

Effekt av endring i fermenteringsbetingelser på smak, i produksjon av øl

Eirin Korvald

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: januar 2015

Hovedveileder: Per Bruheim, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for bioteknologi, fakultet for naturvitenskap og teknologi, ved Norges Teknisk-Naturvitenskaplige Universitet (NTNU), fullført 24. januar, 2015.

Jeg vil gjerne takke veileder Per Bruheim for å gjøre det mulig å ta en masteroppgave om ølbrygging, og for verdifull veiledning og tilbakemelding på arbeidet. Jeg er også takknemlig overfor bryggelauset ved institutt for bioteknologi, for hjelp og tips underveis i oppgaven, samt hjelp med den sensoriske analysen. Spesielt vil jeg takke Anders Brunsvik og Hans Fredrik Kvitvang for hjelp med GC-MS-analysene, og for å vise hvordan jeg kunne bruke programvarene for å analysere resultatene. Jeg er også takknemlig for all hjelp og gode ord fra laboratorieteknikker Siri Stavrum.

Takk til medstudenter, familie og venner for støtte og oppmuntring underveis i oppgaven.

Sammendrag

Ved produksjon av øl er det hovedsaklig fire ingredienser som brukes: vann, malt, humle og gjær. Gjæren står for fermenteringen av sukker til alkohol, men bidrar også med produksjon av andre smaksstoffer, for eksempel estere og fuselalkoholer. Ved å endre fermenteringsbetingelsene kan prosessen forkortes, og bryggeren kan spare tid og penger. Det er flere parametre som påvirker gjærens arbeidsevne under fermentering: konsentrasjonen av gjærceller ved start, viabiliteten av gjærcellene, temperatur i gjæringskarene, sukkerkonsentrasjon, oksygeneringsgrad og hvilke vekstvilkår gjæren har hatt før den ble tilsatt vørteren.

I denne oppgaven ble ulike fermenteringsbetingelser variert, for å se hvordan dette påvirket utviklingen i fermenteringen og produksjonen av smaksstoffer. Parametrene som ble variert var inokulumsmengde, fermenteringstemperatur og forbehandling av gjær og vørter. To ulike typer øl ble produsert: Red Ale og Wit. Specific gravity ble målt underveis i fermenteringen av disse, samtidig som prøver ble tatt for å analysere på en gasskromatograf koblet med et massespektrometer, både væskefase og headspace. Kimtallsanalyse og tørrvekstanalyse ble utført for Wit.

Verdiene som er anbefalt for parametrene som ble variert, fungerer som referanse. Tiden det tok å fermentere vørteren til ønsket final gravity ble forkortet ved høyere temperatur og høy inokulumsmengde. Høyere inokulumsmengde enn den anbefalte verdien, førte til høyere konsentrasjoner av fuselalkoholer. Til sammenligning ga lavere inokulumsmengde samme mengde fuselalkoholer som referanseverdien. Høy inokulumsmengde ga større endringer i smak, enn lav inokulumsmengde.

Forbehandling av vørter og gjær, i form av oksygenering av vørter og rehydratisering av tørrgjær, ha ingen klare forskjeller for ester- og fuselalkoholproduksjon. Generelt ble det produsert lavere konsentrasjoner med forbehandling, men endringene er ikke store nok til å si noe konklusivt.

Lavere konsentrasjoner av estere og fuselalkoholer produseres ved lav fermenteringstemperatur, 15 °C. Det var ingen store forskjeller mellom 20 og 25 °C. Smaksmessig var ølet fermentert ved lav temperatur mildere, enn det med høy fermenteringstemperatur.

Det er mulig å spare tid ved å fermentere ølet ved høyere temperatur eller høyere inokulumsmengde, men det er viktig å huske på hvordan dette kan påvirke smaken. For å få bedre oversikt over invirkningen forandring i fermenteringsbetingelser har på smak, burde standardkurver lages for å kvantifisere stoffene funnet. I tillegg burde terskelverdier for disse stoffene identifiseres for ulike typer øl. Da blir det lettere å sammenligne med hva som er vanlig, for ølet som har blitt produsert.

Abstract

In the production of beer there are four main ingredients: water, malt, hops and yeast. The yeast will ferment sugars into alcohol, and in addition it will also produce other taste active compounds, like esters and fusel alcohols. The fermentation process can be shortened by changing the fermentation conditions and this will, in turn, save the brewer time and money. There are several parameters that influence the working capacity of the yeast during fermentation: pitch rate, cell viability, fermentation temperature, sugar concentration, degree of oxygenation, and the yeast's growth conditions prior to pitching.

In this thesis, the impact of changing different fermentation conditions was studied. Specifically, the impact on the production of taste active compounds. The parameters changed were pitch rate, fermentation temperature, and pretreatment of wort and dry yeast prior to pitching. Two beer styles were produced: Red Ale and Wit. Specific Gravity was measured as a function of fermentation time. Samples were taken to be analyzed on a Gas Chromatograph coupled with a Mass Spectrometer, and this was performed by injecting both headspace and liquid. Colony Forming Unit analysis and Dry Weight analysis was done for the yeast in Wit.

Recommended values for the changed parameters were used as reference values. The time it took to reach desired Final Gravity was shortened by using higher fermentation temperature and higher pitching rates. Increasing the pitch rate led to higher fusel alcohol concentrations compared to the reference. In contrast, a lower pitching rate did not vary a lot from the reference.

The pretreatment of wort and yeast, in the form of aeration of wort and rehydration of dry yeast, gave no distinct changes in ester and fusel alcohol production. In general, the production of esters and fusel alcohols decreased when using the pretreatments. However, the changes were too small to be conclusive in this matter.

Low fermentation temperature (15 °C) lead to lower concentrations of esters

and fusel alcohols, compared with the reference. No major differences were detected when comparing the fermentation temperatures 20 and 25 °C. The taste of the beer fermented at a lower temperature was perceived as milder, compared to the beer fermented at higher temperatures.

Time can be saved by fermenting beer at higher temperatures or by using higher pitch rates, but it is important to remember how this might influence the taste. To acquire more knowledge of how changing fermentation conditions influence taste, there should be made standard curves for varying concentrations of the taste active compounds. The threshold values should be determined for the identified compounds, and other common compounds found in beer. This would make it easier to determine if the changes in the parameters lead to significant changes in taste.

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Malting og mesking	2
1.1.1	Malting av korn	2
1.1.2	Mesking: enzymatisk frigjøring av fermenterbare sukker	2
1.2	Koking: bitterhet, sterilisering og utfelling av proteiner	4
1.3	Fermentering: fra vørter til øl	6
1.3.1	Produksjon av smaksstoffer	11
1.3.2	Oksygenering av medium	14
1.3.3	Inokulumsmengde av <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	14
1.4	Gasskromatografi og massespektrometri	17
2	Materialer og metoder	21
2.1	Gjærtype og medium	21
2.2	Fermenteringsforhold	27
2.3	Prøvetaking	28
2.4	Fermenteringsanalyse	29
2.4.1	Specific gravity	29
2.4.2	Kimtallsanalyse	29
2.4.3	Tørrvektsanalyse	30
2.4.4	Gasskromatografi og massespektrometri, vannfase	30
2.4.5	Gasskromatografi og massespektrometri, headspace	30

3	Resultater	31
3.1	Red Ale	31
3.1.1	Fermentering med tre ulike inokulumsmengder	31
3.1.2	Fermentering med ulike forbehandlinger	34
3.1.3	Gasskromatografi og massespektrometri: væskefase	36
3.1.4	Gasskromatografi og massespektrometri: headspace	40
3.1.5	Sensorisk analyse av Red Ale	42
3.2	Wit	44
3.2.1	Fermenteringsutvikling	44
3.2.2	Tørrvekt	49
3.2.3	Kimtall	52
3.2.4	Gasskromatografi og massespektrometri: headspace	54
3.2.5	Sensorisk analyse av Wit	61
4	Diskusjon	62
4.1	Fermenteringsutvikling	62
4.2	Analyse av stoffproduksjon	65
4.2.1	Red Ale	65
4.2.2	Wit	68
4.3	Forsøksoppsett	70
4.4	Videre arbeid	71
5	Konklusjon	73
A	Oppskrift - Red Ale og Wit	i
B	Bryggeutstyr og fremgangsmåte	v
C	Innstillinger for gasskromatograf og massespektrometer: Væskefase	viii
D	Innstillinger for gasskromatograf og massespektrometer: Headspace	xiv

E	Specific Gravity: Rådata	xvii
E.1	Red Ale	xvii
E.2	Wit	xxiv
F	Tørrvekt	xxvii
G	Kimtallsanalyse	xxxii
H	GC-MS væskefase:	
	Rådata	xxxv
I	Headspace GC-MS Red Ale: Rådata	xlix
J	Headspace GC-MS Wit 1: Rådata	liii
J.1	Ulike inokulumsmengder	liv
J.2	Ulike fermenteringstemperaturer	lxiii

Kapittel 1 Introduksjon

Det er fire hovedingredienser som brukes i bryggingen av øl: byggmalt (maltet *Hordeum vulgare*), vann, humle (*Humulus Lupulus*) og gjær (*Saccharomyces cerevisiae*). Malt og vann blir blandet og varmet i en prosess som kalles mesking. Deretter blir væske og malt skilt fra hverandre ved avsiling. Væsken blir varmet opp til kokepunktet før humle tilsettes. Vørteren som nå er produsert kjøles ned til romtemperatur før *S. cerevisiae* tilsettes. Gjæren fermenterer sukker til alkohol og CO_2 , i tillegg til at den produserer bl.a. smaksstoffer (f.eks. estere).

Ulike parametre vil påvirke hvordan gjæren fermenterer og dermed hvilke stoffer som produseres. Noen slike parametre er temperatur, konsentrasjon av fermenterbare sukre, inokulumsmengde av gjær, oksygeneringsgrad av vørter og hvilke vekstvilkår gjæren har hatt før inokulering i vørteren. Noen av parameterne er viktigere enn andre, det er ikke sikkert endringene i disse er merkbare for mennesker.

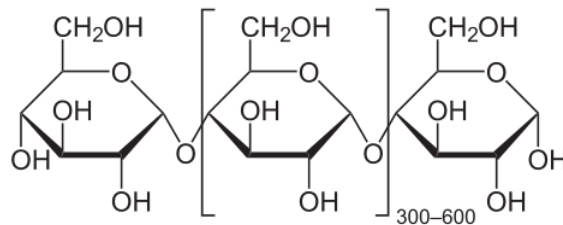
Effektivitet er ønskelig i ølbryggerindustrien så vel som for hjemmebryggere. Hvis det viser seg at deler av prosessen kan kuttes ut fordi merarbeidet ikke fører til et bedre produkt, er det tid, krefter og penger å spare. Fermenteringen er den delen av prosessen som tar lengst tid. Hvis denne kan forkortes ved å tilsette mer gjær, øke temperaturen, eller lignende, og likevel ende opp med ønsket resultat er dette å foretrekke. Dette gjelder ikke bare industrielle bryggere, men også hjemmebryggere.

I dette prosjektet skal utviklingen underveis i fermenteringen, samt sluttresultatet, analyseres. Vil endringer i de nevnte parameterne føre til forskjeller i produktet? Det skal brukes flere analysemetoder for å se på potensielle forskjeller, blant annet gasskromatografi koblet med massespektrometer, kimtall og tørrvekt av gjær. Dette skal gjøres både underveis og ved endt fermentering.

1.1 Malting og mesking

1.1.1 Malting av korn

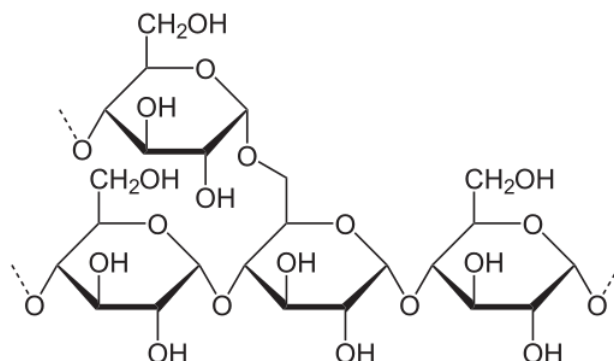
Bygg (*Hordeum vulgare*) brukes hovedsakelig som dyrefôr, menneskemat og i produksjon av malt. I produksjon av øl er malt en av de viktigste ingrediensene. Stivelsen i maltet, som består av amylose og amylopektin, må brytes ned til sukkerarter som *S. cerevisiae* kan fermentere. Amylose og amylopektin er to biopolymerer, bestående av glukoseresiduer, og vises i henholdsvis Figur 1.1 og 1.2. Amylose er en lang kjede glukose-molekyler bundet til hverandre med α -1,4-bindinger, mens amylopektin er forgrenede amylosekjeder. Bindingene til forgreningene er α -1,6-bindinger. [1] For å kutte i kjedene og frigjøre sukkermolekylene må enzymer som bryter ned stivelse aktiveres. Dette gjelder i hovedsak α - og β -amylase. Aktiveringen av enzymene gjøres ved å oppbevare kornet varmt og fuktig så spiringen starter. Under naturlige omstendigheter vil enzymene bryte ned stivelsen så kornet kan begynne å gro, men spiringen stoppes før det skjer. Enzymene er avhengig av vann for å virke, så kornet tørkes, og produktet kalles malt. Maltet kan brennes i ulik grad for å gi ulike smaker. Maltet er nå klart for å brukes i meskingen.



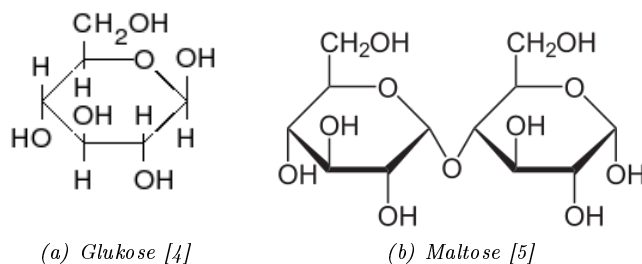
Figur 1.1: Illustrasjon av en amylosekjede. [2]

1.1.2 Mesking: enzymatisk frigjøring av fermenterbare sukker

Det er i hovedsak to enzymer som bryter ned stivelse til fermenterbart sukker. Disse to, α - og β -amylase, har ulik virkning på stivelse. α -amylase kutter tilfeldig og β -amylase kutter fra endene. Sistnevnte produserer maltose, som består av to glukosemolekyler. Glukose og maltose er vist i Figur 1.3, som henholdsvis a) og b).



Figur 1.2: Illustrasjon av amylopektin, som er en forgrenet versjon av amylose. [3]



(a) Glukose [4] (b) Maltose [5]

Figur 1.3: Haworth-projeksjon av glukose og maltose.

Før enzymene kan katalysere hydrolyse av stivelse, må stivelsen gelatiniseres. Dvs. stivelsen sveller grunnet høyere temperatur (mellom 60 - 65 °C) og en økning i fuktighet. Dette gjør at stivelsesmolekylene er tilgjengelig for katalyse av enzymene.

Figur 1.4 viser hydrolyse av stivelse katalysert av β -amylase. Enzymet bryter den andre α -1,4-glukosidbindingen og frigjør maltose fra den ikke-reducerende enden på stivelseskjeden. Deretter vil enzymet igjen feste seg til den ikke-reducerende enden av stivelseskjeden for å frigjøre enda et maltosemolekyl. Når β -amylase virker på amylose, vil hele kjeden brytes ned på denne måten. Det blir derimot

annerledes når enzymet skal virke på amylopektin, på grunn av forgreningene i disse molekylerne. Når β -amylase står overfor en forgrening, stopper enzymet katalyse av stoffet og må finne en annen ikke-reducerende ende å katalysere. β -amylase produserer derfor maltose-molekyler og et stort rest-dekstrin som det ikke kan bryte ned, fra amylopektin. α -amylase kan derimot dele opp dette rest-dekstrinet i mindre biter, siden det kutter tilfeldige bindinger. [6]

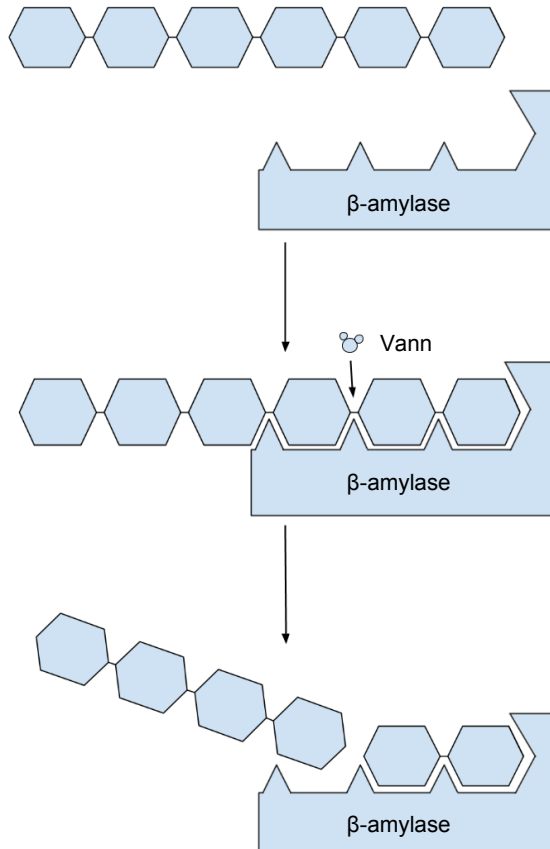
De to enzymene er kun aktive i visse temperaturintervall og fra denne informasjonen bestemmes mesketemperaturene. Temperaturen i mesken må være over en viss verdi for å aktivere enzymene, men hvis det blir for varmt vil enzymene denatureres. β -amylase har temperaturoptimum ved 60 °C og alfa-amylase i området 60 - 70 °C. For å få mest mulig fermenterbart sukker ut av meskingen, vil temperaturen holdes i et område der begge enzymene er aktive, gjerne 67 °C. Denne temperaturen er ikke bare basert på α - og β -amylases temperaturoptimum, men også andre enzymers aktivitet, samt temperaturen for gelatinisering. [7] Når den ønskede sukkerprofilen er oppnådd skal meskingen avsluttes. Dette gjøres ved å tilsette vann ved høyere temperatur så enzymene inaktiveres.

Separering av vørter og malt

Avsilingen starter etter at meskingen er ferdig. Vann tilsettes i toppen av kjelen og siles gjennom maltet for å få med mest mulig av de fermenterbare sukrene. Det anbefales å ha en avsilingstemperatur rundt 78 °C. Høyere temperaturer kan frigi tanniner, som er uønsket i ølet fordi det fører til astringent smak. Denne sukkerholdige væsken kalles vørter.

1.2 Koking: bitterhet, sterilisering og utfelling av proteiner

Koking av vørter er viktig av flere grunner: sterilisering, utfelling av proteiner, smak fra humle. Fra vørteren har begynt å koke tar dette trinnet oftest 60 minutter, men det finnes oppskrifter der kokingen varer lenger. Humle (*Humulus lupulus*) tilsettes ved ulike tider for å gi bitterhet og aroma. Den humlen som tilsettes helt i starten gir bitterhet til ølet. Bitterheten bestemmes av humlas α -syreinnhold og mengde humle som tilsettes. Bitterheten måles i International Bittering Units (IBU). Det tilsettes også humle for å gi aroma til ølet. Disse humlene tilsettes i slutten av kokingen siden aromastoffene er flyktige og vil



Figur 1.4: Illustrasjonen viser en hydrolyseaksjon katalysert av β -amylase. En maltose-enhet blir kuttet fra den ikke-reduserende enden av stivelseskjeden.

fordampe hvis de kokes lenge. Det er derfor vanlig å tilsette humle en eller flere ganger de siste 15 minuttene. [7]

Under kokingen vil proteiner i vørteren denatureres, samles sammen ved hjelp av bevegelsen i den kokende væsken og falle til bunnen av kjelen. Dette er viktig for å få et så klart øl som mulig. For å hjelpe til med denne prosessen tilsettes det ofte et klarningsmiddel som gjør det lettere for proteinene å felle ut (f.eks.

Whirlfloc). [7]

Når vørteren koker blir den sterilisert. Hvis uønskede organismer, f.eks. bakterier, får gro i vørteren vil ølet smake surt og det blir mindre næringsstoffer igjen til den ønskede gjæren. Alt som er i kontakt med vørteren etter koking og nedkjøling må derfor være sterilt. Hvis dette kriteriet er oppfylt vil vørteren være et bra fermenteringsmedium for *S. cerevisiae*. [7, 8]

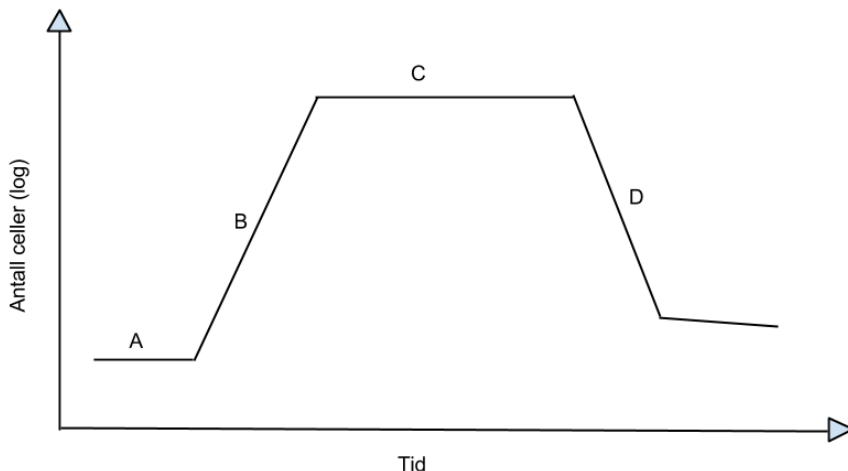
1.3 Fermentering: fra vørter til øl

S. cerevisiae trives godt i miljø med tilgang til store mengder sukker, og vørter er derfor et perfekt miljø for denne gjæren. Gjæren er fakultativ aerob, som betyr at den helst groer i aerobe miljø, men den kan også leve i anaerobe miljø. Respirasjon, som foregår når oksygen er tilstede, er foretrukket fordi mer energi blir produsert per sukkerenhet. I produksjon av øl blir *S. cerevisiae* tilsatt vørteren, og beholderen forsegles og en gjærlås plasseres på toppen av beholderen. Mikroorganismer og oksygen holdes ute og CO_2 slipper ut. *S. cerevisiae* vil først bruke opp oksygenet som er tilgjengelig i vørteren, men må bytte fra respirasjon til fermentering når oksygen ikke er tilgjengelig.

Vekstfaser

Når cellekulturen tilsettes mediumet vil den gjennomgå ulike vekstfaser, som vist i Figur 1.5. I begynnelsen vil det ta litt tid før gjæren har blitt akklimatisert til det nye mediumet. Det foregår ikke noe målbar aktivitet, men cellene bruker tiden til å ta opp næringsstoffer de trenger. Denne fasen kalles latensfase (A) og varer ofte i rundt ett døgn. Varigheten avhenger av flere forhold: cellekonsentrasjon, mediumets sammensetning, gjærstammen som brukes, forbehandling av cellekultur og medium, osv.

Etter hvert som cellene har tatt opp stoffer og er blitt akklimatisert begynner den eksponentielle vekstfasen (B). Det er i den eksponentielle fasen de fleste smaksstoffene produseres, som f.eks. estere og høyverdige alkoholer. [7] Veksten kan uttrykkes ved hjelp av en base og en eksponent, som i $N = N_0 2^n$, der basen er tallet 2 og eksponenten er antall generasjoner, n . N_0 og N er antall celler ved henholdsvis start og slutt. For å beregne gjennomsnittlig antall generasjoner kan ligning 1.1 brukes. Dette er den samme ligningen uttrykt ved n . Vekst hastigheten varierer og er avhengig av organismen og de miljømessige forholdene. Temperatur, inokulumsmengde og tilgang til næringsstoffer er noen eksempler



Figur 1.5: Illustrasjonen viser de ulike vekstfasene for en gjærkultur ved introduksjon i et nytt medium. A er latensfase, B eksponentiell vekstfase, C stasjonær fase og D er dødsfase. Logaritmen av antall celler er plottet som funksjon av inkuberingstiden.

på miljømessige forhold. Det er også forskjell på prokaryot og eukaryot vekst, da prokaryote er mindre og formerer seg raskere. [9] En eventuell bakterieinfeksjon i vørteren vil derfor raskt kunne dominere i mediet.

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \approx 3,3(\log N - \log N_0) \quad (1.1)$$

Veksten vil etterhvert stoppe opp og den stasjonære fasen (C) nås. Noen celler vil dø og noen vil fortsette å dele seg, men det totale celleantallet vil ikke forandres i denne fasen. Grunnen til vekststopp kan være mangel på et essensielt næringsstoff som f.eks. et vitamin, mineral eller en aminosyre. *S. cerevisiae* blir ofte begrenset av sink, et mineral som er en viktig co-faktor for alkohol dehydrogenase (enzym viktig i produksjonen av alkohol under fermentering). [7] En annen grunn til begrenset vekst kan være høy konsentrasjon av avfallsstoffer. Under fermentering blir det produsert alkoholer og syrer i konsentrasjoner som kan være toksiske for noen organismer. *S. cerevisiae* har en relativt høy toleranse for etanol i forhold til mange andre mikroorganismer. Vanligvis er alkoholinnholdet i øl rundt 3-6%, men noe øl kan inneholde opp mot 12% alkohol

selv uten etterbehandling av ølet. [9]

Stasjonær fase er tiden for modning av ølet. Under eksponentiell fase har *S. cerevisiae* produsert diacetyl og acetaldehyd, stoffer som gir vond smak til ølet. I stasjonær fase vil disse absorberes av cellene som så flokkelærer og felles ut av væsken. Den stasjonære fasen er typisk tre til ti dager lang. Til slutt vil cellepopulasjonen gå inn i dødsfasen (D). Som følge av mangel på næringsstoffer vil populasjonen sakte, men sikkert, bli mindre. [9]

Metabolisme

Glukose går inn i glykolysen, en prosess som er lik i både aerobe og anaerobe miljø. Her vil sukrene gjøres om til pyruvat, men i utnyttelsen av pyruvat er det forskjeller mellom respirasjon og fermentering. For anaerob fermentering er totalregnskapet som gitt i ligning 1.2. Til sammenligning ville aerob respirasjon etter glykolyse ha gitt 30-32 ATP-ekvivalenter. [10]



Andre mono- og disakkarider vil også fermenteres, disse følger ulike biokjemiske spor som sammenføres med glykolysen. Figur 1.6 viser de biokjemiske sporene som blir ført inn i de innledende stegene i glykolysen. Vørter inneholder typisk 45% maltose, 14% maltotriose, 8% glukose, 6% sukrose, 2% fruktose og resten er ufermenterbare dekstriner. [7] Maltose hydrolyseres til to glukosemolekyler ved hjelp av maltase, og sukrose hydrolyseres til fruktose og glukose ved hjelp av sukrase. Maltotriose kan også hydrolyseres til glukose, men ikke alle gjærstammer utfører dette like effektivt. [8]

Hvilke sakkarider som er i mediumet har innvirkning på hvor store mengder estere og andre smaksstoffer som produseres under fermentering. Fermenteringer der maltose er eneste sakkarid produserer færre estere enn fermenteringer med glukose eller fruktose. [11] Grunnen til dette er uvisst. En studie har vist at cellevekst med maltose som medium gir lavere konsentrasjoner av acetyl-CoA, enn vekst med glukose. Acetyl-CoA er viktig i produksjon av estere. [12] Det er også mulig at cellemembranen i celler som vokser på maltose ikke slipper ut like store mengder estere. Da vil konsentrasjonen av estere målt i ølet være lavere enn konsentrasjonen produsert.

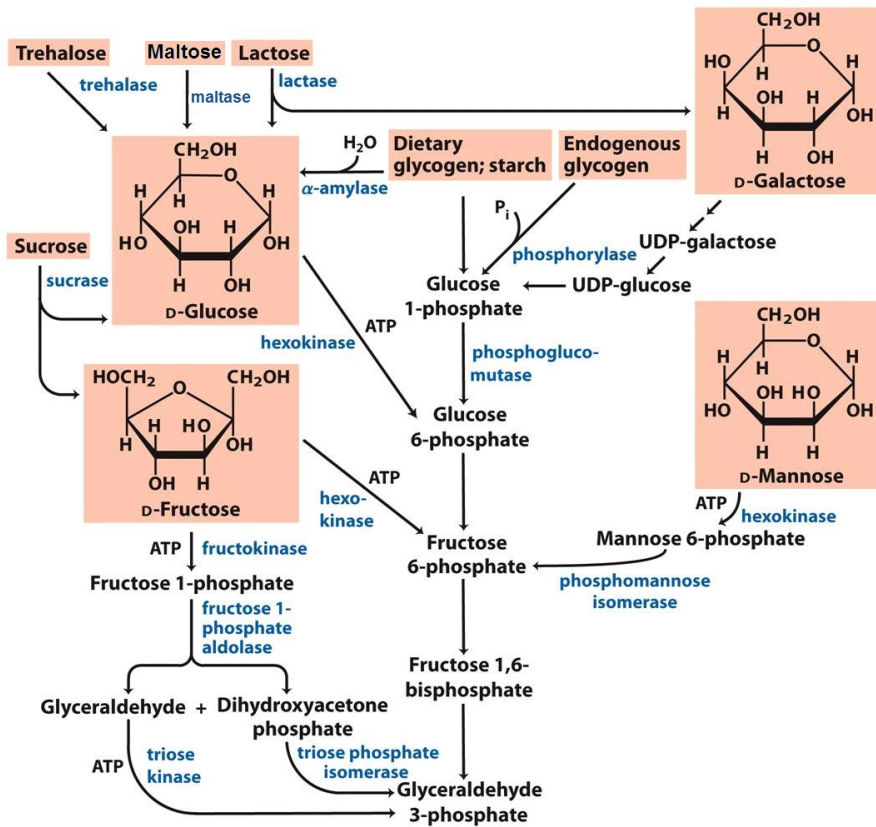


Figure 14-11
 Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
 © 2013 W. H. Freeman and Company

Figur 1.6: Illustrasjonen viser av ulike karbohydrater som føres inn i de innledende stegene av glykolysen. [10].

1.3.1 Produksjon av smaksstoffer

Under fermentering produseres ulike grupper av smaksstoffer, der estere kan sies å være en av de viktigste gruppene. Andre som kan nevnes er organiske syrer, alkoholer og fenoler. [13] I Tabell 1.1 er det listet opp noen vanlige smaksstoffer funnet i øl, med verdier for smaksterskel og vanlige verdier funnet i øl. [8,14]

Tabell 1.1: Smaksstoffer som er typiske å finne i øl, sammen med verdier for smaksterskel og vanlige konsentrasjoner i øl. [8, 14]

Stoff	Cas#	Vanlig konsentrasjon i øl [mg/l]	Smaksterskel i øl [mg/l]
<i>Estere</i>			
Etylacetat	141-78-6	10 - 50	20 - 40
Etylheksanoat	123-66-0	0,07 - 0,5	0,15 - 0,25
Etyloktanoat	106-32-1	0,04 - 0,53	0,9
Etyldekanoat	110-38-3	0 - 2,1	0,2
Isoamylacetat *	624-41-9 og 123-92-2	0,5 - 5	1 - 2
Fenyletylacetat	103-45-7	0,10 - 0,73	3,8
<i>Alkoholer</i>			
2-fenyletanol	60-12-8	25 - 40	125
1-propanol	71-23-8	10 - 100	800
2-metyl-1-propanol	78-83-1	7 - 11	200
2-metyl-1-butanol	137-32-6	50 - 65**	65
3-metyl-1-butanol	123-51-3	50 - 65**	70
2-metyl-2-butanol	75-85-4	10 - 150	50
3-metyl-2-butanol	598-75-4	30 - 150	70
Glyserol	56-81-5	1400 - 3200	2500
<i>Andre</i>			
Acetaldehyd	75-07-0	2 -20	10 - 20
Diacetyl	431-03-8	0,01 - 0,6	0,07 - 0,15
Hydrogensulfid	7783-06-4	(1 - 200) ·10 ⁻³	4 ·10 ⁻³

* Isoamylacetat er en 25:75-blanding av 2-metylbutylacetat og 3-metylbutylacetat. ** Vanlig konsentrasjon av 2-metyl-1-butanol og 3-metyl-1-butanol ble målt under ett.

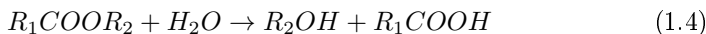
Oppfatningen av smak varierer ut fra hvilke stoffer som blandet sammen, på

grunn av interaksjoner mellom de ulike smaksstoffene. [14] Smaksintensiteten av stoffene blandet sammen, R_{miks} , er ikke nødvendigvis summen av de individuelle smaksintensitetene, $R_1 + R_2 + \dots + R_n$. For å få graden av interaksjon mellom smakene, d_{int} , kan R_{miks} deles på $R_1 + R_2 + \dots + R_n$. Hvis smakene forsterker hverandres intensitet vil $d_{int} > 1$. Det motsatte kan også skje, at smakene kansellerer hverandre, og da vil $d_{int} < 1$. [14]

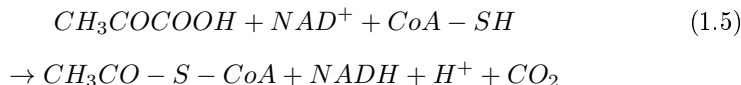
Produksjonen av estere skjer ved å kombinere en acyl-CoA og en alkohol. [15,16] Mengde estere produsert er dermed avhengig av konsentrasjonen av disse to stofftypene, samt enzymene som katalyserer produksjon og nedbrytning av estere. Syntese av estere katalysert ved hjelp av acyltransferase er gitt i ligning 1.3. [17] (Som sitert av [18] og [19].)



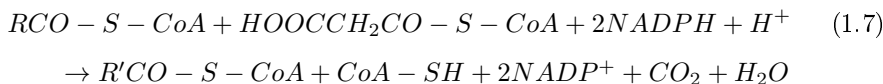
Nedbrytning av estere skjer ved hydrolyse og er gitt ved ligning 1.4. Disse katalyseres av esteraser. [18]



Tre kilder til acyl-CoA vises i ligningene 1.5, 1.6 og 1.7. Ligning 1.5 viser hvordan acetyl-CoA produseres fra pyruvat ved hjelp av pyruvat dehydrogenase.

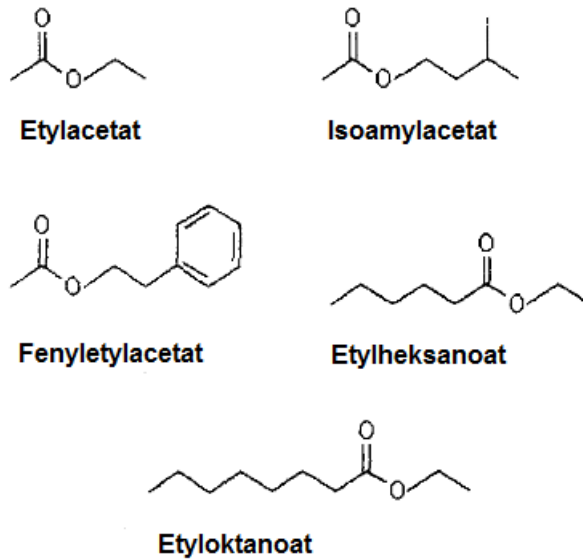


Ligning 1.6 viser hvordan en fettsyre kombineres med med CoA-SH for å produsere en acyl-CoA. Det går med energi i form av ATP i denne reaksjonen. Reaksjonen i ligning 1.7 kan kjennes igjen fra fettsyresyntesen, denne reaksjonen er elongeringstrinnet der malonyl-CoA reagerer med en acyl-CoA for å produsere en lengre acyl-CoA. [18]



Smaksstoffgruppen estere kan deles inn i to undergrupper. Undergruppe 1 lages ved å kombinere acetat med en alkohol, mens undergruppe 2 lages ved å kombinere etanol med en fettsyre med middels kjedelengde, $C_6 - C_{10}$. Noen vanlige

estere er illustrert i Figur 1.7. For eksempel tilhører fenyletylacetat og isoamylacetat undergruppe 1, mens etylheksanoat og etyloktanoat tilhører undergruppe 2.



Figur 1.7: Illustrasjonene viser skjelettformelen for noen typiske estere funnet i øl. [20]

Noen gener som koder for enzymer ansvarlige for produksjonen av estere har blitt identifisert. Alkohol-acetyltransferase I og II (*ATF1* og *ATF2*) er enzymerne som katalyserer reaksjonen der acetat og en alkohol reagerer og produserer en acetat-ester. [13] Mutasjoner i disse kan være ansvarlige for forskjellene i esterprofilene til ulike typer gjær.

To enzymer, *Eeb1* og *Eht1*, antas å ha hovedansvaret for syntese av esterundergruppe 2 (etyl-estere). Eksperimenter der genene (*eeb1* og *eht1*) slettes viser at syntesen er mest avhengig av *Eeb1*, mens sletting av begge genene (*eeb1Δeht1Δ*) viser at de to enzymerne ikke er alene om å syntetisere etyl-estere. Det produseres etyl-estere på tross av mangel på *Eeb1* og *Eht1*. [21]

1.3.2 Oksygenering av medium

Overføring av oksygen fra gass til væske er bestemt av ligningen 1.8. [22]

$$N_A = k_L a (C^*_{AL} - C_{AL}) \quad (1.8)$$

N_A er hastigheten for oksygenoverføring, $k_L a$ er masseoverføringskoeffisienten, C_{AL} er oksygenkonsentrasjonen i mediumet og C^*_{AL} er oksygenkonsentrasjonen dersom væske og gass er i likevekt. Det er forskjellen i de to konsentrasjonene som er den drivende kraften bak overføringen av oksygen. Under vanlige forhold (romtemperatur, atmosfærisk trykk og 20 % oksygen i luften) vil ikke løseligheten av oksygen overstige 10 ppm, grunnet liten overføringsdrivkraft. Slike oksygenkonsentrasjoner vil brukes opp fort. [22] Dette er selvfølgelig blant annet avhengig av cellekonsentrasjonen i mediumet. Uavhengig av dette blir det anbefalt å oksygenere vørteren før inokulering av gjær. En oksygenkonsentrasjon på 8-10 ppm anbefales, hvis vørter og inokulumsmengde er normal (OG < 1,060 og $6 \cdot 10^6$ celler/ml vørter). Brukes ren oksygen i stedet for luft kan oksygenkonsentrasjonen komme opp i ca. 14 ppm på to minutter. [8]

Tiden det tar for å fullføre fermenteringen kan forkortes. Det har blitt observert dårligere ytelse i generasjon tre og fem, sammenlignet med én, hvis oksygenkonsentrasjonen i vørteren har vært lavere enn anbefalt (5-6 ppm). [23] Oksygenering har innvirkning der gjæren gjenbrukes.

Oksygenering av vørteren før gjæren tilsettes virker inn på viabiliteten til gjæren. Oksygen er en av de næringsstoffene som er nødvendige for en god start, siden det er med i produksjonen av steroler til cellemembranen. Steroler er viktige for membranens permeabilitet og fluiditet. [8]

1.3.3 Inokulumsmengde av *Saccharomyces cerevisiae*

Ved inokulering av *S. cerevisiae* i medium vil antall levedyktige celler ved start gi utslag på fermenteringsutviklingen. Dette kan i sin tur ha innvirkning på produksjon av smaksstoffer. Anbefalt inokulumsmengde varierer. I Tabell 1.2 er det samlet noen anbefalinger fra forhandlere og andre aktører. White og Zainasheff (2010) anbefaler å bruke ligning 1.9 når inokulumsmengde skal beregnes. 0,75 millioner celler brukes for ale der vørteren er av den vanligste typen (OG < 1,060). [8]

$$\# \text{celler til inokulering} = (0,75 \cdot 10^6 \text{ celler}) \cdot (\text{ml medium}) \cdot (^\circ \text{Plato}) \quad (1.9)$$

Generelt vil for lav inokulumsmengde påvirke smak negativt i større grad enn

Tabell 1.2: Anbefalninger fra forhandlere av gjær og andre ølbryggeraktører. Utregningene er forutsatt OG < 1,060.

Firma/Kilde	Type gjær	# celler [/ml vørter]	Mengde gjær [/l vørter]
Fermentis [24]	Tørrgjær	$(4-6) \cdot 10^6$	0,5-0,8 g
Danstar [25]	Tørrgjær	$(5-10) \cdot 10^6$ *	1 g *
Wyeast [26]	Våtgjær	$6 \cdot 10^6$	6,6 ml
Ølbrygging fra hånd til munn [27]	Begge	$6 \cdot 10^6$	-
How To Brew [7]	Begge	$(3-6) \cdot 10^6$ **	-
BrewersFriend [28]	Begge	$10 \cdot 10^6$	1 g / -

* Brukeren blir anbefalt å eksperimentere med inokulumsmengde ut fra denne mengden for å oppnå ønsket resultat. ** Funnet fra tabell der anbefalt inokulumsmengde er gitt som funksjon av original gravity (her: OG < 1,055).

for høy inokulumsmengde. Ved for lave inokulumsmengder vil det ta lenger tid før fermenteringen og veksten starter, noe som gir bakterier og villgjær en mulighet til å ta over mediumet. For høy inokulumsmengde kan føre til dårligere celleviabilitet ved fermenteringsslutt, som er viktig å huske på dersom gjæren skal høstes og brukes på nytt. Høy inokulumsmengde kan også føre til uventede esterprofiler eller at cellene lyserer. [8]

Andre faktorer som påvirker produktet

Innholdet i vørteren har, naturlig nok, innflytelse på produktet av fermenteringen. Mengde karbon i forhold til nitrogen vil påvirke esterproduksjonen. Med masse nitrogen i mediumet vil det produseres overskudd av acetyl-CoA, som fører til høyere esterproduksjon. [18] Det kan tilsettes nitrogen i form av aminosyrer eller uorganiske nitrogenforbindelser. Aminosyrer har også innvirkning på produksjon av alkoholer som påvirker smak eller kan bli omgjort til estere. [8] Foruten nitrogenforbindelser kan også lipidforbindelser eller stoffer suspendert i vørteren påvirke fermenteringen. [18]

Temperatur har innflytelse på produksjon av smaksstoffer. Ved å øke temperaturen vil fermenteringen gå raskere og konsentrasjonen av estere og alkoholer som produseres øke. [8] Selv om endringene i konsentrasjon er små, er det mulig at disse endringene kan oppfattes. Trykk kan også påvirke esterproduksjon, generelt vil det produseres mindre estere med høyere trykk. [18]

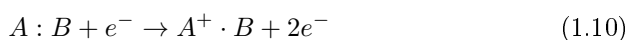
1.4 Gasskromatografi og massespektrometri

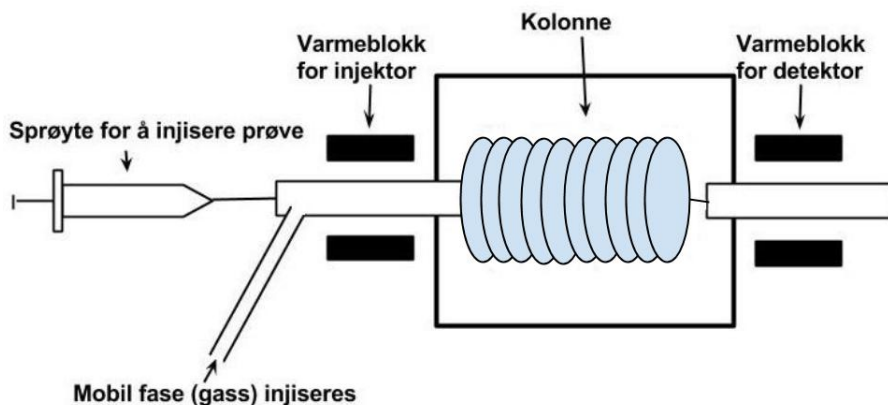
Gasskromatografi og massespektrometri er ofte brukt for å identifisere enkeltstoffer eller analysere prøver med mange ukjente stoffer. Øl er en kompleks blanding av stoffer og egner seg til å analyseres på en gasskromatograf koblet med et massespektrometer (GC-MS).

I en kromatograf er det én stasjonær og én mobil fase. Prøven plasseres på den stasjonære fasen, og den mobile fasen setter molekylene i prøven i bevegelse. Stoffer har ulik motstand mot bevegelse over det stasjonære materialet, og vil ha ulik fart. I en gasskromatograf er den mobile fasen en inert gass, f.eks. helium eller nitrogen. Gassen vil frakte stoffer med seg gjennom kolonnen, som er et tynt, langt, oppkveilet rør. Inne i kolonnen er det ofte brukt kuler med et belegg eller en overflate som innholdet i prøven vil holdes tilbake på. Disse kulene er den stasjonære fasen og holder stoffene tilbake i ulik grad. Stoffene vil dermed bruke ulik tid gjennom kolonnen (retensjonstid = RT). [29]

Prøven kan enten injiseres som gass (headspace GC-MS) eller væske, der væske er det vanligste. I headspace GC-MS oppbevares prøven i en tett beholder og sprøyten vil ta prøve fra gassfasen. Stoffene vil etter hver oppnå likevekt mellom gass og væske. Flyktige stoffer er derfor passende å analysere ved hjelp av headspace GC-MS. Etter injisering vil stoffene holdes tilbake av den stasjonære fasen avhengig av hvor ofte stoffene i prøven vil være i væskefase. Hvis stoffene er i væskefase, er de adsorbent på kulene og holdes tilbake. Så fort stoffene fordampes, blir de fraktet videre med gassfasen. Ulike stoffer separeres og molekylene som er like forlater kolonnen samtidig. Når det kommer stoff ut av kolonnen vil det registreres, og antall registreringer vil være det samme som antall ulike stoffer i prøven. Tiden det ukjente stoffet bruker gjennom kolonnen kan sammenlignes med kjente stoffer. Dermed blir det lettere å identifisere det ukjente stoffet. Figur 1.8 illustrerer hvordan en typisk gasskromatograf er satt sammen. [29]

Etter at stoffene har blitt separert i gasskromatografen vil de føres videre inn i massespektrometeret. En elektronstråle ioniserer stoffene som injiseres. Elektronene i strålen slår løs elektroner i stoffene og kationradikaler dannes. Dette er vist i ligning 1.10. [29]





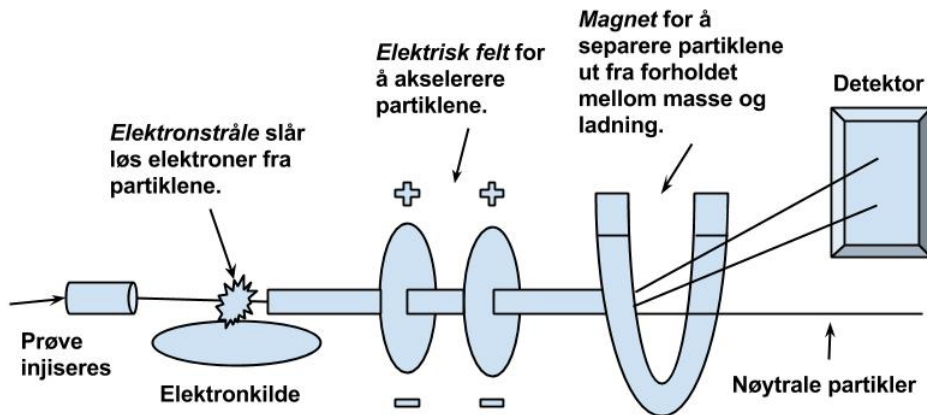
Figur 1.8: Skisse av en gasskromatograf og hvordan den virker. Prøve injiseres og varmes opp til en bestemt temperatur før den mobile fasen fører prøven gjennom kolonnen. Gasskromatografen har ofte en egen detektor for å registrere retensjonstid. I mange tilfeller føres de separerte stoffene fra gasskromatografen direkte inn i et massespektrometer.

I massespektrometer brukes det ofte 70 eV og denne typen stråling vil, i tillegg til å ionisere molekylene, bryte kjemiske bindinger. Det dannes da noen positive og noen nøytrale partikler, som vist i ligning 1.11.



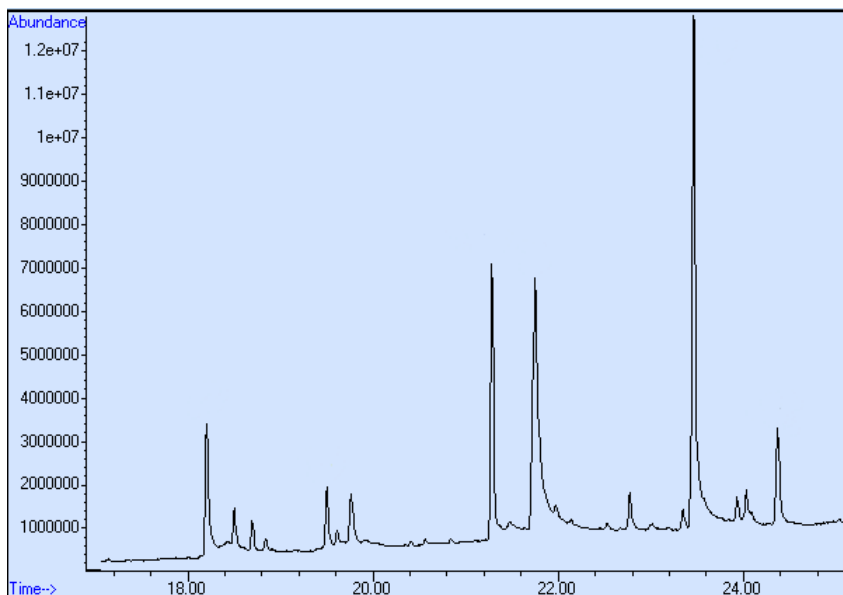
Etter ioniseringen blir stoffene akselerert ved hjelp av et elektrisk felt. Deretter passerer de et magnetfelt som fører til at stoffenes baner avbøyes. Forholdet mellom masse og ladning (m/z) fører til ulik avbøyning av stoffenes bane. Nøytrale partikler vil ikke registreres av detektoren siden det magnetiske feltet ikke fører til avbøyning av deres bane, men de ladde partiklene vil bli registrert. Partiklene med lave verdier for m/z vil avbøyes mer enn partiklene med høye verdier. Det er ulike mengder av de ulike stoffene og dette representeres ved intensitet i massespektrene. Intensiteten registreres som funksjon av m/z for

hvert stoff som går gjennom massespektrometeret. I Figur 1.9 vises en skisse av et massespektrometer og dets vanligste funksjoner. [29]

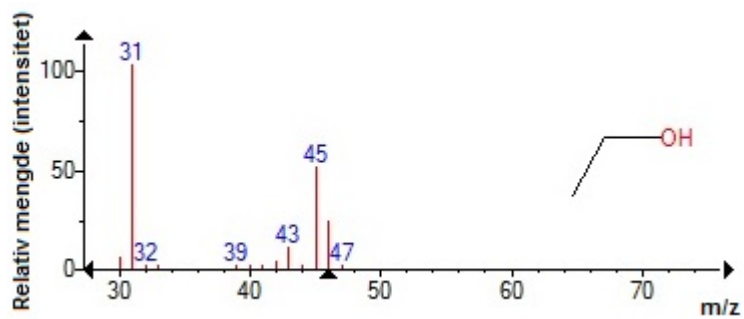


Figur 1.9: Skisse av et massespektrometer og hvordan det virker. En prøve injiseres for så å bli ionisert ved å bli bestrålt av elektroner. Prøvepartiklene akselereres inn i feltet til en magnet som forandrer banen til de ladde partiklene. Partiklene har ulikt forhold mellom masse og ladning (m/z) som fører til ulik avbøyning av banen. Partiklene og deres avbøyning registreres av en detektor.

Figur 1.10 viser et kromatogram der hver topp representerer et stoff, med mindre det er overlapp mellom stoffene. For hver topp kan man få massespektret til stoffet. I Figur 1.11 er massespektret for etanol gitt, for å gi en idé av hvordan et massespekter ser ut.



Figur 1.10: Kromatogram for en prøve med ukjente stoffer, der intensitet eller mengde er gitt som funksjon av retensjonstiden.



Figur 1.11: Massespekteret til etanol der relativ mengde er gitt som funksjon av forholdet mellom masse og ladning (m/z).

Kapittel 2 Materialer og metoder

For å produsere øl må det først produseres vørter. Dette blir overført til sterile fermenteringsbeholdere. I del 1 brukes det tre ulike inokulumsmengder av *S. cerevisiae*, i Red Ale. Fermenteringsutviklingen følges ved å teste specific gravity, pH og ta ut prøver til GC-MS ved bestemte tidspunkt. I del 2 studeres forskjellene i fermentering som følge av oksygenering av vørter og rehydratisering av tørrgjær for produksjon av en Red Ale. Specific gravity, pH og prøver til GC-MS blir tatt også her. I del 3 blir det produsert Wit med ulike inokulumsmengder, og Wit fermentert ved ulike temperaturer. Kimtall og tørrvekt analyseres, i tillegg til headspace-GC-MS og specific gravity.

For en detaljert fremgangsmåte for bryggingen og for å se en skisse av bryggetutstyret, se Tillegg B.

2.1 Gjærtype og medium

Eksperimentene ble utført med gjærtypene Fermentis Safale US-05 [30] og White Labs' WLP400 [31], for henholdsvis Red Ale og Wit.

Maltsammensetning

For del 1 og 2 ble det produsert vørter til Red Ale. Maltsammensetningen i de to bryggingene er litt ulike, og malttypene og mengde av disse er gitt i Tabell 2.1 for del 1 og 2.2 for del 2. For del 1 ble det laget det dobbelte av det oppskriften viser for å få 60 liter vørter i stedet for 30 liter. Maltet ble i begge tilfeller kjøpt og kvernet på Bakke Brygg AS (Fjordgata 9, 7010 Trondheim).

Tabell 2.1: Maltsammensetning for Red Ale, del 1.

Malt	Mengde [kg]
Pale Malt, Marris Otter	4,0
Munich Malt	1,2
Melanoiden Malt	1,0
Munich Malt - 20L	1,0
Chocolate Malt	0,1

Tabell 2.2: Maltsammensetning for Red Ale, del 2.

Malt	Mengde [kg]
Pale Malt, Maris Otter	3,5
Munich Malt - 10L	2,2
Melanoiden Malt	1,0
Chocolate Malt	0,1

Maltsammensetningen for del 3 er gitt i Tabell 2.3 og er basert på Ægirs Wit [27]. Den er skalert opp til 30 liter ferdig produkt. Maltet ble kjøpt og kvernet på Bakke Brygg AS (Fjordgata 9, 7010 Trondheim).

Tabell 2.3: Maltsammensetning for Wit, del 3.

Malt	Mengde [kg]
Munton's Pale Ale	3,0
Hvetemalt	2,0
Munton's torrified wheat	1,0
Flaket havre	0,6

Programmet BeerSmith 2.0 ble brukt for å beregne mengde vann som må brukes i mesken, samt temperaturen vannet må være ved før maltet tilsettes. Rapportene fra BeerSmith 2.0 for bryggingene er gitt i Tillegg A.

Salttilsetninger

Vannet som brukes tilsettes salter. Noen salter tilsettes for å justere pH, andre for å forbedre gjærens vekstsvilkår. En oversikt over konsentrasjoner av de ulike saltene er gitt nedenfor, i Tabell 2.4 og 2.5. Dette er anbefalte mengder for henholdsvis Red/Amber Ale og Wit. [32] Kalsiumsulfat ($CaSO_4$) tilsettes til totalvolumet, kalsiumkarbonat ($CaCO_3$) til meskevannet, og magnesiumklorid ($MgCl_2$) og sinkulfat ($ZnSO_4$) til vørteren som kokes. Mengder av de ulike saltene er gitt i oppskriftene i Tillegg A.

Tabell 2.4: Saltkonsentrasjoner i vann for å få riktig vannkvalitet i en Red/Amber Ale, i tillegg til salter som gir bedre vekstsvilkår for *S. cerevisiae*.

Salt	Konsentrasjon [g/L]
$CaSO_4$	0,4
$CaCO_3$	0,2
$MgCl_2$	0,05
$ZnSO_4$	$4 \cdot 10^{-4}$

Tabell 2.5: Saltkonsentrasjoner i vann for å få riktig vannkvalitet i en Wit, i tillegg til salter som gir bedre vekstsvilkår for gjæren.

Salt	Konsentrasjon [g/L]
$CaSO_4$	0,2
$CaCl_2$	0,1
$MgCl_2$	0,05
$ZnSO_4$	$4 \cdot 10^{-4}$

Humle

Foruten vann, malt, salter og gjær tilsettes også humle. Mengde og tidspunkt for å tilsette disse under kokingen er gitt i Tabell 2.6, 2.7 og 2.8 for henholdsvis del 1, del 2 og del 3. Den nedkjølte vørteren fordeles på ønsket antall fermenteringsbeholdere og er vekstmedium for *S. cerevisiae*.

Tabell 2.6: *Typer humle og mengde av hver humle tilsatt i Red Ale, del 1. Tidspunkt for å tilsette humlene er også gitt.*

Humle	Tid før avslutning [min]	Mengde [g]
Bitterhumle, Tomahawk 16,4%	60	25,0
Aromahumle, Cascade 5,9%	0	50,0
Aromahumle, Tomahawk 16,4%	0	50,0

Tabell 2.7: *Typer humle og mengde av hver humle tilsatt i Red Ale, del 2. Tidspunkt for å tilsette humlene er også gitt.*

Humle	Tid før avslutning [min]	Mengde [g]
Bitterhumle, Tomahawk 16,4%	60	20,0
Aromahumle, Cascade 5,9%	0	50,0
Aromahumle, Tomahawk 16,4%	0	50,0

Tabell 2.8: *Typer humle og mengde av hver humle tilsatt i Wit, del 3. Tidspunkt for å tilsette humlene er også gitt.*

Humle	Tid før avslutning [min]	Mengde [g]
Bitterhumle, Tettnanger 2,1%	60	25,0
Bitterhumle, Tettnanger 2,1%	30	50,0
Aromahumle, Tettnanger 2,1%	10	50,0

Petriskåler med YPD-agar

For å lage 500 ml YPD-agar, vei ut 5 g gjærekstrakt, 5 g baktopepton, 10 g glukose og 10 g agar, som overføres til en 1-liters flaske. Tilsett vann til det er et volum på 500 ml i flasken. Innholdet blandes deretter ved hjelp av en magnetrører. Autoklaver blandingen og kjøøl den ned til ca 50 °C før den helles over i petriskåler. Blandingens skal kun dekke bunnen. La stå til de har stivnet før de settes med bunnen opp i et kjøleskap.

Rehydratisering av tørrgjær

Tørrgjæren trenger å rehydreres før fermenteringen kan starte. For å rehydratisere tørrgjæren før den tilsettes til vørteren drysses ønsket mengde gjær over sterilt vann, mengde vann skal være minst 10 ganger gjærens vekt. Dette får hvile i 15 minutter før blandingen røres i 30 minutter. Blandingens kan nå tilsettes fermenteringsbeholderen.

Gjærstarter for våtgjær

For å lage en tilstrekkelig stor gjærstarter, tilsettes to liter vann og 200 g Dry Malt Extract (DME) til en tre liter stor erlenmeyerkolbe før den autoklaveres. Når blandingen har blitt kjøølt ned til romtemperatur tilsettes to tempererte gjærampuller av typen White Labs WLP400. Gjærstarteren står til røring i to døgn for å få opp celleantallet. Stopp røringen og sett kolben kjøølig (15 °C) så cellene sedimenterer. Dekantér av så mye som mulig av væsken før cellene resuspenderes. Dette skal inneholde ca. $5 \cdot 10^{-11}$ gjærceller og fordeles i vørteren etter ønske.

2.2 Fermenteringsforhold

I del 1 ble det brukt fire forskjellige inokulumsmengder og disse er gitt i Tabell 2.9. Hvis ikke noe annet spesifiseres, utføres fermenteringene ved 20 °C.

*Tabell 2.9: Ulike inokulumsmengder av *S. cerevisiae* tilsatt vørteren. Anbefalt antall celler/ml er gitt i Ref, i tillegg er det to ytterpunkter: fem ganger Ref og en femdel av Ref. Disse verdiene brukes i både Red Ale og Wit.*

Batch	# celler/ml
Ref	$5 \cdot 10^6$
5·Ref	$25 \cdot 10^6$
$\frac{1}{5}$ ·Ref	$1 \cdot 10^6$

Vørteren fra del 1 (Red Ale) ble fordeles på ønsket antall beholdere, uten oksygenering av vørteren. *S. cerevisiae* tilsettes ved å drysse den over vørteren. Utveiling av tørrgjær utføres i et sterilt miljø. Referanseverdien er mengde tørrgjær anbefalt av Fermentis og tilføres beholder #1 og #2. I tillegg brukes to ytterpunkter: fem ganger (#3 og #4) og en femdel (#5 og #6) av referanseverdien.

Vørteren fra del 2 (Red Ale) fordeles på tre beholdere og anbefalt inokulumsmengde tilsettes alle tre ($5 \cdot 10^6$ celler/ml vørter). I den første beholderen tilsettes rehydratisert tørrgjær. Den andre beholderen oksygeneres i 30 min etter tørrgjæren tilsettes. For å ha noe å sammenligne med er vørteren i den siste dunken ikke oksygenert og tørrgjæren ikke rehydratisert. Dette er referansebeholderen.

I del 3 (Wit) blir vørter overført til 15 erlenmeyerkolber på en liter, 800 ml vørter i hver. Resten av vørteren fordeles på tre beholdere. Alle EM-kolber og beholdere har gjærlås. Det brukes tre forskjellige inokulumsmengder i EM-kolbene. For batch 1 har de tre store beholderne tre ulike fermenteringstemperaturer, 15, 20 og 25 °C, og har samme inokulumsmengde. I batch 2 ble de store beholderne tilsatt tre ulike inokulumsmengder. Det skal da være mulig å ha sensorisk analyse av ulike fermenteringstemperaturer og av ulike inokulumsmengder for Wit.

2.3 Prøvetaking

For del 1 og 2 ble det tatt ut prøver underveis i fermenteringen for å måle specific gravity og pH, og for å analysere prøvene på GC-MS (vannfase). Fra toppen av fermenteringsdunkene ble det tatt ut 1 ml prøve, overført til eppendorfrør på 1,5 ml. Dette fryses ned umiddelbart for senere å analyseres på GC-MS. For del 1 ble gjærkaken resuspendert og en analyse ble utført for å beregne tørrvekten på hele gjærkaken. I tillegg ble det ferdige produktet i del 1 og 2 analysert på headspace GC-MS.

Kimtallsanalyse, tørrvekt av gjærkaken, SG, pH og headspace GC-MS-analyse ble utført i del 3. Erlenmeyerkolbene ble ristet så blandingen med øl og gjærkake ble homogen. 50 ml av blandingen ble tatt ut for så å bli sentrifugert. Supernatant ble tatt over i et nytt rør på 50 ml og frosset ned for å bruke i headspace GC-MS-analyse. Pelleten ble brukt i tørrvektsanalyse. 1 ml av homogen blanding fra erlenmeyerkolben ble tatt ut for å lage en fortynningsserie til bruk i kimtallsanalyse. For hver inokulumsmengde ble en kolbe analysert ved hvert tidspunkt. Dette ble gjentatt fem ganger.

Fra beholderene med vørter som ble fermentert ved tre ulike temperaturer ble det også tatt ut prøver til SG og headspace GC-MS. Dette ble gjort ved samme tidspunkt som prøvetaking fra erlenmeyerkolbene.

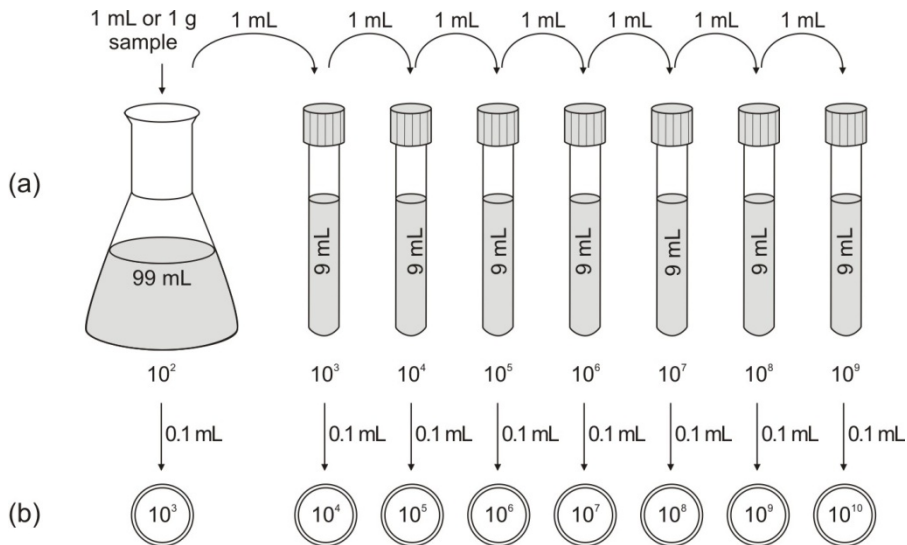
2.4 Fermenteringsanalyse

2.4.1 Specific gravity

Overfør prøve til en 100 ml målesylinder med et hydrometer. Når hydrometeret flyter er nok prøve overført. Spinn hydrometeret for å fjerne eventuelle bobler og les av verdien for specific gravity.

2.4.2 Kimtallsanalyse

Lag fortynningsserie med sterilt vann, fortynninger ned til 10^{-6} . 200 μl og 100 μl av hver fortynning plates ut på YPD-agarskåler. Disse settes i varmeskap ved 30 °C i ca. to døgn. Antall kolonier, kim, på hver plate noteres. Illustrasjon av kimtallsanalyse vises i Figur 2.1.



Figur 2.1: a) Fortynningsserie av prøve der fortynningene er i en faktor på 10. b) Et kjent volum av fortynningen plates ut på en agarskål. [33]

2.4.3 Tørrvektsanalyse

Pellet fra 50 ml prøve resuspenderes i 10 ml destillert vann og helles over på en forhåndsveid aluminiumsskål. Denne står i varmeskap på 120 °C over natten før den veies på nytt. Noter resultatene.

2.4.4 Gasskromatografi og massespektrometri, vannfase

Prøvene ble tint og deretter filtrert før de ble analysert på GC-MS. 400 μ l ble overført til VWR Centrifugal Filter (500 μ l). Disse ble sentrifugert i 10 minutter ved 14000 rps. Filtratet ble overført til en 15 mm glassbeholder plassert nede i VWR Vial short thread (1,5 ml) med skrukork. Filteret kastes. Resten av prøvene ble lagt tilbake i fryseren. Prøvene ble analysert på Agilent Technologies' gasskromatograf (Agilent 7890) koblet med et massespektrometer (Agilent 5975C) [34]. Prøvene ble tatt ved hjelp av en elektronisk prøvetaker (ALS: Automatic Liquid Sampler). I gasskromatografen ble kolonnen Agilent J&W DB-FFAP brukt [35]. For å se programmet brukt, se Tillegg C.

2.4.5 Gasskromatografi og massespektrometri, headspace

Prøvene ble tint og 10 g ble overført til 20 ml headspace GC-MS-flasker, lokk ble satt på. Prøvene ble analysert på Agilent Technologies' gasskromatograf (Agilent 7890) koblet med et massespektrometer (Agilent 5975C) [36], der prøvene ble tatt ved hjelp av en elektronisk prøvetaker (Agilent 7697A Headspace Sampler) [37]. Kolonnen Agilent J&W DB-WAX ble brukt i gasskromatografen [38]. Detaljer rundt metoden brukt er gitt i Tillegg D.

Kapittel 3 Resultater

3.1 Red Ale

3.1.1 Fermentering med tre ulike inokulumsmengder

I den første batchen av Red Ale ble det produsert 35 liter vørter som ble fordelt på seks beholdere. Det ble tilsatt tre ulike inokulumsmengder (ref, 5ref og 1/5ref), og gjærmengdene er gitt i Tabell 3.1. Gjæren brukt i fermenteringen er Safale US-05.

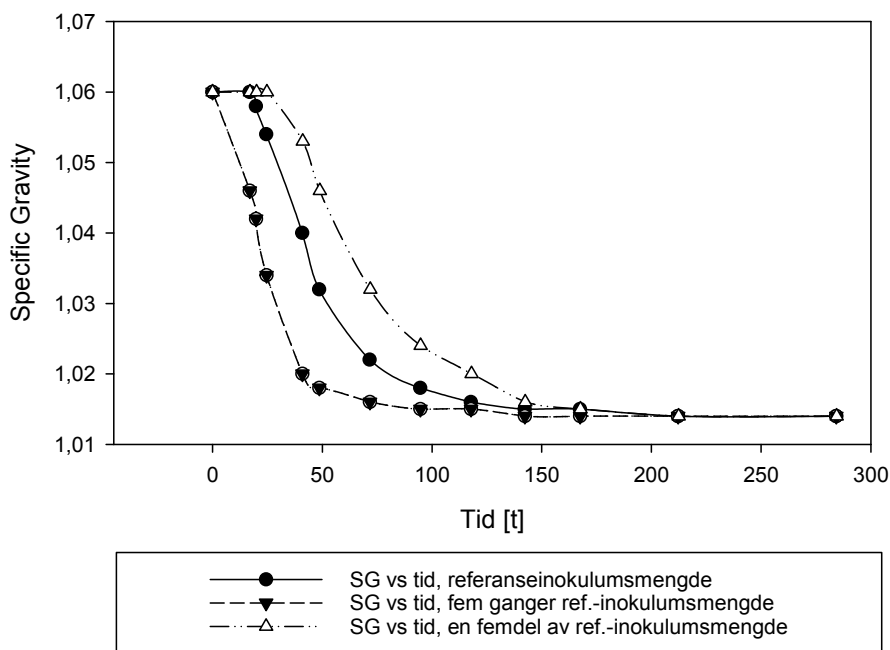
Tabell 3.1: Ulike inokulumsmengder av *S. cerevisiae*, Safale US-05, tilsatt i Red Ale.

Nummer	Batch	Konsentrasjon [g/L]
#1, #2	Ref	0,46
#3, #4	5·Ref	2,30
#5, #6	$\frac{1}{5}$ ·Ref	0,09

Specific gravity

Specific gravity ble målt som en funksjon av tid for de ulike parallellene. SG ble ikke korrigert for svingningene i romtemperatur da disse ikke gir store utslag. Temperaturen varierer mellom 18,5 og 21 °C og dette gir ingen endring i verdiene for SG. For å se rådata, se Tillegg E.1.

Fra Red Ale med ulike inokulumsmengder ble det tatt prøver oftest i begynnelsen av fermenteringen, siden SG endres fort i begynnelsen. Figur 3.1 viser SG for Red Ale; to dunker med anbefalt mengde gjær, to med fem ganger så mye gjær og to med en femdel av det anbefalte. Gjennomsnittet mellom to paralleller er brukt i figuren. Latensfasen til ref og 1/5 ref er på henholdsvis 20 og 40 timer. Til sammenligning hadde 5 ref ingen tydelig latensfase. Da fermenteringen startet forløp den like raskt for alle tre. Original gravity er på 1,060, og alle parallellene ender opp med en final gravity på 1,014.



Figur 3.1: Specific gravity som funksjon av tid, for Red Ale med ulike inokulumsmengder av *S. cerevisiae*, Safale US-05: ref, 5ref og 1/5ref.

Tørrvekt

For Red Ale med tre ulike inokulumsmengder ble gjærkakene resuspendert, tørket og så veid. Gjennomsnittresultatene er gitt i Tabell 3.2, sammen med antall celler. Dette gjelder for red ale med anbefalt, fem ganger anbefalt og en femdel av anbefalt inokulumsmengde. Antall celler ble beregnet ut fra gjennomsnittsvekten på en gjærcele, $8 \cdot 10^{-11}$ g. [39] Antall celler for de tre parallellene etter fermenteringen var ferdig, er i samme størrelsesorden.

Tabell 3.2: Tørrvekt og antall celler i Red Ale med tre ulike inokulumsmengder.

Batch	Tørrvekt [g]	Antall celler
Referanse	48	$6 \cdot 10^{11}$
5 · referanse	56	$7 \cdot 10^{11}$
1/5-del av referanse	40	$5 \cdot 10^{11}$

Fra antall celler ved start og slutt kan antall generasjoner beregnes, ved å bruke ligning 1.1. I Tabell 3.3 er antall celler ved start, N_0 , antall celler ved slutt, N , og antall generasjoner, n , gitt. Antall generasjoner er lavest der inokulumsmengden var høyest. Det trengs færre generasjoner for å komme opp i passende celleantall for fermenteringen, når inokulumsmengden er høyere.

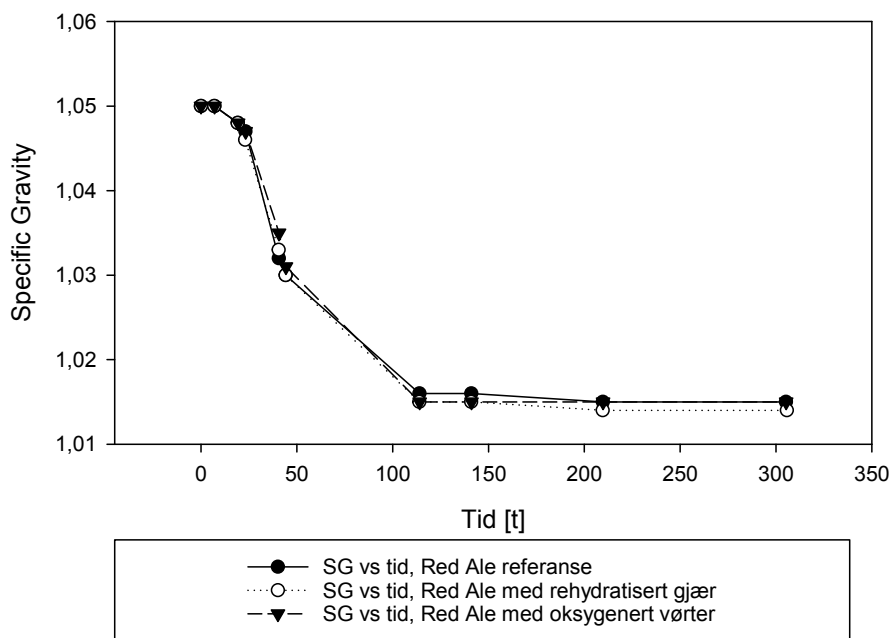
Tabell 3.3: Verdier for antall generasjoner, n , i Red Ale, beregnet fra antall celler ved start, N_0 , og antall celler ved slutt, N .

Parallell	N_0	N	n
Referanse	$3 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^{11}$	8
5 · referanse	$1 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^{11}$	6
1/5-del av referanse	$6 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^{11}$	10

3.1.2 Fermentering med ulike forbehandlinger

Det ble produsert 30 liter Red Ale-vørter, som ble fordelt på tre beholdere. I den første beholderen ble det tilsatt rehydratisert gjær og i beholder nummer to ble vørteren oksygenert i 30 minutter før tørrgjæren ble tilsatt. Den siste beholderen ble brukt som referanse, uten oksygenering eller rehydratisering av tørrgjæren. De andre parameterne var like for alle parallellene: samme vørter, original gravity = 1,050, inokulumsmengde, fermenteringstemperatur og type gjær (Safale US-05). Figur 3.2 viser utviklingen i SG som funksjon av fermenteringstiden.

Fermenteringsutviklingen i de tre beholderne følger hverandre tett, men parallellen med rehydratisert gjær ender opp med $SG = 1,014$, der de to andre til sammenligning har $SG = 1,015$.

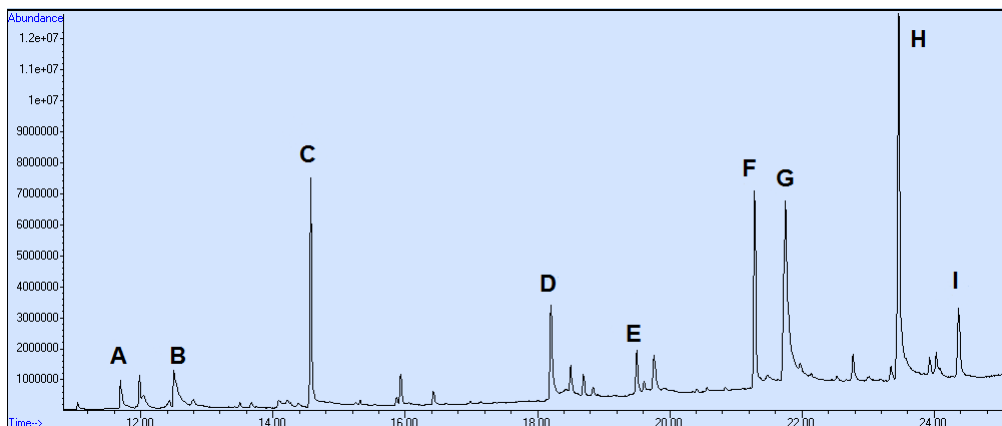


Figur 3.2: Specific gravity som funksjon av tid for Red Ale med ulike forbehandling: rehydratisering av tørrgjæren eller oksygenering av vørter. I tillegg er det en referanse, uten noe forbehandling. Gjæren Safale US-05 er brukt i alle tre.

3.1.3 Gasskromatografi og massespektrometri: væskefase

For Red Ale med ulike inokulumsmengder ble 50 prøver analysert på GC-MS, der væskefasen blir injisert. Toppene i kromatogrammet har blitt analysert som funksjon av tid. Agilent Mass Hunter ble brukt for å kalkulere arealene av toppene som ble funnet. Arealene ble plottet som funksjon av tid, og utviklingen for de tre parallellene kan sammenlignes for hvert stoff. Ved hjelp av AMDIS og NIST-biblioteket ble toppene i prøvene kvalifisert ved å sammenligne med kjente stoffer og deres massespektre. I Figur 3.3 vises et av kromatogrammene funnet ved GC-MS-analysen, der ni av stoffene er analysert videre. Toppene har blitt gitt navn A - I. De ble identifisert med varierende grad av sikkerhet for de 50 prøvene, og dette er gitt i Tabell 3.4, sammen med navn, CAS-nummer og retensjonstid. Resten av toppene som er vist på kromatogrammet er vanskeligere å identifisere enn A - I, og derfor ikke analysert videre.

De fleste stoffene funnet har naturlige forekomster i kornprodukter eller and-



Figur 3.3: Eksempel på kromatogram vist i Agilent Technologies' Enhanced Data Analysis ChemStation (E.02.02.1431), der toppene som har blitt markert, er analysert videre. Disse har blitt navngitt A-I.

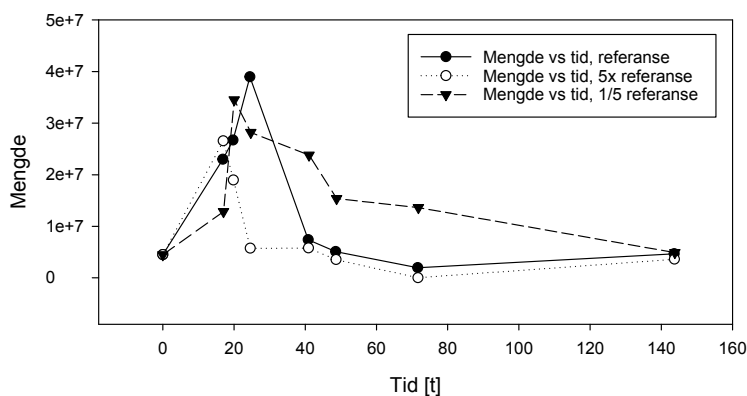
re planteprodukter. 2-furanolmetanol (C), også kalt furfurylalkohol, er forbundet med korn og kornprodukter. [40] Smaken av 2,3-dihydro-3,5-dihydrokso-6-metyl-4H-pyran-4-on (F) og maltol (D) har blitt identifisert som karamellaktig,

og stammer antakeligvis fra maltet. [41] 1,3-dihydroksey-2-propanon (E) er et karbohydrat funnet i planter, ofte som følge av fermentering av glyserol. Glyserol (G) er, på en annen side, mer knyttet til mikrobiell vekst [42]. Glyserol er forholdsvis viskøst, som kan gi ølet en bedre konsistens. 5-hydroksymetyl-2-furankarboksaldehyd (H), eller hydroksymetylfurfural, oppstår under varmebehandling av sukkerholdig mat. [43] Dihydro-4-hydroksey-2(3H)-furanon, har likheter til stoffene nevnt over, og har antakeligvis kommet fra maltet i likhet med de fleste andre. Glyserol skiller seg ut, og blir antakeligvis produsert på grunn av mikrobiell vekst.

Tabell 3.4: Gir navn, CAS-nummer, retensjonstid og sannsynligheten for at kvalifiseringen er rett, for A-I. Resultatene er basert på en gasskromatograf- og massespektrometer-analyse av Red Ale med ulike inokulumsmengder av gjær.

Navn	CAS#	RT [min]	Sannsynlighet [%]
A , Eddiksyre	64-19-7	11,72	96,2
B , Maursyre	64-18-6	12,52	82,5
C , 2-furanmethanol	98-00-0	14,57	80,2
D , Maltol	118-71-8	18,21	89,4
E , 1,3-dihydroksey-2-propanon	96-26-4	19,51	86,7
F , 2,3-dihydro-3,5-dihydroksey-6-metyl-4H-pyran-4-on	28564-83-2	21,29	91,2
G , Glyserol	56-81-5	21,77	88,2
H , 5-hydroksymetyl-2-furankarboksaldehyd	67-47-0	23,46	96,0
I , dihydro-4-hydroksey-2(3H)-furanon	5469-16-9	24,37	93,0

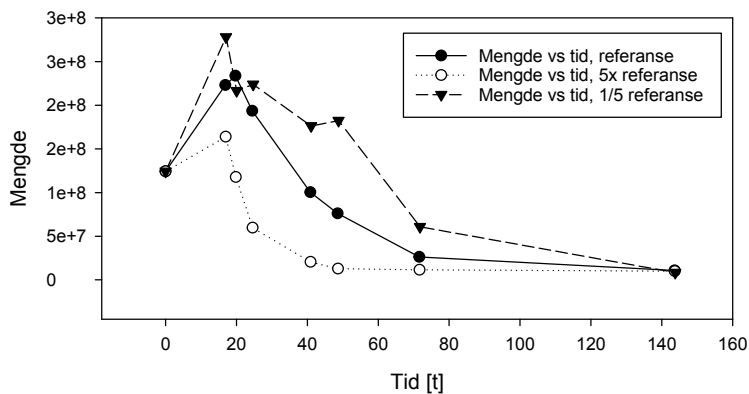
Mengde stoff for toppene A - I ble plottet som funksjon av tid. Disse er gitt i Tillegg H. Mengde stoff økte kraftig i begynnelsen av fermenteringen og nådde topp rundt 20 timer, for de fleste parallellene. Mengde eddiksyre og maursyre økte raskt i starten. De tre parallellene med ulik inokulumsmengde nådde topp rundt 20 timer, for deretter å minke eksponentielt. Den eksponentielle nedgangen var raskest for 5ref og tregest for 1/5 ref. Ved slutten av fermenteringen var mengde eddiksyre og maursyre så godt som tilbake ved utgangspunktet. Dette er vist i Figur 3.4.



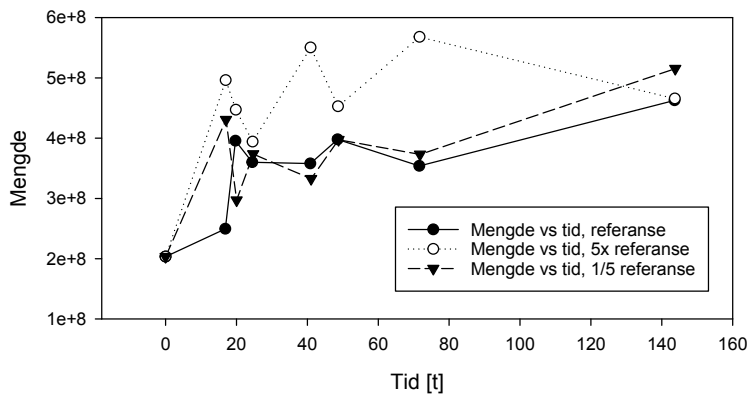
Figur 3.4: Relativ mengde eddiksyre (A) som funksjon av tid, der prøvene er analysert med GC-MS, væskefase.

Stoffene C, D, E, F, H og I følger en lignende trend, med rask økning de første 20 timene, for så minke eksponentielt. Mer stoff blir brutt ned enn produsert, og sluttkonsentrasjonen er lavere enn den initielle konsentrasjonen. Parallellen for 5ref øker ikke mye, og synker deretter raskt. De to andre parallellene har et høyere toppunkt, og minker tregere jo lavere inokulumsmengden er. Dette er vist i Figur 3.5 for F (2,3-dihydro-3,5-dihydrokso-6-metyl-4H-Pyran-4-on), figurene for C, D, E, H og I er å finne i Vedlegg H.

Glyserol er det eneste stoffet funnet ved GC-MS, væskefase, som har netto økning i mengde. Utviklingen er litt ulik mellom de tre parallellene, men de tre ender opp med nesten samme mengde ved slutt av fermenteringen. Dette er vist i Figur 3.6. For alle stoffene er det liten forskjell mellom de tre parallellene i sluttprøven, selv om verdiene underveis i fermenteringen er annerledes.



Figur 3.5: Relativ mengde 2,3-dihydro-3,5-dihydroksey-6-metyl-4H-Pyran-4-on (E) som funksjon av tid, der prøvene er analysert med GC-MS, væskefase.



Figur 3.6: Relativ mengde av glyserol (G) som funksjon av tid, der prøvene er analysert med GC-MS, væskefase.

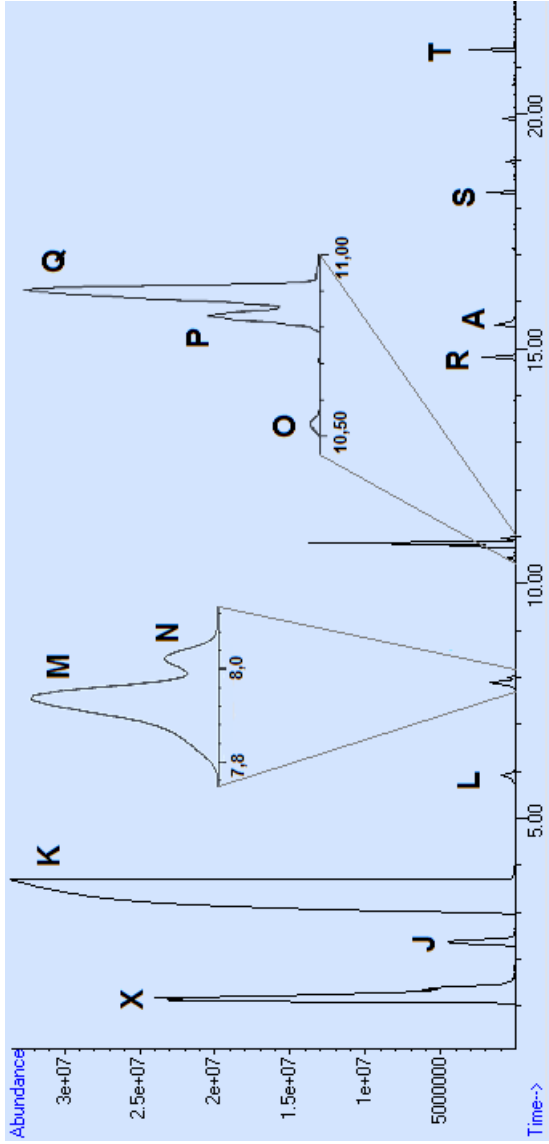
3.1.4 Gasskromatografi og massespektrometri: headspace

For Red Ale ble sluttproduktene, fra inokulumsmengdeforsøkene og forbehandlingsforsøkene, analysert med headspace GC-MS. Dette ble totalt ni prøver. Rådata er gitt i Tillegg I. I Figur 3.7 vises et kromatogram som er et av ni fra analysen gjort med headspace GC-MS. Der det er vanskelig å skille på toppene, fordi de står tett, er det blitt felt inn forstørrede bilder. Stoffene toppene representerer ble kvalifisert, og relativ mengde stoff ble funnet. Stoffene som ble funnet er gitt i Tabell 3.5, der de har blitt navngitt J-T. I tillegg ble eddiksyre (A) funnet, som allerede var blitt detektert i væskefase.

Etanol er et av de vanligste stoffene produsert under fermentering, og er ofte det som forbindes med fermentering og ølproduksjon. De andre alkoholene (fusel-alkoholer) er også å forvente fra en fermentering. Disse blir ofte sett på som usmaker i ølet. [7,8] Det ble også produsert estere, både etyl-estere (O, R og S) og acetat-estere (J og N).

Tabell 3.5: Navn, CAS-nummer, retensjonstid og sannsynligheten for at kvalifiseringen er rett for J-T. Resultatene er basert på en gasskromatograf- og massespektrometeranalyse av Red Ale, og er sortert etter retensjonstiden.

Navn	CAS#	RT [min]	Sannsynlighet [%]
J, Etylacetat	141-78-6	2,37	94-96
K, Etanol	64-17-5	3,72-3,81	81-87
L, 1-propanol	71-23-8	5,99	95-97
M, 2-metyl-1-propanol	78-83-1	7,94	94-95
N, 3-metyl-1-butylacetat	123-92-2	8,03	89-91
O, Etylheksanoat	123-66-0	10,54	80-88
P, 2-metyl-1-butanol	137-32-6	10,85	44-65
Q, 3-metyl-1-butanol	123-51-3	10,91	66-68
R, Etyloktanoat	106-32-1	14,80	91-92
S, Etyldekanooat	110-38-3	18,33	83-86
T, 2-fenyletanol	60-12-8	21,37	85-86



Figur 3.7: Eksempel på kromatogram for Red Ale analysert med headspace GC-MS, vist i Agilent Technologies' Enhanced Data Analysis ChemStation. Toppene som vises har blitt analysert videre, kvalifisert og har blitt navngitt J-T. Eddiksyre ble identifisert også her (A). X (den første toppen) er en blanding av mange stoffer som f.eks. karbondioksid og oksygen, og er ikke interessant i denne oppgaven.

For å tydeligere se forskjellene mellom de ulike inokulumsmengdene har forholdet til referansen blitt gitt i Tabell 3.6. Dette er gitt som M_{5ref}/M_{ref} og $M_{1/5ref}/M_{ref}$ for henholdsvis fem ganger referanse og en femdel av referanse, delt på referanseverdien. Forholdet til referansen for parallellene med ulike forbehandlinger er gitt i 3.7. Dette er gitt som M_{O_2}/M_{ref} og M_{rehyd}/M_{ref} for henholdsvis oksygenering av vørter og rehydratisering av tørrgjær. Hvis forholdet er lik 1 vil det si at mengde stoff er det samme som i referansen. Hvis tallet er større enn 1, er det mer stoff enn i referansen.

Tabell 3.6: Mengde av de 11 stoffene i forhold til referansen for ulike inokulumsmengder, M_{5ref}/M_{ref} og $M_{1/5ref}/M_{ref}$.

Stoff	M_{5ref}/M_{ref}	$M_{1/5ref}/M_{ref}$
<i>Alkoholer</i>		
Etanol	0,9	0,9
1-propanol	1,0	0,7
2-metyl-1-propanol	1,7	0,6
2-metyl-1-butanol	1,1	0,7
3-metyl-1-butanol	1,1	0,7
2-fenyletanol	1,6	1,3
<i>Estere</i>		
Etylacetat	0,9	0,7
3-metyl-1-butylacetat	0,7	0,6
Etylheksanoat	0,5	0,9
Etyloktanoat	0,5	0,9
Etyldekanoat	0,8	0,5

3.1.5 Sensorisk analyse av Red Ale

Sensoriske tester av Red Ale med ulike inokulumsmengder indikerte smaksforskjeller mellom de tre parallellene. Først smakte testpersonene på referansen, for å ha dette som nullpunkt. Deretter ble de to ytterpunktene prøvd ut, og alle tre ble sammenlignet med hverandre. Ølet med lavest inokulumsmengde hadde en mild og ren smak, men var muligens litt kjedelig i forhold til de andre to. Ølet med høyest inokulumsmengde hadde mest smak og virket kraftigere, og det ble ikke oppfattet noen distinkte usmaker. I Red Ale med ulike forbehandlinger ble det ikke oppfattet noen forskjeller, men den sensoriske analysen av disse var heller ikke så omfattende som analysen av de ulike inokulumsmeng-

Tabell 3.7: Mengde av de 11 stoffene i forhold til referansen for de ulike forbehandlingene av vørter eller gjær, M_{O_2}/M_{ref} og M_{rehyd}/M_{ref} .

Stoffer	M_{rehyd}/M_{ref}	M_{O_2}/M_{ref}
<i>Alkoholer</i>		
Etanol	0,9	1,0
1-propanol	0,8	0,8
2-metyl-1-propanol	0,8	0,7
2-metyl-1-butanol	0,9	0,8
3-metyl-1-butanol	0,9	0,9
2-fenyletanol	0,7	1,0
<i>Estere</i>		
Etylacetat	4,4	1,6
3-metyl-1-butylacetat	0,5	0,7
Etylheksanoat	0,8	0,9
Etyloktanoat	0,9	0,9
Etyldekanooat	0,8	1,3

dene. En håndsopprekning blant ca 30 personer viste at parallellen med lavest inokulumsmengde ble foretrukket (ca 20 foretrakk $1/5_{ref}$, mens 5 likte hver av de andre to).

3.2 Wit

Gjærstarteren som ble laget til Wit stod i to døgn, de siste 8 timene stod den kjølig, før 1200 ml ble dekantert av fra erlenmeyerkolben. Gjæren ble resuspendert og mengde gjærstarter tilsatt vørteren er gitt i Tabell 3.8. For temperaturforsøket ble referanseinokulumsmengden brukt.

*Tabell 3.8: Ulike inokulumsmengder av *S. cerevisiae* tilsatt i Wit. 15 erlenmeyerkolber med 800 ml vørter og med tre ulike inokulumsmengder: referanse, 5·referanse og $\frac{1}{5}$ ·referanse.*

Batch	Mengde, gjærstarter [ml]
Ref	10,0
5·Ref	50,0
$\frac{1}{5}$ ·Ref	2,0

3.2.1 Fermenteringsutvikling

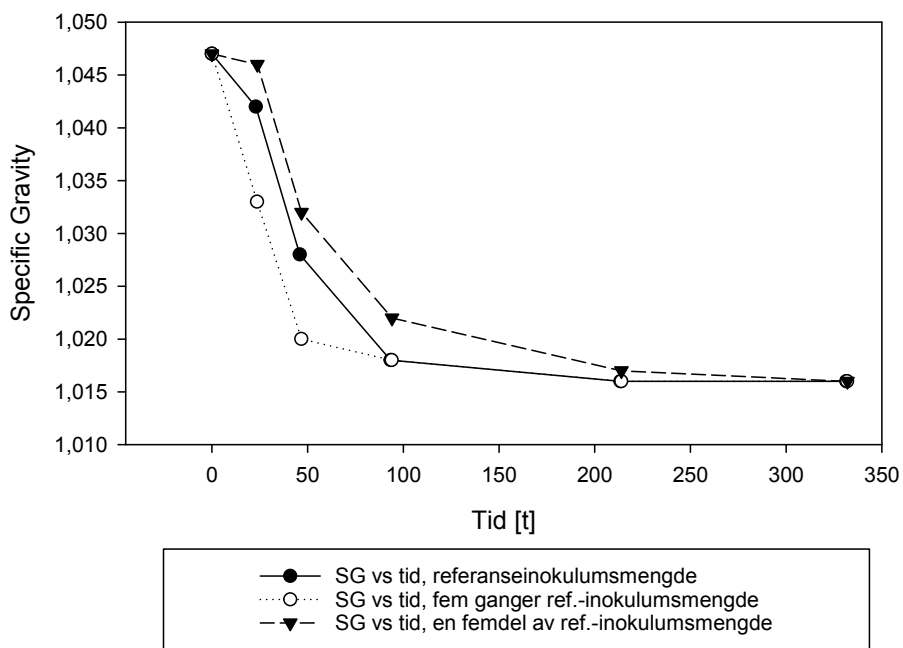
Specific gravity ble målt som en funksjon av tid for de ulike parallellene. SG ble ikke korrigert for svingningene i romtemperatur da disse ikke gir store utslag. Temperaturen varierer mellom 18,5 og 21 °C og dette gir ingen endring i verdiene for SG. For å se rådata, se Tillegg E.2.

Specific gravity:

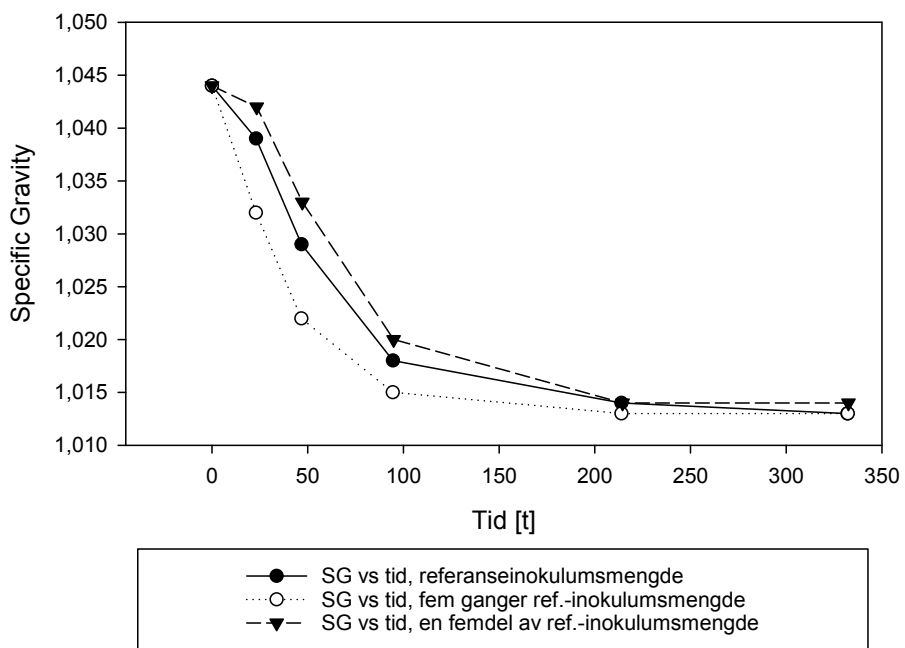
Vørter med ulike inokulumsmengder

Figur 3.8 og 3.9 viser effekten av ulike inokulumsmengder på SG som funksjon av tid for Wit, henholdsvis for batch 1 og 2. Her er det brukt litt færre målepunkter enn i Figur 3.1, som følge av metoden brukt. Det var fem EM-kolber med 800 ml i hver, for hver parallell, som det skulle taes prøver fra. Det var altså mindre volum tilgjengelig for prøvetakning.

Latensfasen for $\frac{1}{5}$ ref er lenger enn for referansen og 5 ganger ref. Fermenteringsforløpet etter latensfase ser ut til å være lik for de tre parallellene.



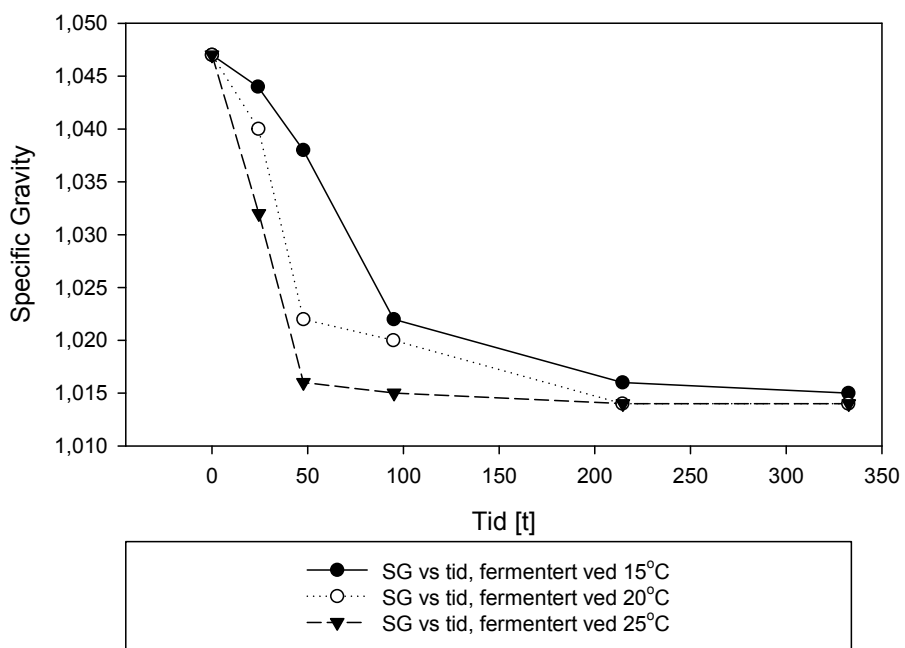
Figur 3.8: Specific gravity som funksjon av tid for Wit med ulike inokulumsmengder, for batch 1.



Figur 3.9: Specific gravity som funksjon av tid for Wit med ulike 0 inokulumsmengder, for batch 2.

Specific gravity:**Fermentering ved ulike temperaturer**

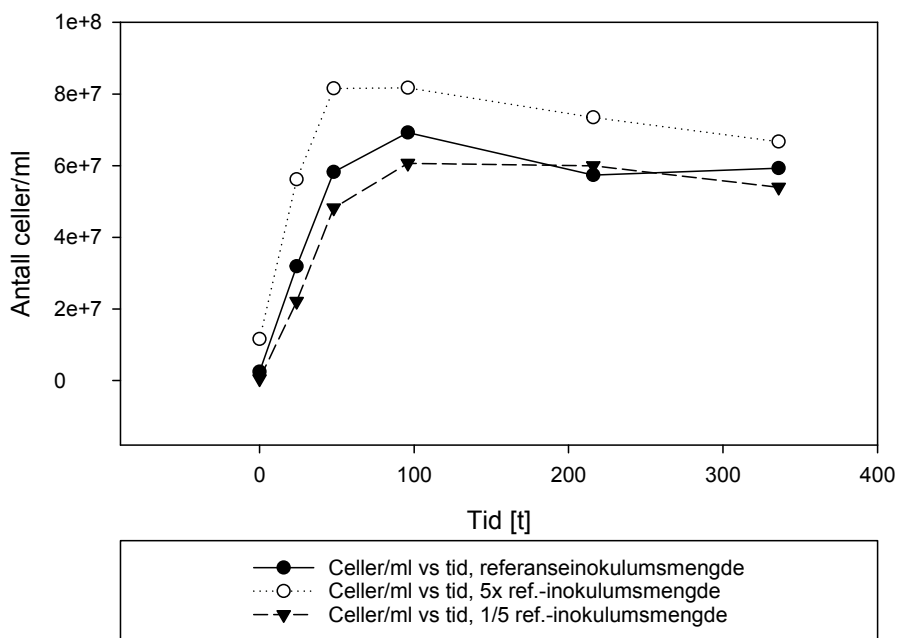
I Figur 3.10 vises endringen i SG for Wit som funksjon av tid. Utgangspunktet for fermenteringen, vørter og inokulumsmengde, er den samme for alle tre, men fermenteringen utføres ved ulike temperaturer: 15, 20 og 25 °C. Normalt vil en ale som denne fermenteres ved 20 °C, så denne parallellen er referansen. Det ser ut til at latensfasen er lengst ved lavest temperatur. Derimot er det ingen tydelig latensfase for den høye temperaturen. Fermenteringsforløpet er raskere ved høyere temperatur, enn ved lavere temperatur. Fermenteringen ved 15 °C ender opp på $SG = 1,014$, i motsetning til de andre to som ender opp på $SG = 1,015$.



Figur 3.10: Specific gravity som funksjon av tid for Wit, fermentert ved ulike temperaturer: 15, 20 og 25 °C. Vørter og inokulumsmengde er den samme for alle tre parallellene.

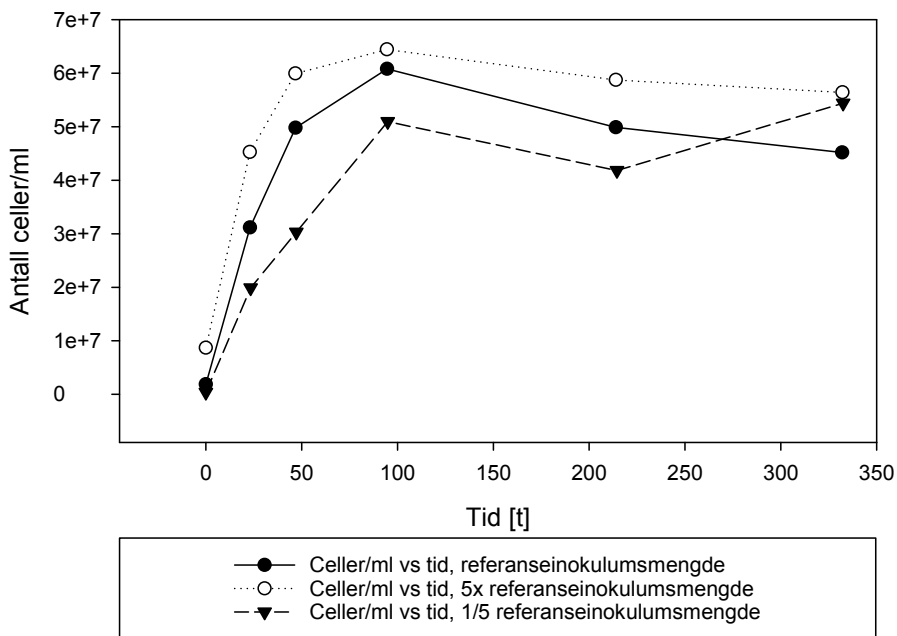
3.2.2 Tørrvekt

Tørrvekt ble målt i begge batchene av Wit. Resultatene er vist som funksjon av fermenteringstiden i Figur 3.11 og 3.12, for henholdsvis batch 1 og batch 2. Det er gitt som antall celler per milliliter, som funksjon av tiden i timer. Antall celler ble beregnet ut fra gjennomsnittsvekten på en gjærcele, $8 \cdot 10^{-11}$ g. [39] Høyere inokulumsmengde fører til raskere økning i antall celler. Etter at toppunktet for antall celler er nådd, er det en treg nedgang i celleantall. Dette er trenden i begge bryggingene.



Figur 3.11: Tørrvekt av gjær per ml vørter som funksjon av inkubasjonstiden for Wit, batch 1. Det er brukt tre ulike inokulumsmengder: en referanse, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

Antall generasjoner ble beregnet for Wit. Sammen med antall celler ved start og slutt er antall generasjoner gitt i Tabell 3.9 og Tabell 3.10, for henholdsvis



Figur 3.12: Tørrvekt av gjær per ml vørter som funksjon av fermenteringstiden for Wit, batch 2. Det er brukt tre ulike inokulumsmengder: referanse, fem ganger referanse og en femdel av referanse.

batch 1 og batch 2. Antall generasjoner for de ulike inokulumsmengdene er lik for batch 1 og 2.

Tabell 3.9: Verdier for antall generasjoner, n , beregnet fra antall celler ved start, N_0 , og antall celler ved slutt, N , i Wit, batch 1.

Parallell	N_0	N	n
Referanse	$2,4 \cdot 10^9$	$5,9 \cdot 10^{10}$	5
5 · referanse	$1,2 \cdot 10^{10}$	$6,7 \cdot 10^{10}$	3
1/5-del av referanse	$5,0 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^{10}$	7

Tabell 3.10: Verdier for antall generasjoner, n , beregnet fra antall celler ved start, N_0 , og antall celler ved slutt, N , i Wit, batch 2.

Parallell	N_0	N	n
Referanse	$1,8 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^{10}$	5
5 · referanse	$8,7 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^{10}$	3
1/5-del av referanse	$3,7 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^{10}$	7

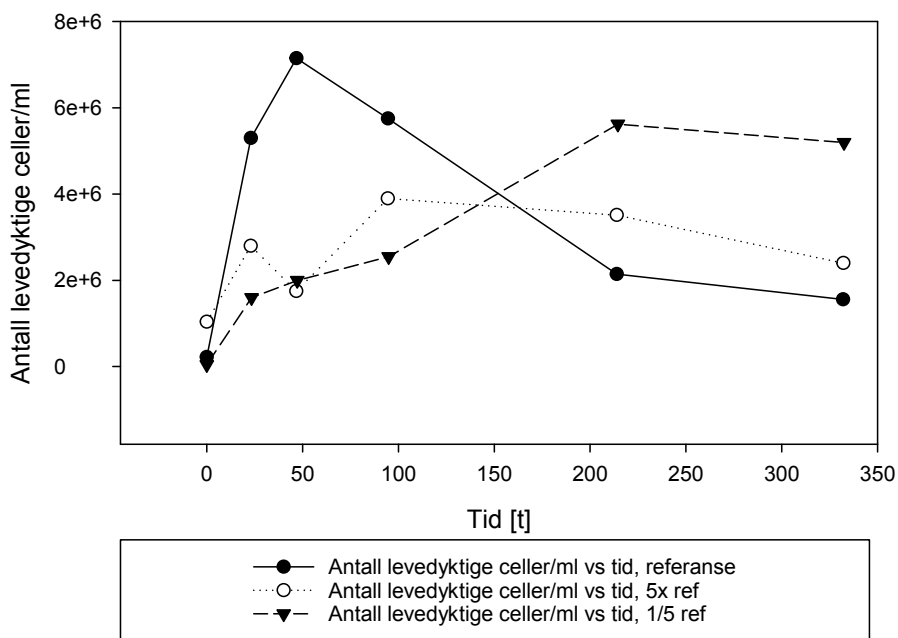
3.2.3 Kimtall

For Wit ble det utført kimtallsanalyser. Fra første brygging (batch 1) ble det ikke funnet noen kim de første tre kimtallsanalysene, fordi løsningene ble fortynnet for mye. Fortynningene brukt er gitt i Tillegg G. Prøvene som ble tatt dag 9 og 14 ble ikke fortynnet så mye som de første prøvene. Antall levedyktige celler ved dag 9 og dag 14 av fermenteringen er gitt i Tabell 3.11, for de tre parallellene.

Tabell 3.11: Antall levedyktige celler ved slutten av fermenteringen i de tre parallellene beregnet fra antall kim, i batch 1 av Wit.

Parallell	Dag 9 [celler/ml]	Dag 14 [celler/ml]
Referanse	$2,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$
5 · referanse	$2,3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
1/5-del av referanse	$2,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$

Siden batch 1 ikke ga nok resultater, ble det utført kimtallsanalyser på batch 2 også, men med andre fortynninger. Antall levedyktige celler per milliliter er gitt i Tillegg G. Det ble utført en kimtallsanalyse av gjærstarteren, og dette fungerer som nullpunktet for plottet i Figur 3.13, som viser antall levedyktige celler som funksjon av tid for Wit, batch 2. Parallellen med referanseinokulumsmengde har en kraftig økning i antall levedyktige celler de første 50 timene, men avtar og ender opp med lavest antall levedyktige celler. Parallellen med lavest inokulumsmengde øker sakte, men sikkert, og ender opp med flest levedyktige celler. Høyest inokulumsmengde ender opp med middels antall levedyktige celler. Alle ender opp i området $1\text{-}5 \cdot 10^6$ celler/ml.



Figur 3.13: Antall levedyktige celler, kim, per milliliter vørter, som funksjon av fermenteringstiden for Wit, batch 2. Det er brukt tre ulike inokulumsmengder: referanse, fem ganger referanse og en femdel av referanse.

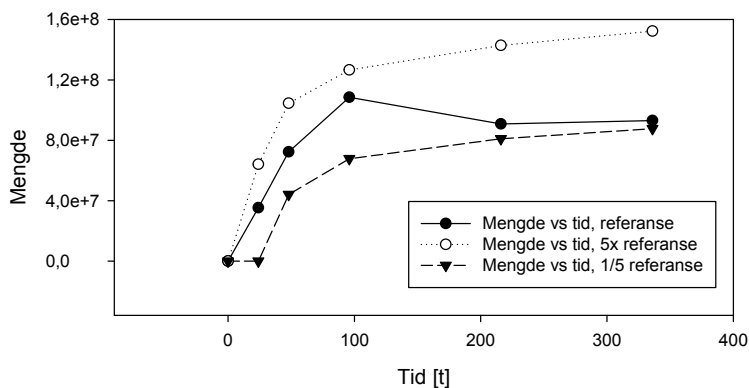
3.2.4 Gasskromatografi og massespektrometri: headspace

For Wit, batch 1 ble det tatt prøver underveis i fermenteringen, som senere ble analysert på headspace GC-MS. Dette ble totalt 31 prøver: en nullprøve før gjæren ble tilsatt, 15 fra inokulumsmengdeforsøket og 15 fra temperaturforsøket. For hvert kromatogram ble toppene integrert, og de tilhørende stoffene identifisert ved hjelp av massespektrene. Kromatogrammene har tilsvarende topper som vist for Red Ale, og de samme stoffene ble identifisert.

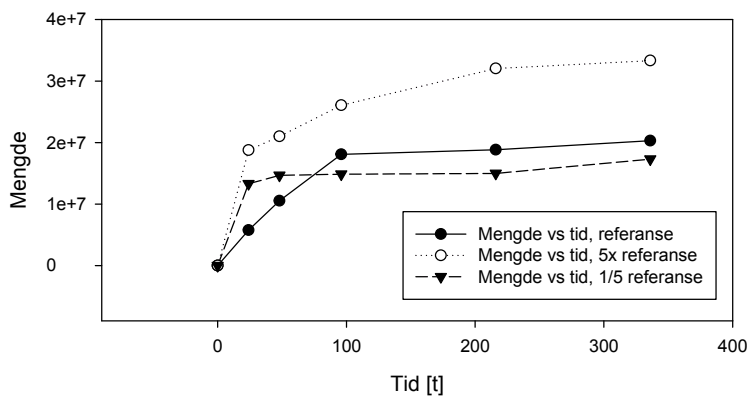
Arealene av toppene, ekvivalent til relativ mengde stoff, og hvilke stoffer som ble identifisert, er gitt i Tillegg J.

Ulike inokulumsmengder

Areal ble plottet som funksjon av fermenteringstiden for stoffene J-T, alle disse er gitt i Tillegg J. Det er en økning i mengde for alle stoffene. Endringen er størst i løpet av de første 100 timene, deretter begynner mengde av stoffene å stabiliseres. Generelt tar det lenger tid før produksjonen av stoffene starter, hvis inokulumsmengden er mindre. Et unntak er 2-fenyletanol, der referansen har lengst latensfase. Den høyeste inokulumsmengden har høyest konsentrasjon av fuselalkoholer (L, M, P og Q) i sluttproduktet, sammenlignet med lavere inokulumsmengder. Det samme er tilfelle for 2-fenylalkohol og 3-metyl-1-butylacetat. Utviklingen i 2-metyl-1-butanol (fuselalkohol) og 2-fenyletanol vises i Figur 3.14. Utviklingen av to estere, 3-metyl-1-butylacetat og etylheksanoat, er gitt i Figur 3.15. Det er høy produksjon av stoffer i starten, og deretter vil konsentrasjonen synke litt, før den stabiliseres. Konsentrasjonene er høyest for 5ref.

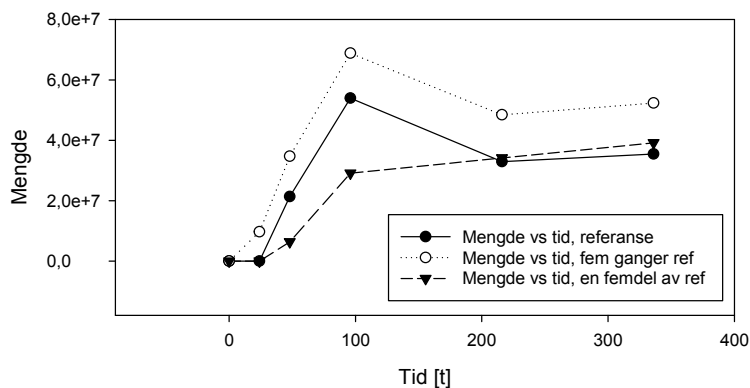


(a) P: 2-metyl-1-butanol

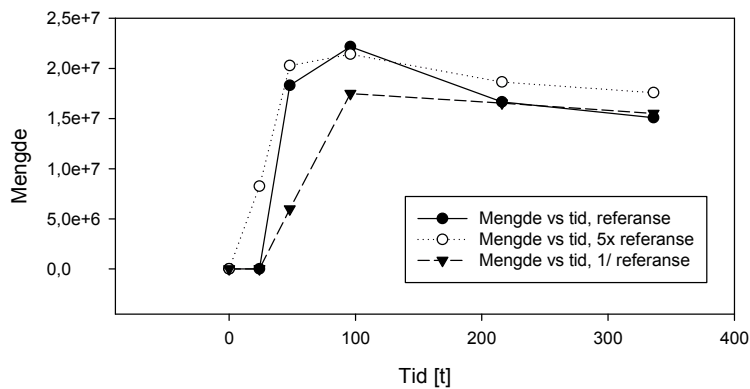


(b) T: 2-fenylalkohol

Figur 3.14: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for en av fuselalkoholene, 2-metyl-1-butanol og for 2-fenyletanol. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.



(a) N: 3-metyl-1-butylacetat



(b) O: Etylhexanoat

Figur 3.15: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for esterne 3-metyl-1-butylacetat og etylhexanoat. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

For å lettere se om forskjellene i produktene er store, som følge av ulike fermenteringsbetingelser, blir forholdet mellom referansen og de to ytterpunktene, $5 \cdot Ref$ og $1/5 \cdot Ref$, beregnet (henholdsvis $M_{5 \cdot Ref}/M_{Ref}$ og $M_{1/5 \cdot Ref}/M_{Ref}$). Dette gjøres kun for prøvene tatt ved 14 dagers fermentering. Forholdene for de ulike stoffene er å finne i Tabell 3.12. Hvis forholdet er lik 1 vil det si at mengde stoff er det samme som i referansen. Hvis tallet er større enn 1, er det mer stoff enn i referansen.

Tabell 3.12: Mengde av de 11 stoffene i forhold til referansen der det er brukt ulike inokulumsmengder. Dette er verdiene funnet i prøvene tatt etter 14 dager fermentering.

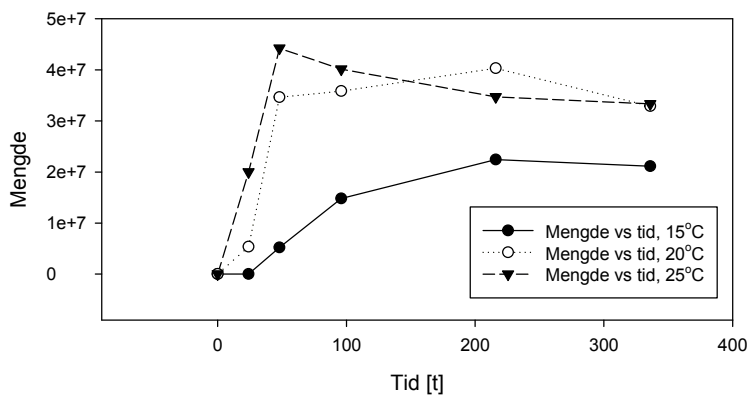
Stoffer	$M_{5 \cdot Ref}/M_{Ref}$	$M_{1/5 \cdot Ref}/M_{Ref}$
<i>Alkoholer</i>		
Etanol	1,2	1,1
1-propanol	1,3	1,0
2-metyl-1-propanol	2,2	0,9
2-metyl-1-butanol	1,6	0,9
3-metyl-1-butanol	1,6	1,0
2-fenyletanol	1,6	0,9
<i>Estere</i>		
Etylacetat	1,1	1,2
3-metyl-1-butylacetat	1,5	1,1
Etylheksanoat	1,2	1,0
Etyloktanoat	1,0	1,0
Etyldekanat	0,9	0,8

Ulike fermenteringstemperaturer

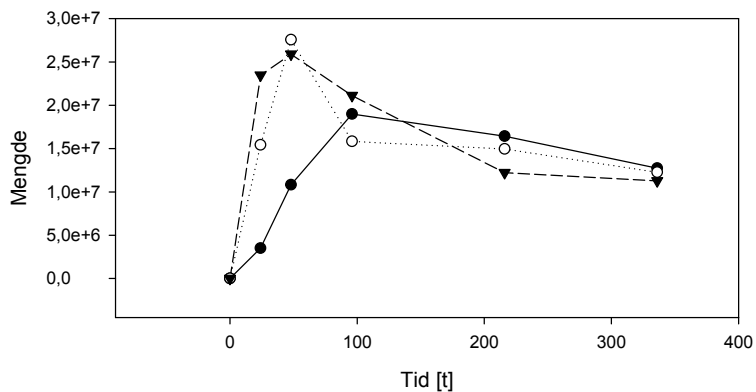
Mengde stoff som funksjon av tid for de 11 stoffene, er gitt i Tillegg J. Samme vørter ble brukt til alle fermenteringene, denne ble ikke oksygenert før inokulering av gjær. Inokulumsmengde brukt i de tre fermenteringsbeholderne var $5 \cdot 10^6$ celler/ml.

Produksjonen av de forskjellige stoffene er generelt tregere i starten for lavere fermenteringstemperaturer enn for høyere temperaturer. Likevel er økningen størst i begynnelsen av fermenteringen for alle parallellene. For etylheksanoat, etyloktanoat og etyldekanooat produseres det først høy konsentrasjon av stoff, som brytes ned igjen før mengden stabiliseres. Dette kan observeres i Figur 3.16 b) for etylheksanoat. Det ser ut til at de fleste stoffene er stabile ved slutten av fermenteringen. I de fleste tilfellene blir det produsert mindre stoff når fermenteringen er ved 15 °C. I Figur 3.17 vises mengde 2-metyl-1-butanol og etanol som funksjon av tid.

2-metyl-1-butanol viser litt samme utvikling som 3-metyl-1-butylacetat, der produksjonen ved 25 °C er høyest i starten. Beholderne ved 20 og 25 °C vil stabiliseres på samme nivå. Utviklingen ved 15 °C er tregere og ender opp på en lavere konsentrasjon. Dette er vist i Figur 3.16 a), for 3-metyl-1-butylacetat, og Figur 3.17 a) for 2-metyl-1-butanol.

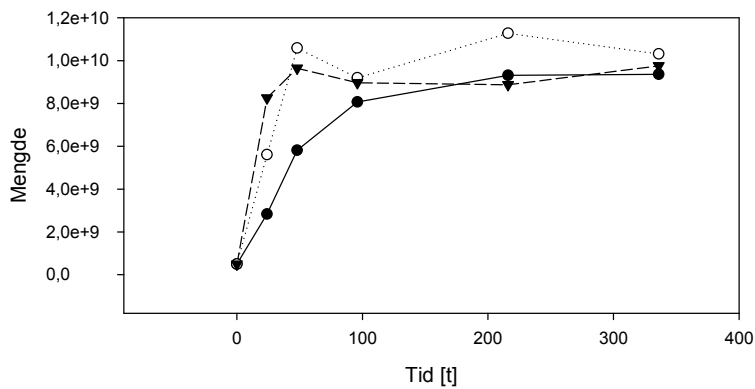


(a) N: 3-metyl-1-butylacetat

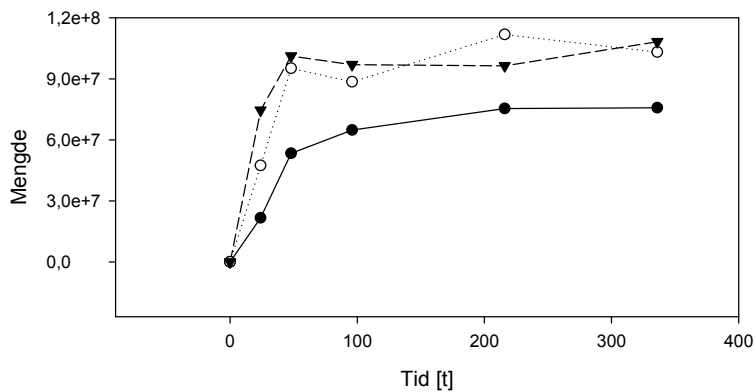


(b) O: Etylheksanoat

Figur 3.16: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for esterne 3-metyl-1-butylacetat. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C. 20 °C fungerer som referanse.



(a) K: Etanol



(b) P: 2-metyl-1-butanol

Figur 3.17: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for alkoholene etanol og 2-metyl-1-butanol. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.

For å lettere se om endringer i fermenteringstemperatur har innvirkning på smaksprofilen har forholdet mellom verdiene for ytterpunktene (15 og 25 °C) og referansen blitt beregnet, $M_{15^{\circ}C}/M_{20^{\circ}C}$ og $M_{25^{\circ}C}/M_{20^{\circ}C}$. Hvis forholdet er lik 1 vil det si at mengde stoff er det samme som i referansen. Hvis tallet er større enn 1, er det mer stoff enn i referansen. Dette er å finne i Tabell 3.13 for de 11 stoffene.

Tabell 3.13: Mengde av de 11 stoffene i forhold til referansen, der det er brukt ulike fermenteringstemperaturer. Dette er verdiene fått fra prøvene tatt etter 14 dager med fermentering.

Stoffer	$M_{15^{\circ}C}/M_{20^{\circ}C}$	$M_{25^{\circ}C}/M_{20^{\circ}C}$
<i>Alkoholer</i>		
Etanol	0,9	0,9
1-propanol	0,9	1,0
2-metyl-1-propanol	0,6	1,2
2-metyl-1-butanol	0,7	1,0
3-metyl-1-butanol	0,8	1,0
2-fenyletanol	0,8	1,0
<i>Estere</i>		
Etylacetat	0,7	0,9
3-metyl-1-butylacetat	0,6	1,0
Etylheksanoat	1,0	0,9
Etyloktanoat	0,8	0,9
Etyldekanooat	0,7	0,9

3.2.5 Sensorisk analyse av Wit

For Wit fermentert med ulike inokulumsmengder ble ref og 5ref oppfattet som ganske like. 1/5 ref hadde en litt mildere smak, enn de to andre. Det var dessverre en bismak i alle tre, antakeligvis fra meskingen (muligens tanniner).

Lav fermenteringstemperatur fører til en renere og mindre kompleks smaksprofil, enn det ølet fermentert ved høyere temperatur. Likevel er det ingen av dem som er vonde. Det er mulig det mer smaksintensiv ølet fort blir mye, og at forbrukere raskere blir lei dette ølet. Det skal sies at profesjonelle øldommere antakeligvis klarer å skille mer på de ulike smakene som er tilstede i de forskjellige parallellene.

Kapittel 4 Diskusjon

4.1 Fermenteringsutvikling

Høyere inokulumsmengde fører til kortere latensfase enn lavere inokulumsmengde. Nedgangen i SG etter latensfasen er omtrent like bratt for alle inokulumsmengdene, noe som kan tyde på at konsentrasjonen av levedyktige celler i de tre dunkene er i samme størrelsesorden når fermenteringen starter. Resultatene fra kimtallsanalysen av Wit, underbygger denne teorien. 24 timer etter inokulering er antall levedyktige celler i overkant av 10^6 celler/ml for de tre inokulumsmengdene.

Etter 14 dager med fermentering er verdien for SG på samme nivå for alle inokulumsmengdeforsøkene, men høyere inokulumsmengder når ønsket FG raskere, enn lavere inokulumsmengder. Dette er tydeligst i forsøket med Red Ale, siden det er flere målepunkter der, men det er også tydelig i forsøkene med Wit. Hvis det er et mål å spare tid ved å forkorte fermenteringstiden kan det å øke inokulumsmengden være en løsning. Selv om FG er nådd er det viktig å huske at gjærcellene kanskje trenger tid for å ta opp og bryte ned diacetyl. Det er blitt foreslått å la ølet stå ved samme fermenteringstemperatur i to dager fra ølet har nådd ønsket SG, for å redusere mengde diacetyl. [8]

Ulike forbehandlinger, oksygenering av vørter eller rehydratisering av gjær, viser ingen tydelige forskjeller i utviklingen av SG under fermenteringen. Rehydratiseringen av tørrgjæren kan ha ført til en liten bedring i fermenteringsresultat. Fermenteringen med rehydratisert gjær ender opp på $SG = 1,014$, i motsetning til de andre to som ender opp på $SG = 1,015$. Det er dermed ingen tydelige bevis på at forbehandlingene av vørter og gjær har noe å si for resultatet, i dette tilfellet. Det er mulig å spare tid og krefter ved å ikke oksygenere vørteren eller rehydratisere gjæren. Dette burde derimot revurderes hvis gjæren

skal høstes og brukes om igjen. Selv om fermenteringene var ganske like, er det mulig viabiliteten til gjærcellene i de tre parallellene er forskjellige. Ved gjentatte underoksygenerte fermenteringer, vil latensfasen øke og dermed vil tiden før fermenteringen er fullført øke. Dette blir tydeligere etter noen generasjoner. [23]

Oksygenering av vørter og rehydratisering av gjær er antakeligvis viktigere hvis vørteren har en høyere OG, siden det er et mer ekstremt miljø enn vørter med lav OG. For å fermentere vørter med høy OG er det viktigere at viabiliteten til cellene er god. I teorien skal oksygenering av vørteren og rehydratisering av gjæren klargjøre gjæren for påkjenningen det er å fermentere. Gjæren får dermed bedre forutsetninger for å fullføre fermenteringen. [8] For å bekrefte at disse forbehandlingene gir bedre viabilitet skulle det vært gjennomført en kintallsanalyse eller en analyse med flowcytometri. Gjæren skulle ikke brukes igjen, så derfor ble ikke dette gjort.

Det er muligheter for at forbehandling av gjær er viktigere for visse gjærstammer. I dette prosjektet har bare to gjærstammer blitt brukt, men det finnes mange gjærstammer tilgjengelig for ølbrygging. På samme måte som at mutasjoner kan føre til endring i ekspresjon av gener nødvendig i esterproduksjon, kan mutasjoner føre til at noen er mer hardføre enn andre. Det finnes for eksempel en type gjær som kan tilsettes etter vanlig ølgjær har fermentert, for å kunne produsere høyere etanolprosent (Champagne-gjær). Mye forskning og erfaring må til for å kartlegge denne type forskjeller.

Fermentering ved ulike temperaturer viser at høyere temperatur fører til kortere latensfase, og raskere fermentering. Det ser ut til å være litt forskjell i hvor raskt SG minker, for de ulike temperaturene. Fermentering ved 25 °C fører til en brattere nedadgående kurve for SG, enn fermenteringen ved 15 °C. SG for fermenteringen ved 15 °C ender opp på 1,015, i motsetning til de to andre som ender opp på 1,014. Det stemmer overens med litteraturen at fermenteringsutviklingen skal gå saktere ved lavere temperatur. Hastigheten på kjemiske og biologiske reaksjoner vil øke med temperatur, opp til et punkt der temperaturen fører til nedbryting av det biologiske materialet. [9]

Hvor mange celler som er nødvendig som inokulum antas å variere med vørterkomposisjonen. For Red Ale, med ulike inokulumsmengder, var original gravity (OG) 1,060. Ved høyere OG er det anbefalt å tilsette mer gjær ved start for å kunne fermentere sukkeret lettere. [7, 8] White og Zainasheff anbefaler heller for høy inokulumsmengde, enn for lav. Dette fordi smaken visstnok påvirkes mer i

negativ retning ved lavere inokulumsmengder.

Tørrvekten har en rask økning i begynnelsen av fermenteringen, for så å minke sakte. Den raske økningen er å forvente, siden cellene her har eksponentiell vekst. Etter hvert som cellene dør kan det hende noen lysere, og cellerestene blir næring for de levende cellene som er igjen for å lage flere fermenteringsprodukter. Dette kan forklare den lille nedgangen i tørrvekten som vises.

Antall generasjoner for gjæren brukt i Red Ale (Safale US-05) og antall generasjoner for gjæren brukt i Wit (WLP400) er forskjellig. For Red Ale er det flere generasjoner, sammenlignet med Wit. Det er mulig Safale US-05 krever høyere antall celler for å fullføre fermenteringen enn det WLP400 gjør. Riktignok er OG høyere for Red Ale her, men det er også forskjell i OG for de to batchene av Wit. Selv med forskjeller i OG i Wit er antall generasjoner den samme for begge batchene. Antall celler ender også opp i samme størrelsesorden for begge batchene. Det er mulig denne forskjellen er en forskjell mellom tørrgjær og våtgjær. For å finne ut av dette må flere stammer sammenlignes, både tørrgjær og våtgjær. Forskjellen kan også være noe som generelt finnes mellom de ulike stammene av ølgjær.

Parallellen med lavest inokulumsmengde hadde høyest konsentrasjon av levedyktige celler ved slutten av fermenteringen, og dette stemmer overens med litteraturen. [8, 44] Gjæren der inokulumsmengden var høy ble utsatt for stress, noe som kan være grunnen til lavere konsentrasjon av levedyktige celler. [44] Det som ikke ser ut til å stemme helt er at referanseinokulumsmengden førte til lavest antall levedyktige celler, det var forventet at høyere inokulumsmengde ville føre til lavere levedyktighet. Det skal likevel sies at antall levedyktige celler for alle tre parallellene er i samme størrelsesorden ($1\text{-}5\cdot 10^6$), så forskjellene var ikke store.

4.2 Analyse av stoffproduksjon

4.2.1 Red Ale

Ulike inokulumsmengder

Av stoffene funnet i væskefase for Red Ale ender alle untatt ett, glyserol, opp med samme mengde ved slutten av fermenteringen som ved starten. For glyserol ble det produsert mest i parallellen med en femdel av referanseinokulumsmengden. Dette til tross for at det tidligere i fermenteringen var parallellen fem ganger referanse som hadde mest. Økningen i glyserolmengde kan være på grunn av økningen i antall celler underveis i fermenteringen, siden produksjon av stoffer oftest skjer i denne vekstfasen. Glyserol er et biprodukt i fermentering av sukker til etanol. [42] De fleste stoffene funnet ved GC-MS, væskefase, er ofte funnet i korn- og planteprodukter, noe som tyder på at stoffene stammer fra maltet.

Utviklingen sett i starten av fermenteringen for stoffene funnet ved GC-MS, væskefase, kunne tilsa at det ville bli store forskjeller i stoffene ved slutten av fermenteringen. Det ser ut til at produksjon og degradering av stoffene etter hvert når en likevekt, uavhengig av mengde gjær tilsatt ved start. Endringene kan skyldes oscillasjoner i likevekter der disse stoffene inngår, hvis likevektene forstyrres av cellevekst. Når celleveksten da stopper opp, vil likevekten gå tilbake til utgangspunktet.

Etter Red Ale var ferdig fermentert og tatt over på flasker, ble det gjennomført en sensorisk analyse. Det ble oppfattet forskjeller mellom de tre parallellene med ulike inokulumsmengder. I følge litteraturen skulle parallellen med lavest inokulumsmengde påvirkes mest negativt når det kommer til smak. [8] Smaken var mindre intens, men den hadde ingen usmaker som kunne oppfattes. Dessuten ble den foretrukket av flertallet blant de spurte.

Fra headspace-analysene ble det identifisert 11 nye stoffer, seks alkoholer og fem estere. For Red Ale ble det ferdige produktet analysert, og mengdene av de ulike stoffene ble sammenlignet mellom de ulike parallellene. Endringer som er under 10 % i forhold til referansen blir ansett som urelevante. Det er likevel viktig å huske at små endringer i ester konsentrasjon kan føre til markante forskjeller i smak, siden terskelverdiene for mange av dem er så lave. [14]

For å estimere mengde av de ulike stoffene som ble funnet i ølet, kan verdiene

for typiske konsentrasjoner brukes, siden det ikke var tid til å lage standardkurver. Det antas at referanse-parallellen ligger på gjennomsnittsverdien av typiske mengder av hvert stoff. Ved å bruke forholdsverdiene mellom ytterpunktene og referansen kan det beregnes teoretiske konsentrasjoner for ytterpunktene. Dette skal brukes videre for å se om ytterpunktene går over terskelverdiene.

Verdiene funnet for mengde av etylestere i Red Ale er lavere for ytterpunktene, enn for referansen. For 1/5ref ble det produsert halvparten så mye etyldekanooat enn for referansen, men omtrent like mye etylheksanoat og etyloktanoat som referansen. Endringer i inokulumsmengden ser ikke ut til å gjøre så produksjon av etylestere økes. Dette stemmer overens med tidligere funn. [44]

Enzymene Eht1 og Eeb1 er begge ansvarlige for både produksjon og degrading av etylestere. Hvis disse to enzymene uttrykkes i større grad enn normalt har det ikke innvirkning på mengden etylestere. [21] Det må derfor være en annen grunn til lavere produksjon. Hvis det produseres færre fettsyrer, som trengs i produksjon av etylestere, vil det også produseres færre etylestere.

Etylacetatproduksjonen var lavere i ytterpunktene enn i referansen. For 5ref ble det produsert omtrent like mye som for referansen. Det ble derimot større forskjell for 1/5ref, der 30 % mindre ble produsert enn for referansen. For å få en formening om hvordan dette vil påvirke smaken, kan tallene kombineres med de typiske verdiene for mengde i øl. Her er det tydelig at ytterpunktene ikke fører til at terskelverdien overstiges, siden de er lavere enn referanseverdien.

Det ble produsert mindre 3-metyl-1-butylacetat i 5ref og 1/5ref, sammenlignet med referansen. Det samme som ble konkludert med for etylacetat kan sies for 3-metylbutylacetat. 5ref hadde 30 % mindre produksjon, mens 1/5ref førte til 40 % mindre produksjon. Terskelverdien for smak vil ikke overstiges, og det er ingen klar sammenheng mellom inokulumsmengde og 3-metyl-1-butylacetatproduksjon.

Høyere inokulumsmengde i Red Ale fører til høyere konsentrasjoner av fusel-alkoholer, enn ved lav inokulumsmengde. Den største forskjellen er å finne for 2-metyl-1-propanol, som det ble produsert 1,7 ganger mer av enn referansen. Litteraturen hevder at høyere konsentrasjoner av fusel-alkoholer ikke er ideelt. Dessuten hevdes det at lavere inokulumsmengder vil påvirke smaken mer negativt, enn høyere inokulumsmengder. [8] Dette samsvarer ikke med resultatene her, siden lav inokulumsmengde gir mindre fusel-alkoholer, og dermed mindre

av de uønskede smakene.

2-fenyletanol i Red Ale har i begge ytterpunkter blitt produsert i større mengder enn for referansen. Der det ble brukt $1/5$ av referanseinokulumsmengden ble det produsert 1,3 ganger så mye stoff som for referansen. Siden vanlig konsentrasjon av 2-fenyletanol er rundt 40 mg/l, vil den teoretiske konsentrasjonen for $1/5$ av ref være på 52 mg/l. Terskelverdien for dette stoffet er på 125 mg/l, og vil derfor ikke overstiges. Dette er et stoff som gir en roseaktig lukt, og er ikke nødvendigvis negativ [45]. For 5ref-inokulumsmengde blir det produsert 1,6 ganger mer stoff enn for referansen. Dette tilsvarer en teoretisk konsentrasjon på 64 mg/l, som heller ikke overstiger terskelverdien.

Ulike forbehandlinger

For alkoholene ble det noen små forskjeller i mengde stoff produsert, når de to forbehandlingene sammenlignes med referansen. Det ble produsert mindre fuselalkoholer der det var forbehandling av vørter eller gjær, sammenlignet med referansen. Den ene store endringen i fuselalkoholer var at 30 % mindre 2-metyl-1-propanol ble produsert hvis vørteren ble oksygenert i forhold til referansen. Rehydratisering av tørrgjær førte til samme endring for 2-fenyletanol, 30 % nedgang i forhold til referansen. Disse endringene er ikke store nok til at noen konklusjon kan trekkes fra det. Det er vanskelig å si om dette er en forbedring, og om denne endringen er mulig å oppfatte for mennesker.

I esterproduksjon ble det større forskjeller. Rehydratisering av tørrgjær førte til en økning i etylacetatproduksjon, som var 4,4 ganger større enn referansen. Dette er en stor endring. Til gjengjeld er terskelverdien for etylacetat høy i forhold til andre estere. Hvis det antas at referansen har vanlig konsentrasjon for etylacetat, 30 mg/l, vil konsentrasjonen i parallellen med rehydratisert gjær være på 132 mg/l. Etter forventningene er dette en konsentrasjon som merkes. Også oksygenering gir en økning i etylacetat. Konsentrasjonen her er 1,6 ganger høyere enn i referansen, som gir en teoretisk konsentrasjon på 48 mg/l. Det er viktig å merke seg at vanlig konsentrasjon for etylacetat er i samme området som terskelverdien i øl.

De fleste esterene har en lavere produksjon ved rehydratisering eller oksygenering. Det eneste stedet det er økning, utenom for etylacetat, er ved produksjon av etyldekanooat i parallellen med oksygenert vørter. Her er produksjonen 1,3 ganger høyere enn for referansen, noe som tilsvarer en teoretisk konsentra-

sjon som overstiger terskelverdien. Vanlig konsentrasjon av dette stoffet varierer alt fra 0 til 2,1 mg/l, mens terskelverdien er på 0,2 mg/l. Dette er en ester som kategoriseres som eple-ester, og mye av denne vil antakeligvis føre til en markant forskjell i smak. Derimot viste forsøk utført av Meilgaard et. al. at smaken fra en blanding av estere er mindre kraftig enn summen av alle smake-
ne sammen. Hvis stoffene i blandingen ikke forsterker eller demper hverandres intensitet, vil graden av smaksinteraksjon, d_{int} , være lik 1. Der etylacetat, 2-metylpropylacetat, isoamylacetat, etylheksanoat og etyloktanoat ble tilsatt øl, var graden av smaksinteraksjon, d_{int} , lik 0,67. En blanding av estere vil føre til demping av den samlede smaksintensiteten. [14] Det kan derfor hende økningen i etyldekanooat ikke fører til en like høy økning i samlet smaksintensitet.

4.2.2 Wit

Siden ølet skulle analyseres for å finne ulike smaksstoffer i øl, ble det valgt en øltype som er kjent for å preges av gjærens smaksstoffer. Ønsket var å se hvilke stoffer som ble produsert underveis i fermenteringen.

Ulike inokulumsmengder

For stoffene funnet ved hjelp av headspace GC-MS er utviklingen av stoffene underveis i fermenteringen rask i begynnelsen, som følge av celleveksten. Etter hvert som celleveksten øker vil produksjonen av stoffer øke. Celleveksten er størst de første 100 timene, det samme gjelder altså produksjonen av stoffene. Deretter vil konsentrasjonene stabilisere seg, ettersom cellene når stasjonær fase.

I begynnelsen av fermenteringen til Wit er det en liten forsinkelse av produksjon av estere for lavere inokulumsmengder. Forsinkelsen er på rundt 30 timer for alle esterene. Det er også noen forsinkelser å finne blant alkoholene, tydeligst blant fuselalkoholene. Referansen for 1-propanol er forsinket rundt 25 timer og lav inokulumsmengde er forsinket rundt 50 timer, før produksjonen starter. For 2-metyl-1-propanol og 2-metyl-1-butanol gir lav inokulumsmengde en produksjonsforsinkelse på 30 timer.

For lav inokulumsmengde i Wit er verdiene for fuselalkoholene nesten helt like som for referansen. De varierer mellom 0,9 og 1,1 ganger verdiene for referansene. Dette er ikke nok forskjell til å si noe konklusivt. Derimot går det an å si noe mer om høye inokulumsmengder. 1-propanol er det produsert 1,3 ganger mer av i høy inokulumsmengde, enn i referansen. Dette er allikevel ikke nok

for å gå over terskelverdien på 800 mg/l, hvis det antas referansen er lik vanlig konsentrasjon på mellom 10 og 100 mg/l.

2-metyl-1-butanol og 3-metyl-1-butanol ble det produsert 1,6 ganger mer av enn referansen. Målt under ett har disse to vanlig konsentrasjon på 50 - 65 mg/l. Hvis det antas at referansen har en konsentrasjon på 25 mg/l for hver, vil den teoretiske konsentrasjonen for hvert stoff være 40 mg/l. Ingen av disse stoffene går over terskelverdiene som gjelder. [14]

2-metyl-1-propanol blir det produsert 2,2 ganger mer av i 5ref, enn i referansen. Dette stoffet ligger vanligvis rundt 7-11 mg/l i øl, og terskelverdien er på 200 mg/l. [14] En økning på 2,2 er derfor ikke nok for å få komme over terskelverdien.

Det ingen klar sammenheng mellom inokulumsmengde og produksjon av esterne. Dette stemmer overens med tidligere funn. [44], men stemmer ikke med den generelle oppfatningen blant bryggere [8]. Det ble riktignok noen ulikheter i verdiene, men det er ikke grunnlag for å si at dette vil overstige terskeverdiene, eller at det vil påvirke smaken negativt.

Ulike fermenteringstemperaturer

For verdiene av etanol og 1-propanol er det ingen store forskjeller mellom de tre fermenteringstemperaturene. Forsøk vist til i boka Yeast av White og Zainasheff viser lavere verdi for 1-propanol ved høyere temperaturer. Dette er heller det motsatte av resultatene funnet i dette prosjektet.

2-metyl-1-propanol har, derimot, en tydeligere trend. Lavere temperaturer fører til mindre produksjon, enn høyere temperaturer. Dette stemmer overens med teorien. [8] Forskjellen var størst for lave fermenteringstemperaturer. Lave temperaturer kan derfor sies å påvirke konsentrasjonen av 2-metyl-1-propanol i større grad enn høyere temperaturer. Alt av metabolske prosesser blir tregere ved lavere temperaturer, og dette ble mer tydelig her.

For 2-metyl-1-butanol, 3-metyl-1-butanol og 2-fenyletanol førte lav temperatur til lavere produksjon. Dette stemmer med litteraturen. [8] I tillegg ville det forventes at høyere temperatur (25 °C) førte til høyere konsentrasjoner enn for referansen, men det var ikke tilfelle. Det vil si at lavere temperatur enn anbefalt fører til større endringer enn for høyere temperatur, også her.

Samme slutning som ble trukket for alkoholene kan trekkes for esterene. Lav temperatur ved fermentering fører til en større forskjell fra referansen, enn for høy temperatur. Høy temperatur gir 0,9 - 1,0 produksjon av estere, noe som ikke er nok endring til å si konklusivt at det er en forskjell. For lavere temperatur ligger forskjellen på 0,6 - 0,8, bortsett fra for etylheksanoat som er helt lik referansen.

4.3 Forsøksoppsett

Red Ale ble fermentert i beholdere som hadde et volum på 25 liter. Hver gang det var prøvetakning måtte lokket åpnes, noe som gjør ølet sårbart overfor mikrobielle infeksjoner fra lufta. Det ville vært bedre om dunkene var utstyrt med tappekran nederst, for å kunne ta prøver uten å forstyrre fermenteringen. Det hadde også vært praktisk om det var mulig å ta prøver av gjærkaken underveis i fermenteringen, for å sjekke viabilitet og vitalitet av disse cellene.

For hver SG-analyse måtte det bli tatt prøver på 90 ml for å kunne bruke hydrometeret. Siden det ble en del uttak av prøver i de to batchene av Red Ale, gikk mye produkt til spille. Dette er derfor ikke å anbefale for bryggere som ønsker å følge fermenteringsutviklingen. På en annen side er det snakk om større batch-volum hos profesjonelle bryggerier, og de har dermed mer å gå på. Det skal være tilstrekkelig å se om det produseres gass, for å se om det er aktivitet.

For fermentering av Wit ble metoden endret litt i forhold til den for Red Ale. Det ble lettere å ta kintallsanalyse, tørrvektsanalyse og å ta ut prøver uten å forstyrre fermenteringen til produktet. Det ble brukt femten erlenmeyerkolber der fem og fem hadde lik inokulumsmengde. Disse skulle brukes til uttak. Produksjonen av øl til smaking ble utført i samme type beholdere som brukt for Red Ale. For å finne tørrvekt underveis i fermenteringen må vørteren og gjæren bli en homogen blanding, noe som vil forstyrre fermenteringen veldig. Derfor blir resten av vørteren fra erlenmeyerkolbene kastet. Det går 800 ml for hver erlenmeyerkolbe, som til sammen utgjør ganske mye (12 liter, fordelt på 15 EM-kolber).

Hvis man ser bort fra tapet av produkt grunnet metoden med erlenmeyerkolbene, er metoden å foretrekke over metoden for Red Ale. Dette foretrekkes fordi det er mulig å utføre flere mikrobielle analyser av ølet. Dessuten er erlenmeyerkolbene lette å håndtere. Som en småskala-analyse av fermenteringsutviklingen

fungerte det bra.

For å få et større innblikk i om verdiene funnet i denne oppgaven er signifikante burde det ha blitt brygget flere paralleller. Forsøket med erlenmeyerkolbene var begrenset, siden antall kolber tilgjengelig var 15. Det kunne derfor ikke være flere paralleller samtidig med denne metoden. Dessuten var det begrenset plass for å lagre så mange fermenteringsdunker.

I denne oppgaven viste headspace GC-MS-analysene hvilke estere og alkoholer ølet kunne inneholde. Eventuelle forskjeller som følge av forskjellige fermenteringsbetingelser har, til en viss grad, blitt identifisert. For å kunne kvantifisere stoffene, måtte det ha blitt laget standardkurver med varierende konsentrasjon. Dette ble det dessverre ikke tid til, da kvalifiseringen måtte skje først. Etter kvalifisering kan stoffer til standardkurver kjøpes inn, for deretter å lage standardkurvene for hvert stoff. Det vil da også være mulig å verifisere identifikasjonen av stoffene, ved å sammenligne resultatene av prøvene og standardene analysert på samme GC-MS-maskin.

Selv om det ble detektert mange ulike smaksstoffer ved hjelp av headspace GC-MS, har ikke alle stoffene som preger ølet blitt identifisert. Det er mulig andre analysemetoder vil føre til deteksjon av andre stoffer som kan gi smak, eller at endring i headspace GC-MS-analysen kan gjøre at andre stoffer kommer frem. Siden øl er en kompleks blanding av mange stoffer, vil ikke analysene brukt her gi hele bildet. Blant annet dekstriner og smaksstoffer fra humla, ble ikke funnet.

4.4 Videre arbeid

Selv om det viser seg at konsentrasjonen av smaksstoffene er over gjennomsnittet for terskelverdier i øl, er det viktig å huske at ulike øl skal ha ulike mengder av smaksstoffer. Det ville derfor gitt mening å analysere ulike typer øl for å finne ønskede konsentrasjoner av de ulike stoffene, for så å finne terskelverdiene for stoffene i det spesifikke ølet. Dette kan da, i kombinasjon med at man vet trendene som følge av ulike fermenteringsbetingelser, gjøre at ølbryggeprosesser kan optimaliseres for hvert spesifikt øl. For eksempel vil en økning i temperatur føre til raskere fermentering, som kan føre til at bryggeriet sparer tid. Hvis endringen i smaksstoffproduksjon har blitt kartlagt, som følge av temperaturøkning, kan bryggerne sjekke om denne økningen vil føre til uønsket mengde stoff i produktet. Hvis det i teorien ikke går over terskelverdien, for uønskede stoffer i dette

ølet, kan høyere temperatur i fermentering testes ut.

Det hadde også vært interessant å ha en større oversikt over ulike gjærstammers produksjon av de ulike smaksstoffene. Det finnes noe informasjon om dette, gitt fra leverandørene, men det er ikke en fullstendig oversikt. Det vil muligens bli lettere å skreddersy et øl som smaker akkurat sånn man vil, ved å vite akkurat hvilke stoffer som kan forventes fra gjæren.

Det ville vært interessant å undersøke i hvilken grad høyere fermenteringstemperaturer vil påvirke høstet og gjenbrukt gjær negativt. Høyere temperaturer fører til en kjappere fermentering, men har ikke vist store endringer i smaksammensetning. Hvis det i tillegg ikke går ut over gjærens viabilitet så mye som forventet, er dette en mulig løsning for optimalisering av fermenteringen.

Kapittel 5 Konklusjon

Høyere inokulumsmengde og høyere fermenteringstemperatur er effektive virkemidler for å forkorte fermenteringstiden. Det er allikevel viktig å være klar over at dette kan gå ut over viabiliteten til cellene og smaksprofilen til produktet.

For inokulumsmengdeforsøkene var det samsvar mellom resultatene for Red Ale og Wit. I headspace GC-MS-analysene tatt av de to øltypene, vises det forskjeller i mengde fuselalkoholer produsert ved de ulike inokulumsmengdene. Dette gjelder i hovedsak for høy inokulumsmengde, der det generelt ble høyere konsentrasjoner av fuselalkoholer, sammenlignet med referanseinokulumsmengden. Lavere inokulumsmengde viste ikke like stor forskjell fra referansen, i alle fall for Wit. Der ble det lik mengde fuselalkoholer for lav inokulumsmengde, som for referansen.

Både observasjonene gjort for fuselalkoholer og for estere står i kontrast til oppfatninger som finnes angående inokulumsmengder i ølproduksjon. Det er en oppfatning at lavere inokulumsmengder fører til større endring i smaksproduksjon, enn høyere inokulumsmengder, i forhold til referansen. I dette prosjektet viser resultatene det motsatte. Det er riktignok lettere for uønskede mikroorganismer å dominere vørteren, hvis inokulumsmengden av gjær er lav. Dette vil føre til uønsket smak, men det kan unngås ved gode steriliseringsrutiner.

Oksygenering av vørter og rehydratisering av gjær gir ikke store endringer i fuselalkoholer. For begge forbehandlingene produseres det litt mindre stoff, i forhold til referansemengdene. De største forskjellene er å finne for 1-propanol og 2-metyl-1-propanol. Her er det produsert 0,7 - 0,8 ganger mindre stoff der det er brukt oksygenering eller rehydratisering, sammenlignet med referansen. Generelt er det ønskelig med mindre fuselalkoholer, så det skader ikke å oksygenere eller rehydratisere. Likevel er det ikke store nok forskjeller til å si at dette

er nødvendig, for dette ølet. Absoluttverdier for mengde av stoffene må opparbeides før det kan konkluderes her. Ved høyere OG, eller hvis andre gjærtyper brukes, er det mulig oksygenering og rehydratisering er viktigere.

Produksjonen er lavere for 3-metyl-1-butylacetat og etylheksanoat, hvis rehydratisering av gjær og oksygenering av vørter brukes, enn referansen. Etylacetat ble produsert i større mengder for både rehydratisering og oksygenering, sammenlignet med referansen. Forskjellen lå på 4,4 og 1,6 ganger større for henholdsvis rehydratisering og oksygenering. Etyldekanooat ble også produsert i større mengder, men bare ved oksygenering. Det er ingen tydelig trend for esterproduksjon ved oksygenering eller rehydratisering av vørter.

Lave fermenteringstemperaturer ga større forskjeller fra referansen, enn høy temperatur gjorde. Dette er tydeligst for 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol, 3-metyl-1-butanol og 2-fenyletanol. Lav fermenteringstemperatur fører til lavere produksjon av fuselalkoholer, enn for referansen. Det var riktignok ikke en stor forskjell, variasjonen var på 0,6 - 0,8 ganger referansen.

Den samme trenden for fermenteringstemperatur kan oppfattes for estere. Færre estere blir produsert ved lavere fermenteringstemperatur for alle stoffene, utenom for etylheksanoat. Høyere fermenteringstemperatur gir så godt som samme mengde som for referansen, av alle esterene.

I den sensoriske analysen likte flertallet ølet med lav inokulumsmengde. Den var mildere og renere i smaken. Dette gjelder for både Wit og Red Ale. Forskjellene i Wit med ulike fermenteringstemperaturer var også merkbare. De to høyeste temperaturene hadde mest smak, sammenlignet med den laveste fermenteringstemperaturen, men ingen av dem hadde noen usmaker. Da kommer det bare an på subjektive preferanser for å si hvilket øl som er best. For de to forbehandlingene ble det ikke oppfattet noen forskjell fra referansen, som kan tyde på at oksygenering og rehydratisering ikke er nødvendig under disse omstendighetene.

For å analysere øl for estere og fuselalkoholer er headspace GC-MS en god metode. Mange ulike stoffer ble detektert, og hvis standardkurver for disse stoffene blir laget, vil dette kunne brukes for å kvantifisere stoffene i tillegg til å kvalifisere. Det burde utføres flere paralleller av analysene for å kunne si noe konklusivt angående kvantitet.

Bibliografi

- [1] Christensen, B. (2013) *Compendium TBT4135 Biopolymers*, 1ste versjon, Akademika Forlag, Trondheim, 277 sider.
- [2] Wikimedia, bruker: NEUROtiker (2008) Amylose [online]. Kilde: Wikimedia. Tilgjengelig fra: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amylose2.svg> [Lastet ned 19.12.2014].
- [3] Wikimedia, bruker: NEUROtiker (2008) Amylopektin [online]. Kilde: Wikimedia. Tilgjengelig fra: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File: Amylopektin_Haworth.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amylopektin_Haworth.svg) [Lastet ned 13.01.2015].
- [4] Wikimedia, bruker: Geierunited (2005) Glukose, Fisher- til Haworth-projeksjon [online]. Kilde: Wikimedia. Tilgjengelig fra: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucose-Fisher-to-Haworth.png> [Lastet ned 20.12.2014].
- [5] Wikimedia, bruker: NEUROtiker (2008) Maltose, Haworth-projeksjon [online]. Kilde: Wikimedia. Tilgjengelig fra: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maltose_Haworth.svg [Lastet ned 20.12.2014].
- [6] Bernfeld, P. (2006) Enzymes of starch degradation and synthesis, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **12**, 379-428.
- [7] Palmer, J. (2006) *How to Brew*, 3dje versjon, Brewers Publications, Boulder, Colorado, USA, 347 sider.
- [8] White, C. og Zainasheff, J. (2010) *Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation*, 1ste versjon, Brewers Publications, Boulder, Colorado, USA, 304 sider.
- [9] Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. og Clark, D. (2011) *Brock Biology of Microorganisms*, 13nde versjon, Pearson, New Jersey, USA, 1152 sider.

- [10] Nelson, D. og Cox, M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5te versjon, W.H. Freeman and Company, London, 1158 sider.
- [11] Younis, O. og Stewart, G. (1998) Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the Institute of Brewing*, **104**(5), 255-264.
- [12] Shindo, S., Murakami, J. og Koshino, S. (1992) Control of acetate ester formation during alcohol fermentation with immobilized yeast. *Journal of fermentation and bioengineering*, **73**(5), 370-374.
- [13] Verstrepen, K., Van Laere, S., Vanderhaegen, B., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Pretorius, I., Winderickx, J., Thevelein, J. og Delvaux, F. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters, *Applied and environmental microbiology*, **69**(9), 5228-5237.
- [14] Meilgaard, M. C. (1982). Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**(6), 1009-1017.
- [15] Nordström, K. (1963) Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast: IV. Metabolism of Acetyl-Coenzyme A, *Journal of the Institute of Brewing*, **69**(2), 142-153.
- [16] Nordström, K. (1964) Formation of esters from alcohols by brewer's yeast, *Journal of the Institute of Brewing*, **70**(4), 328-336.
- [17] Yoshioka, K. og Hashimoto, N. (1981) Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers yeast, *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**(10), 2183-2190.
- [18] Peddie, H. (1990) Ester formation in brewery fermentations, *Journal of the Institute of Brewing*, **96**(5), 327-331.
- [19] Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. og Hamachi, M. (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene, *Applied and environmental microbiology*, **60**(8), 2786-2792.
- [20] Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., og Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**(2), 110-118.

- [21] Saerens, S., Verstrepen, K., Van Laere, S., Voet, A., Van Dijck, P., Delvaux, F. og Thevelein, J. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity, *Journal of Biological Chemistry*, **281**(7), 4446-4456.
- [22] Doran, P. (2012) *Bioprocess Engineering Principles*, 2dre versjon, Academic Publisher, Waltham, Massachusetts, USA, 919 sider.
- [23] Parker, N. (2008) Are Craft Brewers Underaerating Their Wort?, *Technical quarterly & the MBAA communicator*.
- [24] Brew with Fermentis (ingen dato), Tips and tricks, cells at pitching [online]. Tilgjengelig fra: <http://www.brewwithfermentis.com/tips-tricks/cells-at-pitching/> [Lastet ned 29.09.2014].
- [25] Lallemand Brewing (2011), Datablad, Danstar Nottingham Ale Yeast [Online]. Tilgjengelig fra: http://www.danstaryeast.com/system/files/pdfs/nottingham_datasheet_0.pdf?download=1 [Lastet ned 09.01.2015].
- [26] Wyeast Laboratories, Inc. (ingen dato) Wyeast, pitch rates [online]. Tilgjengelig fra: http://www.wyeastlab.com/hb_pitchrates.cfm [Lastet ned 29.09.2014].
- [27] Horne, T. og Eick, C. (2013), *Ølbrygging fra hånd til munn*, 1ste versjon, Kagge forlag AS, Oslo, 205 sider.
- [28] Brewersfriend.com (2007) Yeast Pitch Rate and Starter Calculator [Online]. Tilgjengelig fra <http://www.brewersfriend.com/yeast-pitch-rate-and-starter-calculator/> [Lastet ned 09.01.2015]
- [29] Carey, F. (2008) *Organic Chemistry*, 7ende versjon, McGraw-Hill, New York, 1280 sider.
- [30] Fermentis (ingen dato) Safale US-05, spesifikasjoner [online]. Tilgjengelig fra: http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2012/02/SFA_US05.pdf [Lastet ned: 10.10.2014]
- [31] White Labs (ingen dato) Beskrivelse av WLP400 Belgian Wit Ale Yeast [online]. Tilgjengelig fra: <http://www.whitelabs.com/yeast/wlp400-belgian-wit-ale-yeast> [Lastet ned 22.01.2015]

- [32] Smith-Gahrnsen, G. (ingen dato) *Vann, hjemmebryggingens last frontier"?* [Online] Tilgjengelig fra: <http://norbrygg.no/> (må være medlem for å få tilgang til denne).
- [33] Tó th, E. (2013) Practical Microbiology [Online]. Tilgjengelig fra: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/microbiology/ch05s03.html> [Lastet ned: 16.01.2015]
- [34] Agilent Technologies 5977 GC/MS. Produkt, gasskromatograf koblet med massespektrometer, væskefaseanalyse [Online] Tilgjengelig fra http://www.agilent.com/about/newsroom/lsc/mediakit/asms2014/ASMS_2014_5977A_Brochure.pdf [Siste besøk: 16.01.2015]
- [35] Agilent Technologies J&W DB-FFAP. Produkt, gasskromatografkolonne for væskefase [Online] Tilgjengelig fra <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/GC-GC-MS-Columns/Capillary/DB-FFAP/Pages/default.aspx> [Siste besøk: 15.01.2015]
- [36] Agilent Technologies 5975C Series GC/MSD. Produkt, gasskromatograf koblet med massespektrometer, headspaceanalyse [Online] Tilgjengelig fra <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/US5898-6105EN.pdf> [Siste besøk: 15.01.2015]
- [37] Agilent Technologies 7697A Headspace Sampler. Produkt, elektronisk prøvetaker [Online] Tilgjengelig fra <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Gas-Chromatography/7697A-Headspace-Sampler/Pages/default.aspx> [Siste besøk: 15.01.2015]
- [38] Agilent Technologies J&W DB-WAX. Produkt, gasskromatografkolonne for headspace [Online] Tilgjengelig fra <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/GC-GC-MS-Columns/Capillary/DB-WAX/Pages/default.aspx> [Siste besøk: 15.01.2015]
- [39] Haddad, S., Lindegren, C. (1953) A method for determining the weight of an individual yeast cell, *Applied microbiology*, **1**(3), 153-156.
- [40] Chemicalland21.com (ingen dato), Beskrivelse av 2-furanmetanol [online]. Tilgjengelig fra: <http://www.chemicalland21.com/industrialchem/solalc/FURFURYL%20ALCOHOL.htm> [Lastet ned: 22.01.2015]

- [41] Preininger, M., Gimelfarb, L., Li, H. C., Dias, B. E., Fahmy, F., og White, J. (2009). Identification of Dihydromaltol (2, 3-Dihydro-5-hydroxy-6-methyl-4 H-pyran-4-one) in Ryazhenka Kefir and Comparative Sensory Impact Assessment of Related Cycloenolones. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**(21), 9902-9908.
- [42] Klopper, W. J., Angelino, S. A. G. F., Tuning, B., og Vermeire, H. A. (1986). Organic acids and glycerol in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, **92**(3), 225-228.
- [43] van Putten, R. J., van der Waal, J. C., de Jong, E., Rasrendra, C. B., Heeres, H. J., og de Vries, J. G. (2013). Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. *Chemical reviews*, **113**(3), 1499-1597.
- [44] Verbelen, P. J., Dekoninck, T. M. L., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Thevelein, J. M., og Delvaux, F. R. (2009). Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Applied microbiology and biotechnology*, **82**(1), 155-167.
- [45] Bryant, D. (2010), Wheat Beer Yeast and Fermentation [online]. Tilgjengelig fra: http://www.mbaa.com/districts/MidSouth/Events/Documents/2010-03-13Wheat_Beer_Yeast_Fermentation2.pdf [Lastet ned 20.12.2014]
- [46] Smith, B. (2003-2013), BeerSmith 2 [PC-program]. Tilgjengelig fra: <http://beersmith.com/> [Installert 31.01.2014].
- [47] Petit Agentur AS (2013) Datablad, SterkRens2 [Online]. Tilgjengelig fra: http://shop.petit-agentur.no/users/petitagentur_mystore_no/Image/STERKRENS2.pdf [Lastet ned 20.10.2014].

Tillegg A Oppskrift - Red Ale og Wit

Ingrediensene brukt for å lage Red Ale, og Wit er gitt på de neste sidene. Det er noen forskjeller i ingrediensene mellom batch 1 og 2 av Red Ale. Mesking utføres ved 66,7 °C, utmesking ved 75,6 °C. For mengder vann, se de neste sidene og oppskriftene laget ved hjelp av BeerSmith. [46]

Det ble brukt Fermentis US-05 til Red Ale og White Labs' WLP400 til Wit, og inokulumsmengde og forbehandlingen av gjæren varierer.

Red Ale #1

American Amber Ale (6 B)

Type: All Grain

Batch Size: 30,00 l

Boil Size: 34,13 l

Boil Time: 60 min

End of Boil Vol: 32,24 l

Final Bottling Vol: 28,00 l

Fermentation: Ale, Single Stage

Taste Notes:

Date: 11 Feb 2014

Brewer: Eirin

Asst Brewer:

Equipment: Storekjelen

Efficiency: 72,00 %

Est Mash Efficiency: 74,4 %

Taste Rating: 30,0



Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU
4,00 kg	Pale Malt, Maris Otter (5,9 EBC)	Grain	1	54,8 %
1,20 kg	Munich Malt (17,7 EBC)	Grain	2	16,4 %
1,00 kg	Melanoiden Malt (39,4 EBC)	Grain	3	13,7 %
1,00 kg	Munich Malt - 20L (39,4 EBC)	Grain	4	13,7 %
0,10 kg	Chocolate Malt (689,5 EBC)	Grain	5	1,4 %
25,00 g	Columbus (Tomahawk) [16,40 %] - Boil 60,0 min	Hop	6	33,7 IBUs
50,00 g	Cascade [5,90 %] - Boil 0,0 min	Hop	7	0,0 IBUs
50,00 g	Columbus (Tomahawk) [16,40 %] - Boil 0,0 min	Hop	8	0,0 IBUs

Gravity, Alcohol Content and Color

Est Original Gravity: 1,054 SG

Est Final Gravity: 1,014 SG

Estimated Alcohol by Vol: 5,3 %

Bitterness: 33,7 IBUs

Est Color: 27,7 EBC

Measured Original Gravity: 1,046 SG

Measured Final Gravity: 1,010 SG

Actual Alcohol by Vol: 4,7 %

Calories: 427,1 kcal/l

Mash Profile

Mash Name: Single Infusion, Medium Body

Sparge Water: 12,54 l

Sparge Temperature: 75,6 C

Adjust Temp for Equipment: FALSE

Total Grain Weight: 7,30 kg

Grain Temperature: 22,2 C

Tun Temperature: 22,2 C

Mash PH: 5,20

Mash Steps

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Mash In	Add 18,25 l of water at 73,4 C	66,7 C	60 min
Mash Out	Add 10,66 l of water at 93,1 C	75,6 C	10 min

Sparge: Fly sparge with 12,54 l water at 75,6 C

Mash Notes: Simple single infusion mash for use with most modern well modified grains (about 95% of the time).

Carbonation and Storage

Carbonation Type: Bottle

Pressure/Weight: 149,86 g

Keg/Bottling Temperature: 21,1 C

Fermentation: Ale, Single Stage

Volumes of CO2: 2,3

Carbonation Used: Bottle with 149,86 g Table

Sugar

Age for: 30,00 days

Storage Temperature: 18,3 C

Notes

Tilsett salter:

l totalvolum start: Kalsiumsulfat = 15,01 g

l mesken: Kalsiumkarbonat = 5,94 g

l kokevolum: Magnesiumklorid = 1,7 g og sinksulfat = 0,014 g

Created with [BeerSmith](#)

Red Ale #2

American Amber Ale (6 B)

Type: All Grain
Batch Size: 30,00 l
Boil Size: 34,13 l
Boil Time: 60 min
End of Boil Vol: 32,24 l
Final Bottling Vol: 28,00 l
Fermentation: Ale, Single Stage
Taste Notes:

Date: 11 Feb 2014
Brewer: Eirin
Asst Brewer:
Equipment: Storekjelen
Efficiency: 72,00 %
Est Mash Efficiency: 74,4 %
Taste Rating: 30,0



Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU
3,50 kg	Pale Malt, Maris Otter (5,9 EBC)	Grain	1	51,5 %
2,20 kg	Munich Malt - 10L (19,7 EBC)	Grain	2	32,4 %
1,00 kg	Melanoiden Malt (39,4 EBC)	Grain	3	14,7 %
0,10 kg	Chocolate Malt (689,5 EBC)	Grain	4	1,5 %
20,00 g	Columbus (Tomahawk) [16,40 %] - Boil 60,0 min	Hop	5	27,8 IBUs
50,00 g	Cascade [5,90 %] - Boil 0,0 min	Hop	6	0,0 IBUs
50,00 g	Columbus (Tomahawk) [16,40 %] - Boil 0,0 min	Hop	7	0,0 IBUs

Gravity, Alcohol Content and Color

Est Original Gravity: 1,050 SG
Est Final Gravity: 1,013 SG
Estimated Alcohol by Vol: 4,9 %
Bitterness: 27,8 IBUs
Est Color: 25,7 EBC

Measured Original Gravity: 1,046 SG
Measured Final Gravity: 1,010 SG
Actual Alcohol by Vol: 4,7 %
Calories: 427,1 kcal/l

Mash Profile

Mash Name: Single Infusion, Medium Body
Sparge Water: 14,01 l
Sparge Temperature: 75,6 C
Adjust Temp for Equipment: FALSE

Total Grain Weight: 6,80 kg
Grain Temperature: 22,2 C
Tun Temperature: 22,2 C
Mash PH: 5,20

Mash Steps

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Mash In	Add 17,00 l of water at 73,4 C	66,7 C	60 min
Mash Out	Add 9,93 l of water at 93,1 C	75,6 C	10 min

Sparge: Fly sparge with 14,01 l water at 75,6 C

Mash Notes: Simple single infusion mash for use with most modern well modified grains (about 95% of the time).

Carbonation and Storage

Carbonation Type: Bottle
Pressure/Weight: 149,86 g
Keg/Bottling Temperature: 21,1 C
Fermentation: Ale, Single Stage

Volumes of CO2: 2,3
Carbonation Used: Bottle with 149,86 g Table Sugar
Age for: 30,00 days
Storage Temperature: 18,3 C

Notes

Tilsett salter:

l totalvolum start: Kalsiumsulfat = 15,01 g

l mesken: Kalsiumkarbonat = 5,94 g

l kokevolum: Magnesiumklorid = 1,7 g og sinksulfat = 0,014 g

Created with BeerSmith

Witbier (Ægir)

Witbier (16 A)

Type: All Grain
Batch Size: 30,00 l
Boil Size: 37,86 l
Boil Time: 60 min
End of Boil Vol: 32,86 l
Final Bottling Vol: 28,00 l
Fermentation: Ale, Two Stage

Date: 05 Nov 2014
Brewer: Eirin
Asst Brewer:
Equipment: Storekjelen
Efficiency: 72,00 %
Est Mash Efficiency: 74,4 %
Taste Rating: 30,0



Taste Notes:

Ingredients

Amt	Name	Type	#	%/IBU
3,00 kg	Pale Malt (2 Row) Bel (5,9 EBC)	Grain	1	45,5 %
2,00 kg	Wheat Malt, Bel (3,9 EBC)	Grain	2	30,3 %
1,00 kg	Wheat, Torrified (3,3 EBC)	Grain	3	15,2 %
0,60 kg	Oats, Malted (2,0 EBC)	Grain	4	9,1 %
50,00 g	Tettnang (Tettnang Tettnager) [2,10 %] - Boil 60,0 min	Hop	5	9,4 IBUs
25,00 g	Tettnang (Tettnang Tettnager) [2,10 %] - Boil 30,0 min	Hop	6	3,6 IBUs
25,00 g	Tettnang (Tettnang Tettnager) [2,10 %] - Boil 10,0 min	Hop	7	1,7 IBUs
2,0 pkg	Belgian Wit Ale (White Labs #WLP400) [35,49 ml]	Yeast	8	-

Gravity, Alcohol Content and Color

Est Original Gravity: 1,049 SG
Est Final Gravity: 1,011 SG
Estimated Alcohol by Vol: 5,0 %
Bitterness: 14,7 IBUs
Est Color: 7,8 EBC

Measured Original Gravity: 1,046 SG
Measured Final Gravity: 1,010 SG
Actual Alcohol by Vol: 4,7 %
Calories: 427,1 kcal/l

Mash Profile

Mash Name: Single Infusion, Medium Body
Sparge Water: 17,62 l
Sparge Temperature: 75,6 C
Adjust Temp for Equipment: FALSE

Total Grain Weight: 6,60 kg
Grain Temperature: 22,2 C
Tun Temperature: 22,2 C
Mash PH: 5,20

Mash Steps

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Mash In	Add 17,21 l of water at 73,1 C	66,7 C	60 min
Mash Out	Add 9,64 l of water at 93,7 C	75,6 C	10 min

Sparge: Fly sparge with 17,62 l water at 75,6 C

Mash Notes: Simple single infusion mash for use with most modern well modified grains (about 95% of the time).

Carbonation and Storage

Carbonation Type: Bottle
Pressure/Weight: 164,70 g
Keg/Bottling Temperature: 21,1 C
Fermentation: Ale, Two Stage

Volumes of CO2: 2,3
Carbonation Used: Bottle with 164,70 g Corn Sugar
Age for: 30,00 days
Storage Temperature: 18,3 C

Notes

Totalvolum start = 50 liter.

I dette tilsettes 10,00 g kalsiumsulfat og 5,00 g kalsiumklorid.

Created with BeerSmith

Tillegg B Bryggeutstyr og fremgangsmåte

Mål ut totalt ønsket mengde vann og tilsett salter for å få riktig vannkvalitet til ølet som skal brygges. Ønskede konsentrasjoner og mengder er gitt i Tabell B.1 for Amber/Red Ale og B.2 for Wit.

*Tabell B.1: Saltkonsentrasjoner i vann for å få riktig vannkvalitet i en Red/Amber Ale, i tillegg til salter som gir bedre vekstvilkår for *S. cerevisiae*.*

Salt	Konsentrasjon [g/L]
$CaSO_4$	0,4
$CaCO_3$	0,2
$MgCl_2$	0,05
$ZnSO_4$	$4 \cdot 10^{-4}$

Tabell B.2: Saltkonsentrasjoner i vann for å få riktig vannkvalitet i en Wit, i tillegg til salter som gir bedre vekstvilkår for gjæren.

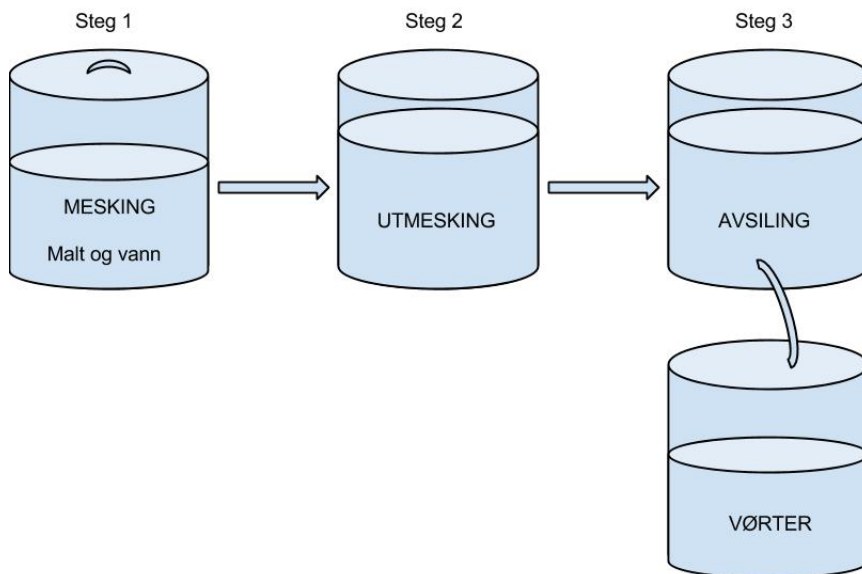
Salt	Konsentrasjon [g/L]
$CaSO_4$	0,2
$CaCl_2$	0,1
$MgCl_2$	0,05
$ZnSO_4$	$4 \cdot 10^{-4}$

Kalsiumsulfat ($CaSO_4$) og kalsiumklorid ($CaCl_2$) tilsettes til totalvolumet, og magnesiumklorid ($MgCl_2$) og sink sulfat ($ZnSO_4$) tilsettes til vørteren på slutten av kokingen.

Av totalvolumet overføres noe vann til meskekjelen. Mengder og temperaturer er gitt under *Mash Steps* i oppskriften i Tillegg A. Vannet varmes opp før

maltet tilsettes. Det er viktig å blande maltet så godt som mulig med vannet, eventuelle tørre klumper knuses. Temperaturen i blandingen skal være på 66 - 67 °C. Lokket legges på og kjelen pakkes inn med isolerende materiale. Dette står i 60 minutter.

I mellomtiden blir vann til utmesking varmet opp til 93 °C. Når 60 minutter mesking er over blir dette vannet tilsatt meskekjelen og blandet inn for å få en gjennomsnittstemperatur på 76 °C. Mer vann tilsettes til denne temperaturen er nådd. Dette hviler i 10 minutter før avsilingen startes. Vørter blir tappet av fra bunnen og ført tilbake hvis det inneholder maltrester. Når vørteren tappet ikke lenger inneholder maltrester blir det tappet over i kokekjelen. Denne blir satt på full effekt for å varme opp vørteren til kokepunktet så fort som mulig. Avsilingsvannet holder 76 °C og blir spriklet over mesken, samtidig som vørter blir tappet fra bunnen av meskekjelen. Dette blir gjort helt til riktig mengde vørter er oppnådd (mengden som er gitt som *Boil Size* i Tillegg A). Disse innledende stegene er vist i Figur B.1.

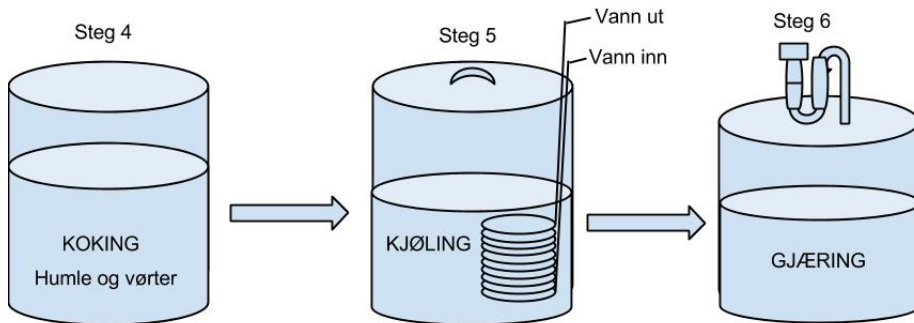


Figur B.1: Viser de første stegene i bryggeprosessen, mesking og avsiling, der malt og vann blir til en sukkerholdig væske.

Etter mesking og avsiling er utført skal vørteren kokes. Når vørteren er ved kokepunktet blir bitterhumlen tilsatt. Vørteren koker til sammen i 60 minutter uten lokk. Aromahumle tilsettes nærmere slutten av kokingen, tidspunktene er gitt i Tabell 2.6, 2.7 og 2.8 for henholdsvis del 1, 2 og 3. Tiden blir gitt ut fra hvor lenge humlen skal koke (hvis det står 15 min skal humlen tilsettes 15 min før slutten av kokingen). Mengde humle og navn på humlene er også gitt i disse tabellene.

Etter en time med koking blir vørteren kjølt ned, her ved hjelp av en kjølespiral koblet til kaldt vann. Kjølespiralen blir ført ned i vørteren når det er 15 minutter igjen av kokingen, for å sterilisere den. Lokk blir satt på kjelen, og aluminiumsfolie blir brukt for å tette igjen rundt lokket. Fra dette steget av må alt som er i kontakt med vørteren være sterilt.

Vørteren blir kjølt ned til romtemperatur før den blir overført til sterile fermenteringsdunker med tilhørende lokk og gjærlås. For å sterilisere blir det brukt *Sterkrens2*, som inneholder fosforsyre. [47] Koking, kjøling og fermentering er gitt i Figur B.2.



Figur B.2: Skisséerer de siste stegene i bryggeprosessen: koking, kjøling og fermentering.

Tillegg C Innstillinger for gasskromatograf og massespektrometer: Væskefase

Analysene ble utført på Agilent Technologies' gasskromatograf (Agilent 7890) koblet med et massespektrometer (Agilent 5977) [34]. Prøvene ble tatt ved hjelp av en elektronisk prøvetaker (ALS: Automatic Liquid Sampler). I gasskromatografen ble kolonnen Agilent J&W DB-FFAP brukt [35]. Innstillingene for gasskromatografen og massespektrometeret er gitt fra Tabell C.1 til C.5.

Tabell C.1: Instrumentinnstillinger for analyse med gasskromatograf og massepektrometer, der væske blir injisert. Del 1.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS-5977	
Control Information	
Sample Inlet :	GC
Injection Source :	GC ALS
Injection Location:	Front
Mass Spectrometer :	Enabled
No Sample Prep method has been assigned to this method.	
GC Oven Temperature	
Setpoint	On
(Initial)	40 °C
Hold Time	4 min
Post Run	40 °C
Program	
#1 Rate	10 °C/min
#1 Value	250 °C
#1 Hold Time	4 min
#2 Rate	15 °C/min
#2 Value	250 °C
#2 Hold Time	15 min
Equilibration Time	1 min
Max Temperature	250 °C

Tabell C.2: Instrumentinnstillinger for analyse med gasskromatograf og massepektrometer, der væske blir injisert. Del 2.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS-5977	
ALS Front Injector	
Syringe Size	10 μ L
Injection Volume	1 μ L
Solvent A Washes (PreInj)	4
Solvent A Washes (PostInj)	4
Solvent A Volume	8 μ L
Solvent B Washes (PreInj)	4
Solvent B Washes (PostInj)	4
Solvent B Volume	8 μ L
Sample Washes	1
Sample Wash Volume	2 μ L
Sample Pumps	6
Solvent Wash Draw Speed	300 μ L/min
Solvent Wash Dispense Speed	3000 μ L/min
Sample Wash Draw Speed	300 μ L/min
Sample Wash Dispense Speed	3000 μ L/min
Injection Dispense Speed	6000 μ L/min
Viscosity Delay	0 sec
Injection Type	Standard
L1 Airgap	0.2 μ L
Front MM Inlet	He
Temperature	
Setpoint	On
(Initial)	250 $^{\circ}$ C
Hold Time	0 min
Post Run	250 $^{\circ}$ C

Tabell C.3: Instrumentinnstillinger for analyse med gasskromatograf og massepektrometer, der væske blir injisert. Del 3.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS-5977	
Mode	Pulsed Split
Heater	On 250 °C
Pressure	On 24 psi
Total Flow	On 29.824 mL/min
Septum Purge Flow	On 3 mL/min
1 min (Post Run Total Flow)	25 mL/min
Gas Saver	Off
Split Ratio	10 :1
Split Flow	24.386 mL/min
Injection Pulse Pressure	10 psi Until 0.75 min
Liner Agilent 5190-2293: 900 µL (Splitless, single	taper, ultra inert)
Thermal Aux 2	(MSD Transfer Line)
Temperature	
Setpoint	On
(Initial)	250 °C
Hold Time	0 min
Post Run	0 °C
Column	
Column #1	
Pressure	
Setpoint	
(Initial)	24 psi
Hold Time	0 min
Post Run	9.7853 psi
Agilent 122-3232: FFAP1	
DB-FFAP, 30m x 250µm x 0.25µm	
40 °C - 250 °C (250 °C)	
Column lock	Unlocked
In	Front MM Inlet He
Out	PCM °C
(Initial)	40 °C
Pressure	24 psi
Flow	2.4386 mL/min
Average Velocity	43.08 cm/sec
Holdup Time	1.1606 min

Tabell C.4: Instrumentinnstillinger for analyse med gasskromatograf og massepektrometer, der væske blir injisert. Del 4.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS-5977	
Column	
Column #2	
Pressure	
Setpoint	On
(Initial)	3.8 psi
Hold Time	0 min
Post Run	0
Agilent 160-2615-10	
Deactivated Fused Silica: 1.44 m x 180 μm x 0 μm	
0 °C — 400 °C (400 °C)	
Column lock	Unlocked
In	PCM C He
Out	MSD
(Initial)	40 °C
Pressure	3.8 psi
Flow	4.0754 mL/min
Average Velocity	334.13 cm/sec
Holdup Time	0.0071829 min
Signals	
Signal #1:	Test Plot
Description	Test Plot
Details	
Save	Off
Data Rate	50 Hz
Dual Injection Assignment	Front Sample
Signal #2:	Test Plot
Description	Test Plot
Details	
Save	Off
Data Rate	50 Hz
Dual Injection Assignment	Back Sample

Tabell C.5: Instrumentinnstillinger for analyse med gasskromatograf og massepektrometer, der væske blir injisert. Del 5.

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS:	GCMS-5977
Signal #3:	Test Plot
Description	Test Plot
Details	
Save	Off
Data Rate	50 Hz
Dual Injection Assignment	Back Sample
Signal #4:	Test Plot
Description	Test Plot
Details	
Save	Off
Data Rate	50 Hz
Dual Injection Assignment	Back Sample
MS Information	
General Information	
Acquisition Mode	: Scan
Solvent Delay (minutes)	: 3.70
EM Setting mode Gain	: 1.000000
Normal or Fast Scanning	: Normal Scanning

Tillegg D Innstillinger for gasskromatograf og massespektrometer: Headspace

Prøvene ble analysert på Agilent Technologies' gasskromatograf (Agilent 7890) koblet med et massespektrometer (Agilent 5975C) [36], der prøvene ble tatt ved hjelp av en elektronisk prøvetaker (Agilent 7697A Headspace Sampler) [37]. Kolonnen Agilent J&W DB-WAX ble brukt i gasskromatografen [38]. Innstillingene for gasskromatografen og massespektrometeret er gitt i Tabell D.1 og videre i D.2.

Tabell D.1: Instillinger for Headspace GC-MS for å analysere flyktige stoffer. Headspace sampler: Agilent 7697A, GC: Agilent 7890 og MS: 5975C. Del 1.

<p>Agilent 7697A Instrument Info Address: 10.1.1.203 Serial Number: CN11240018 Firmware Revision: A.01.05.1</p>
<p>Instrument Settings Vial Pressurization Gas: Helium Loop Size (mL): 1 Keyboard Lock: ON Transfer Line Type: Fused Silica Transfer Line Diameter (mm): 0.25</p>
<p>System Configuration Carrier Control: GC Instrument</p>
<p>Resource Conservation Vial Standby Flow: OFF</p>
<p>Temperature Settings: Oven Temperature (°C): 85 Loop Temperature (°C): 85 Transfer Line Temperature (°C): 100</p>

Tabell D.2: Instillinger for Headspace GC-MS for å analysere flyktige stoffer. Headspace sampler: Agilent 7697A, GC: Agilent 7890 og MS: 5975C. Del 2.

<p>Timing Settings: Vial Equilibration (min): 15.00 Injection Duration (min): 0.50 GC Cycle Time (min): 45.00</p>
<p>Vial and Loop Settings: Vial Size: 20 Vial Shaking: Level 1, 18 shakes/min with acceleration of 60 cm/s Fill Mode: Default Fill Pressure (psi): 15 Loop Fill Mode: Custom Loop Ramp Rate (psi/min): 20 Loop Final Pressure (psi): 5 Loop Equilibration Time: 0.05</p>
<p>Carrier Settings: Carrier Control Mode: GC controls Carrier</p>
<p>Advanced Settings: Extraction Mode: Single Extraction Vent After Extraction: ON Post Injection Purge: Default, 100 mL/min for 1 min Acceptable Leak Check: Default, 0.2mL/min</p>
<p>Sequence Actions: Vial Missing:: Skip Wrong Vial Size: Continue Leak Detected: Continue System Not Ready: Abort</p>
<p>No Sample Prep method has been assigned to this method.</p>

Tillegg E Specific Gravity: Rådata

E.1 Red Ale

I Tabell E.1, E.2 og E.3 er Specific gravity gitt for Red Ale tilsatt ulike inokulumsmengder. Specific gravity er målt underveis i fermenteringen. Figur E.1 viser Specific Gravity plottet som funksjon av fermenteringstid.

I Tabell E.4 er Specific gravity gitt for Red Ale med ulike forbehandlinger av gjær og vørter.

Tabell E.1: Rådata for specific gravity som funksjon av tid, samt pH og temperatur registrert samtidig. Referanseverdien for inokulumsmengde er benyttet i disse to batchene (1 og 2) for Red Ale.

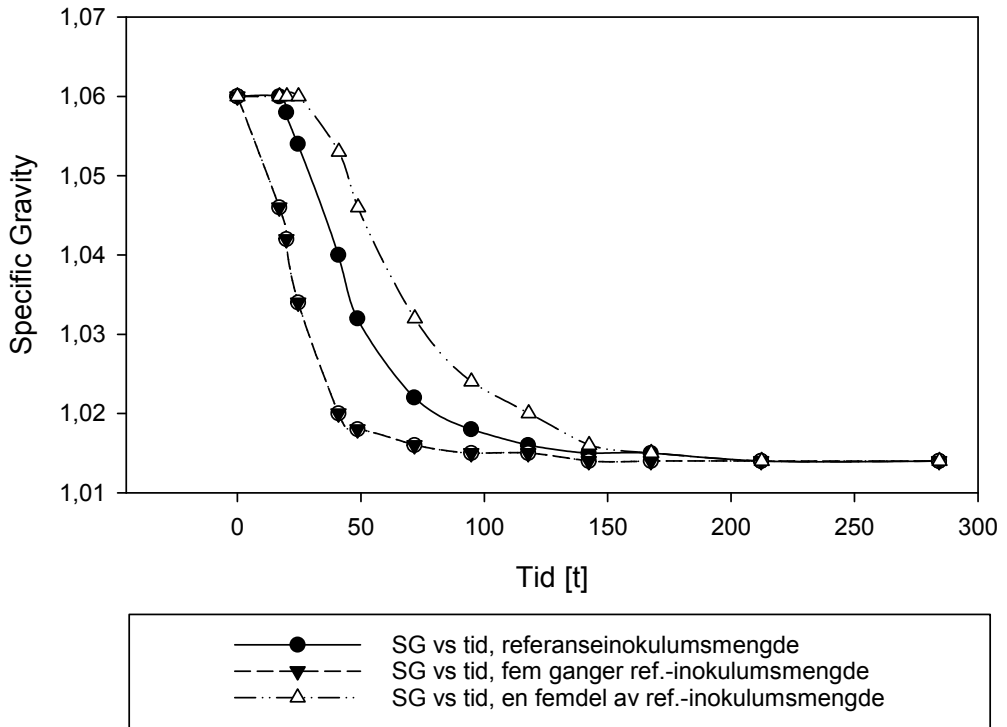
Batch	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG	pH	Temp [°C]	
1	03.09.2014	Kl 15.27	0	1,060	5,1	19,0	
	04.09.2014	Kl 08.16	17	1,060	4,6	19,0	
	04.09.2014	Kl 11.07	20	1,058	4,4	19,0	
	04.09.2014	Kl 15.51	24	1,054	4,4	19,5	
	05.09.2014	Kl 08.13	41	1,040	4,1	21,0	
	05.09.2014	Kl 15.56	48	1,032	4,1	21,5	
	06.09.2014	Kl 15.00	72	1,022	4,1	20,0	
	07.09.2014	Kl 14.00	95	1,018	3,8	21,0	
	08.09.2014	Kl 13.08	118	1,016	3,8	21,0	
	09.09.2014	Kl 13.43	142	1,015	3,8	19,0	
	10.09.2014	Kl 14.51	167	1,015	3,8	19,0	
	12.09.2014	Kl 11.34	212	1,014	3,8	18,5	
	15.09.2014	Kl 11.36	284	1,014	3,8	18,0	
	2	03.09.2014	Kl 15.27	0	1,060	5,1	19,0
		04.09.2014	Kl 08.21	17	1,060	4,6	19,0
04.09.2014		Kl 11.13	20	1,058	4,4	19,0	
04.09.2014		Kl 15.56	24	1,054	4,4	19,5	
05.09.2014		Kl 08.19	41	1,040	4,1	21,0	
05.09.2014		Kl 16.03	49	1,032	4,1	21,5	
06.09.2014		Kl 15.04	72	1,022	4,1	20,0	
07.09.2014		Kl 14.05	95	1,018	3,8	21,0	
08.09.2014		Kl 13.12	118	1,016	3,8	21,0	
09.09.2014		Kl 13.47	142	1,015	3,8	19,0	
10.09.2014		Kl 14.56	167	1,015	3,8	19,0	
12.09.2014		Kl 11.38	212	1,014	3,8	18,5	
15.09.2014		Kl 11.41	284	1,014	3,8	18,0	

Tabell E.2: Rådata for specific gravity som funksjon av tid, samt pH og temperatur registrert samtidig. Fem ganger referanseverdien for inokulumsmengde er benyttet i disse to batchene (3 og 4) for Red Ale.

Batch	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG	pH	Temp [°C]
3	03.09.2014	Kl 15.35	0	1,060	5,1	19,0
	04.09.2014	Kl 08.32	17	1,046	4,1	19,0
	04.09.2014	Kl 11.23	20	1,042	3,8	19,0
	04.09.2014	Kl 16.07	24	1,034	3,8	19,5
	05.09.2014	Kl 08.28	41	1,020	3,8	21,0
	05.09.2014	Kl 16.12	49	1,018	3,8	21,5
	06.09.2014	Kl 15.14	72	1,016	3,8	20,0
	07.09.2014	Kl 14.14	95	1,015	3,8	21,0
	08.09.2014	Kl 13.20	118	1,015	3,8	21,0
	09.09.2014	Kl 13.56	142	1,014	3,8	19,0
	10.09.2014	Kl 15.06	167	1,014	3,8	19,0
	12.09.2014	Kl 11.47	212	1,014	3,8	18,5
	15.09.2014	Kl 11.48	284	1,014	3,8	18,0
4	03.09.2014	Kl 15.37	0	1,060	5,1	19,0
	04.09.2014	Kl 08.36	17	1,046	3,8	19,0
	04.09.2014	Kl 11.29	20	1,042	3,8	19,0
	04.09.2014	Kl 16.12	24	1,034	3,8	19,5
	05.09.2014	Kl 08.31	41	1,020	3,8	21,0
	05.09.2014	Kl 16.17	49	1,018	3,8	21,5
	06.09.2014	Kl 15.18	72	1,016	3,8	20,0
	07.09.2014	Kl 14.18	95	1,015	3,8	21,0
	08.09.2014	Kl 13.25	118	1,015	3,8	21,0
	09.09.2014	Kl 14.01	142	1,014	3,8	19,0
	10.09.2014	Kl 15.10	167	1,014	3,8	19,0
	12.09.2014	Kl 11.51	212	1,014	3,8	18,5
	15.09.2014	Kl 11.53	284	1,014	3,8	18,0

Tabell E.3: Rådata for specific gravity som funksjon av tid, samt pH og temperatur registrert samtidig. En femdel av referanseverdien for inokulumsmengde er benyttet i disse to batchene (5 og 6) av Red Ale.

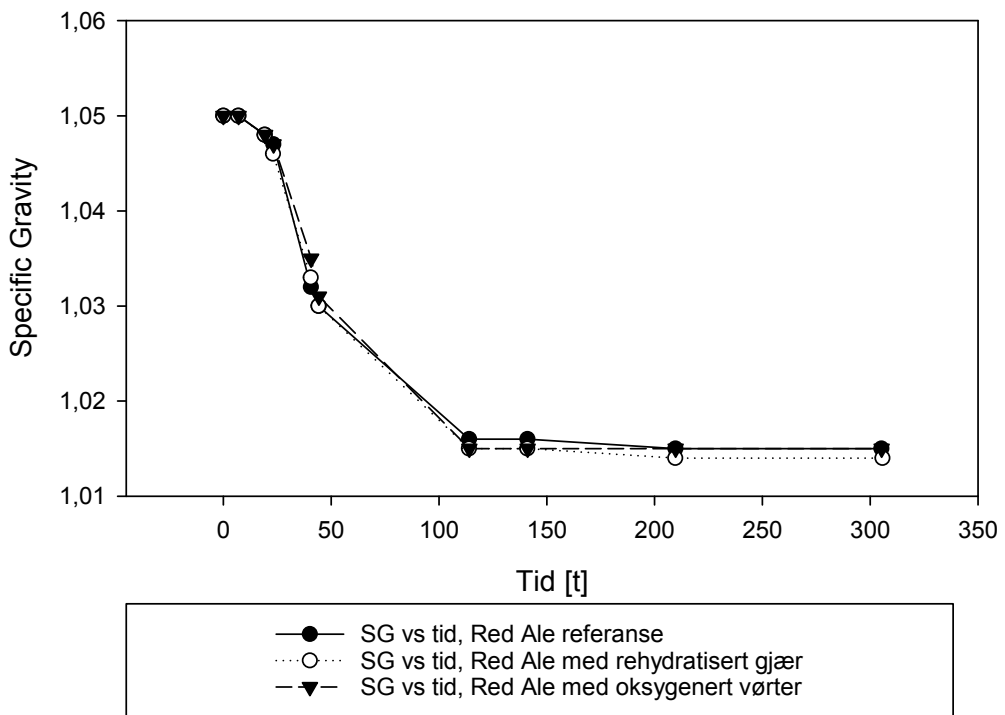
Batch	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG	pH	Temp [°C]
5	03.09.2014	Kl 15.40	0	1,060	5,1	19,0
	04.09.2014	Kl 08.41	17	1,060	4,8	19,0
	04.09.2014	Kl 11.35	20	1,060	4,6	19,0
	04.09.2014	Kl 16.15	24	1,060	4,6	19,5
	05.09.2014	Kl 08.36	41	1,052	4,4	21,0
	05.09.2014	Kl 16.22	49	1,046	4,4	21,5
	06.09.2014	Kl 15.22	72	1,032	4,1	20,0
	07.09.2014	Kl 14.22	95	1,024	4,1	21,0
	08.09.2014	Kl 13.31	118	1,020	4,1	21,0
	09.09.2014	Kl 14.04	142	1,016	3,8	19,0
	10.09.2014	Kl 15.13	167	1,015	3,8	19,0
	12.09.2014	Kl 11.56	212	1,014	3,8	18,5
	15.09.2014	Kl 11.56	284	1,014	3,8	18,0
6	03.09.2014	Kl 15.41	0	1,060	5,1	19,0
	04.09.2014	Kl 08.44	17	1,060	4,8	19,0
	04.09.2014	Kl 11.38	20	1,060	4,8	19,0
	04.09.2014	Kl 16.19	24	1,060	4,6	19,5
	05.09.2014	Kl 08.40	41	1,054	4,4	21,0
	05.09.2014	Kl 16.26	49	1,046	4,4	21,5
	06.09.2014	Kl 15.26	72	1,032	4,1	20,0
	07.09.2014	Kl 14.24	95	1,024	4,1	21,0
	08.09.2014	Kl 13.35	118	1,020	4,1	21,0
	09.09.2014	Kl 14.08	142	1,016	3,8	19,0
	10.09.2014	Kl 15.18	167	1,015	3,8	19,0
	12.09.2014	Kl 12.01	212	1,014	3,8	18,5
	15.09.2014	Kl 12.01	284	1,014	3,8	18,0



Figur E.1: Specific gravity som funksjon av tid for Red Ale, med ulike inokulumsmengder: referanse, fem ganger referanse og en femdel av referanse.

Tabell E.4: Rådata for specific gravity og pH som funksjon av tid, for forsøk der innvirkningen av oksygenering av vørter på produktet og innvirkningen av rehydratisering av tørrgjær på produktet sammenlignes med en referanse.

Batch	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG	pH
Referanse: uten rehydratisering og oksygenering.	08.10.2014	Kl 16.33	0	1,050	5,1
	08.10.2014	Kl 23.34	7	1,050	4,8
	09.10.2014	Kl 11.47	19	1,048	4,4
	09.10.2014	Kl 15.44	23	1,047	4,4
	10.10.2014	Kl 09.10	41	1,032	4,1
	10.10.2014	Kl 12.45	44	1,030	3,8
	13.10.2014	Kl 10.31	114	1,016	3,8
	14.10.2014	Kl 13.33	141	1,016	3,8
	17.10.2014	Kl 10.16	210	1,015	3,8
	21.10.2014	Kl 09.48	305	1,015	3,8
Med rehydratisert gjær.	08.10.2014	Kl 16.33	0	1,050	5,1
	08.10.2014	Kl 23.28	7	1,050	4,6
	09.10.2014	Kl 11.37	19	1,048	4,4
	09.10.2014	Kl 15.36	23	1,046	4,4
	10.10.2014	Kl 09.04	41	1,033	4,1
	10.10.2014	Kl 12.41	44	1,030	3,8
	13.10.2014	Kl 10.27	114	1,015	3,8
	14.10.2014	Kl 13.29	141	1,015	3,8
	17.10.2014	Kl 10.11	210	1,014	3,8
	21.10.2014	Kl 09.43	306	1,014	3,8
Vørter oksygenert i 30 min.	08.10.2014	Kl 16.33	0,0	1,050	5,1
	08.10.2014	Kl 23.38	7,1	1,050	4,6
	09.10.2014	Kl 11.51	19,3	1,048	4,4
	09.10.2014	Kl 15.48	23,3	1,047	4,4
	10.10.2014	Kl 09.16	40,7	1,035	4,1
	10.10.2014	Kl 12.52	44,3	1,031	3,8
	13.10.2014	Kl 10.36	114,1	1,015	3,8
	14.10.2014	Kl 13.38	141,1	1,015	3,8
	17.10.2014	Kl 10.23	209,8	1,015	3,8
	21.10.2014	Kl 09.52	305	1,015	3,8



Figur E.2: Specific gravity som funksjon av tid for Red Ale, med ulike forbehandlinger av vørter og gjær. En beholder ble tilsatt rehydratisert gjær, en annen ble oksygenert i 30 minutter før gjæren ble tilsatt og den siste hadde vanlig gjær og ingen oksygenering. Den siste fungerer som en referanse.

E.2 Wit

I Tabell E.5 vises utviklingen i specific gravity for Wit 1 der tre ulike inokulumsmengder av gjær ble brukt. Tabell E.6 viser det tilsvarende for Wit 2. I tillegg til inokulumsforsøket ble noe vørter fra Wit 1 brukt i fermenteringstemperaturforsøk. Tre beholdere med vørter og referanseinokulumsmengde ble satt til fermentering ved tre ulike temperaturer: 15, 20 og 25 °C. Specific gravity for disse er å finne i Tabell E.7.

Tabell E.5: Rådata som viser utviklingen i specific gravity som funksjon av tid for Wit 1, med tre ulike inokulumsmengder av gjær (referanse, fem ganger referanse og én femdel av referanse).

Parallell	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG
Referanse	10.11.2014	Kl 15.00	0,0	1,047
	11.11.2014	Kl 13.58	23,0	1,042
	12.11.2014	Kl 12.55	45,9	1,028
	14.11.2014	Kl 12.22	93,4	1,018
	19.11.2014	Kl 12.29	213,5	1,016
	24.11.2014	Kl 10.29	331,5	1,016
5 ganger referanse	10.11.2014	Kl 14.49	0,0	1,047
	11.11.2014	Kl 14.24	23,6	1,033
	12.11.2014	Kl 13.29	46,7	1,020
	14.11.2014	Kl 12.42	93,9	1,018
	19.11.2014	Kl 12.45	213,9	1,016
	24.11.2014	Kl 10.44	331,9	1,016
1/5-del av referanse	10.11.2014	Kl 15.09	0,0	1,047
	11.11.2014	Kl 14.46	23,8	1,046
	12.11.2014	Kl 13.48	46,8	1,032
	14.11.2014	Kl 13.01	94,0	1,022
	19.11.2014	Kl 13.00	214,0	1,017
	24.11.2014	Kl 11.03	332,1	1,016

Tabell E.6: Rådata som viser utviklingen i specific gravity som funksjon av tid for Wit 2, med tre ulike inokulumsmengder av gjær (referanse, fem ganger referanse og én femdel av referanse).

Parallell	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG
Referanse	03.12.2014	Kl 15.44	0	1,044
	04.12.2014	Kl 14.44	23	1,039
	05.12.2014	Kl 14.30	47	1,029
	07.12.2014	Kl 14.15	95	1,018
	12.12.2014	Kl 13.41	214	1,014
	17.12.2014	Kl 11.48	332	1,013
5 ganger referanse	03.12.2014	Kl 16.04	0	1,044
	04.12.2014	Kl 15.00	23	1,032
	05.12.2014	Kl 14.47	47	1,022
	07.12.2014	Kl 14.31	94	1,015
	12.12.2014	Kl 14.01	214	1,013
	17.12.2014	Kl 12.15	332	1,013
1/5-del av referanse	03.12.2014	Kl 15.54	0	1,044
	04.12.2014	Kl 15.17	23	1,042
	05.12.2014	Kl 15.05	47	1,033
	07.12.2014	Kl 14.47	95	1,020
	12.12.2014	Kl 14.28	215	1,014
	17.12.2014	Kl 12.28	333	1,014

Tabell E.7: Rådata som viser utviklingen i specific gravity som funksjon av tid for Wit 1, fermentert ved tre ulike temperaturer (15, 20 og 25 °C).

Parallell	Dato	Tidspunkt	Tid [t]	SG
Fermentering 15 °C	10.11.2014	Kl 15.20	0	1,047
	11.11.2014	Kl 15.18	24	1,044
	12.11.2014	Kl 14.58	48	1,038
	14.11.2014	Kl 14.15	95	1,022
	19.11.2014	Kl 13.55	215	1,016
	24.11.2014	Kl 11.54	333	1,015
Fermentering 20 °C	10.11.2014	Kl 15.18	0	1,047
	11.11.2014	Kl 15.32	24	1,040
	12.11.2014	Kl 15.03	48	1,022
	14.11.2014	Kl 14.00	95	1,020
	19.11.2014	Kl 13.48	215	1,014
	24.11.2014	Kl 11.45	332	1,014
Fermentering 25 °C	10.11.2014	Kl 15.22	0	1,047
	11.11.2014	Kl 15.52	25	1,032
	12.11.2014	Kl 15.09	48	1,016
	14.11.2014	Kl 14.30	95	1,015
	19.11.2014	Kl 14.03	215	1,014
	24.11.2014	Kl 12.03	333	1,014

Tillegg F Tørrvekt

Red Ale

Tørrvekt for gjærkakene av Red Ale med ulike inokulumsmengder ble beregnet. Gjærkakene ble resuspendert i vann for å lage en homogen blanding. Vekten av denne blandingen ble målt for alle parallellene. 1 ml av dette ble tatt ut og veid på forhåndsveid aluminiumsskål før de ble satt i varmeskap (120 °C) over natten. Dette ble igjen veid. Denne informasjonen, forholdene mellom de ulike verdiene, ble brukt for å beregne den totale tørrvekten av gjærkakene. Gjennomsnittet av de like parallellene ble brukt videre. Rådata og resultater er gitt i Tabell F.1 og F.2, sammen med mellomregningsverdier.

Tabell F.1: Rådata og mellomregninger for å finne tørrvekt av gjærkakene fra Red Ale med ulike inokulumsmengder.

Parallell	Total våtvekt	Våtvekt/ml	Forhold, (tot. våtvekt)/(våtvekt/ml)
Ref	672	0,94	716
	656	0,88	741
5 ref	381	0,92	416
	805	1,02	788
1/5 ref	696	0,95	735
	746	0,91	823

Tabell F.2: Rådata og mellomregninger for å finne tørrvekt av gjærkakene fra Red Ale med ulike inokulumsmengder. Gjennomsnittet for tørrvekt er gitt for de tre parallellene.

Parallell	Tørrvekt/ml	Total tørrvekt	Gjennomsnitt
Ref	0,071	50,5	48,1
	0,062	45,7	
5 ref	0,135	56,2	55,9
	0,071	55,7	
1/5 ref	0,050	36,9	40,2
	0,053	43,5	

Tabell F.3: Viser mengde gjær tilsatt og gjærkonsentrasjoner i hver av parallellene for Wit.

Parallell	Masse [g]	Masse/vørter [g/ml]	Kons [g/L]
Ref	0,12	0,00015	0,15
5ref	0,60	0,00069	0,69
1/5ref	0,02	0,00003	0,03

Wit

Det ble gjort en tørrvektanalyse av gjærstarteren for å ha et nullpunkt. 50 ml av gjærstarteren ble sentrifugert. Supernatant ble kastet og pellet ble resuspendert i 10 ml destillert vann. Dette ble satt i varmeskap som holdt 120 °C over natten. Masse av gjær ble målt til 478 mg for 50 ml. Dette er en konsentrasjon på 0,0096 g/ml. Konsentrasjon av gjær i de tre ulike parallellene av Wit er gitt i Tabell F.3.

Rådata for tørrvekt funnet for de tre inokulumsmengdene er gitt i Tabell F.4 og F.5, for henholdsvis batch 1 og 2.

Tabell F.4: Rådata og mellomregninger for å finne tørrvekt av gjær i Wit med ulike inokulumsmengder, batch 1. Tørrvekten er gitt som mg/ml vørter.

Parallell	Tid	Masse skål+gjær	Masse, skål	Masse, gjær [mg/ 50ml]	Masse, gjær [g/ml]
Ref	24	2239,42	2143,75	95,67	0,0019134
	48	2316,86	2142,14	174,72	0,0034944
	96	2081,4	1873,64	207,76	0,0041552
	216	2101,19	1929,09	172,1	0,003442
	336	2053,66	1875,75	177,91	0,0035582
5 ref	24	2306,3	2137,73	168,57	0,0033714
	48	2373,79	2129,1	244,69	0,0048938
	96	2164,77	1919,56	245,21	0,0049042
	216	2144,36	1923,89	220,47	0,0044094
	336	2086,12	1885,94	200,18	0,0040036
1/5 ref	24	2196,13	2129,74	66,39	0,0013278
	48	2279,92	2135,24	144,68	0,0028936
	96	2105,96	1923,97	181,99	0,0036398
	216	2098,7	1918,7	180	0,0036
	336	2082,53	1920,52	162,01	0,0032402

Tabell F.5: Rådata og mellomregninger for å finne tørrvekt av gjær i Wit med ulike inokulumsmengder, batch 2. Tørrvekten er gitt som mg/ml vørter.

Parallell	Masse, skål+gjær [mg]	Masse, skål [mg]	Masse, gjær [mg]	Kons, gjær [mg/ml]	Tid [t]
Ref	2047	1923	125	2,5	23
	2563	2364	199	4,0	47
	3291	3047	243	4,9	95
	2022	1685	337	4,0	214
	2372	2066	305	3,6	332
5 ref	2113	1932	181	3,6	23
	2515	2275	240	4,8	47
	4158	3900	258	5,2	94
	2516	2150	366	4,7	214
	2166	1815	352	4,5	332
1/5 ref	1986	1906	80	1,6	23
	2433	2312	121	2,4	47
	3622	3418	204	4,1	95
	2428	2141	287	3,3	215
	2253	1879	374	4,4	333

Tillegg G Kimtallsanalyse

For Wit ble det utført kimtallsanalyse. Fortynningene brukt for batch 1 er gitt i Tabell G.1. Dag 1 er 24 timer etter inokulering, dag 2 er 48 timer etter inokulering, osv. 200 μl ble platet ut på agarskålene for hver fortynning.

Tabell G.1: Fortynningene brukt i kimtallsanalysen for Wit, batch 1. Dag 1 er 24 timer etter inokulering, dag 2 er 48 timer etter, osv.

Parallell	Dag 1 Fortynning	Dag 2 Fortynning	Dag 4 Fortynning	Dag 9 og 14 Fortynning
Referanse	$10^{-5}\text{-}10^{-8}$	$10^{-7}\text{-}10^{-11}$	$10^{-5}\text{-}10^{-10}$	$10^{-2}\text{-}10^{-5}$
5 ·ref	$10^{-6}\text{-}10^{-9}$	$10^{-7}\text{-}10^{-12}$	$10^{-5}\text{-}10^{-10}$	$10^{-2}\text{-}10^{-5}$
1/5-del av ref	$10^{-4}\text{-}10^{-7}$	$10^{-6}\text{-}10^{-11}$	$10^{-5}\text{-}10^{-10}$	$10^{-2}\text{-}10^{-5}$

For de første tre analysene ble det ingen kim, fordi prøvene var fortynnet for mye. I Tabell G.2 er fortynningene og antall kim gitt for de to siste dagene for hver parallell. Kimtallsanalysen for gjærstarteren ga 176 kim (ved 10^{-4} fortynning og 100 μl ble platet ut).

Antall levedyktige celler i de tre parallellene for dag 9 og 14 er gitt i Tabell G.3, for batch 1.

Fortynningene brukt for prøvene i batch 2 er $10^{-3} - 10^{-6}$ for alle uttakene, der 100 μl ble platet ut. Kim funnet er gitt i Tabell G.4.

Antall levedyktige celler i de tre parallellene beregnet fra antall kim er gitt i Tabell G.5, for batch 2. Gjærstarteren ble også analysert, og er dag 0.

Tabell G.2: Antall kim ved slutten av fermenteringen i de tre parallellene, i batch 1 av Wit.

Dag	Parallell	Fortynning	Kim
9	Ref	10^{-4}	43
14	Ref	10^{-4}	60
9	5 · ref	10^{-4}	45
14	5 · ref	10^{-4}	215
9	1/5 ref	10^{-4}	41
14	1/5 ref	10^{-4}	268

Tabell G.3: Antall levedyktige celler ved slutten av fermenteringen i de tre parallellene beregnet fra antall kim, i batch 1 av Wit.

Parallell	Dag 9 [celler/ml]	Dag 14 [celler/ml]
Referanse	$2,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$
5 · referanse	$2,3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$
1/5-del av referanse	$2,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$

Tabell G.4: Antall kim for de tre parallellene, i batch 2 av Wit.

Dag	Parallell	Fortynning	Kim
1	Ref	10^{-4}	53
2	Ref	10^{-4}	72
4	Ref	10^{-4}	58
9	Ref	10^{-3}	213
14	Ref	10^{-3}	156
1	5 ref	10^{-4}	283
2	5 ref	10^{-4}	176
4	5 ref	10^{-4}	39
9	5 ref	10^{-4}	35
14	5 ref	10^{-3}	240
1	1/5 ref	10^{-4}	161
2	1/5 ref	10^{-4}	200
4	1/5 ref	10^{-3}	255
9	1/5 ref	10^{-4}	56
14	1/5 ref	10^{-4}	52

Tabell G.5: Antall levedyktige celler i de tre parallellene beregnet fra antall kim, for batch 2 av Wit.

Parallell	Dag 0 [celler /ml]	Dag 1 [celler /ml]	Dag 2 [celler /ml]	Dag 4 [celler /ml]	Dag 9 [celler /ml]	Dag 14 [celler /ml]
Referanse	$2,2 \cdot 10^5$	$5,3 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$
5 · ref	$1,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
1/5-del av ref	$4,4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$

Tillegg H GC-MS væskefase: Rådata

Prøvene tatt fra Red Ale, del 1 ble spinnfiltrert og deretter injisert inn i en gasskromatograf koblet til et massespektrometer. Toppene i kromatogrammet ble analysert ved hjelp av Agilent Technologies' Enhanced Data Analysis for å finne relativ mengde. Stoffene toppene representerer ble identifisert ved søk i NIST-biblioteket gjort ved hjelp av programmet AMDIS. Verdiene for A - I er gitt i Tabell H.1 - H.8.

Tabell H.1: Mengde eddiksyre som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for eddiksyre i kromatogrammene.

Eddiksyre RT=11,8 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gj.snitt areal
1 og 2: referanse	0	4493184	4493184	4493184
	17	8808134	37177024	22992579
	20	37317534	16085052	26701293
	24	38249477	39699240	38974359
	41	5302967	9478588	7390778
	48	3332024	6891305	5111665
	72	0	3961667	1980834
	144	0	9332701	4666351
3 og 4: 5 ganger referanse	0	4493184	4493184	4493184
	17	6767169	46326031	26546600
	20	16626570	21312348	18969459
	25	0	11506850	5753425
	41	6147332	5448953	5798143
	49	7106328	0	3553164
	72	0	0	0
	144	0	7246776	3623388
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	4493184	4493184	4493184
	17	7507938	18235327	12871633
	20	43384678	25669055	34526867
	25	27090161	29338771	28214466
	41	12583616	35017660	23800638
	49	9478399	21325467	15401933
	72	11802184	15480311	13641248
	144	3838781	5997927	4918354

Tabell H.2: Mengde maursyre som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for maursyre i kromatogrammene.

Maursyre RT = 12,5 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	1	0	0	0
	10	7347723	68973034	38160379
	15	64608333	28608040	46608187
	21	84565375	71179460	77872418
	32	12656840	31100029	21878435
	40	0	24532561	12266281
	55	0	0	0
	94	0	12448706	6224353
3 og 4: 5 ganger referanse	0	0	0	0
	17	16918940	105333090	61126015
	20	46858948	53292356	50075652
	25	10938746	33296684	22117715
	41	9639582	0	4819791
	49	17425997	0	8712999
	72	0	0	0
	144	0	10497645	5248823
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	0	0	0
	17	69459421	37402522	53430972
	20	86350402	55285538	70817970
	25	55008270	62391270	58699770
	41	48991959	67404195	58198077
	49	28493326	46684505	37588916
	72	19599771	39609301	29604536
	144	0	0	0

Tabell H.3: Mengde maltol som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for maltol i kromatogrammene.

Maltol RT = 18,2 Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	55579731	55579731	55579731
	17	87348756	103444761	95396759
	20	116552639	101226070	108889355
	24	118333232	95299166	106816199
	41	93370559	110776158	102073359
	49	53460803	72232766	62846785
	72	25709764	46975287	36342526
	144	13306605	21646515	17476560
3 og 4: 5 ganger referanse	0	55579731	55579731	55579731
	17	92061054	176445760	134253407
	20	118513257	106836204	112674731
	24	66361957	73929006	70145482
	41	30617825	14681518	22649672
	49	29687381	7498160	18592771
	72	18947501	9706494	14326998
	144	11466202	18239959	14853081
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	55579731	55579731	55579731
	17	129116954	86658275	107887615
	20	131306786	82701571	107004179
	24	103188590	111765463	107477027
	41	120581424	102349171	111465298
	49	83571589	131685171	107628380
	72	57960133	77610828	67785481
	144	10102867	9569796	9836332

Tabell H.4: Mengde 1,3-dihydroksy-2-propanon som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for 1,3-dihydroksy-2-propanon i kromatogrammene.

1,3-dihydroksy-2-propanon RT = 19,5 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	14385064	14385064	14385064
	17	17178582	42528132	29853357
	20	39441148	28535874	33988511
	24	38432464	43313593	40873029
	41	4728536	11053714	7891125
	49	4975959	8465737	6720848
	72	0	3210024	1605012
	144	0	3664058	1832029
3 og 4: 5 ganger referanse	0	14385064	14385064	14385064
	17	6829412	39359432	23094422
	20	20028666	20487643	20258155
	24	4743409	15048077	9895743
	41	3803827	0	1901914
	49	2402137	0	1201069
	72	0	0	0
	144	0	1193109	596555
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	14385064	14385064	14385064
	17	75966738	34794939	55380839
	20	46161636	35998642	41080139
	24	37586018	60282714	48934366
	41	20570419	52458408	36514414
	49	16086002	31030767	23558385
	72	12377747	16650630	14514189
	144	0	0	0

Tabell H.5: Mengde 2,3-dihydro-3,5-dihydroksy-6metyl-4H-pyran-4-on som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for 2,3-dihydro-3,5-dihydroksy-6metyl-4H-pyran-4-on i kromatogrammene.

2,3-dihydro- 3,5-dihydroksy- 6-metyl-4H- pyran-4-on RT = 21,3 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	124376634	124376634	124376634
	17	169591365	276595400	223093383
	20	236961410	230542081	233751746
	24	202168557	185112008	193640283
	41	85600137	115269226	100434682
	49	63332062	88954655	76143359
	72	18008589	34806557	26407573
	144	6938323	14620245	10779284
4 og 5: 5 ganger referanse	0	124376634	124376634	124376634
	17	103069158	224699190	163884174
	20	123095817	112350091	117722954
	24	48475864	71118858	59797361
	41	21918875	19384194	20651535
	49	18805210	6651324	12728267
	72	13844051	9104017	11474034
	144	5121812	14714797	9918305
6 og 7: 1/5-del av referanse	0	124376634	124376634	124376634
	17	347913160	208452376	278182768
	20	248490093	184812761	216651427
	24	211083299	236866000	223974650
	41	174044017	178754199	176399108
	49	117575573	247335640	182455607
	72	50187874	71745440	60966657
	144	5237913	11482642	8360278

Tabell H.6: Mengde 5-(hydroksymetyl)-2-furankarboksaldehyd som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for 5-(hydroksymetyl)-2-furankarboksaldehyd i kromatogrammene.

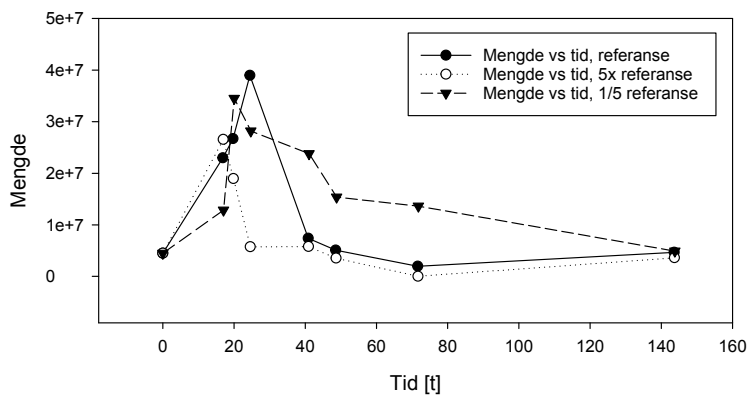
5-(hydroksymetyl)- 2-furan karboksaldehyd RT = 23,5 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	162099111	162099111	162099111
	17	438590071	1026703923	732646997
	20	726449569	577647533	652048551
	24	679084837	452988463	566036650
	41	138387560	186574160	162480860
	49	71748118	111502831	91625475
	72	12094484	35035601	23565043
	144	0	5571571	2785786
3 og 4: 5 ganger referanse	0	162099111	162099111	162099111
	17	118865764	617056252	367961008
	20	245845764	253534437	249690101
	24	68964251	92638138	80801195
	41	13984633	0	6992317
	49	14488817	0	7244409
	72	8365190	0	4182595
	144	0	4607847	2303924
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	162099111	162099111	162099111
	17	777152093	618846016	697999055
	20	708246200	525126296	616686248
	24	503428674	683165891	593297283
	41	263633108	429577167	346605138
	49	184727037	327454489	256090763
	72	18032507	67951525	42992016
	144	0	0	0

Tabell H.7: Mengde glyserol som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for glyserol i kromatogrammene.

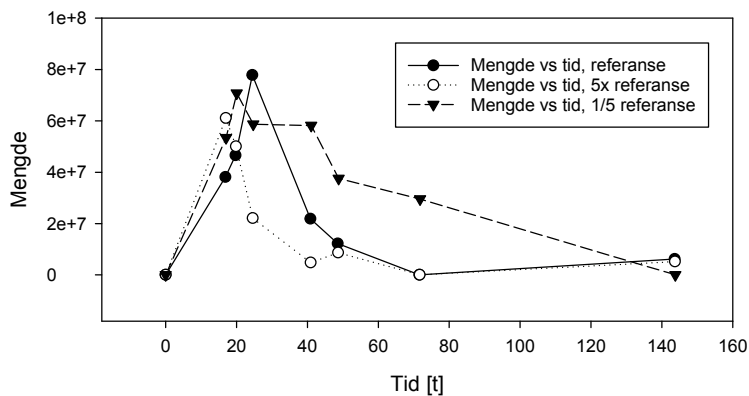
Glyserol RT=21,7 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	203348844	203348844	203348844
	17	173132254	325879190	249505722
	20	16089002	375210615	395649809
	24	363482259	356561243	360021751
	41	386398724	329279369	357839047
	49	368303136	427563313	397933225
	72	362232334	345560583	353896459
	144	352506939	572842423	462674681
3 og 4: 5 ganger referanse	0	203348844	203348844	203348844
	17	363199477	629090525	496145001
	20	452987284	441018466	447002875
	24	401999729	386178124	394088927
	41	491341010	609374914	550357962
	49	520631854	384863800	452747827
	72	523889749	611959180	567924465
	144	353782414	577629423	465705919
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	203348844	203348844	203348844
	17	559579697	301852507	430716102
	20	323815322	270563556	297189439
	24	422858541	324693951	373776246
	41	290785035	374566681	332675858
	49	373688163	421267748	397477956
	72	428163458	318078351	373120905
	144	428774660	602282288	515528474

Tabell H.8: Mengde dihydro-4-hydroksy-2(3H)-furanon som funksjon av tid, for de ulike parallellene, funnet ved å integrere toppen for dihydro-4-hydroksy-2(3H)-furanon i kromatogrammene.

dihydro-4-hydroksy- 2(3H)-Furanon RT = 24,4 min Batch	Tid [t]	A Areal	B Areal	Gjennomsnitt areal
1 og 2: referanse	0	45731972	45731972	45731972
	17	63210096	103659185	83434641
	20	92490514	138988072	115739293
	24	93484946	76775784	85130365
	41	45039020	63200866	54119943
	49	38384002	57895490	48139746
	72	17724551	41004100	29364326
	144	9164572	20402982	14783777
3 og 4: 5 ganger referanse	0	45731972	45731972	45731972
	17	44351486	67600601	55976044
	20	60725819	61154245	60940032
	24	30611036	46459818	38535427
	41	21168447	6250520	13709484
	49	21650614	6863384	14256999
	72	25717987	12959706	19338847
	144	9367919	24213662	16790791
5 og 6: 1/5-del av referanse	0	45731972	45731972	45731972
	17	124796216	112365617	118580917
	20	121947848	59176081	90561965
	24	74595317	115905166	95250242
	41	73711299	86498818	80105059
	49	72623067	127613143	100118105
	72	43014723	50595899	46805311
	144	8977479	12518771	10748125

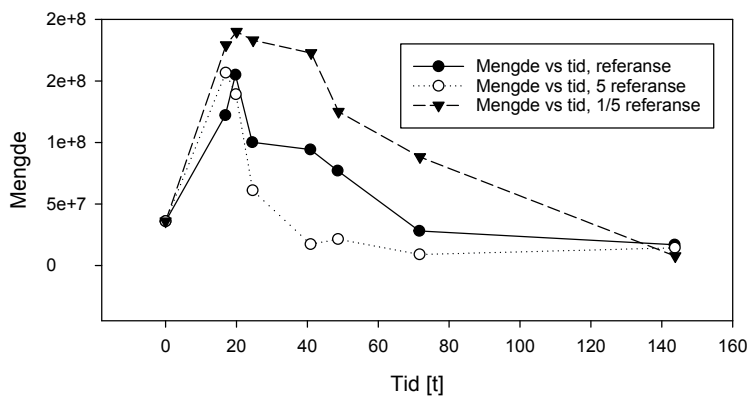


(a) A: Eddiksyre

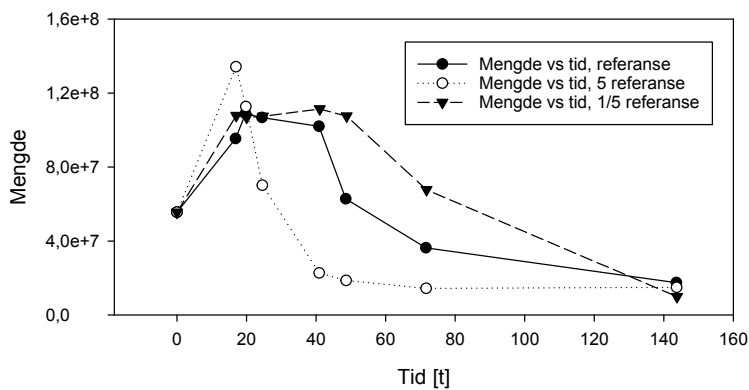


(b) B: Maursyre

Figur H.1: Relativ mengde stoff er plottet som funksjon av tid for stoffene A og B. Prøvene er analysert med GC-MS.

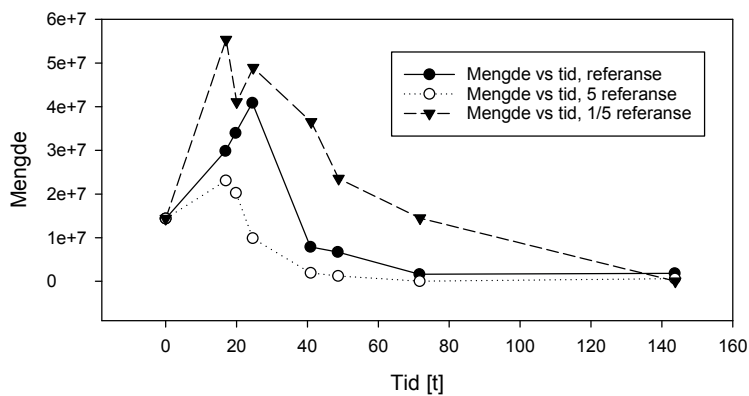


(a) C: 2-furanmetanol

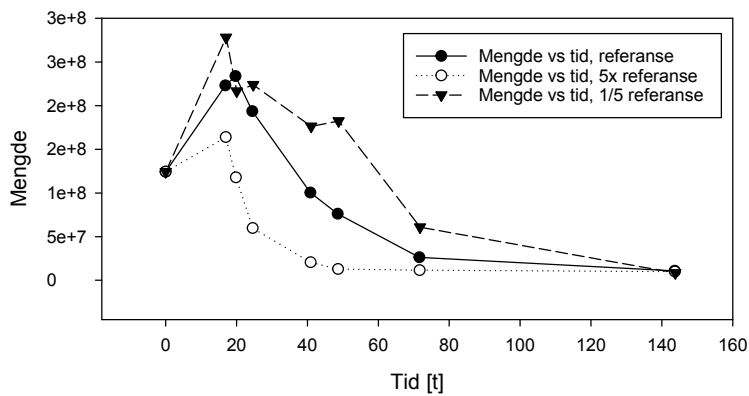


(b) D: Maltol

Figur H.2: Relativ mengde stoff er plottet som funksjon av tid for stoffene C og D. Prøvene er analysert med GC-MS.

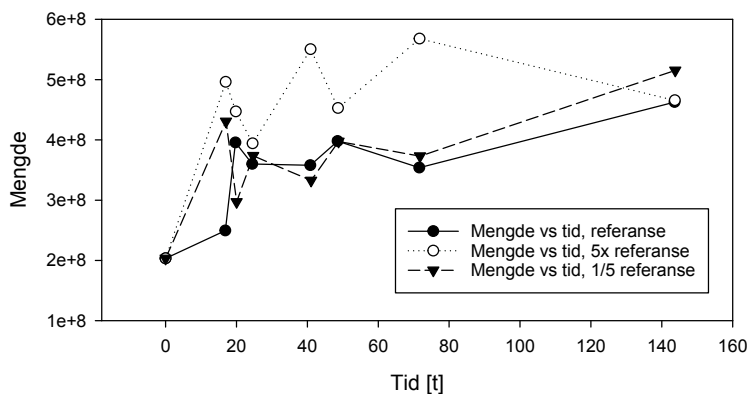


(a) E: 1,3-dihydroksy-2-propanon

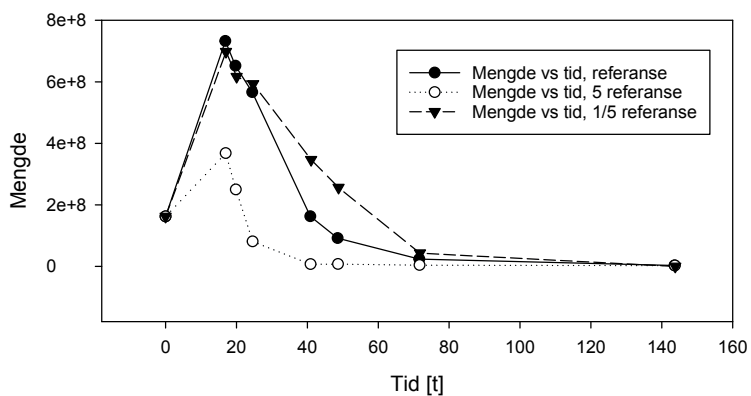


(b) F: 2,3-dihydro-3,5-dihydroksy-6-metyl-4H-Pyran-4-on

Figur H.3: Relativ mengde stoff som funksjon av tid for stoffene E og F. Prøvene er analysert med GC-MS.

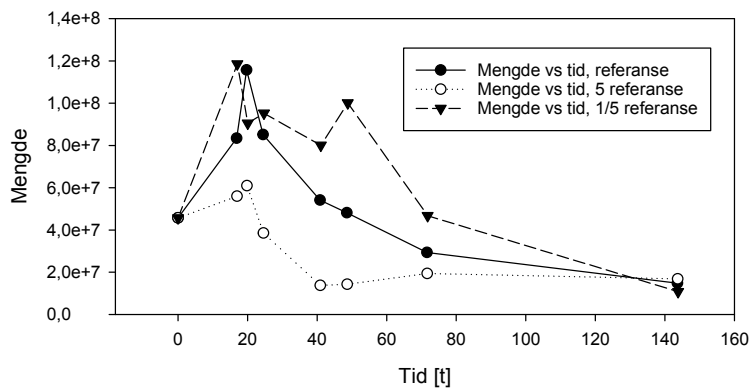


(a) G: glyserol



(b) H: 5-(hydroksymetyl)-2-furankarbo ksaldehyd

Figur H.4: Relativ mengde stoff som funksjon av tid for stoffene G og H. Prøvene er analysert med GC-MS.



(a) I: dihydro-4-hydroksey-2(3H)-furanon

Figur H.5: Relativ mengde dihydro-4-hydroksey-2(3H)-furanon (I) som funksjon av tid, der prøvene er analysert med GC-MS.

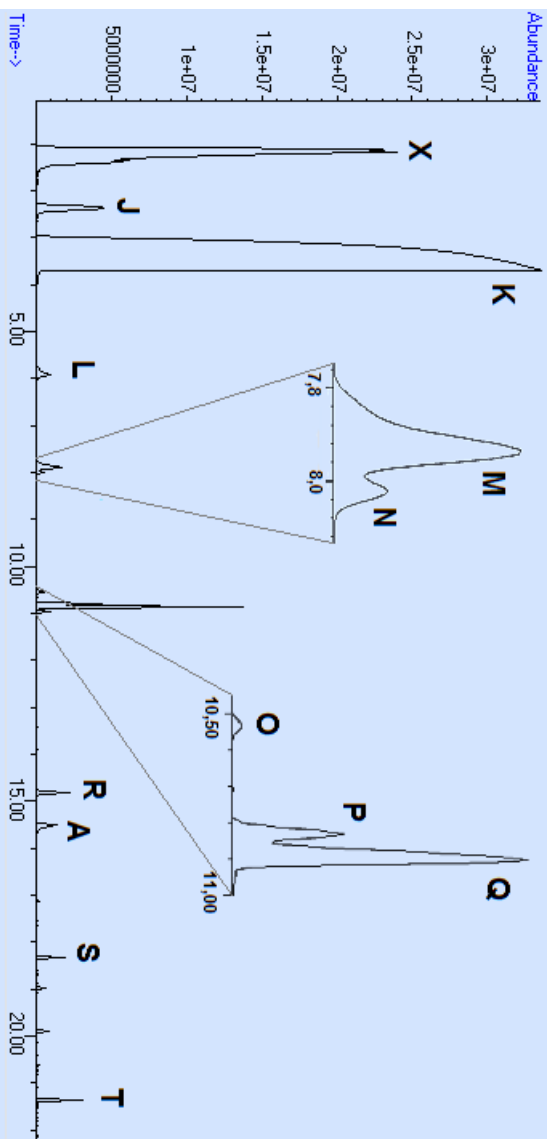
Tillegg I Headspace GC-MS Red Ale: Rådata

I Tabell I.1 er stoffene som ble identifisert ved analyse av Red Ale, utført med Headspace GC-MS. Fra kromatogrammene ble hver topp integrert for å finne arealet, som er et mål på mengde stoff. For hver topp ble massespekteret analysert ved hjelp av AMDIS og Agilent Enhanced Data Analysis, og sammenlignet med verdier fra NIST-biblioteket for å kvalifisere stoffene. Hvilke stoffer som ble identifisert og relativ mengde i form av areal er gitt i Tabell I.2 og I.3, for henholdsvis inokulumsmengdeforsøket og forbehandlingsforsøket.

Figur I.1 viser kromatogrammet for parallell 1 av Red Ale analysert på headspace GC-MS. Stoffene som ble funnet ble gitt navn fra J - T, og er markert på figuren.

Tabell I.1: Navn, CAS-nummer, retensjonstid og sannsynligheten for at kvalifiseringen er rett for J-T. Resultatene er basert på en gasskromatograf- og massepektrometeranalyse av Red Ale, og er sortert etter retensjonstiden.

Navn	CAS#	RT [min]	Sannsynlighet [%]
J , Etylacetat	141-78-6	2,37	94-96
K , Etanol	64-17-5	3,72-3,81	81-87
L , 1-propanol	71-23-8	5,99	95-97
M , 2-metyl-1-propanol	78-83-1	7,94	94-95
N , 3-metyl-1-butylacetat	123-92-2	8,03	89-91
O , Etylheksanoat	123-66-0	10,54	80-88
P , 2-metyl-1-butanol	137-32-6	10,85	44-65
Q , 3-metyl-1-butanol	123-51-3	10,91	66-68
R , Etyloktanoat	106-32-1	14,80	91-92
S , Etyldekanoat	110-38-3	18,33	83-86
T , 2-fenyletanol	60-12-8	21,37	85-86



Figur 1.1: Kromatogram for Red Ale analysert med headspace GC-MS, vist i Agilent Technologies' Enhanced Data Analysis ChemStation. Toppene som vises har blitt analysert videre, kvalifisert og har blitt navngitt J-T. Eddiksyre ble identifisert også her (A). X (den første toppen) er en blanding av mange stoffer som f.eks. karbondioksid og oksygen, og er ikke interessant i denne oppgaven.

Tabell I.2: Resultater fra headspace GC-MS-analyse av Red Ale med ulike inokulumsmengder. Kromatogrammet integreres for å gi arealet av de ulike toppene, massespektrene for de forskjellige toppene analyseres og sammenlignes med NIST-biblioteket for å identifisere stoffene.

Stoff	Areal Ref1	Areal Ref2	Areal 5 ref 1	Areal 5 ref 2	Areal 1/5 ref 1	Areal 1/5 ref 2
J	365442606	385758359	262488681	441785088	268172662	268756095
K	14798998699	14869174521	14147551735	13635322263	13485770397	14030916819
L	104928328	98111662	105632823	96690823	68262262	74723323
M	116390308	109541386	201502889	189102600	63453304	67983726
N	27973343	30840865	21553107	16970340	18684005	18638646
O	17217483	18107939	9066535	7623528	15090415	15403000
P	142370999	136211092	155255646	140044872	101323400	102817595
Q	438665637	434722281	504436664	464872171	310755006	310074206
R	69820166	73005409	36783256	29998396	61418554	61130657
S	18797987	26666705	19425435	17174037	12897755	9455721
T	24907791	57084385	64837846	68349392	55967784	48976149

Tabell I.3: Resultater fra headspace GC-MS-analyse av Red Ale med ulike forbehandlingar av gjær eller vørter. Kromatogrammet integreres for å gi arealet av de ulike toppene, massespektrene for de forskjellige toppene analyseres og sammenlignes med NIST-biblioteket for å identifisere stoffene.

Stoff	Areal Ref	Areal Rehyd.	Areal Oksygenering
J	193425550	856089109	302714059
K	11121756409	10150625518	10801348024
L	72853990	59737660	61629802
M	121510653	94586012	87407810
N	22251490	11854262	16535434
O	13459941	10371719	11879968
P	110381869	96541032	89206227
Q	345906810	316005594	314289811
R	66618275	58112747	59792227
S	23651253	19626496	31310900
T	45790811	32042828	47614202

Tillegg J Headspace GC-MS Wit 1: Rådata

Stoffene som ble identifisert ved å sammenligne med NIST-biblioteket, er gitt i Tabell J.1.

Tabell J.1: Navn, CAS-nummer, retensjonstid og sannsynligheten for at kvalifiseringen er rett for J-T. Resultatene er basert på en gasskromatograf- og massepektrometeranalyse av Red Ale, og er sortert etter retensjonstiden.

Navn	CAS#	RT [min]	Sannsynlighet [%]
J , Etylacetat	141-78-6	2,37	94-96
K , Etanol	64-17-5	3,72-3,81	81-87
L , 1-propanol	71-23-8	5,99	95-97
M , 2-metyl-1-propanol	78-83-1	7,94	94-95
N , 3-metyl-1-butylacetat	123-92-2	8,03	89-91
O , Etylheksanoat	123-66-0	10,54	80-88
P , 2-metyl-1-butanol	137-32-6	10,85	44-65
Q , 3-metyl-1-butanol	123-51-3	10,91	66-68
R , Etyloktanoat	106-32-1	14,80	91-92
S , Etyldekanoat	110-38-3	18,33	83-86
T , 2-fenyletanol	60-12-8	21,37	85-86

J.1 Ulike inokulumsmengder

Toppene i kromatogrammene fått fra headspace GC-MS-analyse, er gitt tabell J.2, J.3 og J.4, for wit med ulike inokulumsmengder.

Tabell J.2: Mengde stoffer funnet i headspace-GC-MS-analyse av Wit, for ulike inokulumsmengder. Del 1.

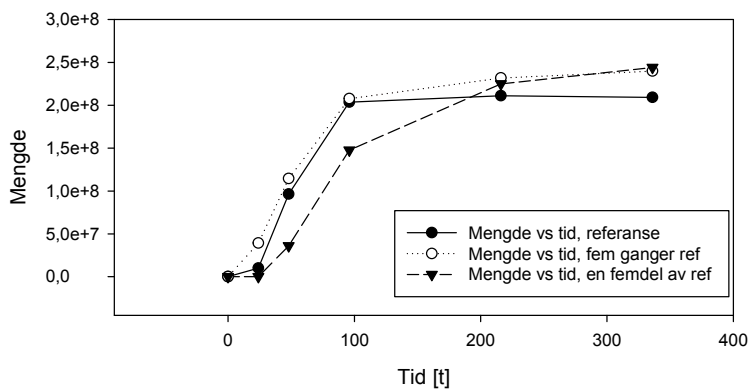
Stoff	Tid [t]	Areal Ref	Areal 5 ref	Areal 1/5 ref
Etylacetat	0	0	0	0
	24	10033584	39310984	0
	48	96394647	114508613	36129704
	96	203617929	207704489	147753841
	216	211132784	231846399	224964143
	336	209273463	239947250	244134899
Etanol	0	490676547	490676547	490676547
	24	4109788294	6523347173	2268146920
	48	8341927759	9333039235	5834927785
	96	10271203669	10594446871	9304162184
	216	10134930319	11898697167	10656179939
	336	10181849444	11766993879	11677997880
1-propanol	0	0	0	0
	24	0	14593636	0
	48	19395667	19679348	0
	96	22734186	23157641	16921490
	216	20764373	26062060	19522166
	336	20310957	27379849	21324565
2-metyl-1-propanol	0	0	0	0
	24	13406704	31686581	0
	48	26247367	44099447	15982229
	96	41171859	52728560	21488405
	216	30241508	61158851	25453099
	336	31122931	67240918	28220149

Tabell J.3: Mengde stoffer funnet i headspace-GC-MS-analyse av Wit, for ulike inokulumsmengder. Del 2.

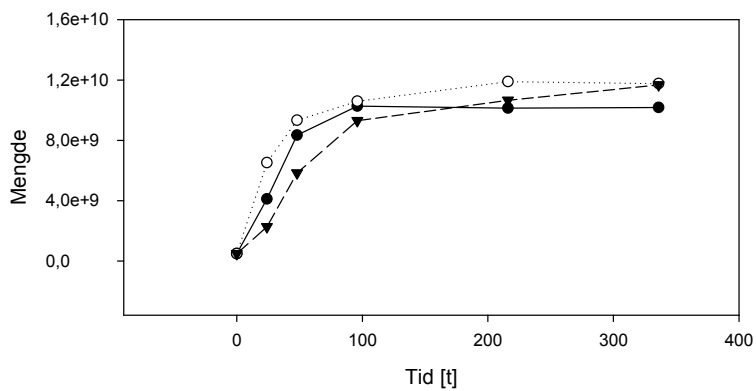
Stoff	Tid [t]	Areal Ref	Areal 5 ref	Areal 1/5 ref
3-metyl-1-butylacetat	0	0	0	0
	24	0	9689762	0
	48	21362772	34717127	6367304
	96	53972162	68851559	29101884
	216	32931714	48429915	34193472
	336	35444122	52360513	39187045
Etylheksanoat	0	0	0	0
	24	0	8253472	0
	48	18317973	20286203	5983548
	96	22168794	21420493	17498161
	216	16657709	18646900	16547040
	336	15094514	17587416	15513774
2-metyl-1-butanol	0	0	0	0
	24	35328537	64115484	0
	48	72295288	104531494	44139815
	96	108549260	126606658	67839800
	216	90852110	142832612	81025023
	336	93047120	152310741	87799106
3-metyl-1-butanol	0	21079472	21079472	21079472
	24	141043589	238256187	82797130
	48	287478761	465733725	174118366
	96	439969572	514532853	293540816
	216	362786582	564368809	344850543
	336	369884779	601320374	363292593

Tabell J.4: Mengde stoffer funnet i headspace-GC-MS-analyse av Wit, for ulike inokulumsmengder. Del 3.

Stoff	Tid [t]	Areal Ref	Areal 5 ref	Areal 1/5 ref
Etyloktanoat	0	0	0	0
	24	3926884	13905511	0
	48	41398342	26136414	10829425
	96	60853455	55345580	50080997
	216	79807413	79963386	79291427
	336	57748506	57134868	58954303
	Etyldekanoat	0	0	0
24		0	11137359	3349229
48		17844252	11916935	6198729
96		25584495	19110366	23217363
216		32688649	33369460	28263464
336		35324026	32162772	29195482
2-fenyletanol		0	0	0
	24	5756259	18775119	13309816
	48	10530626	21014780	14676667
	96	18081020	26078657	14861956
	216	18829230	32048541	15002067
	336	20303721	33332326	17307848

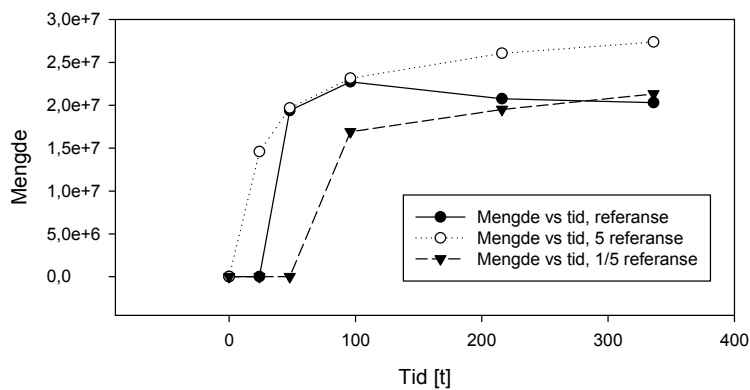


(a) J: Etylacetat

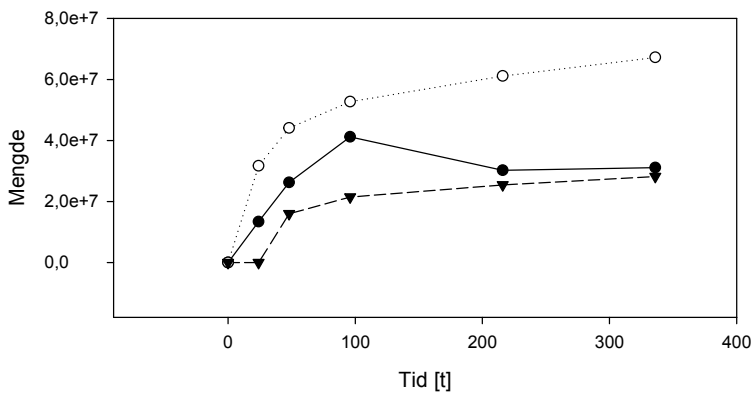


(b) K: Etanol

Figur J.1: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene J og K. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

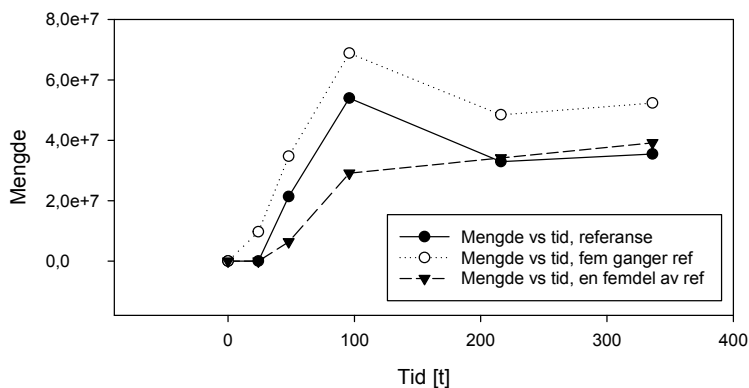


(a) L: 1-propanol

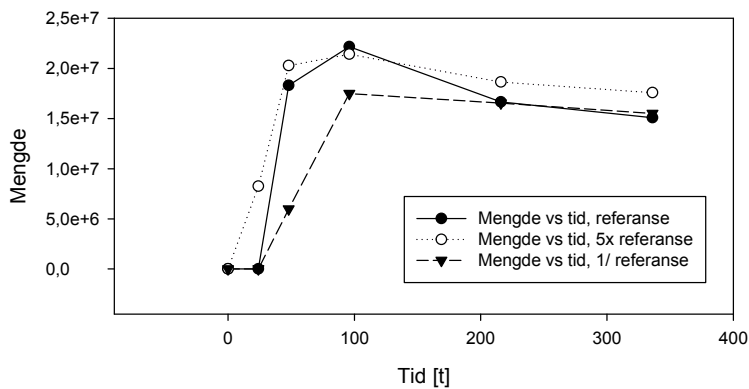


(b) M: 2-metyl-1-propanol

Figur J.2: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene L og M. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

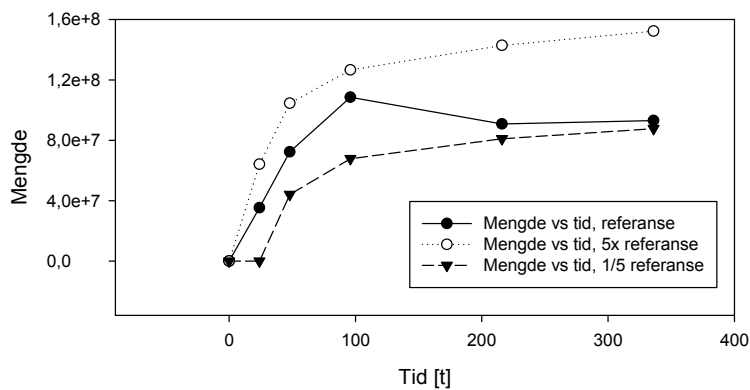


(a) *N: 3-metyl-1-butylacetat*

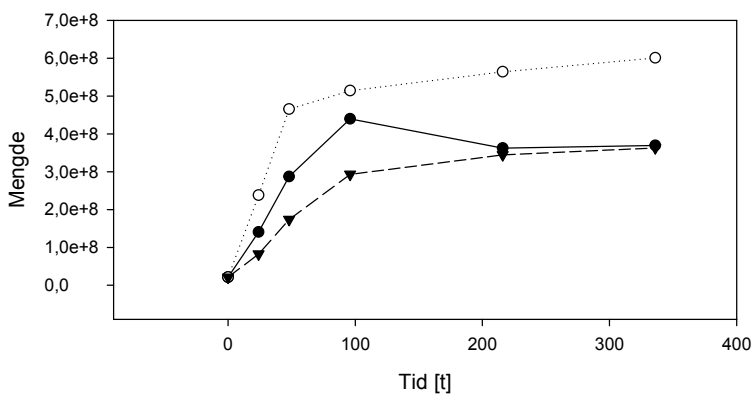


(b) *O: Etylheksanoat*

Figur J.3: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene *N* og *O*. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

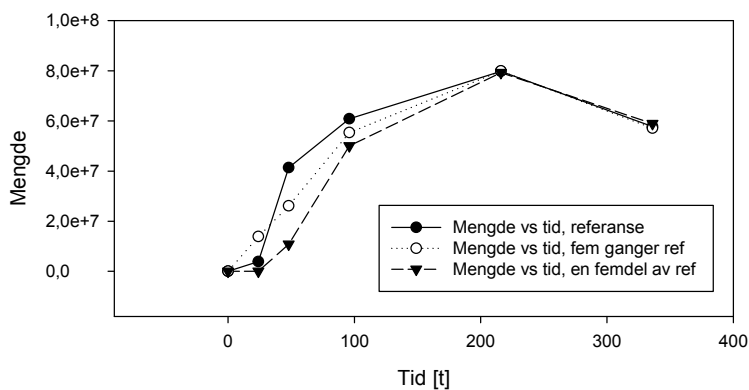


(a) P: 2-metyl-1-butanol

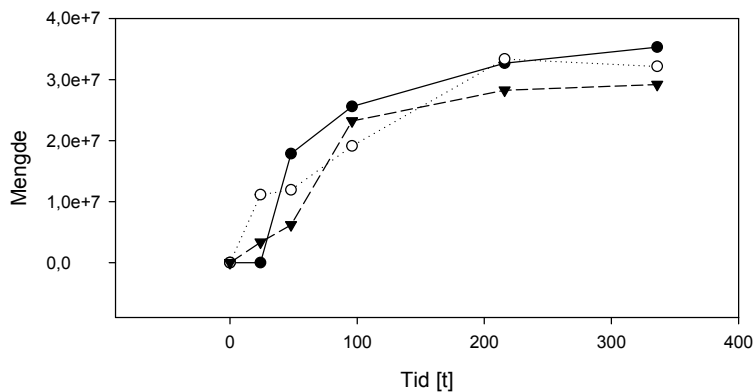


(b) Q: 3-metyl-1-butanol

Figur J.4: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene P og Q. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

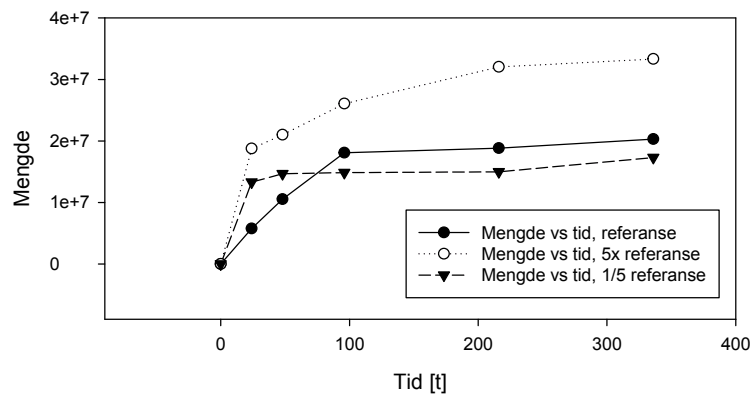


(a) R: Etyloktanoat



(b) S: Etyldekanoat

Figur J.5: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene R og S. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.



(a) T: 2-fenyletanol

Figur J.6: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene 2-fenyletanol. I hvert plott er det tre ulike inokulumsmengder: referansen, fem ganger referansen og en femdel av referansen.

J.2 Ulike fermenteringstemperaturer

Toppene i kromatogrammene fått fra headspace GC-MS-analyse, er gitt tabell J.5, J.6 og J.7, for wit med ulike fermenteringstemperaturer.

Tabell J.5: Mengde stoff funnet ved å integrere topper i kromatogram funnet ved headspace GC-MS-analyse. Del 1.

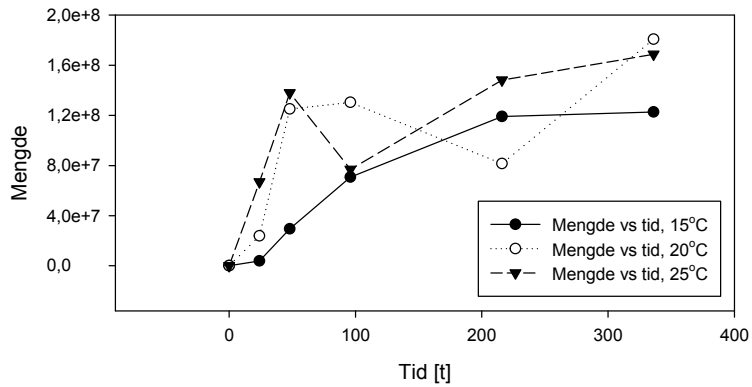
Stoff	Tid [t]	Areal 15 °C	Areal 20 °C	Areal 25 °C
Etylacetat	0	0	0	0
	24	3785708	23907740	66975751
	48	29481168	125114842	138047423
	96	70808952	130363980	76964871
	216	119139390	81502659	148161276
	336	122736496	180782043	168806257
Etanol	0	490676547	490676547	490676547
	24	2833226385	5613955177	8256755769
	48	5816500685	10588853921	9650657977
	96	8068581708	9196813964	8971141919
	216	9318125891	11278124946	8876497008
	336	9360177138	10315005068	9757977872
1-propanol	0	0	0	0
	24	0	11886886	19867967
	48	10894582	22283186	17873036
	96	15119647	15398407	15735368
	216	16018565	19904218	14766356
	336	15582749	17486238	16624875
2-metyl-1-propanol	0	0	0	0
	24	10306289	22782599	41821847
	48	22255089	44190176	49736733
	96	24144296	37916586	46918795
	216	28244659	49103057	46367316
	336	27542723	43749304	52019181

Tabell J.6: Mengde stoff funnet ved å integrere topper i kromatogram funnet ved headspace GC-MS-analyse. Del 2.

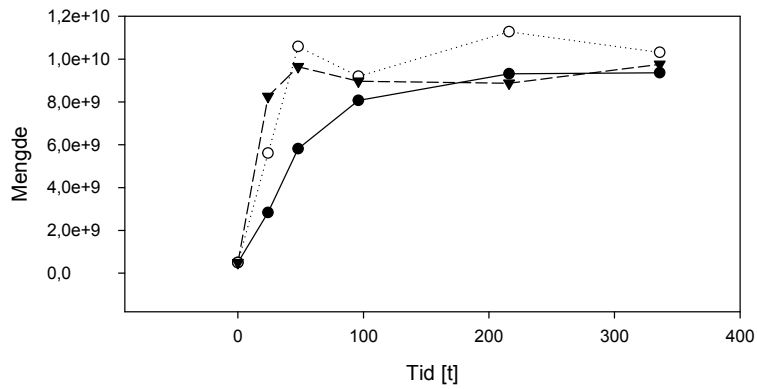
Stoff	Tid [t]	Areal 15 °C	Areal 20 °C	Areal 25 °C
3-metyl-1-butylacetat	0	0	0	0
	24	0	5367043	20014971
	48	5220651	34659135	44231824
	96	14806681	35850016	40147463
	216	22432140	40324442	34725500
	336	21136241	32910407	33346822
Etylheksanoat	0	0	0	0
	24	3514190	15424151	23474757
	48	10835307	27570323	25910161
	96	18989297	15842243	21120229
	216	16437106	14964226	12231372
	336	12746491	12269148	11283708
2-metyl-1-butanol	0	0	0	0
	24	21623458	47393450	74607651
	48	53362734	95180282	101265661
	96	64816489	88552921	97018261
	216	75412813	111815135	96430809
	336	75787024	103174780	108294880
3-metyl-1-butanol	0	21079472	21079472	21079472
	24	111656150	188003162	300068383
	48	208113939	396416067	415175189
	96	288281980	387619423	392441136
	216	367700916	467922385	386618764
	336	361525817	432896316	426067938

Tabell J.7: Mengde stoff funnet ved å integrere topper i kromatogram funnet ved headspace GC-MS-analyse. Del 3.

Stoff	Tid [t]	Areal 15 °C	Areal 20 °C	Areal 25 °C
Etyloktanoat	0	0	0	0
	24	11705720	34890159	46729719
	48	47701674	77415767	66551558
	96	81550375	49072355	61987788
	216	63146660	53766683	48239516
	336	33708076	44887834	40750788
	Etyldekanooat	0	0	0
24		7457247	16544656	31503617
48		17195377	33101570	40672216
96		19478804	8059247	23002656
216		11160216	11477844	12097101
336		8894967	12844754	12114876
2-fenyletanol		0	0	0
	24	9352029	10899428	17463514
	48	11081041	20055607	21362446
	96	14562221	15441484	18134473
	216	12328020	17800416	17927369
	336	15949603	18787360	18140736

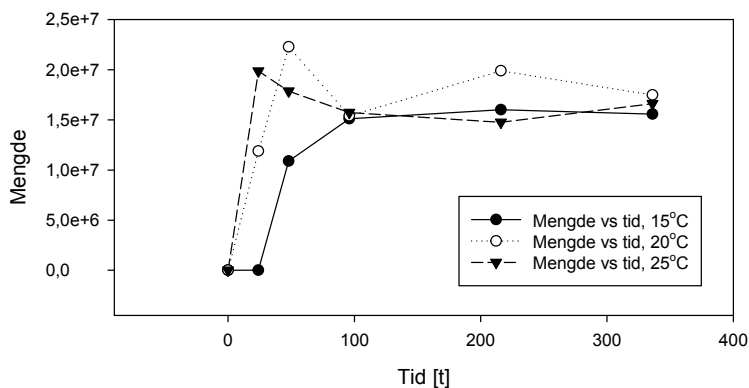


(a) J: *Etylacetat*

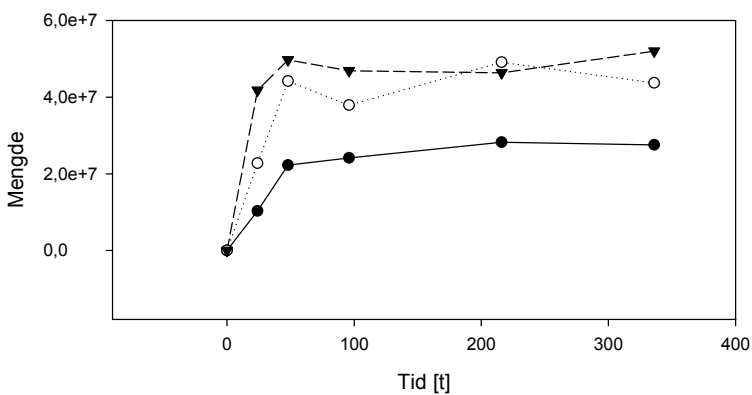


(b) K: *Etanol*

Figur J.7: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene J og K. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.

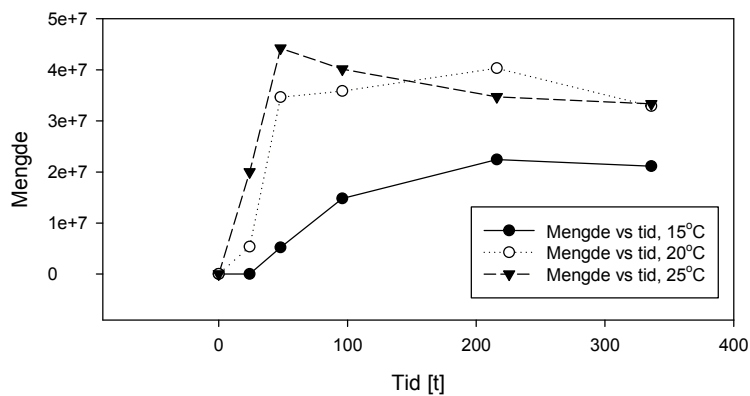


(a) L: 1-propanol

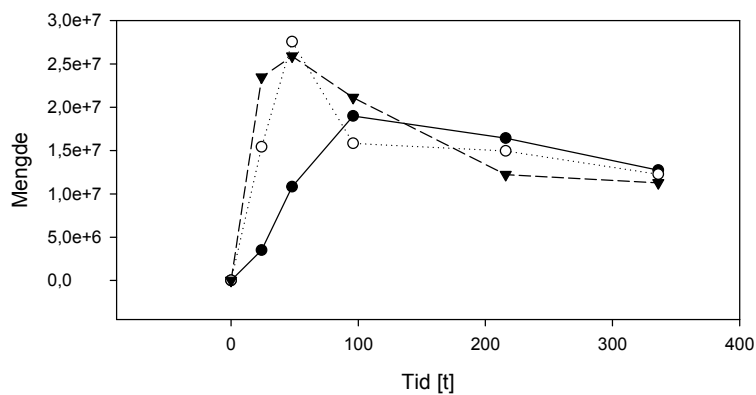


(b) M: 2-metyl-1-propanol

Figur J.8: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene L og M. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.

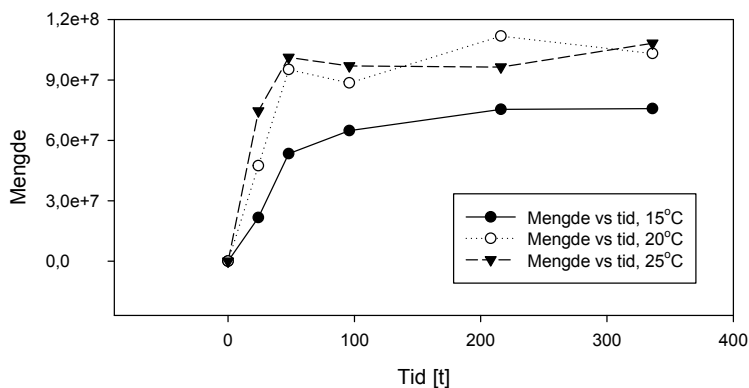


(a) N: 3-metyl-1-butylacetat

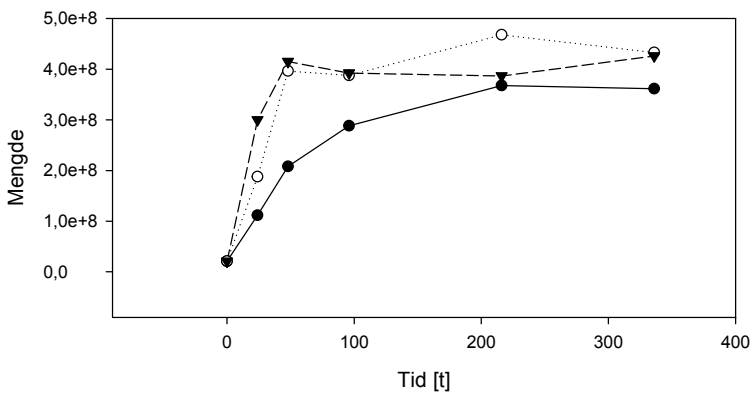


(b) O: Etylheksanoat

Figur J.9: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene N og O. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.

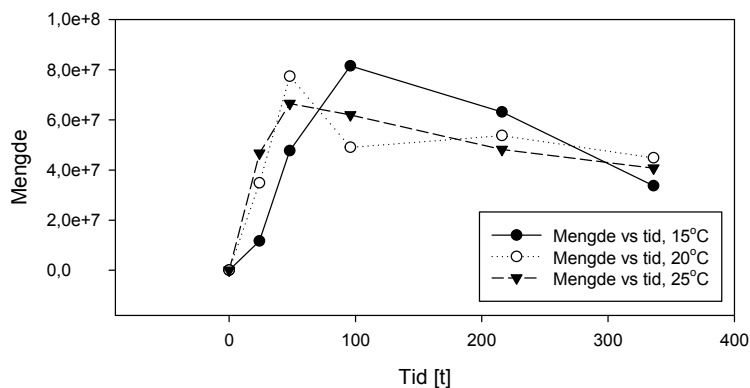


(a) P: 2-metyl-1-butanol

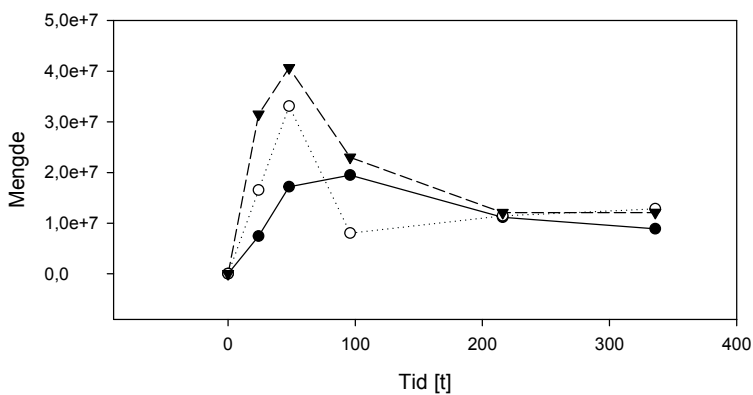


(b) Q: 3-metyl-1-butanol

Figur J.10: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene P og Q. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.

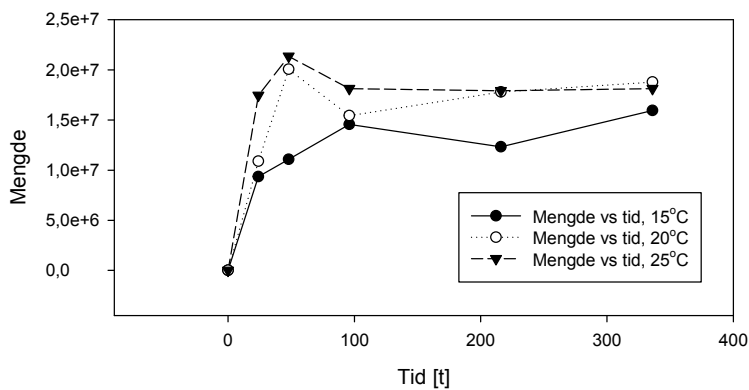


(a) R: Etyloktanoat



(b) S: Etyldekanoat

Figur J.11: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffene R og S. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.



(a) T: 2-fenyletanol

Figur J.12: Relativ mengde stoff funnet fra kromatogrammene er gitt som funksjon av fermenteringstiden for stoffet 2-fenyletanol. I hvert plott er det tre ulike fermenteringstemperaturer: 15, 20 og 25 °C, der 20 °C fungerer som referanse.