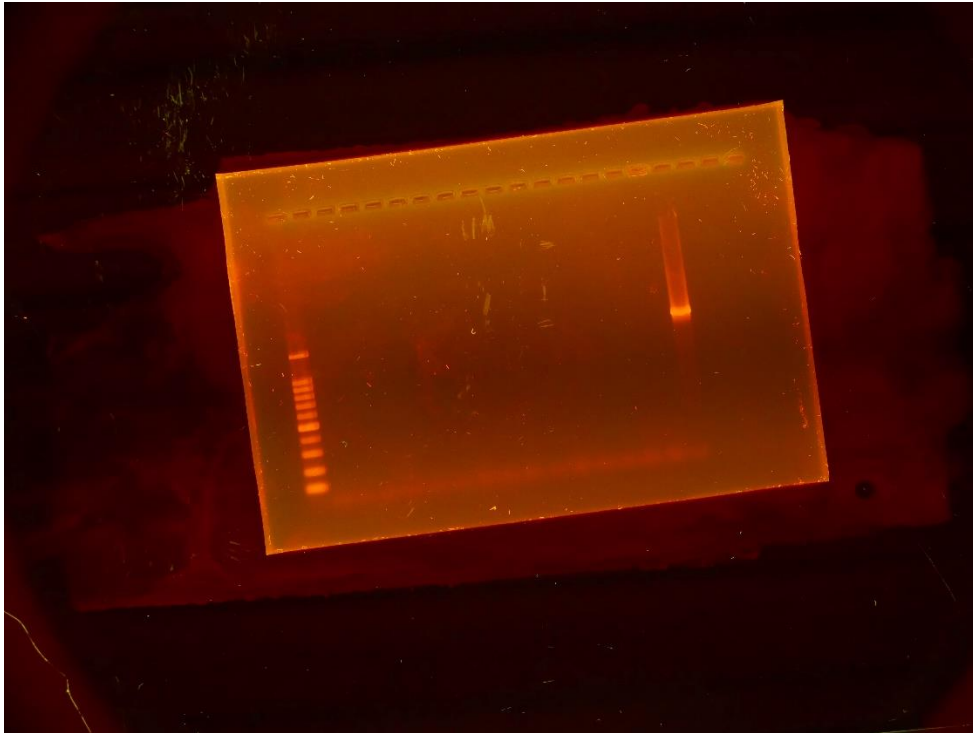
Tabell 18: Tabellen visar negativt (-) eller positivt (+) resultat vid gelelektrofores för gel 3,4 och 5.

PCR och gelelektrofores för S (Starter) och Ö (Öl) från TSA och MRS						
Brunn	Gel 4	Resultat	Gel 5	Resultat	Gel 6	Resultat
1	Stege	+	Stege	+	Stege	+
2	TSA S 1-1	+	MRS S 1-1	-	TSA Ö 1-1	+
3	TSA S 1-2	-	MRS S 1-2	-	TSA Ö 1-2	+
4	TSA S 2-1	-	MRS S 2-1	-	TSA Ö 2-1	+
5	TSA S 2-2	-	MRS S 2-2	-	TSA Ö 2-2	+
6	TSA S 3-1	-	MRS S 3-1	-	TSA Ö 3-1	+
7	TSA S 3-2	-	MRS S 3-2	-	TSA Ö 3-2	+
8	TSA S 4-1	-	MRS S 4-1	-	TSA Ö 4-1	+
9	TSA S 4-2	-	MRS S 4-2	-	TSA Ö 4-2	+
10	TSA S 5-1	-	MRS S 5-1	-	TSA Ö 5-1	+
11	TSA S 5-2	-	MRS S 5-2	-	TSA Ö 6-1	-
12	TSA S 6-1	-	MRS S 6-1	-	TSA Ö 6-2	+
13	TSA S 6-2	-	MRS S 6-2	-		

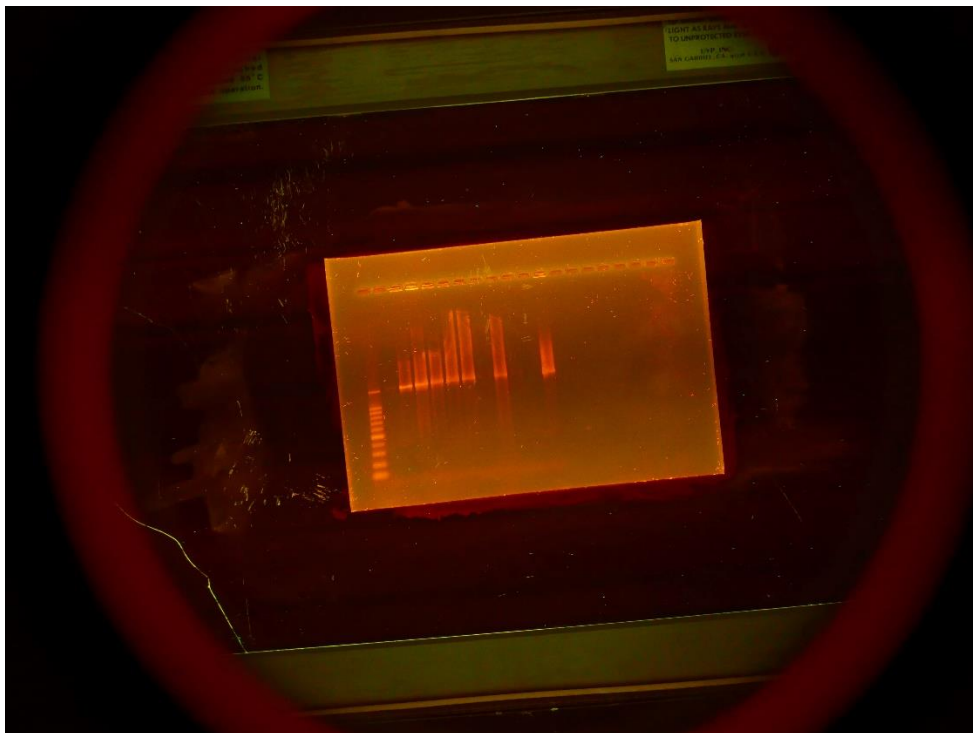
14			MRS Ö 6	-		
15			MRS Ö 4-2	-		
16	MRS Ö 1-1	+	MRS Ö 4-1	-		
17	MRS Ö 1-2	+	MRS Ö 3-1	+		
18	MRS Ö 1-3	+				
19	MRS Ö 2					
20	MRS Ö 3-2	+				



*Figur 8:* Figuren visar gel 4 i tabell 18.



*Figur 9:* Figuren visar gel 5 i tabell 18.



*Figur 10:* Figuren visar gel 6 i tabell 18.

Tabell 19: Tabellen visar negativt (-) eller positivt (+) resultat vid gelelektrofores för gel 7 och 8 samt vilka brunnar proverna är fördelade i.

PCR och gelelektrofores för S (Starter) och Ö (Öl) från TSA och MRS						
Brunn	Gel 7	Resultat	Gel 8	Resultat		
1	Stege	+	Stege	+		
2	MRS S 1-1	-	TSA S 1-2	-		
3	MRS S 1-2	-	TSA S 2-1	-		
4	MRS S 2-1	-	TSA S 2-2	-		
5	MRS S 2-2	-	TSA S 3-1	-		
6	MRS S 3-1	-	TSA S 3-2	-		
7	MRS S 3-2	-	TSA S 4-1	-		
8	MRS S 4-1	-	TSA S 4-2	-		
9	MRS S 4-2	-	TSA S 5-1	-		
10	MRS S 5-1	-	TSA S 5-2	-		
11	MRS S 5-2	-	TSA S 6-1	-		
12	MRS S 6-1	-	TSA S 6-2	-		
13	MRS S 6-2	-				
14	MRS Ö 2	-				
15	MRS Ö 4-1	-				
16	MRS Ö 4-2	-				
17	MRS Ö 6	-				
18	TSA Ö 6-1	-				
19	Negativ	-				
20						

Tabell 20: Tabellen visar negativt (-) eller positivt (+) resultat vid gelelektrofores för gel 9 och 10 samt vilka brunnar proverna är fördelade i.

PCR och gelelektrofores för S (Starter) och Ö (Öl) från TSA och MRS						
Brunn	Gel 9	Resultat	Gel 10	Resultat		
1	Stege	+	Stege	+		
2	MRS S 1-1	-	TSA S 1-2	-		
3	MRS S 1-2	-	TSA S 2-1	-		
4	MRS S 2-1	-	TSA S 2-2	-		
5	MRS S 2-2	-	TSA S 3-1	-		
6	MRS S 3-1	-	TSA S 3-2	-		
7	MRS S 3-2	-	TSA S 4-1	-		
8	MRS S 4-1	-	TSA S 4-2	-		
9	MRS S 4-2	-	TSA S 5-1	-		
10	MRS S 5-1	-	TSA S 5-2	-		
11	MRS S 5-2	-	TSA S 6-1	-		
12	MRS S 6-1	-	TSA S 6-2	-		
13	MRS S 6-2	-				
14	MRS Ö 2	-				
15	MRS Ö 4-1	-				
16	MRS Ö 4-2	-				
17	MRS Ö 6	-				
18	TSA Ö 6-1	-				
19	Negativ	-				
20						

Tabell 21: Tabellen visar negativt (-) eller positivt (+) resultat vid gelelektrofores för gel 11 och 12 samt vilka brunnar proverna är fördelade i.

PCR och gelelektrofores för S (Starter) och Ö (Öl) från TSA och MRS						
Brunn	Gel 11	Resultat	Gel 12	Resultat		
1	Stege	+	Stege	+		
2	MRS S 1-1	-	TSA S 1-2	-		
3	MRS S 1-2	-	TSA S 2-1	-		
4	MRS S 2-1	-	TSA S 2-2	-		
5	MRS S 2-2	-	TSA S 3-1	-		
6	MRS S 3-1	-	TSA S 3-2	-		
7	MRS S 3-2	-	TSA S 4-1	-		
8	MRS S 4-1	-	TSA S 4-2	-		
9	MRS S 4-2	-	TSA S 5-1	-		
10	MRS S 5-1	-	TSA S 5-2	-		
11	MRS S 5-2	-	TSA S 6-1	-		
12	MRS S 6-1	-	TSA S 6-2	-		
13	MRS S 6-2	-				
14	MRS Ö 2	-				
15	MRS Ö 4-1	-				
16	MRS Ö 4-2	-				
17	MRS Ö 6	-				
18	TSA Ö 6-1	-				
19	Negativ	-				
20						

Tabell 22: Tabellen visar uträkning av medelvärden, standardavvikelse samt log (CFU/ml) för starterkultur och öl på olika agartyper.

Starterkultur	-4	Öl	0	Starterkultur	-4	Öl	0
	LOG CFU / ml		LOG CFU / ml		LOG CFU / ml		LOG CFU / ml
<b>TSA</b>		<b>TSA</b>		<b>MRS</b>		<b>MRS</b>	
21	6.322219295	14	2.146128036	30	6.477121255	18	2.255272505
11	6.041392685	5	1.698970004	24	6.380211242	1	1
13	6.113943352	15	2.176091259	41	6.612783857	2	1.301029996
21	6.322219295	9	1.954242509	24	6.380211242	2	1.301029996
18	6.255272505	2	1.301029996	28	6.447158031	0	
23	6.361727836	11	2.041392685	25	6.397940009	1	1
19	6.278753601	12	2.079181246	33	6.51851394	1	1
16	6.204119983	12	2.079181246	30	6.477121255	0	
23	6.361727836	4	1.602059991	28	6.447158031	1	1
17	6.230448921	5	1.698970004	30	6.477121255	2	1.301029996
20	6.301029996	0		36	6.556302501	0	
19	6.278753601	5	1.698970004	27	6.431363764	0	

Medel:	6.255967409	1.861474271	6.466917198	1.269795312
SD:	0.092992471	0.265671929	0.067131712	0.397688659

Starterkultur	-4	Öl	-6	Starterkultur	0	Öl	0
	LOG CFU / ml		LOG CFU / ml		LOG CFU / ml		LOG CFU / ml
<b>Malt</b>		<b>Malt</b>		<b>VRBD</b>		<b>VRBD</b>	
49	6.69019608	96	8.982271233	0	0	0	0
45	6.653212514	81	8.908485019	0	0	0	0
58	6.763427994	152	9.181843588	0	0	0	0
55	6.740362689	104	9.017033339	0	0	0	0
80	6.903089987	35	8.544068044	0	0	0	0
84	6.924279286	25	8.397940009	0	0	0	0
96	6.982271233	58	8.763427994	0	0	0	0
87	6.939519253	46	8.662757832	0	0	0	0
85	6.929418926	96	8.982271233	0	0	0	0
90	6.954242509	72	8.857332496	0	0	0	0
99	6.995635195	300+		0	0	0	0
82	6.913813852	300+		0	0	0	0

Medel:	6.865789126	8.829743079	0	0
SD:	0.114414131	0.226470624	0	0