

## Summary

Sourdough is a specific and stressful ecosystem inhabited by yeasts and lactic acid bacteria (LAB) obtained through fermentation of a flour-water mixture that is used for the production of baked goods. During spontaneous fermentation, these microorganisms come from the flour, other dough ingredients, and the environment. Fresh, mature sourdoughs are either liquid (industrial sourdoughs) or firm (bakery sourdoughs), depending on the dough yield (DY) applied. As there is no clear-cut relationship between a certain sourdough, characterized by its raw materials and process parameters [fermentation temperature and time, acidification rate and time, DY, backslopping practices, etc.] and its associated microbiota, this study aimed at defining sourdough-specific LAB and yeast species that can be used for starter culture-initiated sourdough fermentation processes. Therefore, the evolution of pH and total titratable acidity (TTA), species diversity, community dynamics, and metabolite production kinetics were studied upon backslopping every 24 h during 10 days of sourdoughs based on different, non-conventional flours (barley, teff, and oat). To avoid biases due to sampling, isolation, and identification procedures, statistically relevant sampling and isolation methodologies were followed and accurate identification procedures were carried out. Concerning the latter, both culture-dependent (selective plating and incubation, followed by molecular identification of the isolates) and culture-independent (rRNA-PCR-DGGE community profiling) analyses were performed. Also, a multiphasic metabolite target analysis was done, encompassing various chromatographic separation and detection techniques. Finally, both laboratory production [fermentors, controlled temperature of 30°C, high DY of 400 (barley and teff) or 600 (oat)] and bakery production conditions (open vessels, ambient temperature, low DY of 200) were tested, making use of the same (barley) or different batches (teff and oat) of flour. It turned out that the LAB and yeast species encountered were not specific for a certain flour but depended on the process conditions, although specific compounds (*e.g.*, inhibitory and texturizing compounds) present in the flour may influence the sourdough fermentation process and the baked goods produced from the mature sourdoughs. Several starter cultures were defined, among which *Lactobacillus fermentum* (barley, teff, and oat), *Lactobacillus plantarum* (barley, teff, and oat), *Lactobacillus brevis* (barley and teff), *Lactobacillus sanfranciscensis* (teff), and *Leuconostoc* and *Weissella* species (bakery barley sourdoughs). The discovery of *Lb. sanfranciscensis* in teff sourdoughs showed that it occurs in other sourdough matrices than those based on wheat or rye, provided that the appropriate process parameters concerning fermentation temperature, pH, and backslopping practices were optimal. It further assumed its presence in flour and allowed to hypothesize its animal intestinal origin. Concerning yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* characterized barley and laboratory teff sourdough fermentations, whereas *Kazachstania exigua* characterized bakery teff sourdoughs. No yeasts thrived in oat sourdoughs because of the presence of inhibitory compounds.

## Samenvatting

Zuurdesem is een specifiek en stressvol ecosysteem van gisten en melkzuurbacteriën (MZB) dat verkregen wordt door fermentatie van een bloem-watermengsel en gebruikt wordt voor de productie van bakkerijproducten. In het geval van spontane fermentatie komen deze micro-organismen van de bloem, andere deegingrediënten en de omgeving. Verse, rijpe zuurdesems zijn ofwel vloeibaar (industriële zuurdesems) of relatief consistent (bakkerijzuurdesems), afhankelijk van de toegepaste deegopbrengst (DY). Daar er evenwel geen duidelijke relatie bestaat tussen een bepaalde zuurdesem, die gekenmerkt wordt door de gebruikte ruwe grondstoffen en de toegepaste procesparameters [fermentatietemperatuur en -tijd, verzuringssnelheid en -tijd, DY, terugfermentatiepraktijk, enz.] en de ermee geassocieerde microbiota, had deze studie als doel om bepaalde zuurdesemspecifieke MZB- en gistsoorten te definiëren teneinde deze te kunnen gebruiken voor met starterculturen geïnitieerde zuurdesemfermentatieprocessen. Daarom werden de evolutie van de pH en totale titreerbare zuurheid (TTA), soortdiversiteit, populatiedynamica en metabolietproductiekinetiek bestudeerd tijdens de backslopping (om de 24 h gedurende 10 dagen) van zuurdesems op basis van verschillende, niet-conventionele bloemsoorten (gerst, teff en haver). Teneinde bias te voorkomen te wijten aan staalname, isolatie en identificatieprocedures, werden statistisch relevante staalname- en isolatiemethodologieën toegepast alsook accurate identificatieprocedures. Wat dit laatste betreft werden zowel cultuurafhankelijke (selectieve uitplating en incubatie, gevolgd door moleculaire identificatie van de isolaten) als cultuur-onafhankelijke (rRNA-PCR-DGGE-populatieprofielen) analyses uitgevoerd. Tevens werd een multifasische metabolietanalyse met verschillende chromatografische scheidings- en detectietechnieken uitgevoerd. Tenslotte werden zowel laboratoriumcondities [fermentoren, gecontroleerde temperatuur van 30°C, hoge DY van 400 (gerst en teff) of 600 (haver)] als bakerijcondities (open vaten, kamertemperatuur, lage DY van 200) getest, waarbij dezelfde (haver) of verschillende bloembatches (teff en haver) gebruikt werden. De resultaten gaven aan dat de betrokken MZB- en gistsoorten niet bloemspecifiek waren maar afhingen van de procescondities, niettegenstaande specifieke verbindingen aanwezig in de bloem (bijvoorbeeld inhiberende of textuurvormende verbindingen) het zuurdesemfermentatieproces en de bakkerijproducten gemaakt van de rijpe zuurdesems konden beïnvloeden. Verschillende starterculturen werden bepaald, met name *Lactobacillus fermentum* (gerst, teff en haver), *Lactobacillus plantarum* (gerst, teff en haver), *Lactobacillus brevis* (gerst en teff), *Lactobacillus sanfranciscensis* (teff) en *Leuconostoc*- en *Weissella*-soorten (bakkerijgerstzuurdesems). De ontdekking van *Lb. sanfranciscensis* in teffzuurdesems toonde aan dat deze bacterie ook voorkwam in andere zuurdesemmatrices dan deze gebaseerd op tarwe of rogge, op voorwaarde dat de aangepaste procesparameters aangaande fermentatietemperatuur, pH en terugfermentatiepraktijken optimaal waren. Het veronderstelde verder dat deze bacterie voorkomt in bloem en het liet toe aan te nemen dat de bacterie van dierlijke intestinale oorsprong is. Wat de gisten betreft, karakteriseerde *Saccharomyces cerevisiae* de gerst- en laboratorium-teffzuurdesems, terwijl *Kazachstania exigua* de bakkerij-teffzuurdesems karakteriseerde. In de haverzuurdesems konden gisten niet gedijen door de aanwezigheid van inhiberende verbindingen.