

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Ringnes E.C. Dahls i Trondheim, og ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap i Ås, i perioden januar til mai 2013. Denne oppgaven var den avsluttende delen av en mastergrad i Matvitenskap.

Oppgaven kommer av en dialog på e-post mellom bryggerimester Roger Løe og undertegnende, hvor vi ble enige at vi skulle se om noe kunne gjøres for å øke mengden isoamylacetat i Dahls Pils. Som trøndere flest står Dahls Pils meg nært i hjertet, og er et viktig produkt for trøndersk kultur og tradisjon. Jeg er stolt over å ha jobbet med dette, hvor utfallet er en masteroppgave jeg er svært fornøyd med. Jeg håper Ringnes E. C Dahls har praktisk nytte av resultatene.

En stor takk rettes til Trude Wicklund, som bestandig hadde råd, tips og triks hele veien fram til levering. Tusen takk for all hjelpen du gav meg, og jeg ønsker deg lykke til i Frankrike til høsten.

En stor takk rettes også til bryggerimester Roger Løe, for god veiledning og sitt hjelpsomme vesen. Det Roger ikke vet om øl er det antagelig ingen som vet.

Jeg vil også takke ansatte på Ringnes E. C Dahls. Dere er en meget trivelig og hjelpsom gjeng, og gjorde det svært lett å komme seg inn i varmen på bryggeriet.

Tusen takk til overingeniør Kari Olsen og resten av laboratoriumspersonalet i tredje etasje for god og rask hjelp ved HSGC analysene.

På tampen vil jeg takke min kjære Elisabeth Oust Ledsaak, for 5 fine studieår sammen. Jeg vil også takke David Ledsaak, som lot meg få bo i kjelleren hans under oppholdet i Trondheim.

Uten dere ville ikke denne oppgaven vært mulig å gjennomføre.

Espen Arntzen

Ås, 14.05.2013

Sammendrag

Øl består av mange ulike aromakomponenter. Sammensetningen av aromakomponentene utgjør smaken i øl, og små endringer i konsentrasjon av disse kan gi et totalt forandret smaksbilde. Dette er aromakomponenter som ester og fuselalkoholer. Hvor mye av disse aromastoffene som blir dannet i øl, kommer an på hvilken gjærstamme man bruker. Ulike gjærstammer produserer ulike mengder aromakomponenter, som vil gi ulike smaksprofiler på øl.

Dahls Pils er et øl som vil ha en sterk esterprofil, hvor esteren isoamylacetat er viktigst. Denne esteren gir en behagelig aroma av banan. Endringer i produksjonen ved Ringnes E. C Dahls har ført til at konsentrasjonen av isoamylacetat i Dahls Pils har blitt noe redusert.

For å undersøke dette ble vørter fra produksjonen brygget i småskala ved temperaturer forskjellig fra vanlig fermenteringstemperatur ved brygging av Dahls Pils. Gjærtilsetningen i forsøksbryggene var også høyere enn ved vanlig Dahls Pils produksjon. Fra forsøksbryggene tok man ut prøver, som ble analysert for flyktige aromakomponenter ved hjelp av Headspace Gas Chromatography (HSGC). Forsøksbryggene ble analysert sensorisk, for å se om det sensoriske panelet kunne detektere konsentrasjonsforskjeller i ester, i forhold til Dahls Pils produsert etter normal praksis.

Resultatene i samsvar med teori, viser at det kan være mulig å øke konsentrasjonen av isoamylacetat i Dahls Pils ved å redusere trykket ved primærfermentering. Ved å øke trykket etter endt primærfermentering, kan man redusere konsentrasjonen av fuselalkoholer. Ved reduksjon av trykk i primærfermenteringen, bør fermenteringstemperaturen antagelig senkes noe i forhold til dagens fermenteringstemperatur, da redusert trykk ved primærfermentering kan gi forhøyede konsentrasjoner av fuselalkoholer, og en lavere fermenteringstemperatur vil motvirke dette.

Ut i fra resultatene kan man ikke si at økt gjærtilsetning øker konsentrasjonen ester, men en økt gjærtilsetning kan antagelig gi et raskere fermenteringsforløp. Det anbefales å utføre et forsøksbrygg i storskala med anbefalte endringer, for å se om dette gir en høyere konsentrasjon av isoamylacetat.

Prøveuttak fra forsøksbryggene ble utført daglig, noe som førte til dannelse av usmaker fra daglig eksponering av oksygen og lys. Usmakene førte til at forsøksbryggene sensorisk ikke kunne sammenlignes med Dahls Pils produsert etter normal produksjonspraksis.

Abstract

Beer consists of many aroma components. The composition of aroma components constitutes the flavour of beer, and small changes in concentration of these can give a completely different flavour profile. These are aroma components such as esters and higher alcohols. Different yeast strains produce different amounts of aroma components, resulting in different flavours in beer, depending on which yeast strain used.

In Dahls Pilsner, the ester isoamylacetate is most important, and gives the beer an estery profile. This ester contributes to a pleasant banana aroma. Changes in the production at Ringnes E. C Dahls have led to a slight reduction in concentration of isoamylacetate.

Wort from the production was brewed in small-scale at different temperatures. The dosage of yeast was greater in the small-scale brews, and temperatures used were different from the normal fermentation temperatures for brewing Dahls Pilsner. Samples from the small-scale brews were analyzed for volatile aroma components, using Headspace Gas Chromatography (HSGC). When the fermentation was completed, the small-scale brews got a sensory evaluation, to see if the sensory panel could detect different concentrations of ester, when compared to Dahls Pilsner produced by normal practice.

Results and theory show that it can be possible to increase the concentration of isoamylacetate in Dahls Pilsner, by applying less pressure during primary fermentation. By applying more pressure when the primary fermentation has ended, it should be possible to reduce the concentration of higher alcohols. By reducing the pressure in the primary fermentation, the fermentation temperature should also be reduced, because less pressure in the primary fermentation can cause a higher concentration in higher alcohols, and a lower temperature can prevent this from happening.

From the results, one cannot state the fact that an increased addition of yeast leads to higher concentrations in ester, but it can lead to a faster fermentation process. It is recommended to execute a test brew in large-scale, to see if these recommendations leads to a higher concentration of isoamylacetate.

Samples were taken daily from the small-scale brews, which resulted in formation of unwanted flavours, due to exposure to oxygen and light. These unwanted flavours resulted that the small-scale brews and Dahls Pilsner produced by normal practice were not sensorial comparable.

Innholdsfortegnelse

1 Innledning.....	1
2 Teori	3
2.1 Ølhistorie	3
2.2 Ølproduksjon	3
2.2.1 Malt	3
2.2.2 Mesking.....	4
2.2.3 Vørterkoking	5
2.2.3.1 Ekstrahering av humlekomponenter	5
2.2.3.2 Utfelling av protein	5
2.2.3.3 Fordamping og sterilisering	5
2.2.3.4 Senking av pH.....	6
2.2.3.5 Fordamping av uønskede aromakomponenter	6
2.2.4 Videre behandling av vørter.....	6
2.2.4.1 Tanker	6
2.2.4.2 Trykkfermentering	7
2.2.5 Modning og kuldestabilisering	8
2.2.6 Filtrering	9
2.2.7 Nedbrygging	9
2.2.8 Pasteurisering	9
2.3 Gjær	9
2.3.1 Gjærhistorie.....	9
2.3.2 Gjærsopp	10
2.3.3 Overgjær og undergjær	11
2.3.4 Fermentering	11
2.3.5 Karbohydratmetabolisme	12
2.3.6 Proteinmetabolisme.....	13
2.3.7 Fettmetabolisme	14

2.3.8 Dannelse og forbruk av ketoner (diacetyl og 2,3-pentandion).....	14
2.3.9 Flokkulering	15
2.3.10 Propagering	15
2.4 Produksjon av flyktige komponenter	16
2.5 Ester	17
2.5.1 Dannelse estere	18
2.5.2 Miljøvariabler som affekterer dannelse av ester	18
2.5.3 Valg av gjær	19
2.6 Fuselalkoholer	20
2.7 Smaksterskelsgrense for komponenter i øl	20
2.8 Effekt av sollys	21
2.9 Effekter av oksygen på ferdig øl.....	23
3 Materialer og metoder	24
3.1 Forberedelser	24
3.2 Utførelse	25
3.2.1 Bryggeutstyr.....	25
3.2.2 Uttak av vørter til fermentering	26
3.2.3 Prøveuttak til analyser.....	27
3.2.4 Fjerning av gjær og kuldestabilisering.....	28
3.2.5 Tapping	28
3.2.6 Transport av prøvemateriale	28
3.3 Analysemetoder	29
3.3.1 Anton Paar	29
3.3.2 Headspace Gas Chromatography (HSGC).....	30
3.3.2.1 Analyse av diacetyl og 2,3-pentandion.....	30
3.3.2.2 Analyse av ester, fuselalkoholer og acetaldehyd	31
3.3.3 pH måling.....	32
3.3.4 Mikrobielle tester	33
3.3.4.1 Ølskadelige bakterier	33

3.3.4.2 Villgjær/mugg	33
3.3.4.3 Generell vekst	34
3.5 Sensorisk analyse.....	34
3.6 Statistiske beregninger.....	36
4 Resultater.....	37
4.1 Dannelse av alkohol og reduksjon av ekstrakt	37
4.2 Fermenteringstid	40
4.3 pH	41
4.4 Flyktige aromakomponenter	42
4.4.1 Esterforløp.....	42
4.4.2 Esterinnhold	44
4.4.3 Fuselalkohol	48
4.4.4 Acetaldehyd	51
4.4.5 Produksjon og reduksjon av diacetyl og 2,3-pentandion	53
4.5 Sensorikk resultater	56
4.6 Mikrobiologi	59
5 Diskusjon.....	60
5.1 Stamvørter	60
5.2 Fermenteringsforløpet	60
5.3 Ester	62
5.4 Fuselalkohol.....	65
5.5 Acetaldehyd	66
5.6 Mikrobielle analyser	66
5.7 Sensorikk	67
5.8 Oppsummering og forslag til videre arbeid	69
6 Konklusjon	71
7 Referanser.....	72
8 Vedleggsliste	76

1 Innledning

Den praktiske utførelsen av denne masteroppgaven tok sted på Ringnes E. C Dahls i Trondheim (heretter RECD) og på UMB, Ås.

I denne oppgaven har man valgt å se på noen produksjonstekniske forhold som kan ha innvirkning på esterproduksjon ved fermentering, og ut i fra teori sammen med analyser komme fram til løsninger som kan gi en økt ester konsentrasjon i Dahls Pils. I Dahls Pils ønskes en markant aroma av esteren isoamylacetat, som gir en behagelig bananaroma (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

Fram til 1981 ble Dahls Pils produsert på horisontale tanker, med en høyere gjærtilsetning enn det som blir brukt i dag. I dag produseres Dahls Pils med en lavere gjærtilsetning, og i vertikale tanker som genererer trykk fra gjærens produksjon av karbondioksid. Horisontale tanker gir ikke like høyt trykk som vertikale, og dette kan være en viktig årsak for nedgang i esterproduksjon (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Mange mener at den viktige bananaromaen som stammer fra isoamylacetat i Dahls Pils har blitt svakere med årene (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

Ved anskaffelse av stående tanker, ble fortsatt liggende tanker tatt i bruk, da disse produserte en øl med mer ester. De nye stående tankene ble tilsatt esterrikt øl fra de liggende tankene, mens modning av ølet fant sted i de stående tankene. Dette blir ikke gjort lengre, og mange mener estermengden i ølet har gått ned etter at man sluttet med dette (Roger Løe, personlig meddelelse 2013). De stående tankene er av typen CCT (Cylinder Conical Tank), som er en kjegleformet sylindrisk tank med kon bunn. Tankene er utstyrt med en mottrykksventil, slik at trykk fra gjærens produksjon av karbondioksid ikke slipper ut fra tanken før trykket er over 0,5 - 0,8 bar (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Det er mye som kan gjøres for å få et optimalt produksjonsforløp i et bryggeri. En ønsker å bruke minst mulig tid før produktet er salgsklart. Dette kan gjøres ved å ha et raskt gjæringsforløp etterfulgt av en rask modning. Ved fermentering under trykk, kan fermenteringstemperaturene økes, da trykket vil redusere dannelsen av fuselalkoholer. Forhøyede fermenteringstemperaturer vil gi et raskere fermenteringsforløp. Dette raske gjæringsforløpet må likevel gi gode sensoriske kvaliteter for å få et produkt med høy kvalitet (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

I denne oppgaven ble vørter tatt ut fra produksjonen, og fermentert i småskala på ulike temperaturer og tilsatt en høyere gjærtilsetning i forhold til normal produksjonspraksis for Dahls Pils. Det skulle utføres tre temperaturalternativer, og forsøkene ble utført tre ganger for å få nok paralleller til å se om resultatene stemte overens med hverandre.

Prøver ble daglig tatt ut fra forsøksbryggene, slik at man kunne måle dannelsesforløpet av ulike aromakomponenter fra de ulike fermenteringstemperaturene. Forsøksbryggene skulle også sammenlignes sensorisk mot referanser, som var Dahls Pils produsert av samme vørter som forsøksbryggene. Referansene ble produsert etter normal produksjonspraksis ved RECD.

I hvert forsøk ble ulike gjærgenerasjoner brukt. Ved å bruke ulike gjærgenerasjoner kunne man se om gjenbrukt gjær blir svekket eller produserer mer/mindre aromakomponenter. Gjenbrukt gjær ble tatt fra produksjonen, og ikke fra de foregående forsøksbryggene. Gjæren som ble brukt var DF2, DF3 og DF4. D står for Dahls gjær, og F er bokstav nr 6 i alfabetet, som betyr at dette er sjette tilsending av gjær fra Cara, tidligere Alfred Jørgensen Laboratory. Tallet 2 betyr at det er oppropagert 2 ganger (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

Innhold av organiske syrer ble ikke analysert, grunnet kapasitetsproblemer. Analyse av organiske syrer er tidkrevende, og dette var tid som ikke var til rådighet. Analyse av organiske syrer ville gitt mer informasjon om Dahls pilsens innhold av aromakomponenter.

2 Teori

2.1 Ølhistorie

Øl er en gammel drikk, og har antagelig blitt drukket siden mennesket begynte å kultivere korn, for ca 12.000 år siden. Øl er for første gang dokumentert og nevnt i greske kileskrifter som stammer fra 2800 f. Kr, som beskriver distribusjon om daglige rasjoner av øl og brød til arbeidsfolket. Det ble tidlig oppdaget at øl var fri for patogene og farlige mikroorganismer, og at urent vann ble drikkbart, som følge av fermenteringsprosessen. I mange århundre var det ikke vann, men øl, som var den daglige tørsteslukkeren, som følge av den nedsatte smitterisikoen. Dette skapte en ølkultur, som fortsatt eksisterer i dag (Kunze 2010).

2.2 Ølproduksjon

Produksjonen av øl består av biokjemiske prosesser, der malt, vann, humle og gjær inngår som hovedingredienser. Ved spiring av korn frigjøres enzymer som bryter ned stivelsen i kornet til sukker. Gjæren fermenterer sukkeret og danner alkohol og karbondioksid (Briggs et al. 2004). Videre følger en kort beskrivelse av de ulike prosesstrinnene for produksjon av øl.

2.2.1 Malt

Malt er laget av forskjellige kornslag, slik som bygg, hvete, rug, havre og hirse. Bygg er mest brukt, da bygg er rik på stivelse og har en høy enzymaktivitet. Etter at kornet har blitt høstet blir det maltet. Ved maltingsprosessen blir korn germinert under kontrollerte forhold. Først blir kornene fuktet. Dette starter spiringsprosessen, der en rekke enzymer i kornet blir aktivert. Amylaser (α -amylase og β -amylase) spalter stivelse til forgjærbart sukker (mono-, di- og tri – sakkarider), mens xylanaser og β -glukanaser degraderer polysakkarider i celleveggen. Spireprosessen aktiverer også proteinaser, som bryter ned proteinmatriksen i endospermen, slik at stivelsen blir tilgjengelig for amylasen (Briggs et al. 2004).

For å hindre at spireprosessen går for langt, blir grønnmalten tørket. Det kalles grønnmalt pga. at den er umoden, og ikke grønn av farge. Tørkeprosessen avgjør hvilken type malt man får. Lys malt blir tørket på lave temperaturer. Dette fører til at enzymene holdes intakte, slik at lys malt har relativt høy enzymaktivitet. Lys malt brukes i så å si alle typer øl, nettopp pga enzyminnholdet (Kunze 2010).

Ved mørkere typer malt blir grønnmalten tørket på høyere temperaturer. Dette gir noe mindre enzymaktivitet enn ved lys malt grunnet denaturering av enzymene. Mørkere malt bidrar med

mer farge og aroma i ølet, grunnet aromakomponenter fra Maillardreaksjoner, som har oppstått som følge av tørking på høy temperatur. Lys malt tørkes på temperaturer opp til 80 °C, mens mørkere typer malt tørkes på over 90 °C (Kunze 2010). Ved industriell ølproduksjon anskaffes malten fra store maltingsanlegg. På RECD anskaffes malt fra Danish Malting Group A/S (Roger Løe, personlig meddelelse 2013). Maltleverandøren sender ut nyhetsbrev, med opplysninger om maltens kvalitet og produktspesifikasjoner. Dette er spesifikasjoner som proteininnhold, stivelsesinnhold, farge (EBC) og enzyminnhold (DMG 2013). Dette hjelper bryggeren med å bestemme om det må gjøres endringer i forhold til malten, for å få en jevn kvalitet på ølet. Hvis for eksempel fargen er for svak kan noe fargemalt tilsettes i maltblandingen, for å få en sterkere farge på ølet (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.2.2 Mesking

Hensikten med mesking er å få omdannet, tilgjengeliggjort og løst opp komponenter i malten som gjæren trenger for vekst. Dette er komponenter som forgjærbart sukker, aminosyrer, fettsyrer, vitaminer og mineraler. Ved mesking må malten åpnes slik at mye av overflaten på kornet kommer i kontakt med vann. Dette gjøres ved å knuse kornet (Kunze 2010).

Før knusing blir kornet fuktet. Skallet rundt kornet bør etter knusingen være så inntakt som mulig, da dette er nødvendig for en enklere filtrering av vørteren etter endt mesking (Briggs et al. 2004).

Etter at kornet er knust blir det blandet med vann. Sukker fra malten vil løse seg opp i vannet, og enzymene vil starte spalting av stivelse til forgjærbart sukker. α -amylase har en optimaltemperatur på 70 – 73 °C, og optimaltemperatur for β -amylase er 62 – 65 °C. Med denne kunnskapen kan ølbryggeren selv bestemme graden av stivlesspalting (Kunze 2010). Mesking foregår normalt innenfor temperaturområdet 63 - 67 °C i 1-3 timer (Briggs et al. 2004). Høyere temperaturer i meskekaret vil gi mer restsødme i ølet, i form av dekstriner. Dekstriner er store suktermolekyler som gjær ikke kan benytte som næring, og som for oss oppfattes som sødme (Kunze 2010).

Ved endt mesking blir skall og andre store uopløste komponenter filtrert vekk fra vørteren (Briggs et al. 2004). Komponentene som blir filtrert bort går til dyrefôr (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.2.3 Vørterkoking

Den rene vørteren blir så kokt i en vørterkjele. Koketiden varierer, men normalt for pils er koketiden rundt en time. Ved koking tilsettes humle. Kokingen er et meget viktig prosessstrinn ved produksjon av øl (Briggs et al. 2004).

2.2.3.1 Ekstrahering av humlekomponenter

I humle finnes en rekke komponenter der de viktigste er humleresin, humleolje og polyfenoler. Humleresin bidrar med bitter smak i ølet. Resinet inneholder α -syrer, som er uløselig i kald vørter. Ved koking blir α -syrene isomerisert til iso- α -syrer. Med dette menes at strukturen på molekylene endres. De isomeriserte komponentene er mer løselige enn α -syrer, og løses opp og blir en del av vørteren. Humleoljen gir aroma til ølet. Oljene er flyktige, og mer fordampes desto lengre de blir kokt (Lea og Piggott 2003). For å få aroma fra oljen gjenværende i ølet, kan humle tilsettes på slutten av kokingen. Dette gir mer aromastoffer i vørteren enn det ville ha blitt ved tidlig tilsetning av humle (Kunze 2010).

Forskjellig humle har forskjellig konsentrasjon av bitterstoffer og aroma. Humlepellets blir ofte brukt, men humleblomst kan også brukes. Pellets er konsentrert form av humle, og man slipper mange urenheter med bruk av pellets i stedet for humleblomst (Lea og Piggott 2003).

2.2.3.2 Utfelling av protein

Koking av vørteren fører til at protein utfelles. Proteiner, polyfenoler fra humlen og nitrogenholdige komponenter blir uløselige ved oppvarming, noe som fører til en koagulering. De koaguleres til store flak, som felles ut. En lang kokeprosess vil gi mer proteinutfelling enn en kort kokeprosess. Dette er gunstig, da gjenværende proteiner kan føre til uklart øl ved endt produksjon (Kunze 2010).

2.2.3.3 Fordamping og sterilisering

Koking av vørter fører til fordamping av vann. Dette er gunstig, da man ut i fra varigheten på kokingen kan regulere hvor mye ekstrakt (forgjærbart sukker) vørteren skal inneholde, slik at alkoholprosenten på ølet kan bestemmes ut i fra dette. Ved High Gravity Brewing kokes vørteren til ekstraktet er 14–16 °Plato (Kunze 2010). Dette gir en høy alkoholprosent i ølet, som senere blir nedbrygget (Lea og Piggott 2003). Nedbrygging blir nærmere forklart i kapittel 2.2.7.

Kokingen desinfiserer vørteren pga. høy temperatur. Hvis mugg og andre mikroorganismer ikke blir inaktivert, kan de fort reprodusere seg i vørteren, og skape uønskede smaks og

aromakomponenter i det ferdige ølet. Den høye temperaturen denaturerer også gjenværende enzymer (Briggs et al. 2004).

2.2.3.4 Senking av pH

pH i vørteren går noe ned ved koking, grunnet Maillardreaksjoner som danner melanoider. Humle bidrar også med senking av pH. Før koking har vørteren en pH på 5.5 – 5.6, og etter koking 5.4 – 5.5. Senking av pH er gunstig, da dette gir en renere bittersmak fra humlen. Dette medfører også økt stress for mikroorganismer, da de er mindre motstandsdyktige ved lavere pH (Kunze 2010).

2.2.3.5 Fordamping av uønskede aromakomponenter

Før koking, inneholder vørteren en rekke flyktige komponenter som har en negativ effekt på smak. Det er nødvendig å fjerne disse uønskede komponentene. Dette er stoffer som dimetylsulfid (DMS), hexanal, hexanol, pentanol, en rekke aldehyder og furfuraler (Kunze 2010). DMS er den viktigste komponenten som må fjernes, da den kan gi en usmak som kan sammenlignes med kokt mais (Baxter og Hughes 2001). Ved koking blir dette molekylet splittet og usmaken forsvinner (Kunze 2010).

2.2.4 Videre behandling av vørter

Etter koking må vørteren renses for malt og humlerester. Industrielt gjøres dette med en *Whirlpool*. Prinsippet med denne er enkel. Den bruker sentrifugalkraften for å få skilt vørter og ususpendert stoff. Etter rensing må vørteren nedkjøles til temperaturer gunstige for gjær. Når vørteren er kjølt ned, tilsettes gjæren. Vørteren blir iblandet steril luft slik at gjæren får nok O₂ og en god, aerob respirasjon (Kunze 2010).

På RECD kjøles vørteren ned til 10,2 °C før steril luft og gjær tilsettes (Roger Løe, personlig meddelelse 2013). Gjæren skaper varme (Briggs et al. 2004), og kjøling blir satt på automatisk når temperaturen i gjæringstanken overstiger 16 °C (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.2.4.1 Tanker

Frem til 1981, ble det brukt horisontale tanker på RECD (Roger Løe, personlig meddelelse 2013). Ved endt fermentering i horisontale tanker, må ølet fjernes for å få innhøstet gjæren. Dette kan by på en rekke problemer (Oliver 2011).

For å innhøste gjær må ølet pumpes til en annen tank. Dette kan forårsake mikrobielle problemer, og man øker risikoen for oksygenopptak i ølet (The Scandinavian School of

Brewing 2010a). Horisontale tanker krever manuelt arbeid, og kan være farlig å jobbe med. Ved innhøsting av gjær, kan operatøren bli utsatt for karbondioksid, noe som kan føre til respirasjonsproblemer (Oliver 2011).

En horisontal tank er mye lavere enn en vertikal. Dette kan føre til at gjær sedimenterer for raskt, som kan føre til at man ikke får tilstrekkelig reduksjon av diacetyl (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Vertikale tanker dominerer i moderne bryggerier, da disse tankene har mange fordeler i forhold til en horisontal tank. De vertikale tankene på RECD er av typen CCT. Ved bruk av vertikal tank, kan gjær fjernes uten at ølet må pumpes til en annen tank, gjæren kan tappes ut fra den kone bunnen av tanken. Dette gir mindre risiko for oksygenopptak (Oliver 2011).

Bruk av vertikal tank gir større fleksibilitet med tanke på innhøsting av gjær. Man kan høste inn gjæren etappevis, slik at hyppig fjerning av sedimentert gjær forhindrer autolyse. Dette medfører at modning av øl kan ta sted i samme tank som fermenteringen. En vertikal tank er også mindre arbeidskrevende, og operatøren trenger ikke å gå inn i tanken for å innhente gjær (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

2.2.4.2 Trykkfermentering

Fermentering under trykk brukes i dag hos de fleste store aktørene innen bryggeribransjen. Dette blir gjort da det er tidsbesparende, og gir positive produksjonsaspekter (Oliver 2011). Fermentering under trykk vil redusere dannelsen av fuselalkoholer og estere som produseres av gjæren. Dette gjør at man kan utføre fermenteringen på en høyere temperatur, noe som igjen fører til en raskere produksjonsprosess (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Trykket genereres av gasser, hovedsakelig karbondioksid, som produseres av gjæren. I toppen av tanken sitter en mottrykksventil, som hindrer at gassen driver ut av tanken. På RECD holdes ventilen tilbake med lodd, og kan stå i mot trykk opp til 0,5 – 0,8 bar. Dette gir et mindre svinn av karbondioksid, da gassen holdes tilbake og løses bedre ut i ølet. Det er mengden karbondioksid som er årsak til reduksjon i produksjon av fuselalkoholer og ester. Karbondioksid demper syntetiseringen av acetyl-CoA i glykolysen hos gjærcellen (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Acetyl-CoA er nødvendig for å danne ester, dette blir nærmere forklart i kapittel 2.5.1.

Vekten av selve ølet vil også skape et ekstra trykk, og trykket er størst i bunnen av tanken. Stående tanker gir mer trykk som følge av væskens masse, i forhold til liggende tanker (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Det er fordelsaktig å ta i bruk High Gravity Brewing ved trykkfermentering. Et høyere innhold ekstrakt gir økt esterproduksjon, da gjæren har mer forgjærbart materiale. Ekstraktinnholdet må likevel ikke være for høyt. Dette kan medføre at gjæren produserer så mye etanol at den inaktiveres før ølet er ferdig fermentert (The Scandinavian School of Brewing 2010a). En høy konsentrasjon av ekstrakt kan gi negative konsekvenser for gjæren. Gjæren blir stresset hvis etanolinnhold er høyt, som gir et høyt osmotisk trykk på gjæren ved fermenteringen. Denne stressfaktoren kan redusere kvaliteten på gjæren, slik at innhøstet gjær kan, ved neste fermentering, gi et annet smaksbilde på ølet (Brown og Hammond 2003).

Fermentering under trykk kan også gi negative konsekvenser for ølet. Trykket fører til at gjær sedimenterer raskere enn ved fermentering uten trykk. Dette gir igjen økt sjanse for autolyse, og usmaker som følge av autolysering av gjær. Trykk kan også øke mengden døde gjærceller da trykket svekker cellemembranen hos gjæren. Dette medfører at oppropagering av gjær må forekomme oftere i forhold til å fermentere uten trykk (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

2.2.5 Modning og kuldestabilisering

Ved endt fermentering har vørteren blitt til øl. Sukkeret er fermentert til etanol og karbondioksid. Ved fermenteringen går pH verdien ned. Dette fører til at polyfenoler og bitterstoffer fra humle kommer nærmere sitt isoelektriske punkt, noe som fører til utfelling. Rundt 33 % av iso- α -syrene utfelles (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Ved endt fermenteringen har ølet en høy konsentrasjon diacetyl og 2,3-pentandion, som er uønskede smakskomponenter (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Ved modningen reduserer gjær disse stoffene (Kunze 2010). Dette blir nærmere forklart i kapittel 2.3.8.

Når uønskede smakskomponenter har blitt redusert blir temperaturen senket. Dette medfører at gjæren synker til bunnen av tanken, slik at den kan høstes og brukes på nytt. Ved lave temperaturer unngår man også autolysering av gjær. Ved autolyse kan gjæren frigjøre aminosyrer, enzymer og fettsyrer. Dette kan føre til nye usmaker i ølet (The Scandinavian School of Brewing 2010a). På RECD blir temperaturen senket til $-1,6$ °C, noe som er en vanlig temperatur ved kuldestabilisering (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.2.6 Filtrering

Etter endt modning og kuldestabilisering inneholder ølet fortsatt gjær og partikler. Ølet blir pumpet gjennom et filter. Ofte brukes porøse medier, da disse lager en labyrintlignende struktur, som ølet diffunderer gjennom, mens større partikler blir gjenværende i mediet. Derfor er det gunstig at ølet inneholder lite partikler før filtrering, slik at ikke filteret går tett. Gjentetting av filter fører til at filterprosessen må stoppes, for å rense filteret (Bamforth 2009). Et eksempel på et porøst filtermedium er kiselgur, som er avleiringer fra alger (Kunze 2010).

Filtreringen skjer vanligvis ved temperaturer under $-1,5\text{ °C}$, slik at ikke utfelt protein løses opp i ølet. Løst protein kan senere føre til et uklart øl, også kjent som kjøletåke (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.2.7 Nedbrygging

Nedbryggingen finner sted etter filtreringen. Nedbrygging vil si at ølet blir fortynnet med karbonisert vann. Dette gjør at man selv kan bestemme hvilken alkoholprosent man ønsker på ølet. High Gravity Brewing er plass- og energibesparende, da man brygger og koker mindre volumer vørter. Ved å tilsette karbonisert vann, vil man gi mer kullsyre til ølet. Dette vannet må være rent, og fritt for oksygen (Briggs et al. 2004).

2.2.8 Pasteurisering

Med pasteurisering menes å drepe mikroorganismer i en vandig løsning med varme. Ølet blir pasteurisert ved hjelp av en platevarmeveksler, eller etter at produktet er tappet på flaske eller boks. Ved pasteurisering i en platevarmeveksler blir ølet varmet opp til $68 - 72\text{ °C}$, og holdt ved denne temperaturen rundt 50 sekunder, for så å bli nedkjølt. Ved pasteurisering av boks eller flaske, blir produktet varmet opp til $60 - 62\text{ °C}$ i 10 – 20 minutter (Kunze 2010).

2.3 Gjær

2.3.1 Gjærhistorie

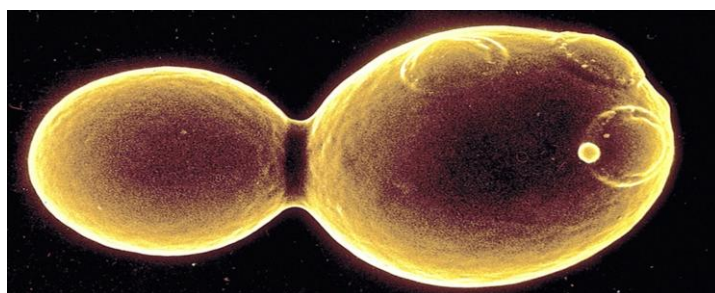
Øl har blitt brygget i tusenvis av år (Kunze 2010). I 1516 kom den tyske renhetsloven. I loven sto det at bygg, vann og humle var de eneste godkjente ingrediensene som kunne brukes for å produsere øl. 300 år senere fant man ut at også gjær deltok som en viktig ingrediens, da det er gjæren som utfører forvandlingen fra vørter til øl. Etter denne oppdagelsen ble gjær inkludert som en godkjent ingrediens for brygging av øl (Schiller og Busch 1993).

I dag kan spesialtilpassede gjærstammer anskaffes fra en rekke gjærleverandører. Dette er bedrifter slik som Christian Hansen, Wyeast og Whitelabs (Roger Løe, personlig meddelelse 2013), og rundt om i verden brukes 700–800 ulike stammer i bryggerier, som alle har ulike egenskaper (Rønning 2011).

2.3.2 Gjærsopp

Gjærsopp er en encellet kjemoorganotrof mikroorganisme som hører til klassen *Hemiascomycetes*, hvor *Saccharomyces* er den viktigste slekten (Gulden et al. 2009). Det å være kjemoorganotrof betyr at man trenger organiske komponenter som energikilde. Gjærens hovedkilde for energi er heksoser, som er sukker bestående av seks karbonatomer. Dette er sukker som glukose og fruktose (Madigan et al. 2003). Gjæren kan leve med og uten oksygen til stedet (Lodolo et al. 1999).

Ved reproduksjon deler gjæren seg og skaper en ny gjærcelle. Dette skjer hovedsakelig ved aerobe tilstander. I deleprosessen blir en ny celle formet som en liten utvekst på en modercelle. Denne utveksten blir gradvis større, og separeres fra modercellen når alt arvematerialet har blitt overført, se figur 2.1. Modercellen vil få et arr på plasseringen der separasjonen fant sted. Dette arret gjør at cellen ikke kan produsere en ny celle fra separasjonsstedet. Det vil være begrensninger på hvor mange ganger en celle kan dele seg. Generelt kan hver gjærcelle reprodusere seg ca 20–30 ganger, og ikke flere, da den vil være dekket av arr. Det vil bestandig være de nyest produserte gjærcellene som har det høyeste reproduktive potensialet (Slaughter et al. 2009). Ved brygging blir gjær sjelden høstet og brukt mer enn 3 generasjoner, grunnet et høyt antall døde gjærceller i innhøstet gjærmasse (The Scandinavian School of Brewing 2010a).



Figur 2.1. Bildet viser celledeling av *Saccharomyces cerevisiae*. Arr på modercellen fra tidligere celledelinger er godt synlig (Madigan et al. 2003).

2.3.3 Overgjær og undergjær

Overgjæring er den eldste metoden brukt for ølbrygging. Dette var den eneste metoden som ble brukt for å produsere øl, fram til 1800 tallet. *Saccharomyces cerevisiae* er gjæren som primært blir brukt til overgjæring. Ved fermentering stiger gjæren til overflaten (Eßlinger 2009). Dette skjer, da overgjær danner kjeder med hverandre. Karbondioksid fester seg under gjærkjedene, og transporteres til toppen i tanken. Overgjæren vil likevel sedimentere i bunnen ved endt fermentering, selv om det tar lengre tid i forhold til undergjær (Kunze 2010).

Overgjær tåler høyere fermenteringstemperaturer enn undergjær. Dette medfører at fermentering med overgjær, sammenlignet med undergjær, vil gå fortere (Eßlinger 2009). Økt gjærdosering vil også gi en raskere fermenteringsprosess. Fermenteringstemperaturer med overgjær er normalt mellom 14 °C og 25 °C. Overgjær brukes som oftest til produksjon av ale, men kan også brukes til andre typer øl (Kunze 2010).

Undergjæring er en prosess hvor man bruker gjær som kan utføre en fermentering ved lave temperaturer. Ved undergjæring blir gjærstammen *Saccharomyces carlsbergensis* (også kjent som *Saccharomyces pastorianus*) benyttet. Gjæren ble isolert og kultivert i 1883 av Dr. Emil Christian Hansen ved Carlsberg Bryggeri i København (Oliver 2011).

Lave fermenteringstemperaturer gir lengre fermenteringsforløp, da gjæren bruker lengre tid på å konsumere tilgjengelig sukker. Ved undergjæring vil det kun være topplaget av den sedimenterte gjæren som utfører fermenteringen. Derfor kan det være gunstig å utføre fermenteringen i lave og brede tanker, slik at man får mer kontakt mellom gjær og vørter (Oliver 2011). I motsetning til overgjær, virker undergjær som enkeltceller, og fester seg ikke til de andre gjærcellene i brygget. Undergjær brukes for å lage øl av typene pilsner og bayer, og fermenteringstemperaturen er mellom 4 °C og 12 °C (Kunze 2010).

RECD benytter seg av *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* 2036, som er en kommersiell gjær, anskaffet fra Cara, tidligere Alfred Jørgensen Laboratory. Gjærmengden som blir brukt for produksjon av Dahls Pils er minimum 8 millioner celler pr ml kaldvørter (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

2.3.4 Fermentering

Fermenteringen har som formål å transformere forgjærbart sukker i vørter til etanol, karbondioksid og smakskomponenter. Smakskomponentene er biprodukter fra fermentering, og er stoffer som ester, fuselalkoholer, og aldehyder. Ved fermentering produseres også gjær,

som kan brukes til senere brygg (Oliver 2011). Man skiller mellom primærfermentering og sekundærfermentering. Med primærfermentering menes fermentering av sukker til etanol, mens sekundærfermentering er redusering av diacetyl og 2,3-pentandion (Kunze 2010).

Vørteren må inneholde oksygen ved gjærtilsetning, da gjæren benytter oksygen for å danne nye celler. For lite tilgjengelig oksygen i vørteren kan gi en treg fermentering, mens for mye oksygen kan gi for høy vekst av gjær. Dette kan være negativt sett fra et produksjonsperspektiv, da gjæren har benyttet mye av det forgjærbare sukkeret til vekst, og ikke produksjon av etanol (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Ved fermentering vil pH i vørteren reduseres. pH i vørter ligger normalt mellom 5.0 – 5.6, mens pH i øl ligger på 4.3 – 4.6. Gjær produserer karbondioksid og organiske syrer ved fermentering av sukker, og dette senker pH. Dette er organiske syrer som eddiksyre, melkesyre og ravsyre. pH reduseres også som følge av at gjæren tar opp kaliumioner og ammoniumioner. Disse ionene virker som en buffer i vørteren. Når gjæren absorberer ionene, forsvinner bufferen. Gjæren frigjør også hydrogenioner i ølet, noe som også er med å senke pH. En redusering av pH i øl er gunstig, da lav pH vil virke inhiberende på mikroorganismer (Kunze 2010).

2.3.5 Karbohydratmetabolisme

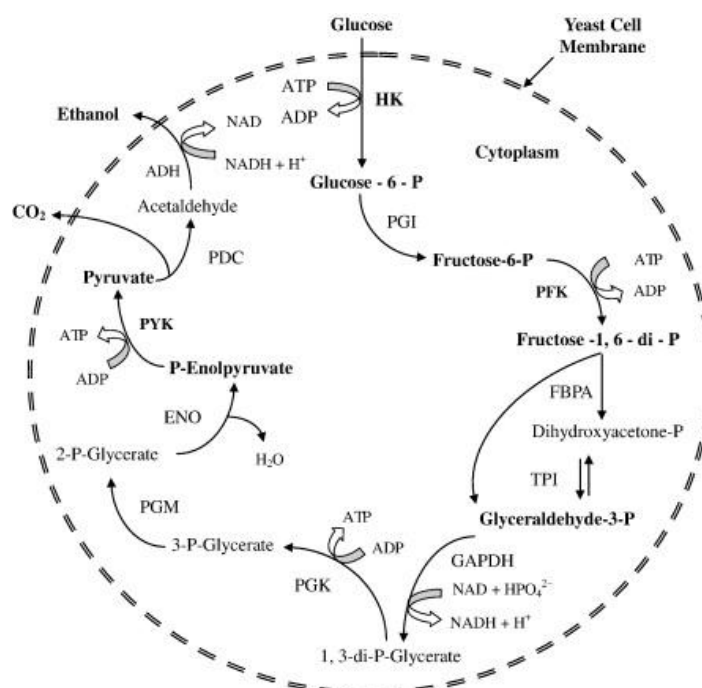
Gjæren absorberer oppløst sukker fra vørteren. Dette gjør den for å anskaffe seg energi. Forgjærbart sukker består av monosakkarider (glukose og fruktose), disakkarider (sukrose og maltose) og trisakkarider, hovedsakelig maltotriose (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Gjæren forbruker glukose og maltose først. Maltotriose blir ikke fermentert før disse sukkerartene er forbrukt, dette skjer som oftest i sekundærfermenteringen (Kunze 2010).

Sukker som gjæren ikke kan benytte seg av, kalles dekstriner, eller uforgjærbare sukker. Denne typen sukker er store suktermolekyler, som består av opp til 10 sammenkoblede glukosemolekyler. Dekstriner vil være igjen i ølet etter endt fermentering, og oppfattes som restsødme ved smak (Kunze 2010).

For å anskaffe seg energi, omdannes glukose til pyrodruesyre. Dette er en 10 trinns prosess, også kjent som glykolysen, hvor glukose blir spaltet og redusert ned til pyrodruesyre. Pyrodruesyre blir transportert til mitokondriene, og omdannes til energi (36 ATP/mol glukose), karbondioksid og vann. Dette er ved aerob respirasjon. Denne prosessen skjer i alle

celler som forbruker glukose som energi. Gjær er den eneste kjente organismen som kan gå fra glykolyse til fermentering (Kunze 2010).

Fermentering finner sted når oksygen ikke lenger er tilgjengelig. Ved anaerob tilstand vil gjæren fortsatt produsere pyrodruesyre, men ikke videre redusere pyrodruesyre til vann, da oksygen ikke kan brukes som endelig elektronakseptor. For å skaffe seg energi, må gjæren produsere etanol. Gjæren bruker etanol som endelig elektronakseptor. Fermentering gir mindre energi enn aerob respirasjon, og gjæren klarer å anskaffe seg kun 2 ATP/mol glukose (Kunze 2010). Nedbrytning av glukose til etanol er illustrert i figur 2.2. 1000 gram glukose gir 511 gram alkohol + 489 gram karbondioksid (The Scandinavian School of Brewing 2010a).



Figur 2.2. Figuren illustrerer alle mellomkomponentene fra omdanning av glukose til etanol ved fermentering utført av *Saccharomyces cerevisiae* (Bai et al. 2008).

2.3.6 Proteinmetabolisme

Ved malting og mesking brytes aminosyrer ned til mindre aminosyrer, peptider og fritt aminonitrogen (FAN). Denne nedbrytningen blir utført av proteaser, som stammer fra malten. Nitrogen er høyst nødvendig for at gjæren skal vokse. Komponentene blir absorbert av gjæren, og kun aminosyrer med lav molekylær vekt blir tatt opp. Dette er aminosyrer som glutaminsyre, asparingsyre, serin og lysin. Gjæren behøver kun NH_2 gruppen, som den bruker for å produsere proteiner. Aminosyrene blir brutt ned, og resten av aminosyren blir omdannet til andre biprodukter, slik som fuselalkoholer, som er flyktige aromastoffer (Kunze 2010). Eksempel på fuselalkoholer i øl er 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol

og 1-propanol (Suomalainen 1983). For å få en god vekst av gjær i den aerobe respirasjonen, bør nitrogeninnholdet i vørteren være mellom 200 og 230 mg/liter (Kunze 2010).

2.3.7 Fettmetabolisme

Gjæren trenger fosfolipider for å få en god og velfungerende cellemembran. Gjæren absorberer fettstoffer fra vørteren, men produserer også fettstoffer selv. For å få produsert fettstoffer, må rikelige mengder molekylært oksygen være tilgjengelig, og fra et praktisk ståsted er en oksygen konsentrasjon på 8-12 ppm nødvendig (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Gjæren syntetiserer blant annet umettet fett og steroler, da denne typen fett er hovedkomponentene til cellemembranen. Disse fettstoffene gjør membranen smidigere, slik at utføring av diffundering eller absorbering av ulike komponenter blir enklere (Kunze 2010).

2.3.8 Dannelse og forbruk av ketoner (diacetyl og 2,3-pentandion)

Innhold av diacetyl og 2,3-pentandion i øl har lenge vært forbundet med infeksjoner fra mikroorganismer slik som *Lactobacillus* og *Pediococcus*. Disse mikroorganismene kan produsere disse komponentene, men komponentene stammer som oftest fra mellomprodukter fra gjærmetabolisme. Diacetyl (også kalt 2,3-butandion) og 2,3-pentandion er ketoner, som begge har svært lave smaksterskelsverdier, henholdsvis 0,1 ppm for diacetyl, og 0,9 ppm for 2,3-pentandion. Disse gir en uønsket og ubehagelig smørlignende smak, og målet for et hvert brygg er å komme under smaksterskelsverdien for disse stoffene. Stoffene blir produsert utenfor gjærcellene, som et resultat av en spontan oksidativ dekarboksylering av α -acetolaktat og α -aceto hydroksibutyrate. α -acetolaktat og α -aceto hydroksibutyrate er mellomprodukter skapt av gjæren, fra nedbrytning av aminosyrer som isoleucin, leucin og valin. Diacetyl og 2,3-pentandion er altså ikke noe som gjæren selv produserer (Blanchette 2006).

Diacetyl og 2,3-pentandion blir senere absorbert av gjæren, hvor den enzymatisk reduserer diacetyl til acetoin, som reduseres til 2,3-butandiol. 2,3-pentandion reduseres til acetyletylcarbinol, som reduseres til 2,3-pentandiol (Blanchette 2006).

2,3-butandiol og 2,3-pentandiol har begge en høy smaksterskelsgrense, og konsentrasjon gjenværende, vil ikke påvirke smaken på ølet. Når diacetyl nivået er under 0,1 ppm, anses ølet som ferdig modnet (Kunze 2010).

En fermenteringstemperatur på 18 °C vil tredoble mengde diacetyl i ølet, i forhold til å brygge på 9 °C. Høye temperaturer vil også redusere mengden diacetyl hyppigere, da metabolismen i gjæren går raskere (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

2.3.9 Flokkulering

Gjærflokkulering er et komplekst fenomen, som skjer ved slutten av fermenteringsprosessen. Gjærceller aggregerer sammen, og danner en multicellulær masse. En multicellulær masse sedimenterer raskere enn enkelt celler (Soares 2011).

Gjæren har lectinproteiner på utsiden av celleveggen. Dette er reseptorer, som gjæren bruker for å oppfatte hva som skjer i omgivelsene. Ved flokkulering, reagerer disse proteinene med nærliggende gjærceller. Kalsiumioner er nødvendig for å aktivere proteinet på celleveggen. Disse proteinene har hydrofobe ender, som frastøter vann, og tiltrekkes andre hydrofobe ender (Soares 2011).

Gjærflokkulering er en reversibel prosess der celler aggregerer til multicellulære klumper. Flokkuleringen blir påvirket av pH, Ca^{2+} ioner, temperatur, tilgjengelig sukker og nitrogeninnhold. Nitrogen påvirker vekst, og gjærceller som vokser, mister muligheten til å flokkulere (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

En teori om hvorfor gjær har denne egenskapen, er at det kan være en langsiktig mekanisme for overlevelse, da sammenklumping vil beskytte mot et skadelig miljø. Ved slutten av en fermentering vil pH være lav, og etanolkonsentrasjonen høy, noe som er ugunstige forhold for gjær. Innhøstet gjær som blir tilsatt i en sukkerholdig vørter vil ikke lengre være flokkulert, da forholdene har blitt bedre (Soares 2011).

En ideell bryggegjær bør vokse og fermentere sukkeret i vørteren, etterfulgt av flokkulering og sedimentering ved endt fermenteringsprosess. Flokkuleringsegenskapene avhenger av hvilken gjærstamme som blir benyttet. En for tidlig flokkulering og sedimentering vil gi en mulighet for fermenteringsstopp og en dårlig reduksjon av diacetyl/2,3-pentandion. Manglende flokkulering kan gi filtreringsproblemer og et dårlig gjærutbytte (Soares 2011).

2.3.10 Propagering

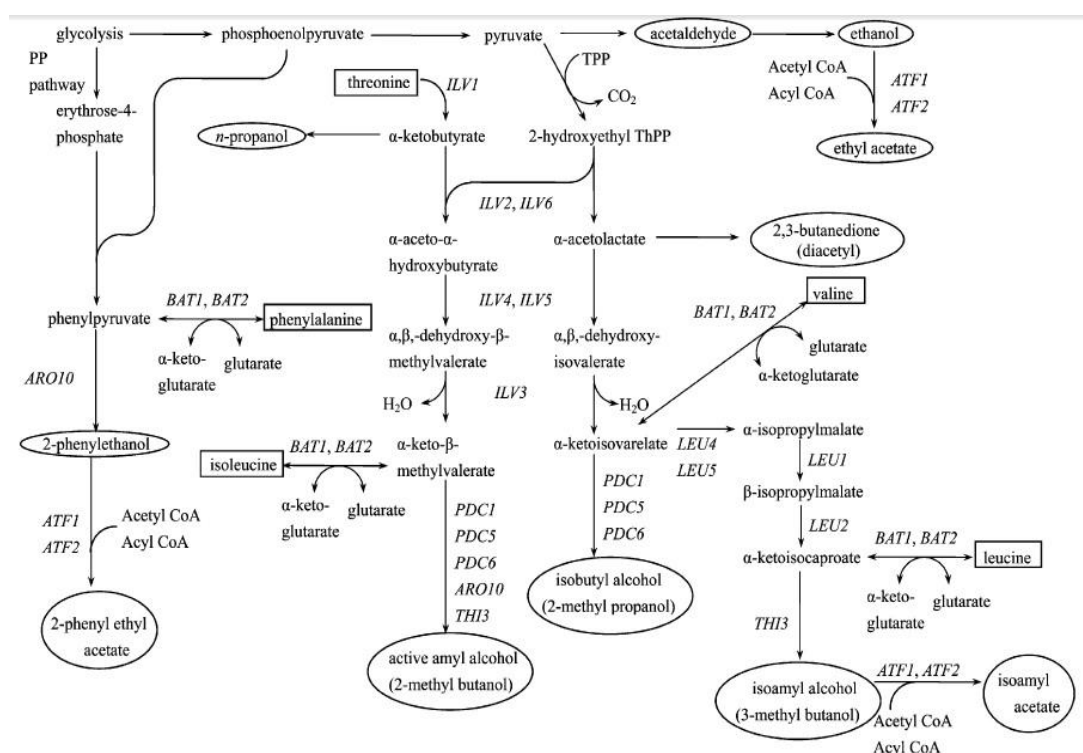
Sedimentert gjær blir høstet, for å brukes i en ny batch. Som nevnt i kapittel 2.3.9, er flokkulering en reversibel prosess. Innhøstet gjær er flokkulert, men tilsetter man denne gjæren i en ny vørter, vil cellene slippe fra hverandre og produsere nye gjærceller (Soares 2011). Dette kalles å opppropagere (Kunze 2010).

Det kan være risikabelt å direkte tilsette gjær som nettopp er blitt innhøstet. Det kan være mange døde gjærceller, og innhøstete gjærmassen kan også inneholde infeksjoner. Man bør analysere gjærmassen, for å sjekke om gjæren holder standsmessige krav. Tilsetter man en

dårlig, og lite aktiv gjær, kan dette føre til et øl med dårlig kvalitet. I verste fall må batchen forkastes (The Scandinavian School of Brewing 2010b). Varme fermenteringstemperaturer kan føre til flere døde gjærceller i innhøstet gjærmasse (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

2.4 Produksjon av flyktige komponenter

I primærfermenteringen produserer *Saccharomyces cerevisiae* en rekke flyktige aromakomponenter, ut i fra en rekke kompliserte metabolismeveier, se figur 2.3.



Figur 2.3. Metaboliske veier for dannelse av flyktige komponenter av *Saccharomyces Cerevisiae* (Kobayashi et al. 2008)

Aromakomponentene er meget viktige for den komplekse smaken i øl. Selv små endringer i konsentrasjoner av disse sekundærmetabolittene kan gi stor forskjell på den endelige, sensoriske kvaliteten på ølet (Saerens et al. 2007). Disse flyktige aromakomponentene kommer som et direkte resultat av gjærens metabolisme. Dette er stoffer som estere, aldehyder og fuselalkoholer. Fuselalkohol dannes ved hjelp av oksidativ dekarboksylering av aminosyrer (Brown og Hammond 2003). Oksidativ dekarboksylering er en biokjemisk prosess, hvor karbondioksid spaltes av en α -ketosyre (SNL u.å.) og blir til aldehyder, også kjent som karbonyl komponenter. Det viktigste aldehydet er acetaldehyd. Gjæren produserer acetaldehyd i primærfermenteringen (Kunze 2010). Senere blir aldehyder dehydrogenisert og omdannes til forskjellige alkoholer (Kobayashi et al. 2008).

Estere dannes direkte fra en reaksjon mellom alkoholer og Acetyl-CoA (Saerens et al. 2007). Acetyl-CoA er et koenzym, som hjelper til med nedbrytning av karbohydrater og fettsyrer (Hauge u.å.).

2.5 Ester

Ester er en av de viktigste aromakomponentene som finnes i øl (Kunze 2010). Ester er svært flyktige komponenter, og fordamper lett da de har lave kokepunkt (Verstrepen et al. 2003). Det er to hovedgrupper av estere. Den ene gruppen er acetatestere, hvor syregruppen er acetat, og alkoholgruppen er etanol, eller en mer kompleks alkohol, slik som fuselalkohol. Estere innenfor denne gruppen inkluderer etylacetat, isoamylacetat og fenyletylacetat (Saerens et al. 2007). Den andre gruppen er etylestere, der alkoholgruppen er etanol og syregruppen er en fettsyre. Estere innenfor denne gruppen inkluderer etylhexanoat, etyloctanoat og etyldecanoate (Saerens et al. 2007). Det er blitt identifisert over 60 forskjellige estere i øl (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Av disse to ester gruppene er det acetatester som er viktigst, da gjæren produserer en større mengde av disse enn etylestere. Dette gjør at acetatestere er enklere å måle og smake (Saerens et al. 2007).

Det er svært lite ester i øl, og estermengden utgjør ca. 0,006 % av den totale, kjemiske sammensetningen i øl (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Likevel er de uhyre viktig for smaksprofilen. De viktigste smaksgivende esterene i øl er etylacetat og isoamylacetat (Verstrepen et al. 2003). Esteren som er viktigst for Dahls Pils er isoamylacetat, og konsentrasjon av denne i ferdigvare bør være mellom 2-3 ppm (Roger Løe, personlig meddelelse 2013), som gir en fruktig banan aroma. Smaksterskelgrensen for isoamylacetat er 0.6-1.2 ppm (Verstrepen et al. 2003).

Mange av esterene som blir produsert dannes i konsentrasjoner over smaksterskelgrensen, noe som har mye å si for ølsmaken. Små endringer i konsentrasjon vil dermed gi store smaksforskjeller på øl (Brown og Hammond 2003). Sammensetningen av forskjellige estere kan gi en synergistisk effekt ved lave konsentrasjoner. Med dette menes at ester kan påvirke ølsmaken, selv om konsentrasjonen er under smaksterskelgrensen (Verstrepen et al. 2003).

Esterkonsentrasjonen i det ferdige ølet avhenger først og fremst av hvilken gjærstamme som blir benyttet, selv om estermengde kan reguleres med miljøvariabler. Dette er miljøvariabler

som konsentrasjon av ekstrakt (mengde forgjærbart sukker), innhold av nitrogen, fermenteringstemperatur, tilgjengelig oksygen, og mengde umettete fettsyrer i vørteren. Disse variablene påvirker i høy grad produksjon av acetatestere (Saerens et al. 2007).

2.5.1 Dannelse estere

Aromatiske estere blir produsert intracellulært av gjærceller. Esterne er fettløselige og diffunderer ut fra gjærens cellemembran, og inn i mediet (Saerens et al. 2007).

I motsetning til acetatestere, bruker etylester lengre tid på å diffundere ut. Tiden det tar avhenger hvor lang fettsyrekjeden på esteren er. Lange fettsyrer vil bruke lengre tid på å diffundere ut gjennom membranen. Er fettsyrene for lange, kan dette resultere i at etylesteren blir gjenværende i cellen. Det går fort for acetatestere å diffundere gjennom membranen, da de ikke inngår med fettsyrer. Distribusjon av ester ut av cellen avhenger veldig på hvilken gjærstamme som tas i bruk (Saerens et al. 2007).

I hovedsak er det to faktorer som er viktig for esterproduksjon. Det er konsentrasjonen av to substrater; Acetyl-CoA og fuselalkoholer. Total aktivitet på enzymer involvert i estersyntetiseringen er også viktig. Alle parametere som affekterer substratkonsentrasjonen vil influere esterproduksjon (Fujii et al. 1996).

Som nevnt tidligere, er estere syntetisert fra fuselalkohol og acetyl-CoA. Denne reaksjonen blir katalysert av esterenzymmer. Et eksempel på et slikt esterenzym er alcohol-acetyl-transeferase. Dette enzymet er kjent for å være ansvarlig for produksjon av isoamylacetat og etylacetat (Fujii et al. 1996). Hyppigheten av esterproduksjon bestemmes ut i fra konsentrasjonen av tilgjengelig næring og substrater, og total enzymatisk aktivitet i gjærcellen. Gjærens metabolisme avhenger av mengde nitrogen, karbon og fettsyresammensetning i vørteren, mens enzymatisk aktivitet bestemmes ut i fra genene i gjærcellen (Fujii et al. 1996).

2.5.2 Miljøvariabler som affekterer dannelse av ester

Rett mengde umettete fettsyrer og steroler produsert av gjæren er viktig for å få en sterk cellemembran ved aerob respirasjon. En sterk cellemembran er viktig når alkoholemengden i mediet øker slik at gjæren kan motstå den økte etanolforgiftningen. En god fettsyreproduksjon er viktig for å få syntetisert etylester, da fettsyrer inngår i synteseringen av ester (Saerens et al. 2007).

Innholdet av karbon og nitrogen i vørteren spiller også en betydelig rolle for produksjon av ester. Et høyt innhold av karbon og nitrogen vil gi mer acetatester produksjon. Et høyt innhold av fruktose og glukose gir mer ester enn vørter som inneholder mye maltose. Grunnen for forskjeller i produksjon av ester ved et høyt innhold av fruktose og glukose er uklar. En teori er at metabolismen av glukose produserer høyere konsentrasjoner av acetyl-CoA, og gir en høyere esterproduksjon (Verstrepen et al. 2003).

Gjæren må ha nitrogen for å utføre nitrogenmetabolisme. Nitrogenmetabolismen setter grunnlag for dannelsen av fuselalkoholer (Saerens et al. 2007, Valera et al. 2012). Oksygen til stede ved anaerob fermentering hindrer esterdannelse, da gjæren vil bruke acetyl-CoA til produksjon av steroler og umettede fettsyrer, og ikke syntetisering av ester. Det er riktignok viktig med rikelig oksygen ved aerob respirasjon, da god gjærvekst er viktig for produksjon av ester (Valera et al. 2012).

Tilsetning av sink øker esterproduksjon, da sink stimulerer formasjon av fuselalkoholer som inngår i dannelsen av ester (Verstrepen et al. 2003).

Mer enn 15 °Plato vil gi en høyere esterdannelse, men også en høyere dannelsen av fuselalkoholer, aldehyder og glyserol. Som nevnt i kapittel 2.2.4.2, vil trykkfermentering senke produksjonen av ester (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

Hvorfor endringer av nevnte parametrene kan endre dannelsen av ester er ikke godt beskrevet i litteraturen. Det finnes mange teorier, men siden det er gjort forskning på forskjellige stammer, kan man ikke komme med et entydig svar på hvorfor endringer av disse nevnte parametrene kan styre dannelsen av ester (Verstrepen et al. 2003).

Tilpasning av disse parametrene gjør at bryggeren, ut i fra erfaring, kan styre fermenteringen i den retningen de vil at ester skal produseres (Verstrepen et al 2003). Optimal teknikk for ølbrygging som gir mye esterdannelse, vil variere fra bryggeri til bryggeri. Den kanskje enkleste måten å øke estermengde i øl er å fermentere uten trykk, i kombinasjon med høye fermenteringstemperaturer, høyt nitrogeninnhold, og en vørter med lite maltose (Verstrepen et al. 2003, Brown og Hammond 2003).

2.5.3 Valg av gjær

Som nevnt tidligere, er gjærstammen det viktigste med tanke på esterproduksjon. Gjærstammene er forskjellige og vil produsere ulike konsentrasjoner av flyktige estere og andre aromastoffer (Verstrepen et al. 2003). Det ble ikke funnet informasjon som viser til

forskning på hvor mye ester *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* 2036 produserer i forhold til andre gjærstammer.

Ved bruk av *Saccharomyces Carlsbergensis* vil en høyere del av produsert ester bli gjenværende i cellen, og diffunderes ikke ut. Bruk av *Saccharomyces cerevisiae*, vil gi en høyere esterkonsentrasjon i ølet (Verstrepen et al. 2003). Esterkonsentrasjon er likevel temperaturavhengig. Kaldere temperaturer produserer mindre ester (Saerens et al. 2007) da høye fermenteringstemperaturer gjør at kjemiske reaksjoner utført av gjær, går raskere (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

2.6 Fuselalkoholer

Fuselalkoholer stammer fra aminosyrer. Aminosyrer blir deaminert til α -keto syrer, som ved en oksidativ dekarboksylering omdannes til aldehyder (Brown og Hammond 2003). Aldehydene blir etter dette redusert til fuselalkoholer. Rundt 80 % av fuselalkoholdannelsen skjer ved primærfermentering (Kunze 2010). Økte fermenteringstemperaturer vil gi mer fuselalkoholer. Fuselalkoholer som 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol og 1-propanol er aromatiske fuselalkoholer og bidrar med karakteristisk smak til øl (Eßlinger 2009).

Total konsentrasjoner av fuselalkoholer bør ikke overgå 100 ppm, da dette vil gi ølet en noe ubehagelig smak. Det er ikke mulig å redusere innholdet av fuselalkoholer etter fermentering, slik at dannelse av fuselalkoholer må justeres ved faktisk fermentering. Man kan redusere produksjonen av fuselalkoholer med en høyere gjærtilsetning og fermentering under trykk (Kunze 2010). Hvilke, og hvor stor konsentrasjon av fuselalkoholer som blir dannet, avhenger også av hvilken gjærstamme som blir benyttet (Verstrepen et al. 2003).

2.7 Smaksterskelsgrense for komponenter i øl

Det finnes en rekke smakskomponenter i øl, og hver av disse har en særegen smak. Viktige aromakomponenter for pilsner, og som man har analysert i denne oppgaven, er listet opp i tabell 2.1.

Tabell 2.1. Tabellen viser hvilken smak de ulike komponentene gir i ølet, samt en smaksterskelsgrense for hvor høy konsentrasjonen av de ulike komponentene må være for å detekteres ved smak (Kunze 2010, Kobayashi et al. 2008, Verstrepen et al. 2003, Suomalainen 1983).

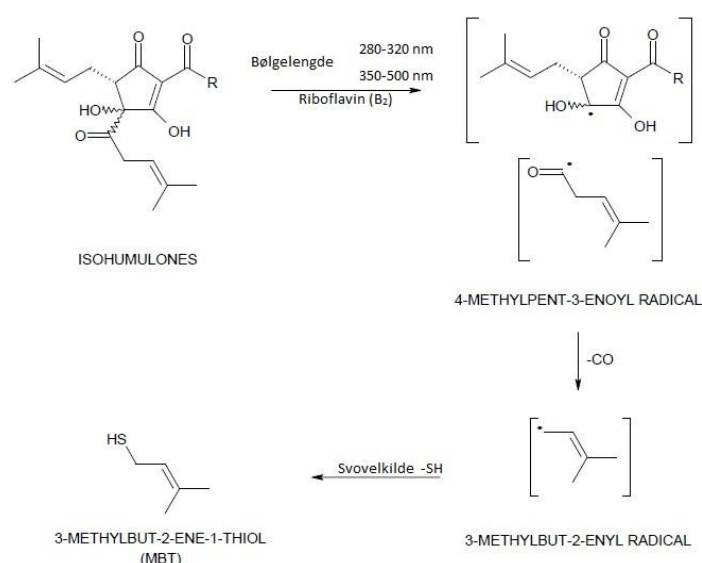
	Smak	Smaksterskelsgrense (ppm)
Fuselalkoholer		
1-propanol	Alkohol	800
2-metyl-1-propanol	Alkohol	200
2-metyl-1-butanol	Alkohol, banan, medisinsmak	65
3-metyl-1-butanol	Alkohol, banan, aromatisk	70
Ester		
Isoamylacetat	Banan, pære	0.6-1.2
Etylacetat	Banan, eple, løsemiddel	30
Isobutylacetat	Ananas	1.6
Karbyl forbindelser		
Acetaldehyd	Grønne blader, fruktig, umoden	25
Diacetyl	Smør	0,1
2,3-pentandion	Smør	0,9

2.8 Effekt av sollys

Sollys kan skape uønskede smakskomponenter i øl. Øl som har stått i sollys over en lengre periode kan få en ubehagelig lukt og smak. På folkemunnet blir denne lukten/smaken omtalt som *skunk*, som betyr stinkdyr på engelsk (Oliver 2011). Dette er et godt ord på denne ubehagelige aromakomponenten, da molekylene som dannes i ølet, kjemisk ligner på komponentene som et stinkdyr bruker som forsvarsmekanisme (Wood 1999).

Isomeriserte humlekomponenter er sensitive ovenfor lys, og ved lyseksponering kan en fotooksidering oppstå, og danne stoffet MTB (3-metyl-2butene-1-thiol). MTB er et av de sterkeste smaksstoffene som er kjent, og stoffet kan detekteres av mennesker ved svært lave konsentrasjoner (Oliver 2011).

Ved dannelse av MBT, blir isopentenylkjeden fra iso- α -syrene splittet av. Dette grunnet en fotodekomponering av iso- α -syrene. Fotodekomponeringen forekommer hyppigere med mye riboflavin (vitamin B₂) til stede. Det er den blå delen av det synlige lysspektrumet som har størst effekt på avspaltningen av isopentenyl. Denne delen av lysspektrumet har en bølgelengde på 350–500 nm. Avspaltningen forekommer også ved vanlig UV stråling, som har en bølgelengde på 280–320 nm (Gros og Collin 2012). Når isopentenylkjedene i iso- α -syrene blir splittet av, blir de et radikal. Reagerer radikalet med en svovelholdig komponent, vil MBT bli dannet. Svovelkomponenten er som oftest svovelholdige aminosyrer, som er i ølet (Heyerick 2001). Reaksjonsforløpet er vist i figur 2.4.



Figur 2.4. Dannelse av 3-methyl-2butene-1-thiol fra iso- α -syrene, som følge av eksponering av lys (Heyerick 2001).

I sterkt sollys kan reaksjonen skje umiddelbart, og det vil være mulig for et sensorisk panel å oppdage endringer etter bare 10 sekunder med lyseksponering (Oliver 2011). Oksiderende stoffer slik som hydrogenperoksid og oksygen kan dempe dannelsen av MBT (Heyerick 2001), men disse har igjen negative effekter på ølet (King 2007), slik at disse stoffene bør unngås. Man bør heller iverksette andre tiltak for å hindre fotodekomponeringen med brune flasker, eller flasker med UV filter (Kunze 2010).

Man kan beskytte mot dannelse av MBT, ved å modifisere α -syrene i humle. Man kan fjerne eller endre isopentenylkjeden i α -syrene. α -syrene kan isomeriseres i alkaniske løsninger, og senere bli redusert til å produsere bitterstoffer som ikke degraderes til MBT. Selv om dette blir gjort, kan lys påføre ølet andre usmak, selv om MBT ikke blir dannet. Lys kan skape 2-sulphanyl-3-methylbutanol, som har en aroma som minner om løk. Dette stoffet syntetiseres av stoffet 3-methyl-2-buten-1-ol, som finnes i isomerisert humleekstrakt (Gros og Collin 2012).

Derfor er det meget viktig med lysbeskyttelse fra produksjon, og helt fram til konsum (Kunze 2010).

2.9 Effekter av oksygen på ferdig øl

Oksygen har negative effekter på aroma og smak i ferdig øl. Øl som har blitt utsatt for oksygen over lengre tid, blir ofte beskrevet som flatt, dødt og oksidert. Oksygen i øl bidrar med at ølet raskere utvikler usmaker, og blir uklart (Oliver 2011). Dette kan oppstå ved oppvarming med oksygen tilstedet. En lukt av katterurin og solbærblader kan oppstå. Dette stammer fra molekylet p-Menthane-8-thiol-3-one, og stammer fra bruningsreaksjoner (King 2007).

Hvis oksygen oppløses i et surt medium som inneholder mye vann, kan dette oksygenet bli ionisert. Dette har lett for å skje i øl, da øl er et surt medium som inneholder mye vann. Vann reagerer med oksygenet og skaper hydrogenperoksid (H_2O_2). Denne reaksjonen har lettere for å oppstå ved lave temperaturer. Hvis dette ølet varmes opp før åpning, for eksempel i en flaske, vil H_2O_2 nedbrytes, og oksygenet blir frigjort. Dette frigjorte oksygenet kan så oksidere andre tilstedeværende komponenter og skape uønskede bruningsreaksjoner i ølet (King 2007).

H_2O_2 kan også være et problem for skumstabiliteten. Ved servering, f.eks. åpning av en flaske, vil man få et trykktap. Dette trykktapet kan føre til en nedbrytning av H_2O_2 til vann og oksygen. Denne blandingen av negativt ladet oksygen og gjenværende H_2O_2 vil stige inn i skummet. Her vil det skje en reaksjon som bryter ned filmen som skaper skum, noe som resulterer i at skummet raskt kollapser (King 2007).

Det er med andre ord viktig å unngå at ferdig øl kommer i kontakt med oksygen. Tett produksjonsutstyr uten luftinnsiving er derfor en nødvendighet skal man lage øl med stabil og god kvalitet (Kunze 2010).

3 Materialer og metoder

3.1 Forberedelser

Det ble planlagt at det skulle utføres tre temperaturalternativer med tre gjentak. De tre batchene med forsøksbrygg skulle ha fermenteringstemperaturene 9 °C, 14 °C og 18 °C, i motsetning til dagsproduksjonen, som fermenterer på 16,2 °C, i CCT tanker med trykk, noe som er standard prosedyre på RECD. Dagsproduksjonen og forsøksbryggene ble laget med samme vørter. Forsøksbryggene inneholdt også i tillegg 2,5 ganger mer gjær enn normal gjærtilsetning. Forsøksbryggene skulle sammenlignes med brygg fra vanlig produksjon ved RECD.

Forskjellen mellom batchene var gjærgenerasjonen. Gjær innhøstet fra batch 1, ble brukt i batch 2. Innhøstet gjær fra batch 2 ble brukt i batch 3. Med dette kunne man se om gjærgenerasjonen innvirker på produksjon av flyktige aromakomponenter.

I fermenteringen dannes varme (Briggs et al. 2004), slik at det ble bestemt at forsøksbryggene måtte stå i rom hvor temperaturen var 1 °C kaldere enn ønsket gjæringstemperatur. Erlenmeyerkolber ble fylt med vann, og plassert på forskjellige steder inne i RECD sine lokaler. Et termometer ble satt i hver kolbe for å måle temperaturen. Dette fikk stå over natta, slik at temperaturen jevnet seg ut, og man fant egnede steder å fermentere forsøksbryggene.

For å redusere kontaminasjonsfaren ved prøveuttakene, ble det på hvert lokk boret et hull på 28 mm i diameter. Gummiplugger med diameter på 30 mm ble anskaffet for å tette disse hullene. Ved prøveuttak slapp man da å ta av hele lokket, og bare pluggen ble tatt av ved prøveuttak.

Det ble ikke foretatt telling av gjærceller, da gjærcelletelleren ved RECD ikke var i drift i tidsrommet forsøkene utspant seg.

3.2 Utførelse

Den praktiske utførelsen av forsøket tok sted på RECD i Trondheim. Analyser av nedfrost prøvemateriale tok sted på Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, Ås. Forsøket ble gjennomført i småskala, slik at mye av arbeidet ble gjort manuelt.

3.2.1 Bryggeutstyr

Bøtter med lokk 6 stk 30 liter

Godkjent for næringsmiddelproduksjon

Gjærlås 6 stk

Gummiplugg 6 stk

PVC gummihandsker Eural 111.0300

Hevert

Prøvetaker Le Voleur *The Thief*

Gummislange

Alt av bryggeutstyr ble klorert før bruk. Ved vasking og klorering ble PVC handsker brukt. Alle delene ble lagt i gjæringsbøttene. Bøttene ble så fylt opp med 30 liter vann, og 50 ml klor. Man klorerte ikke bøttene lengre enn 30 minutter. Faren med å klorere for lenge, er at klor kan feste seg til plasten, og klorfenoler kan dannes. Disse klorfenolene kan skape en usmak som minner om medisinskap (Oliver 2011). Når alt var klorbehandlet, ble utstyret grundig skylt med kaldt vann. Vannslangen som ble brukt til dette ble karakterisert som uren, slik at man måtte være forsiktig slik at den ikke kom i direkte kontakt med utstyret. Dette ville ført til at utstyret hadde blitt rekontaminert og en ny vask ville vært nødvendig. Etter at utstyret var skyllet og fri for klor ble bøttene montert med lokk, gjærlås og gummiplugg. Dette ble gjort for å forhindre eventuell kontaminasjon og forurensing fra luften.

3.2.2 Uttak av vørter til fermentering

Uttak av vørter ble tappet direkte fra tank til bøtte. De ferdigmonterte bøttene ble plassert på en tralle, og fraktet til en tank som inneholdt vørter som nettopp var tilsatt gjær. Hver tank på RECD er utstyrt med en liten ventil, hvor ølprøver kan tas ut.

Før vørteruttaket kunne starte ble denne ventilen åpnet i 30 sekunder, slik at vørteren rant ut på gulvet. Dette ble gjort da gjær sedimenterer og legger seg inni denne ventilen. Hadde man ikke åpnet ventilen for avrenning, ville dette resultert i ulik gjærmengde i prøvebryggene.

Etter avrenningen ble ventilen spritet med 70 % sprit, for å drepe eventuelle mikroorganismer som kunne være denne ventilen. En klorert og skylt gummislange ble satt fast på ventilen. Ventilen ble igjen åpnet, og vørteren i løpet av de første 30 sekundene ble tømt i sluket. Denne gangen for å fjerne spriten som ble sprayet på. Da dette var gjort, ble den andre enden av gummislangen satt i bøttene. Ventilen ble åpnet, og bøttene fylt. Når en bøtte var fylt, ble gummipluggen øyeblikkelig satt på. Dette er vist i figur 3.1.



Figur 3.1. Illustrerer hvordan bøttene ble fylt med vørter fra produksjonen

Bøttene ble fylt med 20 liter vørter. Temperaturen på stamvørteren var ved uttak 10,2 °C. Man fylte alle 3 bøttene samtidig, for så å sette de på forskjellige steder med ulik temperatur, rett etter prøveuttaket. En svart plastsekk ble tredd over bøttene under hele forsøket, for å redusere muligheten for UV skader (Heyerick 2001).

3.2.3 Prøveuttak til analyser

Prøveuttak av forsøksbryggene ble utført daglig, foruten i helgene. For å få 24 timer mellom hvert prøveuttak, ble alle uttakene foretatt mellom klokken 10.00 – 10.15. Ved arbeid med uttak av prøver ble PVC hansker benyttet. Før prøveuttakene startet, ble omgivelsestemperaturen til det aktuelle prøvebrygget sjekket og loggført. Omgivelsestemperaturen ble sjekket vha et termometer i en erlenmeyerkolbe fylt med vann, som sto ved siden av hvert enkelt forsøksbrygg.

Prøveuttakeren sammen med et termometer ble skylt i 1 minutt i varmt vann før og mellom hvert prøveuttak. Skyllingen ble utført i en industriservant. Dette ble gjort for å fjerne rester av gjær og andre eventuelle forurensninger fra prøveuttakeren. Temperaturen på dette vannet ble målt til 71 °C, slik at denne skyllen kan sammenlignes med en noe lengre pasteurisering (Kunze 2010).

Ved prøveuttaket ble pluggen på bøtta tatt av, og prøveuttakeren senket ned i brygget. Prøveuttakeren har en løs bit av plast på enden, slik at væsken kan strømme inn. Når væsken er i røret, vil vekten på væsken presse plastbiten mot åpningen, slik at væsken ikke renner ut. For hvert prøvebrygg ble det tatt ut 500 ml, hvor 50 ml x2 gikk til nedfrysing av prøvemateriale for senere analyse av flyktige aromakomponenter. 100 ml x2 gikk til Anton Paar, og 100 ml til GC- og pH måling. Etter prøveuttaket ble termometeret senket i bøtta for å måle temperaturen på det aktuelle forsøksbrygget. Prøvene som skulle sendes til Ås for analyse ble øyeblikkelig satt i en fryser som holdt - 22 °C. De resterende prøvene ble satt i kjøleskap umiddelbart etter prøveuttaket, for å senke gjæraktiviteten. Dette kjøleskapet holdt 4 °C.

Parallelt med forsøksbryggene ble det tatt prøver av referansetanken, hvor vørteren til forsøksbryggene ble tatt ut fra. Prøver fra referansetanken ble ikke tatt daglig, og ble kun tatt ut ved ferdig fermentering, i nedkjølingsfasen og når den var ferdig kuldestabilisert. Bryggerimester Roger Løe ga beskjed når referansetanken var ferdig med de ulike stadiene. Prøveuttaket fra referansetanken ble utført ved å desinfisere ventilen på tanken med 70 % sprit, åpne ventilen i 30 sekunder for å få ut gjær og eventuelle spritrester fra desinfiseringen, for så å fylle prøveflaskene med øl. Det ble også her tatt ut to paralleller. Disse prøvene ble øyeblikkelig satt i fryseren som holdt – 22 °C.

3.2.4 Fjerning av gjær og kuldestabilisering

Målinger på forgjæringsgrad fra Anton Paar sammen med målinger fra gasskromatografi bestemte når gjæren kunne tas av forsøksbryggene, og når forsøksbryggene kunne settes til kuldestabilisering. Ved en forgjæringsgrad $67 \% \pm 4 \%$ som var uforandret to dager på rad, ble ølet overført til en ny bønne. På denne måten fjernet man bunnfelt gjær. Selv om bunnfelt gjær ble tatt av før diacetylnivåene var nådd 0,08 ppm, var det nok gjæraktivitet i forsøksbryggene til at diacetylnivået videre sank. Rengjøring og montering av bønnene ble gjort på samme måte som beskrevet i kapitlene 3.2.1–3.2.2. Forsøksbryggene ble overført til en ny bønne vha en hevert.

Forsøksbryggene ble satt til kuldestabilisering når mengden diacetyl hadde kommet under 0,08 ppm. En konsentrasjon av diacetyl under 0,08 ppm vil ikke være mulig å kjenne ved smaking (Kunze 2010). Kuldestabiliseringen ble utført ved å sette forsøksbryggene på et rom som holdt $-1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Hensikten med dette var å få sedimentert ut aktiv gjær som var i forsøksbryggene.

3.2.5 Tapping

Når temperaturen i forsøksbryggene var nede i $-1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, ble de tappet. Rene 0,33 l flasker ble hentet fra produksjonen. Man brukte en hevert for å fylle flaskene. Siden gjær hadde sedimentert i bunnen av bønna, ble kun øverste halvdel av ølet i bønna tappet på flaske. Dette utgjorde ca 12 flasker. Korker ble satt på flaskene med en manuell korkepåsetter. Etter tapping ble flaskene satt i kasser, og satt på et rom som holdt $8 \text{ }^\circ\text{C}$. En svart plastsekk ble også her tredd over for å forhindre UV skader. Flaskene sto på dette rommet fram til de skulle analyseres sensorisk.

3.2.6 Transport av prøvemateriale

Det måtte to forsendinger til for å få alle apotekerflaskene fra Trondheim til Ås. Ved transport ble det anskaffet en kjøleboks og 12 fryseelementer. Fryseelementene ble lagt i en fryser som holdt $-22 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 dager før avsending. Flaskene ble stablet lag på lag mellom fryseelementer, papp og bobleplast, som skulle forhindre at prøvene tinte eller gikk i stykker. Ved første forsending ble kjøleboksen sendt som vanlig bagasje med flyselskapet SAS, og ved andre forsending ble kjøleboksen sendt med Posten. Ved ankomst hadde noen få prøver delvis begynt å tine. Hvilke prøver dette var ble ikke notert, og temperaturen på de delvis tinte prøvene ble heller ikke målt.

3.3 Analysemetoder

Ved oppstart av forsøksbrygg, ble stamvørteren analysert for ekstraktinnhold, alkoholinnhold, forgjæringsgrad og pH. Tanken som stamvørteren ble tatt fra var referansetanken, og prøver ble tatt ut og fryst ned, da referansetanken var ferdig fermentert. Disse prøvene skulle analyseres for innhold av ester, fuselalkoholer og acetaldehyd.

Daglig, og helt frem til endt kuldestabilisering, ble fermenterende forsøksbrygg analysert for ekstraktinnhold, alkoholinnhold, forgjæringsgrad, pH og innhold av diacetyl og 2,3-pentandion.

Daglig ble også prøver fra forsøksbryggene fryst ned, som senere skulle analyseres for innhold av ester, fuselalkoholer og acetaldehyd. Etter endt fermenteringsforløp, ble referansen og forsøksbryggene tappet. Disse gjennomgikk sensoriske analyser, samt en analyse på mikrobiell aktivitet.

3.3.1 Anton Paar

Anton Paar ble brukt for å måle alkoholinnhold (% v/v), restekstrakt (% Plato) og forgjæringsgrad (% RDF) i forsøksbryggene. Ved RECD er maskinen satt sammen av flere maskiner, som til sammen fullfører en komplett analyse av ølprøver. Alcoalyzer Beer måler alkoholinnhold, mens DMA4500 Density Meter måler forgjæringsgrad og restekstrakt (Anton Paar 2013).

Ved prøveopparbeidelse ble 100 ml forsøksbrygg tilsatt i spesial sentrifugerør, og satt inn i sentrifugemaskinen Sentrifuge Eppendorf Centrifuge 5804, beholdermekanisme A-4-44. Man kjørte to paralleller av hvert forsøksbrygg. Sentrifugen ble innstilt på 3000 rpm i 15 minutter. Sentrifugering var nødvendig, da Anton Paar maskinen kan gi feil verdier hvis prøven man analyserer inneholder ususpenderte stoffer (Anton Paar 2013). Etter sentrifugering hadde gjær felt ut.

Etter sentrifugering ble filter av typen Filter Whatman™ 597 ½ Diameter 320mm, partikkelretensjon 4-7 µm brettet ut i en trakt. Trakten ble satt i en 250 ml Erlenmeyer kolbe, som ble tilsatt 0,3 gram kiselgur. Retentatet fra sentrifugert ølprøve ble helt i filteret. Etter 30 minutter hadde ølprøven gått igjennom filteret. Dette ble gjort for å fjerne eventuelle uløste stoffer, og fjerne karbondioksid fra prøven.

50 ml av ølet ble så fylt i sylinderglass, som ble satt på SP-1M Sample Charger, som er et roterende prøvebrett. Før prøvene kunne bli kjørt måtte maskinen renses. Dette ble gjort med 50 ml rektifisert sprit fra Kemetyl EG nr 200–578-6, som ble kjørt igjennom maskinen, etterfulgt av 3 x 50 ml ionebyttet vann. Maskinen ble kalibrert hver dag med øl av kjente verdier av forgjæringsgrad, restekstrakt og alkoholprosent. Maskinen har en slange som er koblet opp mot en pumpe, som suger prøvene inn i maskinen. Den brukte 4 minutter på å analysere en prøve. Når analysen var ferdig, ble resultatene skrevet ut av printeren Citizen DP-3110. Ved forgjæringsgrad $67\% \pm 4\%$ med to dager uendrete målinger, ble gjær tatt av forsøksbryggene.

3.3.2 Headspace Gas Chromatography (HSGC)

Gasskromatografi ble brukt for å finne konsentrasjoner og innhold av ester, fuselalkoholer og karbonylforbindelser, slik som acetaldehyd, diacetyl og 2,3-pentandion. En gasskromatograf separerer og registrerer ulike karbonholdige komponenter i en løsning.

Prøvemateriale blir oppvarmet, slik at konsentrasjonen av flyktige komponenter blir lettere tilgjengelig. Med headspace menes det tomrommet mellom lokk og væske, hvor en nål stikkes inn, og suger ut innholdet av de flyktige komponentene. Disse komponentene vil, ved hjelp av en bæregass, bli transportert til en FID (flame ionization detector). Detektoren brenner komponentene med en flamme. Dette danner ioner, som gasskromatografen registrerer som elektriske signaler. Disse signalene blir sammenlignet med lagret data fra tidligere referanseprøver med kjente konsentrasjoner av ulike komponenter. Dette gjør at gasskromatografen kan detektere hvilken konsentrasjon og type komponent man har med å gjøre. Molekylene vil ha ulik størrelse, dette medfører at ulike komponenter når fram til detektoren, og blir forbrent ved ulike tidspunkt. Dette kalles retensjonstid, og sammen med de elektriske signalene brukes retensjonstidene for å kartlegge hvilke komponenter som befinner seg i prøven (Ahuja 2003).

3.3.2.1 Analyse av diacetyl og 2,3-pentandion

Ved RECD ble Headspace Gas Chromatography brukt for å måle konsentrasjonene av diacetyl og 2,3-pentandion i prøvebryggene.

Daglig ble to paralleller fra hvert forsøksbrygg målt for diacetyl og 2,3-pentandion. 20 ml av hvert forsøksbrygg ble tilsatt i sentrifugerør Schott Duran 25 ml, og sentrifugert på 3000 rpm i 16 minutter i sentrifugen Sentrifuge Hermle Z380. Dette var tilstrekkelig for å få gjær til å sedimentere i rørene, og for å fjerne CO₂. Ved endt sentrifugering ble 10 ml av

retentatet pipettert over i Headspace-glass av typen Chromacol 20-CV. Headspace-glasset ble forseglet med et gummiseptum av typen Chromacol 30-CBT3. Når alle prøvene hadde blitt forseglet, ble de satt i et stativ, og plassert i et varmeskap fra Termaks. Dette varmeskapet holdt 55 °C. Prøvene skulle stå i varmeskapet i minimum to timer.

Før prøvene kunne settes på, måtte man i dataprogrammet Chromeleon Client Version 6.80 SR 11d lage en tom profil for hver prøve, slik at målt mengde diacetyl og 2,3-pentandion ble lagret på riktig sted. Headspace-glassene ble satt i en automatisk mater på gasskromatografen Trace GC Ultra fra Thermo Scientific. Gasskromatografen ble så satt på. Dette startet en kondisjonering ved 55 °C i 30 minutter, etterfulgt av ekvibreringstid på 15 minutter. Målingene blir sendt til Chromeleon via en Thermo Finnigan HS 2000, som er en server som forbinder dataprogrammet og gasskromatografen. Det ble kjørt 2 paralleller for å se om verdiene på målingene samsvarte. Ved et diacetylnivå under 0,08 ppm ble ølet ansett som ferdig modnet.

3.3.2.2 Analyse av ester, fuselalkoholer og acetaldehyd

For å måle ester, fuselalkoholer og acetaldehyd, ble Headspace Gas Chromatography ved UMB tatt i bruk. Alle prøvene ble analysert, foruten referanseprøven fra batch 2, som ikke ble funnet igjen.

Fryst prøvemateriale fra RECD ble tatt ut fra fryseren, og tint i kjøleskap ved 4 °C over natta. Neste dag ble 12,00 gram prøve veid inn i 15 ml greiner rør med skrutopp. Vekten som ble benyttet var en METTLER PM480 DeltaRange. 1 ml og 3 ml sterile engangspipetter ble brukt for å fylle greiner rørene, som etterpå ble sentrifugert på 3000 rpm i 16 minutter med sentrifugen Kubota 2010. Dette ble utført for å fjerne gjær.

10,00 gram av retentatet ble veid inn med METTLER PM480 DeltaRange, i N20-20PE Headspace-glass (Marchery Nagel, Tyskland) som ble forseglet med et gummiseptum Chromacol 30-CBT3 (Herts, England). De forseglete Headspace-glassene ble satt i en innmater som er påkoblet gasskromatografen. Mellom hvert Headspace-glass med prøvemateriale, ble to prøver med avionisert vann satt inn. Dette ble gjort for å rense systemet, slik at systemet var fritt for komponenter fra forrige prøve. Instrumentet som ble benyttet er en Hewlett Packard HP/Agilent 7694 Headspace Autosampler, og Headspace 6890 GC System (Aligent, Wilmington USA).

Instrumentet består også av en Interface 900 serie (Parker Hannifin, Kent, England), med en 75–32 Parker hydrogenerator som genererer et trykk på 1,8 bar, og sender hydrogen til FID slik at den brenner. Maskinen benytter seg av en FID, som har en detektortemperatur på 200 °C. Instrumentet varmer opp prøvene til 50 °C, og har en manifoldtemperatur på 60 °C og ekvilibreringsstid på 45 minutter. FID sender signaler til Interface 900, som sender avbrenningsresultatene til softwaren TotalChrom. Total tid for å få kjørt en prøve er 20 minutter. Instrumentet var programmert til å ha følgende temperaturprogram;

- 5 min ved 33 °C
- Temperaturøkning (10 °C/min) til 40 °C, deretter 2 minutter ved denne temperaturen
- Temperaturøkning (15 °C/min) til 70 °C, deretter 2 minutter ved denne temperaturen
- Temperaturøkning (30 °C/min) til 130 °C, deretter 4 minutter ved denne temperaturen

Kjemikalier brukt i apparatet for referanseverdier og konsentrasjoner er gitt i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Liste over leverandører, og hvilke kjemikalier som er brukt i gasskromatografen ved UMB.

Leverandør	Kjemikalier
Fluka	Acetaldehyd og etylacetat
Sigma	2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol
VWR	isoamylacetat, 1-propanol, isobutyl

3.3.3 pH måling

For å måle pH, kan man benytte seg av et pH-meter. Et pH-meter er et apparat som består av en glasselektrode, som er ionesensitiv. Skal man måle riktig pH, må apparatet kalibreres med to ulike buffere. Ved kalibrering, vil apparatet korrigere seg etter pH i bufferne, slik at apparatet har korrekte innstillinger på ulike forhold i konsentrasjonen mellom OH⁻ og H⁺ (Cable 2005).

pH målinger av alle forsøksbryggene ble foretatt daglig. Før målingene kunne starte, måtte prøvene sentrifugeres i Sentrifuge Eppendorf Centrifuge 5804, for å fjerne gjær. Man kom fram til at dette var nødvendig, siden prøvene måtte tempereres til 20 °C, for å få en nøyaktig måling. Resultatene ble oppgitt med en desimal, ved 20 °C. Hadde ikke gjæren blitt fjernet, kunne man ha fått en høy gjæraktivitet i prøvene, som følge av en temperaturøkning. Dette kunne igjen ha ført til uriktige målinger.

Rundt 50 ml forsøksbrygg ble tilsatt i spesial-rør, og sentrifugert i 15 minutter på 3000 rpm. Etter sentrifugering ble retentatet helt i rene flasker, som ble satt i vannbad for temperering. Vannbadet var av typen TB SHO2 No 7706 Heto Birkerød (Danmark). pH apparat PHM 92 LAB pH Meter (Radiometer København, Danmark) ble kalibrert daglig med to kjente bufferløsninger. Bufferne som ble brukt var buffer pH 7 1.09439.1000 og buffer pH 4 1.09435.1000 fra Certipur® (International).

Når prøvene var temperert ble pH målt. To paralleller av hver prøve ble målt. Prøvematerialet ble helt i 40 ml beger, og glasselektroden på pH apparatet ble satt ned i begeret. Glasselektroden ble stående til pH hadde blitt stabilisert.

3.3.4 Mikrobielle tester

En mikrobiell analyse ble utført for å undersøke en eventuell sammenheng mellom mikrobiologisk kontaminasjon og usmaker funnet ved sensoriske tester. Det ble sjekket for ølskadelige bakterier, villgjær og mugg. Dette er standard prosedyre for øl som har blitt produsert på RECD.

3.3.4.1 Ølskadelige bakterier

For å undersøke etter ølskadelige bakterier ble agar av typen NBB®-A tatt i bruk. Denne agaren blir ofte brukt i ølindustrien for å påvise ølskadelige bakterier. Agaren inneholder mange inhibitorer, og selekterer for ølskadelige bakterier, mens gjær og harmløs bakterieflora blir inhibert (Doehler 2013). Dette er ølskadelige bakterier som *Lactobacillus* og *Pediococcus* (Merck 2008).

Agaren ble skaffet ferdig tillaget. Ved prøveopparbeiding, ble flasken med NBB®-A kokt i 15 minutter. Den flytende agaren ble så helt i petriskåler. Ved 20 °C var agaren stiv. Agar som skulle brukes til en senere anledning, ble satt i kjøleskap på 4 °C. 0,1 ml av hvert tappet forsøksbrygg ble strøket utover agaren med en vinkelstav. Petriskålene ble inkubert anaerobt i varmeskapet Termaks B8420 Bacteriologic Chamber på 26–27 °C i 7 dager.

3.3.4.2 Villgjær/mugg

For å kunne påvise fremmedgjær eller mugg ble YM- agar brukt. Navnet YM står for ”yeast and mold”. YM- agar er et selektivt medium som har lav pH, noe som gir gunstige vekstvilkår for mugg og gjær (Rosa og Peter 2006).

YM-agar ble tillaget ved å blande 41 gram Difco™ YM Agar med 1 liter ionebyttet vann. Dette ble ristet godt, og autoklavert i Touchclave-R LTE på 121 °C i 15 minutter. Den

flytende agaren ble så helt i petriskåler. Ved 20 °C var agaren stiv. Agar som skulle brukes til en senere anledning, ble satt i kjøleskap på 4 °C. 0,1 ml av hvert tappet forsøksbrygg ble strøket utover agaren med en vinkelstav. Petriskålene ble inkubert aerobt i varmeskapet Termaks B8420 Bacteriologic Chamber på 26–27 °C i 3 dager.

3.3.4.3 Generell vekst

UBA (Universal Beer Agar) ble brukt for å påvise generell vekst. Agaren er ikke selektiv ovenfor noen mikroorganismer, og har gode forhold for ølskadelige bakterier, slik som *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Zymomonas* ssp og villgjær (Merck 2008). Ved RECD blir UBA tatt i bruk ved kvalitetssikring av produksjonshygiene.

55 gram UBA agar type Merck 1.00445.0500 ble blandet med 750 gram ionebyttet vann. Dette ble ristet godt, og autoklavert i Touchclave-R LTE på 121 °C i 10 minutter. Den flytende agaren ble så helt i petriskåler. Ved 20 °C var agaren stiv. Agar som skulle brukes til en senere anledning, ble satt i kjøleskap på 4 °C. Forsøksbrygg ble filtrert 2 ganger med Filter Whatman™ 597 ½ Diameter 320mm, partikkelretensjon 4-7 µm. Forsøksbryggene ble så filtrert gjennom membranfiltreringssystemet EZ-Pak fra Millipore. Dette er et system bestående av sterile engangsbruk enheter, blant annet membranfilter og beger, og gjør det enkelt å få gjort arbeidet på en aseptisk måte (Millipore 2012). 100 ml prøve ble filtrert gjennom et membranfilter. En pumpe skaper vakuüm, slik at prøven blir sugd gjennom filteret. Dette filteret ble så lagt i petriskålen, og inkubert aerobt i varmeskapet Termaks B8420 Bacteriologic Chamber på 26–27 °C i 3 dager.

3.5 Sensorisk analyse

Det ble utført tre sensoriske tester, en for hver runde prøvebrygg. For hver sensorisk analyse ble en batch forsøksbrygg, samt brygget fra referansetanken bedømt. Hver sensorisk analyse ble utført av 7 dommere. Hensikten med de sensoriske analysene var å se om eventuelle økte ester konsentrasjoner i ølet som følge av økt gjærmengde og forskjellige temperaturer kunne detekteres sensorisk.

Panelet skulle gi karakter på generell likhet, vurdere smaksfeil og graden av smaksfeil, og bedømme konsentrasjonen av ester i ølet. Generell likhet skulle bedømmes med en skala fra 1 til 9, der 1 er udrikkelig, og 9 er svært god. Smaksfeil ble beskrevet med en tallkode, og

graden av denne smaksfeilen skulle vurderes med karakterer fra 1 til 5, der 1 er svak, og 5 er sterk. Videre skulle esteroppfattelsen bedømmes på en skala fra 1 til 4, der 1 var innhold av minst ester, og 4 var høyest innhold av ester.

De sensoriske analysene ble bedømt av det sensoriske panelet på RECD. Dommerne i dette panelet har kurs i CILAS Sensory FlavorActiv, og har god kjennskap til Dahls Pils. Hovedmålet med et sensorisk panel er å opprettholde og forbedre kvaliteten på øl. Sensorisk evaluering er en av de viktigste oppgavene på et bryggeri. Skal kvaliteten på ølet ivaretas og forbedres, må man ha dommere som kan, ved smak, forklare og beskrive eventuelle smaksfeil, og beskrive størrelsen av disse (FlavorActiv 2002).

Panelet ble fortalt på forhånd at de skulle bedømme fire typer lagerkjellerprøver av typen Dahls Pils, der tre av disse var forsøksbrygg, og en var original lagerkjellerprøver. De fikk ikke vite hvilken prøve dette var. Lagerkjellerprøver er øl som ikke har blitt nedbrygget.

Alt ble ordnet i stand på forhånd før analysen startet. De fire variantene av Dahls Pils som var tappet på flaske, ble hver kodet med en tretallskode, og plassert i tilfeldig rekkefølge foran bedømmelsesskjemaet til hver dommer. Ølene holdt 8 °C. Kaldt vann og smaksnøytrale kjeks ble servert i tillegg. Siden dommerne skulle sitte ovenfor hverandre, ble det før bedømmelsen startet, forklart at det ikke var lov å snakke med hverandre mens bedømmelsen pågikk. De ble også forklart at de måtte begrense kroppsspråket, slik at dommerne ikke påvirket hverandre. Panelet måtte selv skrive tretallskodene i skjemaet, i den rekkefølgen de selv følte for. Dommerne måtte selv åpne og skjenke innholdet i flasken. Da alle dommerne var ferdig med sin bedømmelse, diskuterte panelet hva oppfattelsen til hver enkelt dommer var, slik at man kunne ta lærdom av dette til neste sensorisk analyse.

3.6 Statistiske beregninger

Det ble satt opp T-tester, for å se om resultatene fra det sensoriske panelet var signifikante eller ikke. T-testene ble satt opp med tanke på oppfattelse av esterkonsentrasjoner i de ulike forsøksbryggene. Graden av ester (1 - 4) fra forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C ble satt opp mot karakterene som panelet gav referansen. Dette for å se om panelet detekterte forskjeller om det var ulike konsentrasjoner ester i de ulike bryggene. T-tester ble også satt opp for å se om det var signifikante forskjeller i produksjon av ester og fuselalkoholer.

En T-test finner ut om gjennomsnittsverdien er signifikant i forhold til oppsatt hypotese. Ved utførelse av T-tester, ble dataprogrammet Excel benyttet. Ut i fra testen får man en p-verdi. P-verdien er sannsynligheten for at 0-hypotesen er sann. Signifikansnivået ble satt til 0,05 (95 % sikkerhet). Hvis p-verdien er under 0,05, dvs. under 5 %, vil 0 hypotesen forkastes, og hypotese 1 blir akseptert. 0 hypotesen tilsier at statistisk sett er resultatene ulike. Hvis p-verdi er over 0,05, blir 0 hypotesen akseptert (Løvås 2004).

0 hypotese = Det er ikke forskjell på datasettene

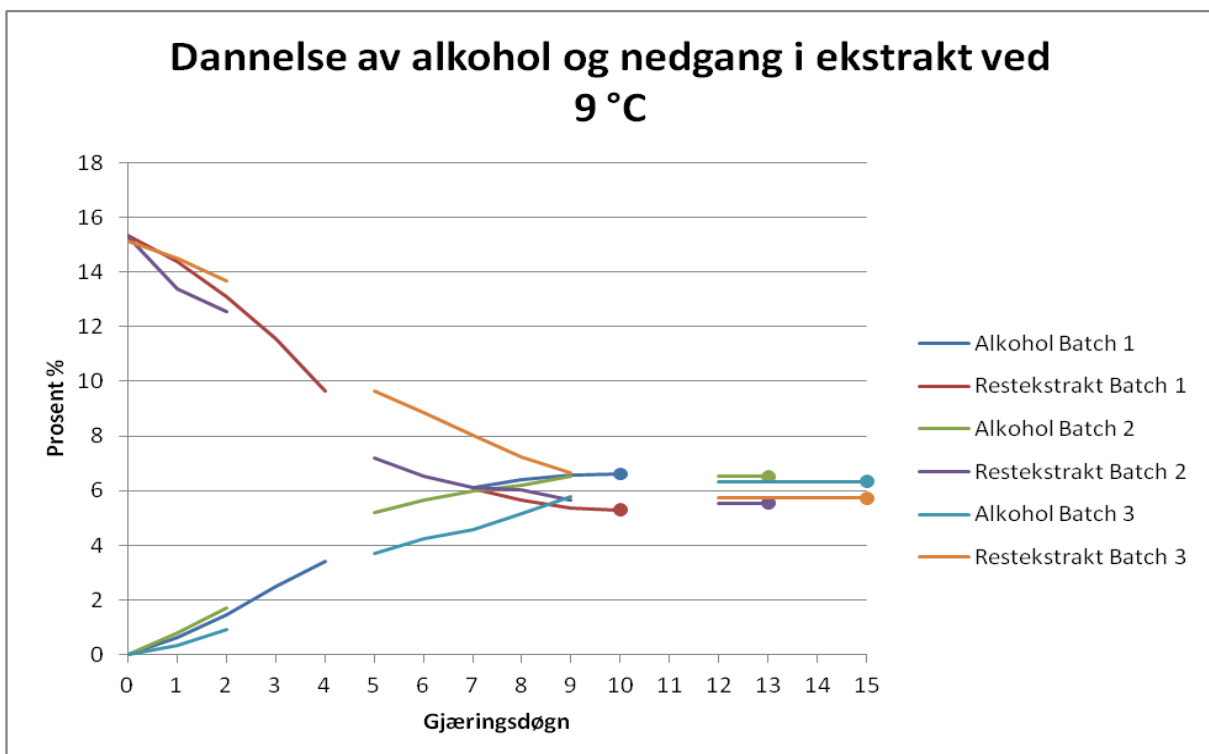
Hypotese 1 = Det er forskjell på datasettene.

4 Resultater

I resultatdelen blir dannelsesforløpet for forskjellige parametre presentert. Stamvørter verdien for disse forløpene er kun tatt fra batch 3. Grunnen til dette er at stamvørter verdiene for batch 1 er feil, antagelig grunnet en fermentering som har tatt sted før prøven ble fryst. Prøvene for stamvørter i batch 2 ble ikke analysert, da de ikke var å finne ved HSGC analysen ved UMB. Dette førte til at kun stamvørterprøve i batch 3 var den eneste som kunne brukes. Dette gjelder for alle grafer i resultatdelen som viser et dannelsesforløp.

4.1 Dannelse av alkohol og reduksjon av ekstrakt

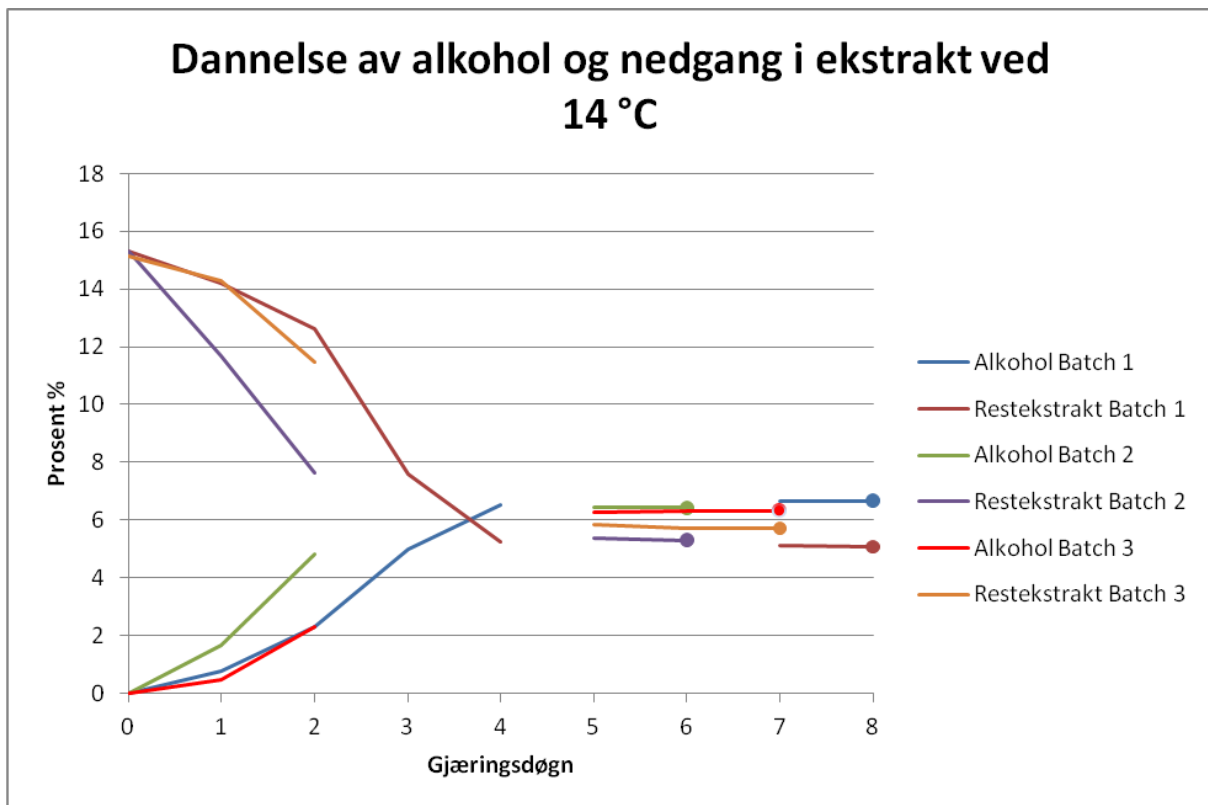
Forsøksbryggene ble daglig målt for alkoholinnhold (% volum) og ekstraktinnhold/ restekstrakt (% Plato) ved bruk av Anton Paar. Parallellene av samme fermenteringstemperatur er satt sammen, da man vil se hvordan de ulike gjærgenerasjonene fermenterer ølet. Resultater fra analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 9 °C er vist i Figur 4.1.



Figur 4.1. Dannelse av alkohol (% volum) og nedgang i ekstrakt (% Plato) ved fermenteringstemperatur 9 °C. Stamvørterens verdi vises ved gjæringsdøgn 0, og siste måling for hver parameter er markert med en sirkel. Siden analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblet.

Resultatene fra figur 4.1 viser at batch 1 produserte alkohol raskest, og brukte 10 dager på å fullføre fermenteringen. Batch 2 brukte 13 dager på å forgjære til ønsket alkoholprosent, mens batch 3 brukte 15 dager. Det var lave forskjeller i mengde alkoholinhold mellom batchene.

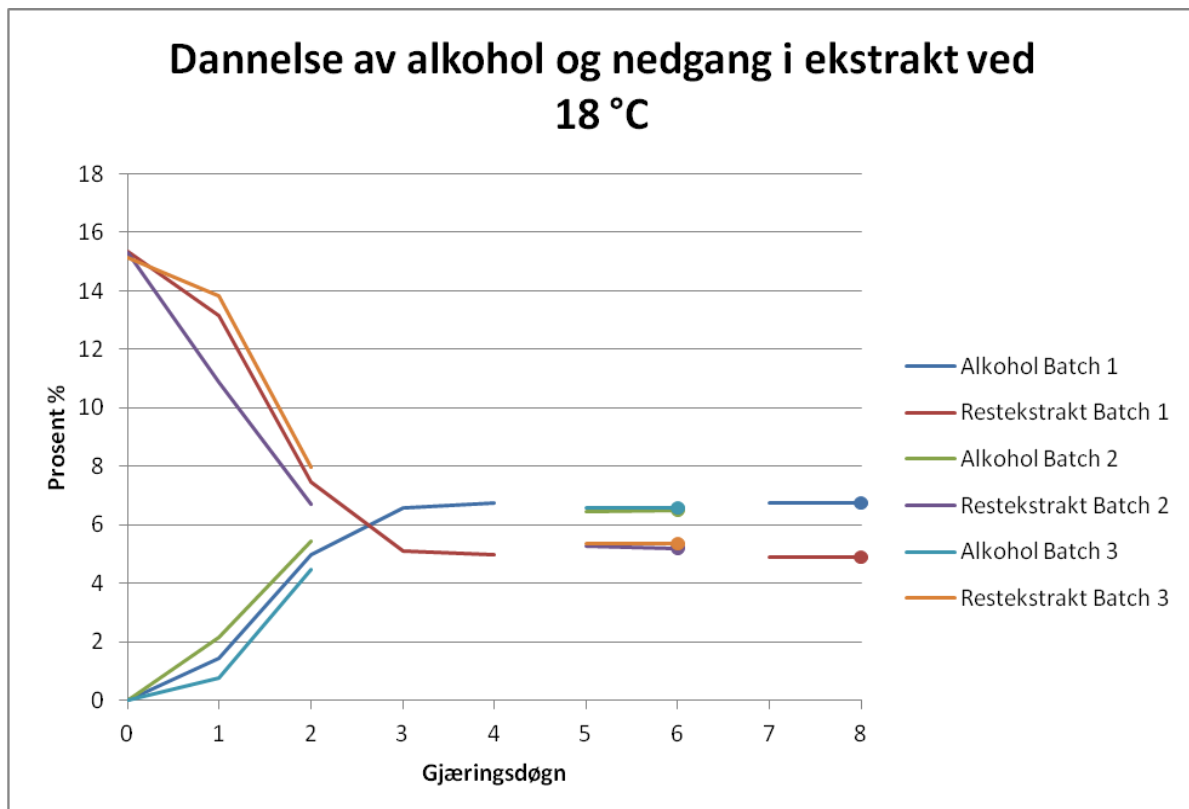
Resultater fra analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 14 °C er vist i Figur 4.2.



Figur 4.2. Dannelse av alkohol (% volum) og nedgang i ekstrakt (% Plato) ved fermenteringstemperatur 14 °C. Stamvørterens verdi vises ved gjæringsdøgn 0, og siste måling for hver parameter er markert med en sirkel. Siden analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblet.

Resultatene viser at det ikke var store variasjoner mellom forsøksbryggene som ble fermentert ved 14 °C. Alle batchene brukte rundt 4 dager på å fermentere ekstraktet. Batch 2 dannet alkohol raskere enn batch 1 og batch 3. Dette kommer av at den ble fermentert, ved en feil, en grad høyere de første to dagene av gjæringsforløpet i forhold til batch 1 og batch 3.

Resultater fra analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 18 °C er vist i Figur 4.3.



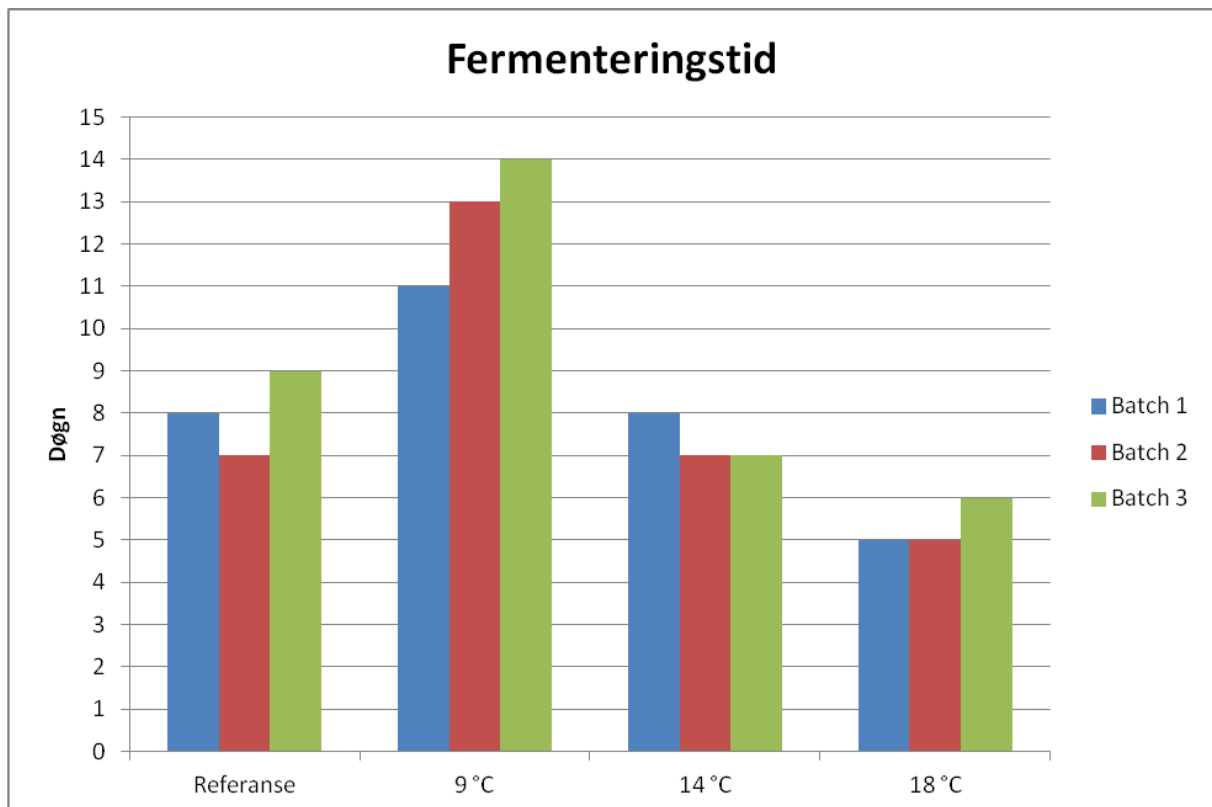
Figur 4.3. Dannelse av alkohol (% volum) og nedgang i ekstrakt (% Plato) ved fermenteringstemperatur 18 °C. Stamvørterens verdi vises ved gjæringsdøgn 0, og siste måling for hver parameter er markert med en sirkel. Siden analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblet.

Resultater fra figur 4.6 viser at det var en stabil økning i alkohol og nedgang i ekstrakt fram til dag 3. Det er ingen nevneverdige variasjoner mellom målingene fra de ulike batchene.

Sammenligner man figur 4.1, 4.2 og 4.3, kommer det tydelig fram at en fermenteringstemperatur på 18 °C gir en raskere fermentering i forhold til forsøksbryggene fermentert på 9 °C og 14 °C. Rådata fra Anton Paar analysene er gitt i vedlegg 1.

4.2 Fermenteringstid

Ved endt fermentering måtte forgjæringsgraden være $67\% \pm 4\%$, med to dager uendrete målinger. Dette ble målt med Anton Paar. Når disse kravene var innfridd, ble ølet nedkjølt og kuldestabilisert. Tallene brukt i figur 4.4 er antall dager før forgjæringsgraden var uendret etter 2 dager. Siden målinger ikke ble tatt i helgene, er antagelig ikke disse resultatene helt korrekte, men gir en indikasjon på hvor raskt de enkelte temperaturene samt referansene bruker på et fermenteringsforløp. Helgedagene er telt med som antall fermenteringsdager.

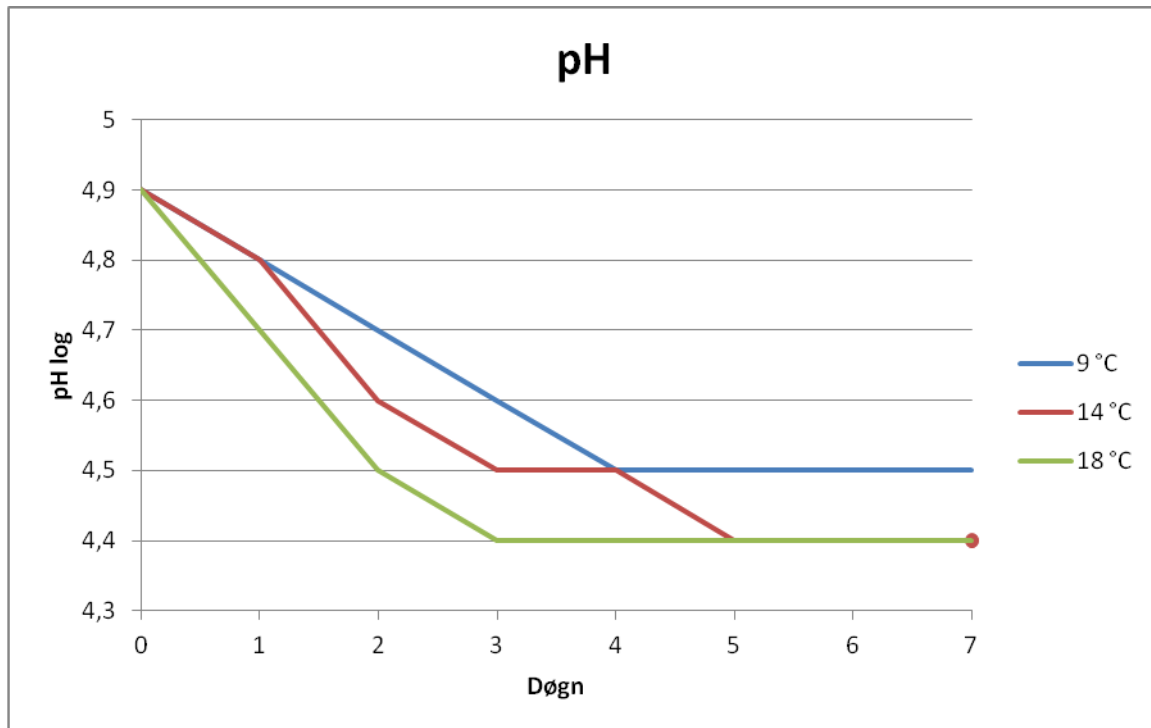


Figur 4.4. Antall dager til endt fermentering for forsøksbryggene samt referansen.

Resultatene fra figur 4.4 viser at forsøksbrygg fermentert på 18 °C hadde den raskeste fermenteringen, og forsøksbrygg fermentert på 9 °C hadde den tregeste fermenteringen. I tidsrommet oppgaven ble utført, ble referansene fermentert på 16,2 °C. Forsøksbrygg fermentert på 14 °C og referansen brukte ca like lang tid på fermenteringen. Rådata fra Anton Paar analysene er gitt i vedlegg 1.

4.3 pH

pH av forsøksbryggene ble målt daglig, foruten om helgene. Resultatene fra pH analysen er gitt i figur 4.5.



Figur 4.5. Utvikling av pH i forsøksbryggene. Stamvørterens verdi er gitt ved døgn 0. Sluttmålingen for forsøksbrygget fermentert på 14 °C er markert med en rød sirkel.

Resultatene fra pH målingene viser at forsøksbryggene som ble fermentert på 18 °C hadde den raskeste reduksjonen i pH, og etter 3 dager hadde pH gått ned til 4,4. Forsøksbryggene fermentert på 14 °C brukte 5 dager på å nå pH 4,4. Forsøksbrygg fermentert på 9 °C nådde sin laveste pH 4,5, etter 4 dager.

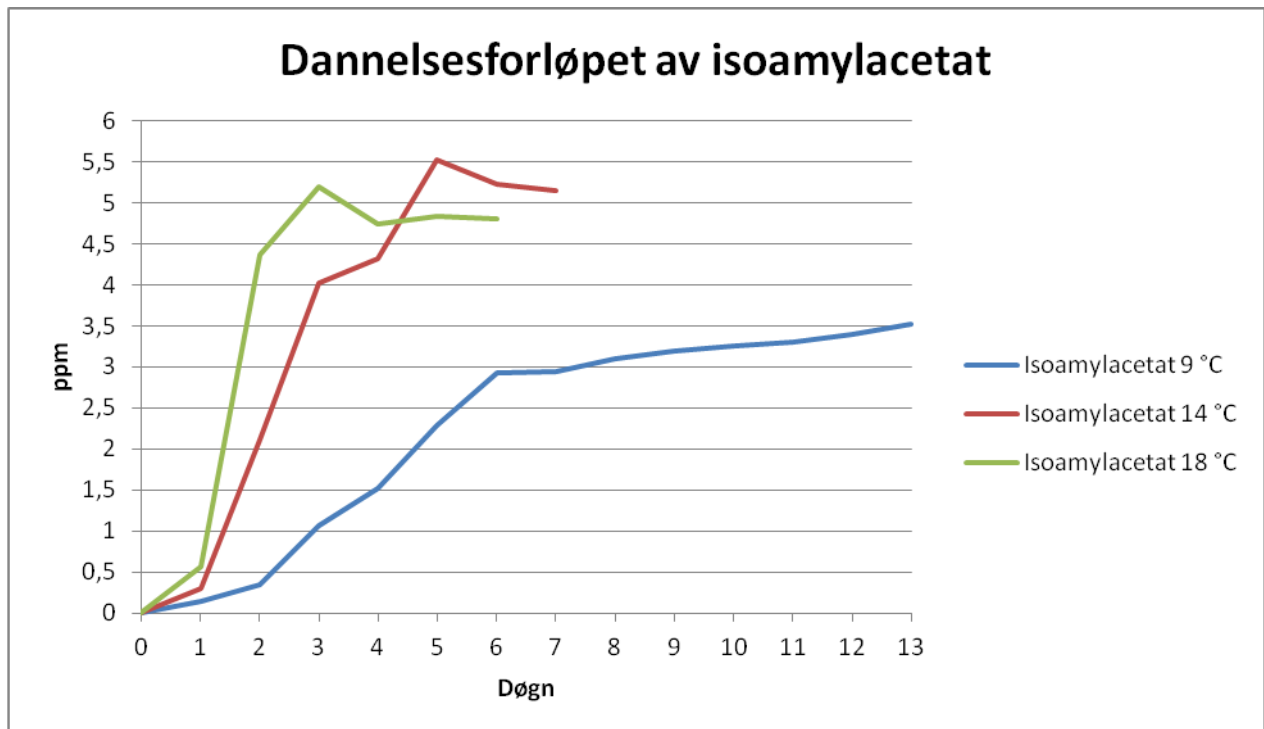
Rådata fra pH målinger er gitt i vedlegg 2.

4.4 Flyktige aromakomponenter

Ved bruk av HSGC på UMB, ble prøvene analysert for flyktige aromakomponenter, slik som estere, fuselalkoholer og acetaldehyd. Rådata fra analysen er gitt i vedlegg 3.

4.4.1 Esterforløp

Gjennomsnittskonsentrasjoner for isoamylacetat (ppm) fra gjæringsforløpet av de ulike forsøksbryggene er vist i figur 4.6.



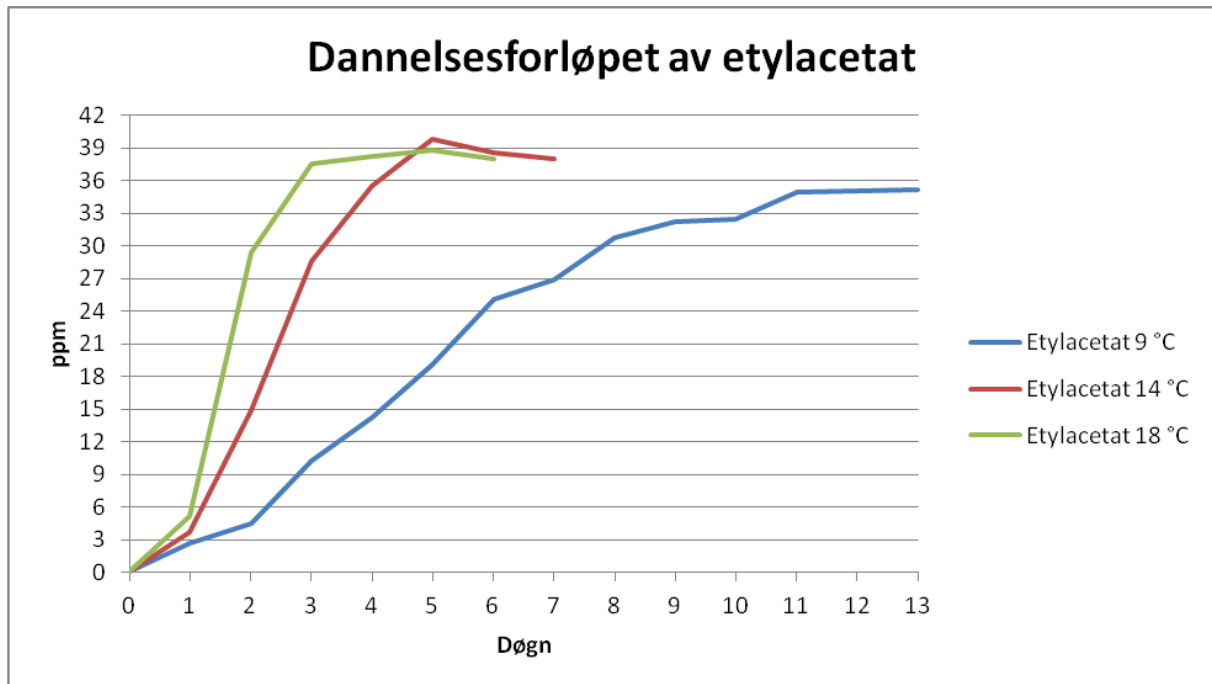
Figur 4.6. Forsøksbryggenes dannelsesforløp av isoamylacetat (ppm). Stamvørterens verdi vises ved døgn 0.

Resultatene fra dannelsesforløpet av isoamylacetat viser at forsøksbryggene som ble fermentert på 18 °C raskest dannet isoamylacetat, og nådde sin høyest konsentrasjon etter 3 dager. Konsentrasjonen av isoamylacetat gikk ned ca. 1 ppm etter dag 3.

Forsøksbryggene fermentert på 14 °C dannet mest isoamylacetat. Dette tok 5 dager, og konsentrasjonen av isoamylacetat gikk ned ca 0,5 ppm etter dag 5.

Forsøksbryggene fermentert på 9 °C hadde en jevn oppgang i konsentrasjon av isoamylacetat, og etter 13 dager nådde brygget sin toppkonsentrasjon.

Gjennomsnittskonsentrasjoner for etylacetat (ppm) fra gjæringsforløpet av de ulike forsøksbryggene er vist i figur 4.7.

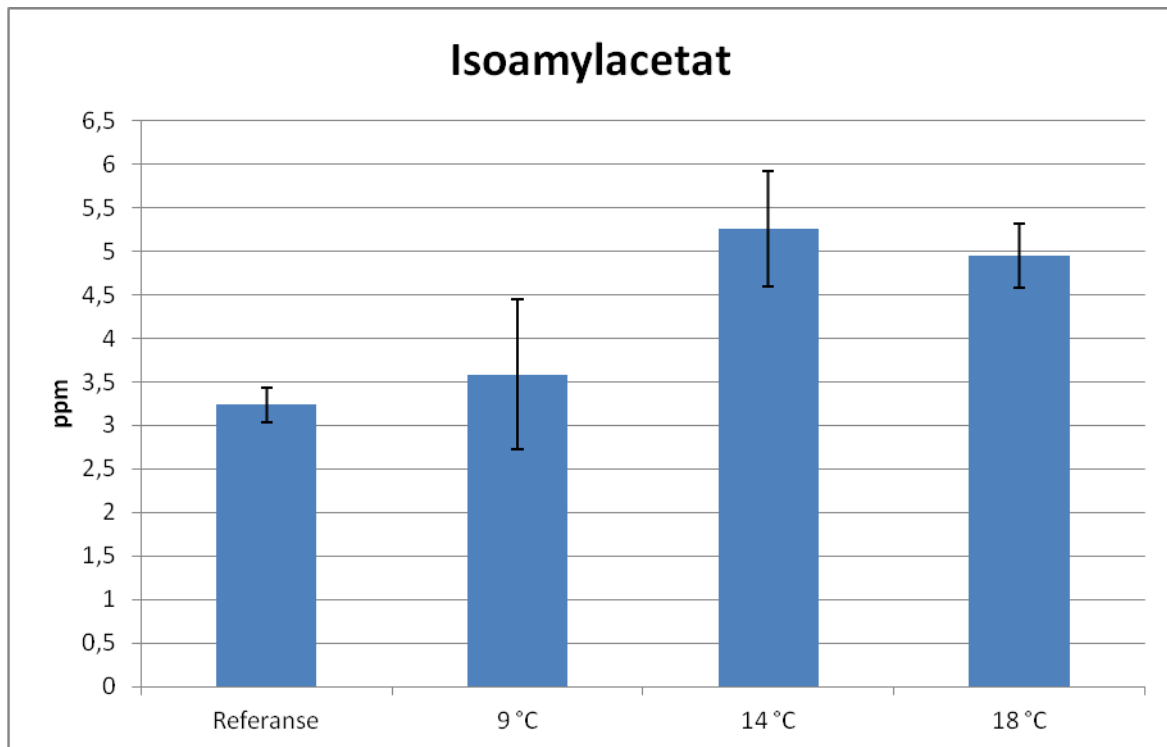


Figur 4.7. Forsøksbryggenes dannelsesforløp av etylacetat (ppm). Stamvørterens verdi vises ved døgn 0.

Resultatene fra dannelsesforløpet av etylacetat, viser at forsøksbryggene som ble fermentert på 18 °C raskest dannet etylacetat, og hadde høyest konsentrasjon etter 5 dager. Konsentrasjonen av etylacetat gikk ned ca 1 ppm ved dag 5. Forsøksbryggene fermentert på 14 °C dannet mest etylacetat. Dette tok 5 dager, og konsentrasjonen av etylacetat gikk ned ca 1 ppm etter dag 5. Forsøksbryggene fermentert på 9 °C hadde en jevn oppgang i konsentrasjon av etylacetat, og etter 13 dager nådde brygget sin toppkonsentrasjon.

4.4.2 Esterinnhold

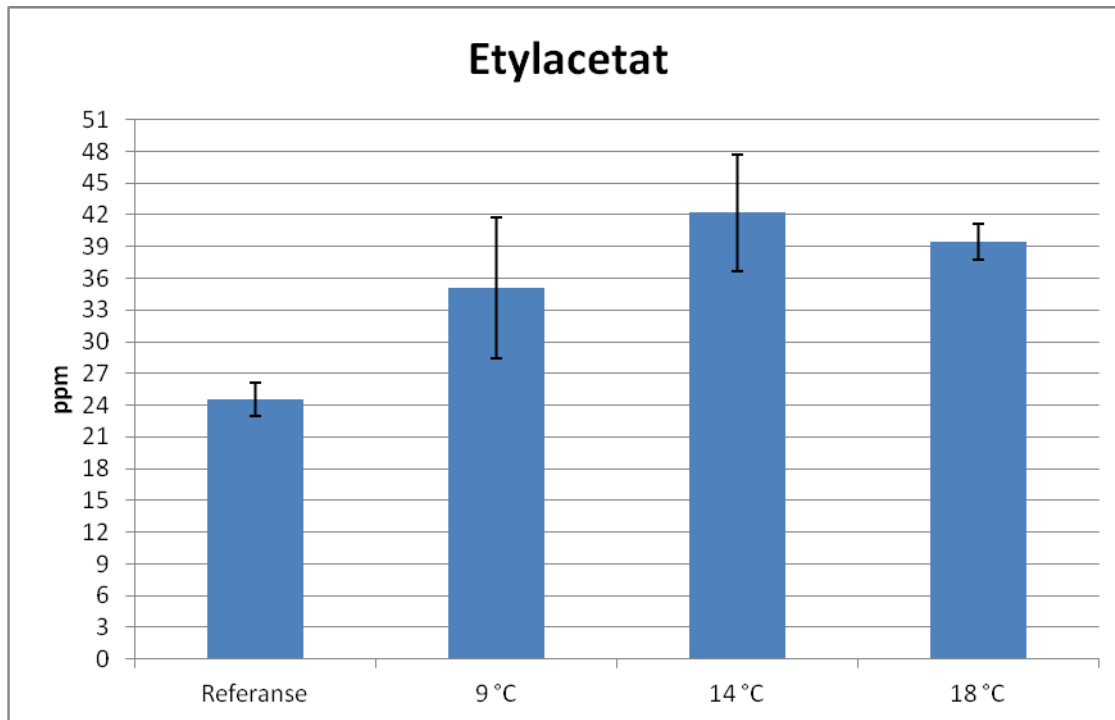
Når forsøksbryggene og referansen var ferdig modnet og kuldestabilisert, ble de tappet. Gjennomsnittsverdier målt i ppm med standardavvik for isoamylacetat fra tappet øl er vist i figur 4.8.



Figur 4.8. Gjennomsnittsverdier målt i ppm med standardavvik for isoamylacetat fra tappet øl.

Figur 4.8 viser at mengden isoamylacetat i ferdig tappet produkt er lavest hos referansen. Forsøksbrygget som ble fermentert på 9 °C har varierende konsentrasjoner av isoamylacetat. Dette gir et relativt stort standardavvik. Det var ingen signifikante forskjeller i målt isoamylacetat konsentrasjon mellom tappet forsøksbrygg som ble fermentert på 14 °C og 18 °C, da p-verdi ble kalkulert til å være 0,53. Referansen og alle forsøksbryggene inneholdt konsentrasjoner over smaksterskelsgrensen for isoamylacetat, som er 0.6-1.2 ppm.

Gjennomsnittsverdier målt i ppm med standardavvik for etylacetat fra tappet øl er vist i figur 4.9.



Figur 4.9. Gjennomsnittsverdier målt i ppm med standardavvik for etylacetat fra tappet øl.

Figur 4.9 viser at mengden etylacetat i ferdig tappet øl er lavest hos referansen. Mengden etylacetat produsert i referansen er lavere enn smaksterskelsgrensen, som er på 30 ppm. Forsøksbryggene som ble fermentert på 9 °C og 14 °C hadde varierende konsentrasjoner etylacetat, og som følge av dette et relativt stort standardavvik. Alle forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C hadde konsentrasjoner over smaksterskelsgrensen for etylacetat. Det var ingen signifikante forskjeller i målt etylacetat konsentrasjon mellom tappet forsøksbrygg som ble fermentert på 14 °C og 18 °C, da p-verdi ble kalkulert til å være 0,48.

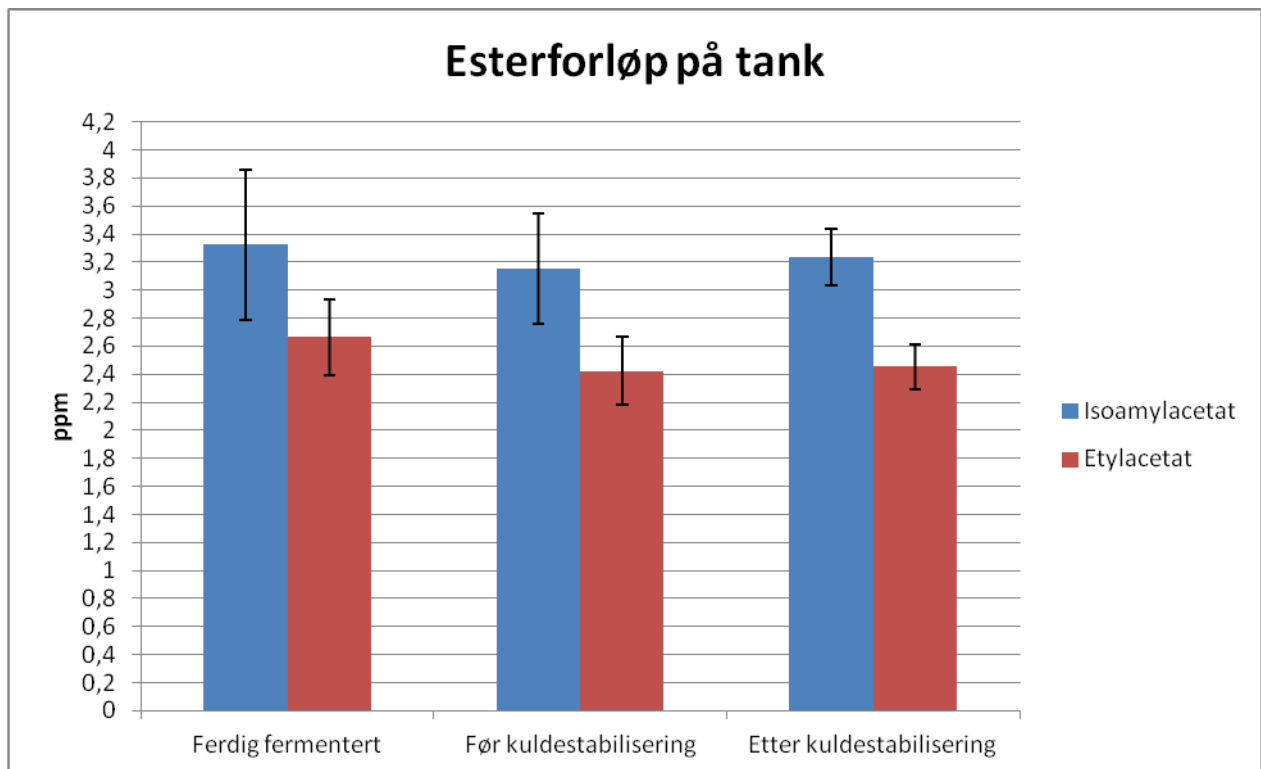
Resultater fra HSGC analysen viser at forsøksbryggene og referansen inneholdt svært lave konsentrasjoner av isobutylacetat. Konsentrasjonen av isobutyl vises i tabell 4.1

Tabell 4.1. Konsentrasjoner av isobutylacetat (ppm) i forsøksbryggene og referansen.

	Referanse	9 °C	14 °C	18 °C
Isobutylacetat (ppm)	0,09	0,14	0,18	0,16
Std. avvik	0,09	0,03	0,01	0

Tabell 4.1 viser resultatene for konsentrasjoner av isobutylacetat. Alle prøvene hadde verdier langt under smaksterskelsgrensen (1,6 ppm) for isobutyl acetat.

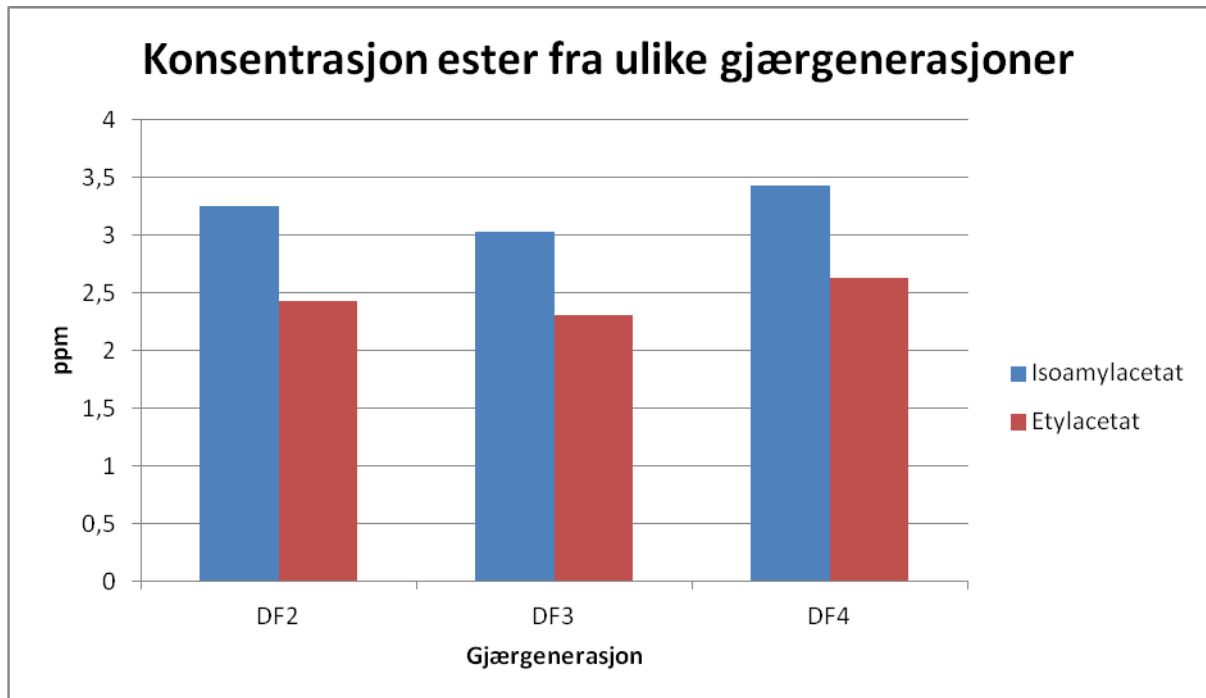
Det var av interesse å se om konsentrasjonen av ester i referansene sank ved kuldestabilisering på tank. Resultater fra dette er vist i figur 4.10. Konsentrasjonen (ppm) etylacetat er dividert på 10, for å få en mer oversiktelig graf.



Figur 4.10. Referansenes innhold av isoamylacetat (ppm) og etylacetat (ppm/10) ved endt fermentering, og før og etter kuldestabilisering.

Resultatene fra målingene av referansene viser at små mengder isoamylacetat forsvinner etter kuldestabilisering. Grafen viser også at Dahls Pils mister rundt 2 ppm i etylacetat konsentrasjon etter kuldestabilisering.

Det var også av interesse å se om ulike gjærgenerasjoner danner ulike sluttkonsentrasjonen av ester i Dahls Pilsen. Resultater fra dette er vist i figur 4.11. Konsentrasjonen (ppm) etylacetat er dividert på 10, for å få en mer oversiktelig graf.

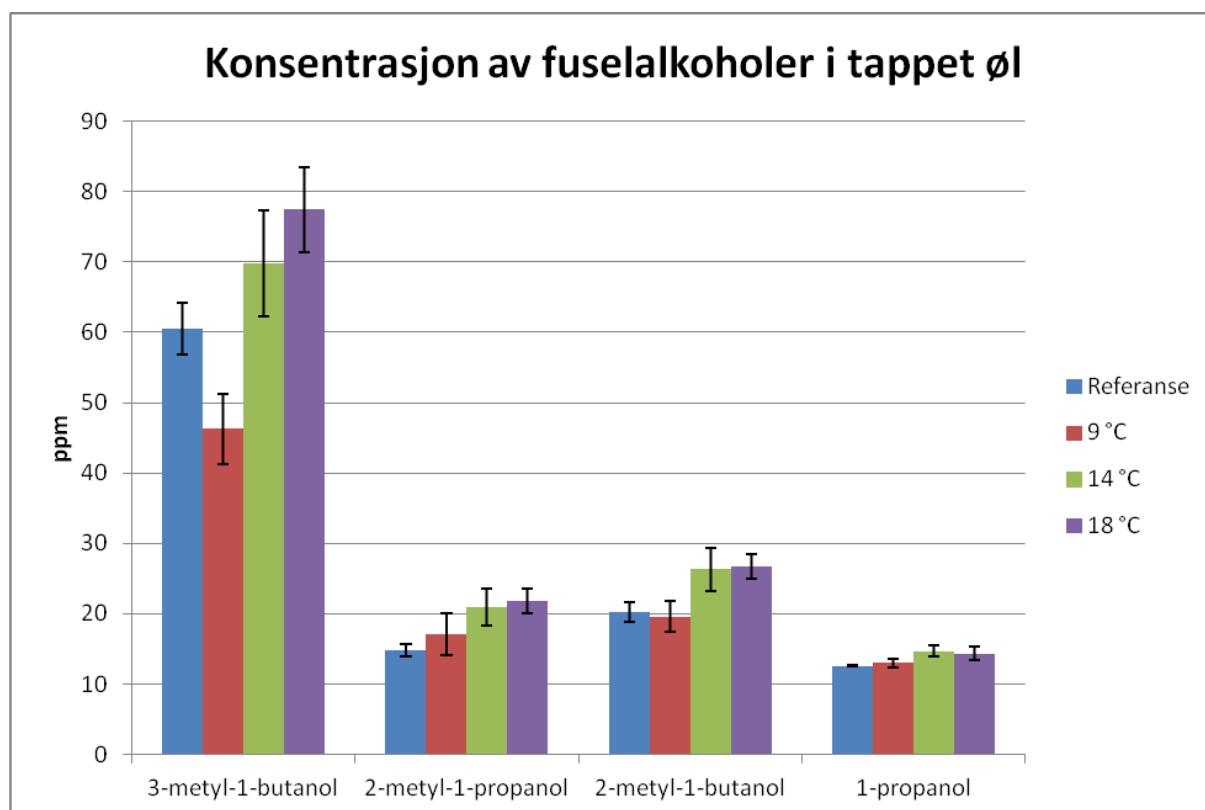


Figur 4.11. Referansenes innhold av isoamylacetat (ppm) og etylacetat (ppm/10) ved endt kuldestabilisering. DF2 er batch 1, DF3 er batch 2, og DF4 er batch 3.

Resultatene fra figur 4.11 viser at ved endt kuldestabilisering, var referansen som ble fermentert med DF4 inneholdt mest ester. Forskjellene i konsentrasjoner ester mellom de ulike referansene var for øvrig ikke store.

4.4.3 Fuselalkohol

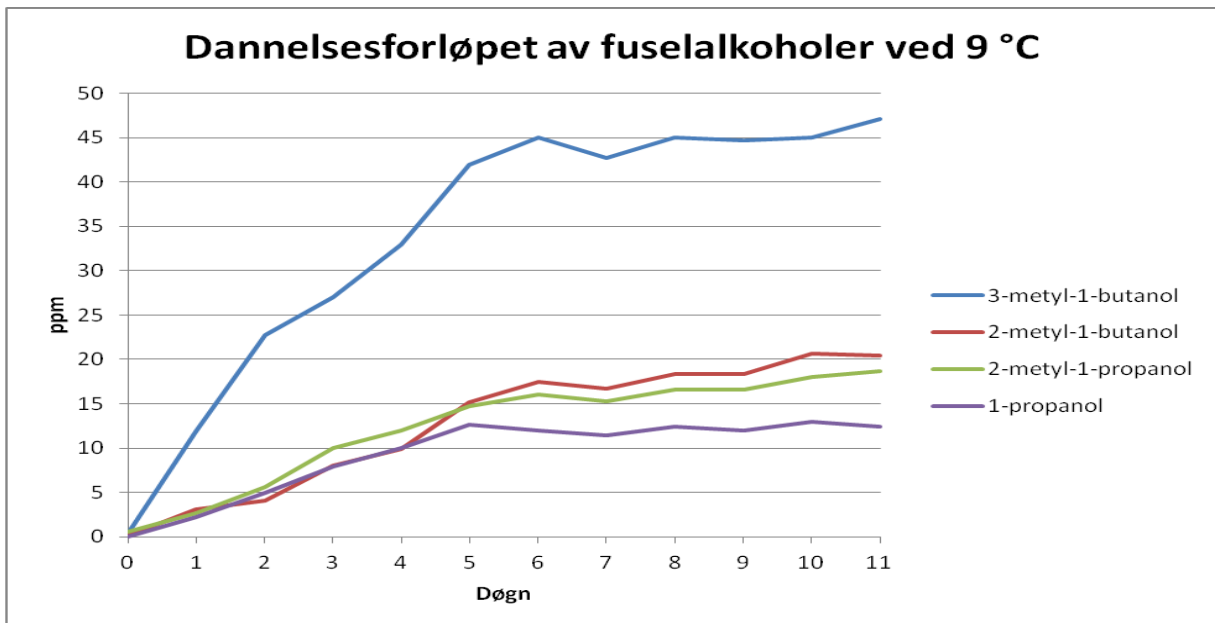
Ved HSGC analysen ble konsentrasjoner av fuselalkoholer målt. Konsentrasjonen av ulike fuselalkoholer i tappet forsøksbrygg blir, i figur 4.12, sammenlignet med referansene. Tallene brukt er gjennomsnitt med standardavvik av alle forsøksbryggene og referansene.



Figur 4.12. Konsentrasjoner av ulike fuselalkoholer i forsøksbryggene og referanseprøvene. Konsentrasjonene er målt i ppm.

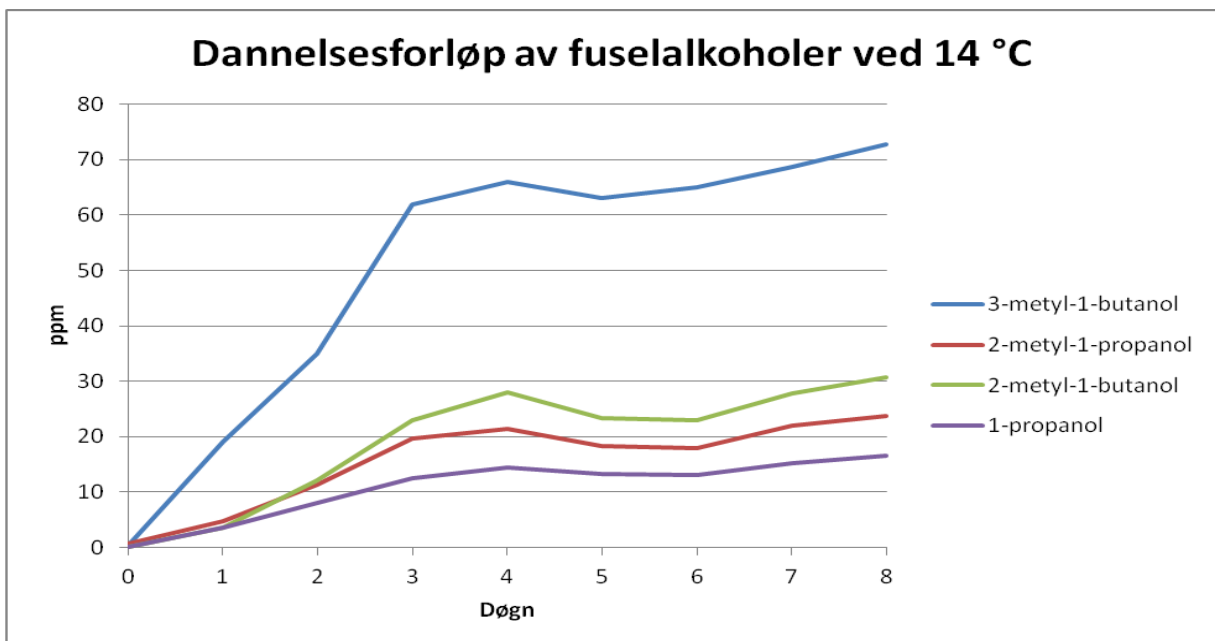
Figur 4.12 viser at forsøksbryggene fermentert på 18 °C produserte mest av alle fuselalkoholene. Denne produserte konsentrasjoner over smaksterskelsgrensen for 3-metyl-1-butanol (70 ppm) i alle batchene. Forskjellen i fuselalkoholkonsentrasjoner mellom forsøksbrygg fermentert på 14 °C og 18 °C var ikke signifikante. 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol og 1-propanol oversteg ikke smaksterskelsgrensen i noen av forsøksbryggene eller referansen.

Prøver fra forsøksbryggene ble tatt daglig, for å kunne se hvordan utviklingen av fuselalkoholer var. I figurene 4.13 – 4.15 vises gjennomsnittsverdier av dannelsesforløpet for målte fuselalkoholer fra forsøksbryggene fram til kuldestabilisering.



Figur 4.13 Dannelsesforløpet av fuselalkoholer i forsøksbryggene fermentert på 9 °C fram til kuldestabilisering. Gjennomsnittskonsentrasjonen av de ulike fuselalkoholene er oppgitt i ppm. Stamvørterens verdi er gitt ved døgn 0.

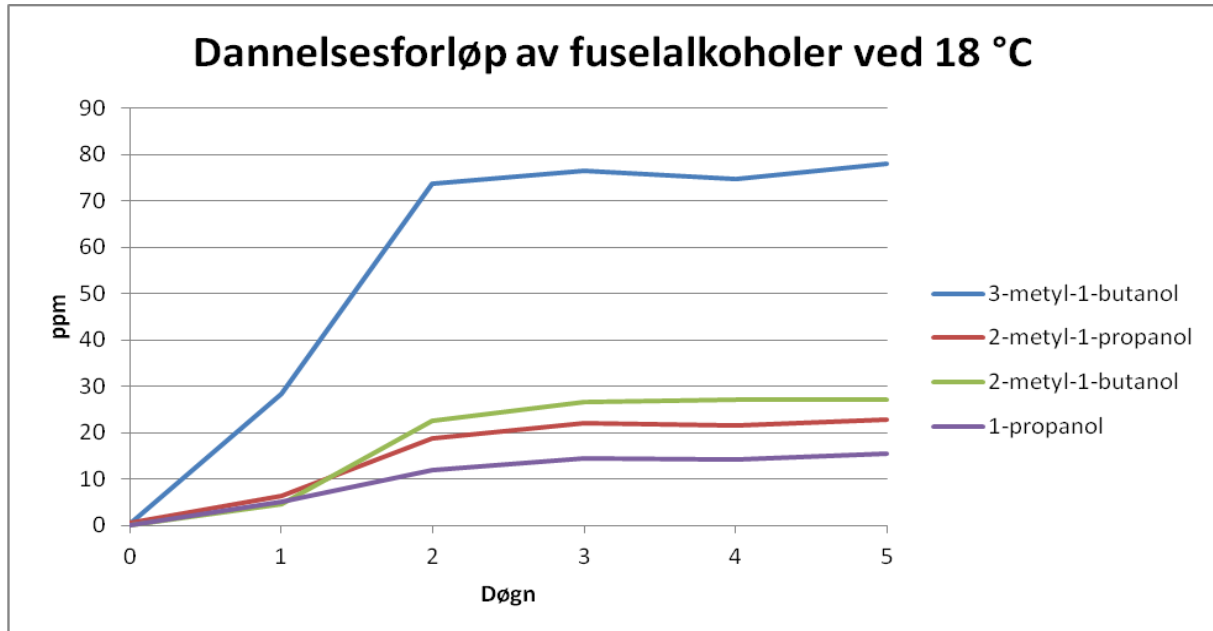
Figur 4.13 viser at forsøksbryggene fermentert på 9 °C har en jevn økning i fuselalkoholer fram til endt kuldestabilisering. Konsentrasjonen ligger godt under smaksterskelsgrensen for de ulike fuselalkoholene.



Figur 4.14 Dannelsesforløpet av fuselalkoholer i forsøksbryggene fermentert på 14 °C fram til kuldestabilisering. Gjennomsnittskonsentrasjonen av de ulike fuselalkoholene er oppgitt i ppm. Stamvørterens verdi er gitt ved døgn 0.

Figur 4.14 viser at forsøksbryggene fermentert på 14 °C har en jevn økning i fuselalkoholer fram til endt kuldestabilisering. Konsentrasjonen ligger under smaksterskelsgrensen for de

ulike fuselalkoholene, bortsett fra 3-metyl-1-butanol. Mellom døgn 7 og 8 kom konsentrasjonen for denne fuselalkoholen over smaksterskelsgrensen.

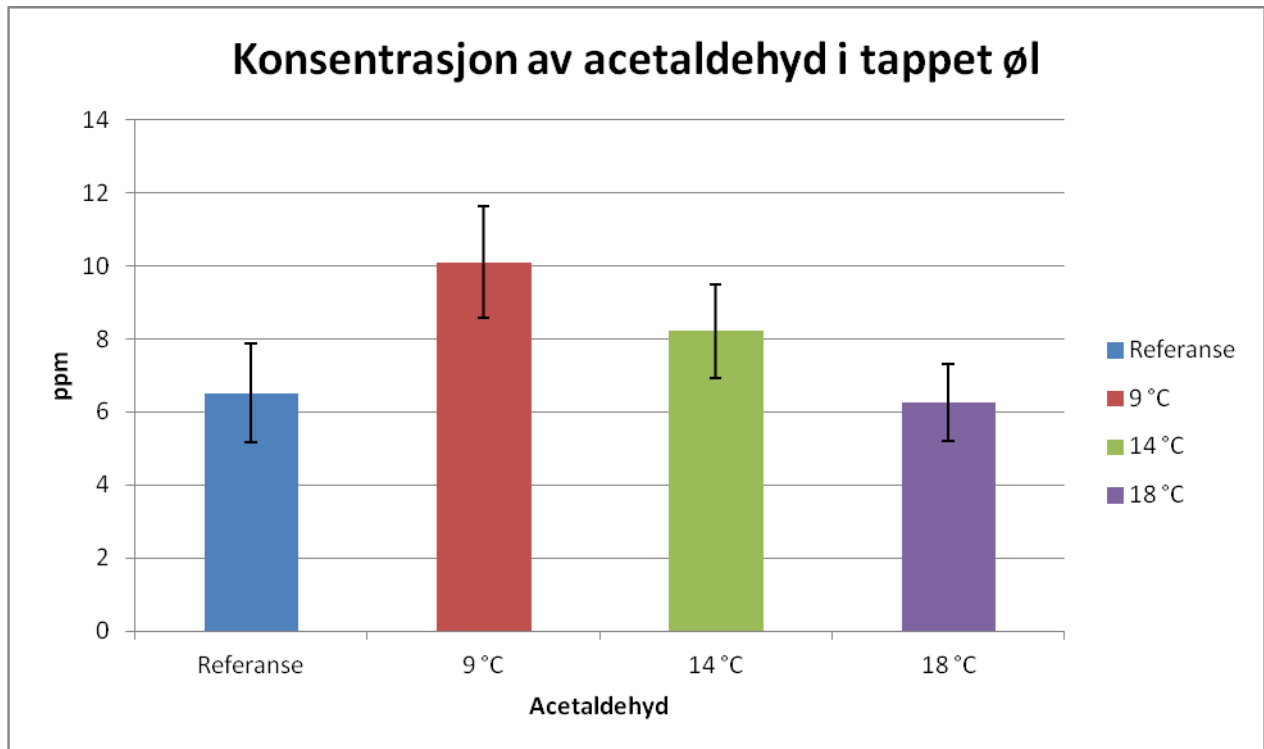


Figur 4.15 Dannelsesforløpet av fuselalkoholer i forsøksbryggene fermentert på 18 °C fram til kuldestabilisering. Gjennomsnittskonsentrasjonen av de ulike fuselalkoholene er oppgitt i ppm. Stamvørterens verdi er gitt ved døgn 0.

Figur 4.15 viser dannelse av fuselalkoholer fra forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Smaksterskelsgrensen for 3-metyl-1-butanol overstiges etter døgn 2. Det meste av dannet 3-metyl-1-butanol skjer fram til dag 2, mens de andre fuselalkoholene produseres jevnt fram til dag 3, hvor konsentrasjonen etter dette ikke øker noe nevneverdig.

4.4.4 Acetaldehyd

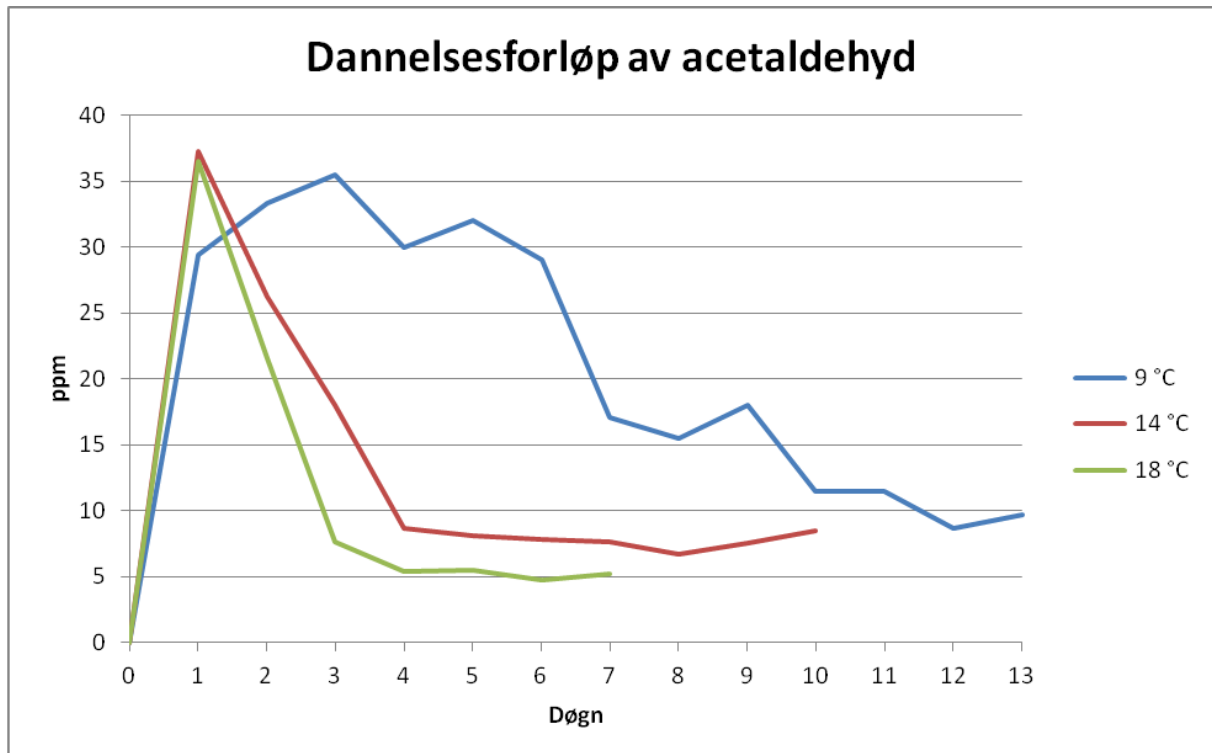
Fra HSGC analysen ble også acetaldehyd detektert. Konsentrasjoner av acetaldehyd i tappet forsøksbrygg, blir i figur 4.16 sammenlignet med referanseprøvene. Tallene i figur 4.16 er et gjennomsnitt av alle målingene fram til kuldestabilisering, med standardavvik.



Figur 4.16. Gjennomsnittskonsentrasjoner av acetaldehyd i forsøksbryggene og referansen fram til kuldestabilisering, med standardavvik. Konsentrasjonene er gitt i ppm.

Figur 4.16 viser at sluttkonsentrasjonen av acetaldehyd er lavest i forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Fra figuren kan man se en trend på at økte temperaturer gir en lavere sluttkonsentrasjon acetaldehyd.

Prøver fra forsøksbryggene ble tatt daglig, for å kunne se hvordan dannelsesforløpet av acetaldehyd utviklet seg. I figur 4.17 vises dannelsesforløpet av acetaldehyd fra forsøksbryggene fram til kuldestabilisering. Konsentrasjonene er gitt i ppm.



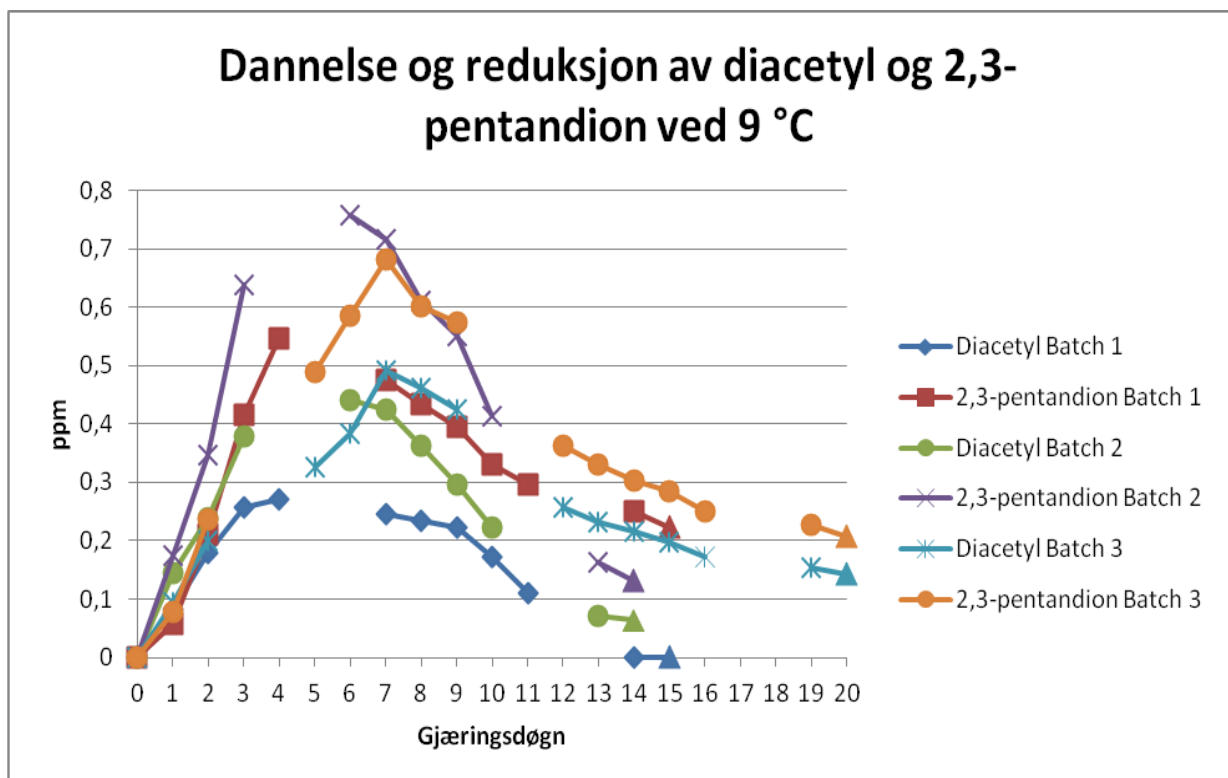
Figur 4.17 Forsøksbryggens dannelsesforløp av acetaldehyd. Stamvørterens verdi er gitt ved døgn 0.

Figur 4.17 viser at dannelsen av acetaldehyd skjer i starten av gjæringsforløpet hos alle forsøksbryggene. I forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C, starter reduksjonen av acetaldehyd etter døgn 1, mens forsøksbrygg fermentert på 9 °C begynner reduseringen etter døgn 3. Forsøksbrygg 18 °C reduserer konsentrasjonen acetaldehyd raskere enn forsøksbrygg 9 °C og 14 °C.

4.4.5 Produksjon og reduksjon av diacetyl og 2,3-pentandion

Ved bruk av HSGC på RECD, ble forsøksbryggene daglig, foruten helg, analysert for diacetyl og 2,3-pentandion. Analyser for diacetyl og 2,3-pentandion gjort på UMB ble ikke benyttet som resultater. Det vil være mest riktig å benytte resultater fra prøver analysert på samme dag som prøven er tatt.

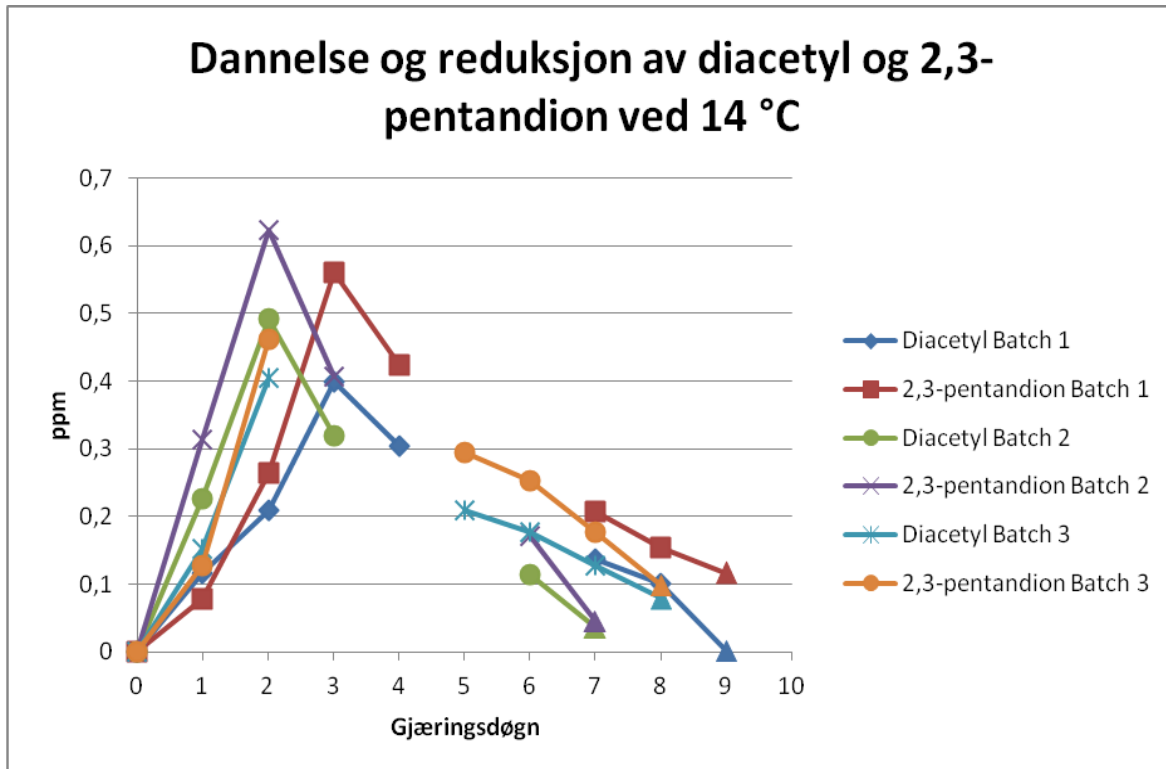
Resultater fra analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 9 °C er vist i Figur 4.18.



Figur 4.18. Utvikling av diacetyl og 2,3-pentandion ved fermenteringstemperatur 9 °C. Stamvørterens verdi vises ved dag 0, og siste måling for hver parameter er markert med en trekant. Siden HSGC analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblet.

Resultater fra dannelse og reduksjon av diacetyl og 2,3-pentandion av forsøksbryggene fermentert på 9 °C, viser at det ble dannet minst diacetyl ved bruk av DF2 i batch 1. Det er ingen stor forskjell i dannelse av diacetyl og 2,3-pentandion mellom batch 2 og batch 3, men batch 3 brukte betraktelig lengre tid på å redusere innholdet av disse komponentene. Grunnet tidsmangel måtte batch 3 tappes før smaksterskelsgrensen for diacetyl var nådd.

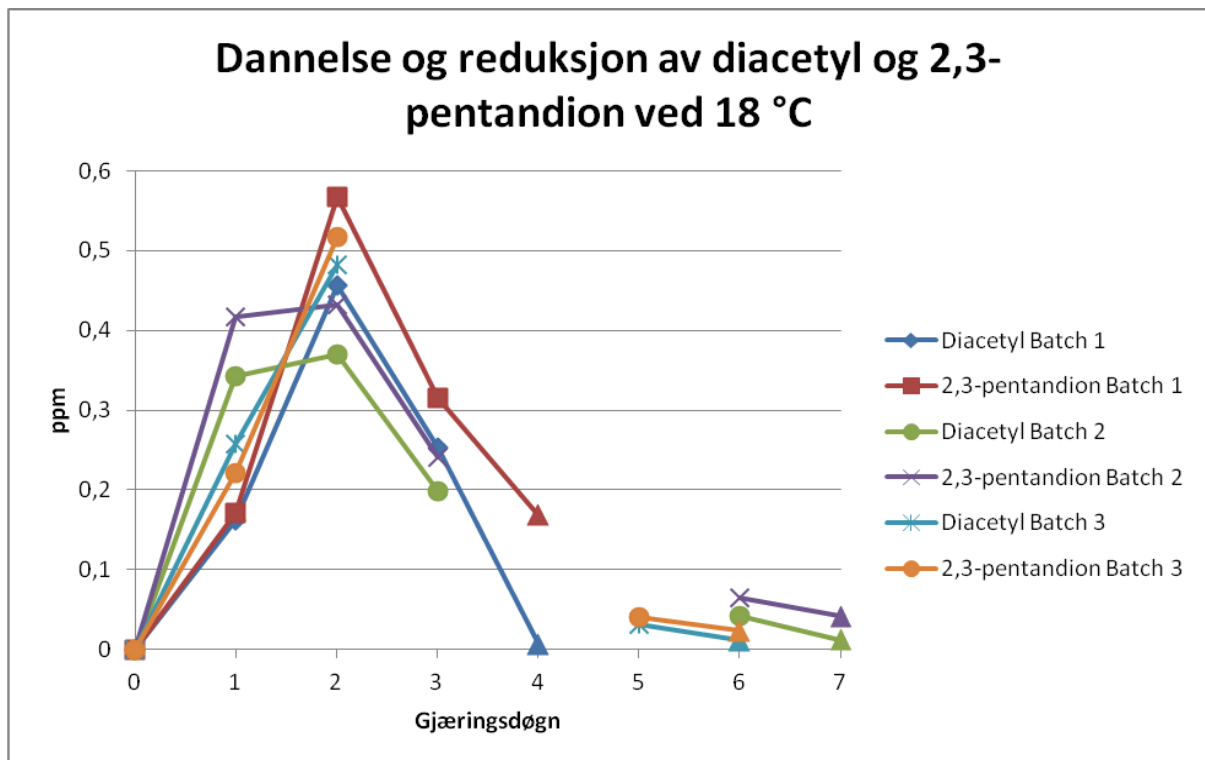
Resultater fra HSGC analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 14 °C er vist i Figur 4.19.



Figur 4.19. Utvikling av diacetyl og 2,3-pentandion ved fermenteringstemperatur 14 °C. Stamvørterens verdi vises ved dag 0, og siste måling for hver parameter er markert med en trekant. Siden analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblet.

Resultater fra dannelse og reduksjon av diacetyl og 2,3-pentandion av forsøksbryggene fermentert på 14 °C, viser at det ikke er stor forskjell på noen av batchene. Av de tre forsøksbryggene, var det batch 3 som dannet minst diacetyl og 2,3-pentandion, og batch 2 som dannet mest av disse stoffene.

Resultater fra HSGC analyser av forsøksbryggene som ble fermentert på 18 °C er vist i Figur 4.20.



Figur 4.20. Utvikling av diacetyl og 2,3-pentandion ved fermenteringstemperatur 18 °C. Stamvørterens verdi vises ved dag 0, og siste måling for hver parameter er markert med en trekant. Siden analyser ikke ble foretatt i helgene, er ikke linjene i grafen sammenkoblede.

Resultatene fra figur 4.20 viser at batch 2 dannet mindre mengder diacetyl og 2,3-pentandion i forhold til batch 1 og 3. Batch 1 reduserte diacetyl raskest.

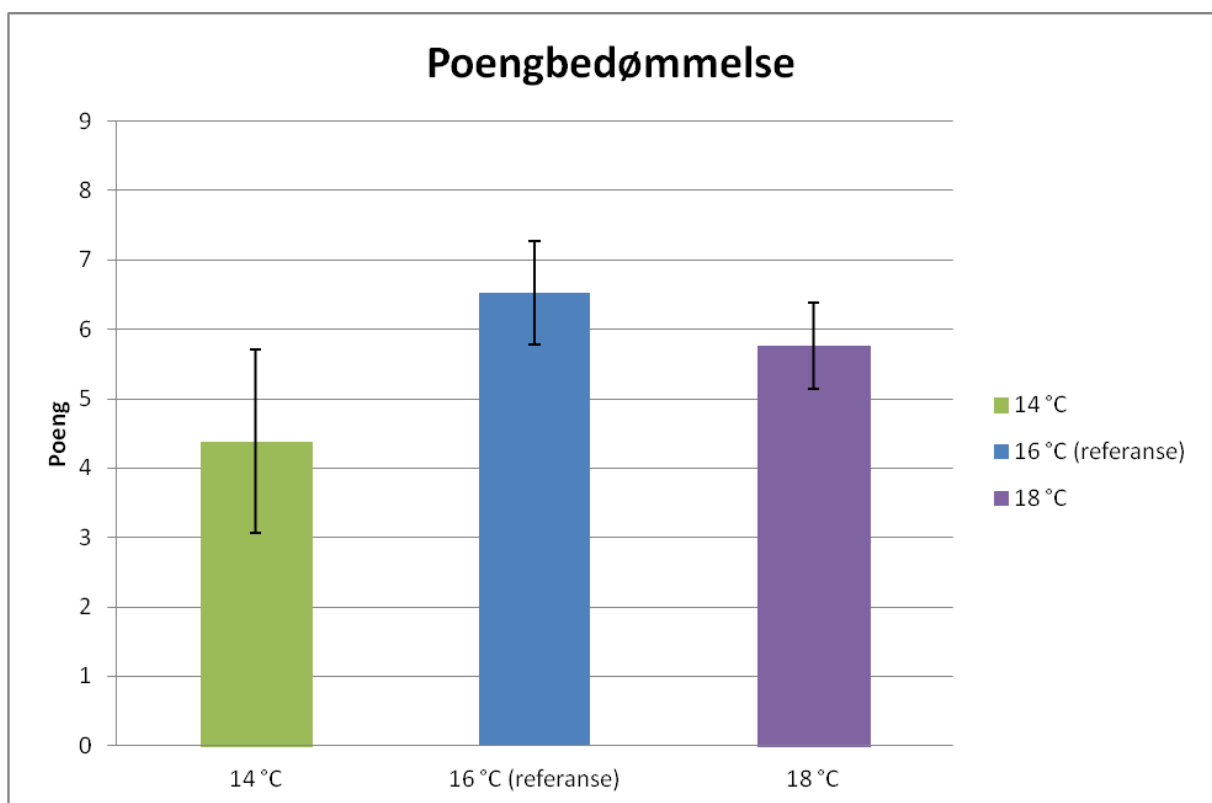
Det kommer tydelig fram at en fermenteringstemperatur på 18 °C gir raskt dannelse av diacetyl og 2,3-pentandion, men disse stoffene reduseres også raskere i forhold til forsøksbryggene fermentert på 9 °C og 14 °C. Den raskeste reduksjonen av diacetyl ved fermenteringstemperatur 9 °C tok 15 dager, mens ved fermenteringstemperatur 14 °C og 18 °C ble diacetyl redusert til under smaksterskelsgrensen på henholdsvis 7 og 4 dager.

Rådata fra HSGC analysene ved RECD er gitt i vedlegg 4.

4.5 Sensorikk resultater

Ved endt fermentering og kuldestabilisering, ble forsøksbryggene og referansen analysert sensorisk. Alle forsøksbryggene som ble fermentert ved 9 °C hadde ved hver sensorisk test kommentar på at ølet inneholdt diacetyl. Siden foregående resultater viser at fermentering på 9 °C er en dårlig industriell produksjonstemperatur, med tanke på fermenteringshastighet og esterdannelse, har man utelatt å ta med sensorikk resultater fra disse.

Ved sensorisk test fikk panelet utgitt et skjema, hvor de først skulle bedømme hvor godt de likte ølet, på en skala fra 1-9, der 9 var svært god, og 1 var udrikkelig. Gjennomsnittsbetømmelsen av dette er gitt i figur 4.21.



Figur 4.21. Poengbedømmelse av de ulike forsøksbryggene, samt referansene. Tallene brukt er gjennomsnitt med standardavvik av de tre sensoriske testene. Karakterene er gitt ut i fra hvor godt panelet likte bryggene, hvor de ulike karakterene betyr 9 = svært god, 8 = veldig god, 7 = god, 6 = tilfredsstillende, 5 = OK, 4 = ikke tilfredsstillende, 3 = dårlig, 2 = svært dårlig, 1 = udrikkelig.

Resultatene fra figur 4.21 viser at det sensoriske panelet foretrakk referansen best, som fikk en karakter mellom god og tilfredsstillende. Forsøksbryggene fermentert på 14 °C var minst likt.

I tillegg til å gi karakter på hvor godt dommerne likte ølet, skulle de også beskrive eventuelle usmaker som var i ølet, samt vektlegge hvor sterk graden av disse var. Graden av smaksfeil som ble detektert er et gjennomsnitt av total vurdering fra alle de tre sensoriske testene. I tillegg kunne dommerne legge til tilleggs kommentarer på de ulike ølprøvene. Resultatene fra detekterte smaksfeil og graden av disse er gitt i tabell 4.2– 4.4.

Tabell 4.2. Oversikt over detekterte smaksfeil, og graden av disse fra forsøksbryggene fermentert på 14 °C. Graden av hvor markante smaksfeilene var, er fra 0 til 5, hvor 0 = fraværende, 1 = svak, 2 = moderat, 3 = merkbar, 4 = markert, 5 = sterk.

14 °C	Diacetyl	Karamell	Krydder smak	Lys-smak (skunk)	Tomat-suppe	Oksidert	Plast-smak	Sur melk	Papir-smak	Kokt løk
Batch 1	0	2	2	1	0	2	2	2	2	0
Batch 2	0	1	2	2	0	2	3	2	2	0
Batch 3	1	0	2	1	1	3	2	0	2	3

Resultatene fra tabell 4.2 viser at totalt detekterte panelet over 10 ulike usmaker i forsøksbryggene fermentert på 14 °C. Ved den andre sensoriske analysen, altså batch 2, skrev en av dommerne at ølet smakte svett hest. Ved alle de tre sensoriske testene, skrev 3 av 7 dommere at forsøksbryggene fermentert på 14 °C manglet skum.

Tabell 4.3. Oversikt over detekterte smaksfeil, og graden av disse fra forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Graden av hvor markante smaksfeilene var, er fra 0 til 5, hvor 0 = fraværende, 1 = svak, 2 = moderat, 3 = merkbar, 4 = markert, 5 = sterk.

18 °C	Diacetyl	Metallisk	Plast	Sur smak	Oksidert	Lyssmak	Saltsmak
Batch 1	1	2	2	2	2	1	3
Batch 2	0	1	2	3	2	1	1
Batch 3	0	0	2	2	2	2	2

Resultatene fra tabell 4.3 viser at panelet detekterte 7 ulike usmaker ved sensorisk analyse av forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Ved alle de tre sensoriske testene, skrev 2 av 7 dommere at forsøksbryggene fermentert på 18 °C manglet skum.

Tabell 4.4. Oversikt over detekterte smaksfeil, og graden av disse fra referansene. Graden av hvor markante smaksfeilene var, er fra 0 til 5, hvor 0 = fraværende, 1 = svak, 2 = moderat, 3 = merkbar, 4 = markert, 5 = sterk.

Referanse	Metallisk	Gjærsmak
Batch 1	1	1
Batch 2	1	0
Batch 3	1	0

Resultatene fra tabell 4.4 viser at panelet detekterte to ulike usmaker ved sensorisk analyse av referansen.

Ved å sammenligne tabell 4.2 – 4.4, ser man at referansen har svært få smaksfeil, mens forsøksbryggene har et høyere antall ulike smaksfeil. Rådata fra sensoriske analyser er gitt i vedlegg 5.

Etter at det hadde blitt gitt bedømmelse på likhet og smaksfeil, skulle panelet bedømme hvilke ølprøver de syntes inneholdt mest ester. Ølprøvene skulle rangeres fra 1-4, hvor 4 var den prøven dommeren syntes inneholdt mest ester, og 1 var minst innhold av ester. Resultatene fra dette ble brukt for å måle om det var signifikante forskjeller på referansene mot forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C. Resultatene fra T-testene blir gitt i tabell 4.5.

Tabell 4.5 Statistiske analyser fra sensorisk bedømmelse av esterkonsentrasjoner i referansebryggene og forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C.

T-test	Kombinasjon	Signifikansnivå	p-verdi	Signifikant
1	Referanse kontra 14 °C	0,05 (5 %)	0,00005	Ja
2	Referanse kontra 18 °C	0,05 (5 %)	0,68	Nei

Resultatene fra tabell 4.5 viser at det var signifikante forskjeller mellom referanseprøvene og forsøksbryggene fermentert på 14 °C. Resultatene viser også at det ikke var signifikante forskjeller mellom referansen og forsøksbrygg fermentert på 18 °C.

Rådata fra esterbedømmelse er gitt i vedlegg 6. Skjema brukt i den sensoriske analysen er gitt i vedlegg 7.

4.6 Mikrobiologi

Mikrobiologiske tester ble utført for å detektere mikrobiologisk aktivitet fra tappet forsøksbrygg. Resultatene fra de mikrobiologiske testene er gitt i tabell 4.2.

Tabell 4.6. Resultater fra mikrobiologisk test på tappet øl.

	NBB®-Agar	YM agar	UBA agar
Hva detekteres	Ølskadelige bakterier	Villgjær og mugg	Generell vekst
Batch 1	Ikke påvist	Ikke påvist	Overgrodd
Batch 2	Ikke påvist	Ikke påvist	Overgrodd
Batch 3	Ikke påvist	Ikke påvist	Overgrodd

Tabell 4.2 viser at ølskadelige bakterier, villgjær og mugg ble ikke detektert. Alle batchene hadde vekst i UBA medium, dette grunnet at tappet øl var ufiltrert, og veksten i UBA stammer antagelig fra *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* 2036.

5 Diskusjon

I denne masteroppgaven ble Dahls Pils brygget i småskala ved ulike temperaturer, gjærmengde og gjærgenerasjoner. I forsøksbryggene ble det brukt 2,5 ganger mer gjær enn i vanlig produksjon. Dette tilsvarer rundt 20 millioner gjærceller pr ml vørter. Vørteren som ble benyttet stammet fra produksjonen fra RECD. Småskalabryggene ble sammenlignet med det aktuelle brygget vørteren ble tatt i fra, for å finne hvordan endringer i temperatur, gjærkonsentrasjon og trykk kan affekttere ølets sammensetning av ulike flyktige komponenter som ester, fuselalkoholer og acetaldehyd.

Daglig ble forsøksbryggenes fermenteringsforløp målt etter ekstraktinnhold, forgjæringsgrad, alkoholinnhold, pH og innhold av diacetyl og 2,3-pentandion. Prøver ble tatt ut og fryst ned daglig ved samme tidspunkt, for å få et 24 timers intervall mellom hvert prøveuttak. Nedfryste prøver ble sendt til UMB, for senere å analysere konsentrasjonen av flyktige komponenter.

5.1 Stamvørter

Ved uttak ble stamvørteren analysert for ekstraktinnhold, alkoholinnhold, pH og innhold av diacetyl og 2,3-pentandion, for å få et startpunkt for de ulike forløpene. Målingene for stamvørterverdier tatt på RECD var korrekte, da pH verdien i stamvørteren var høy, og verken alkohol eller diacetyl/2,3-pentandion ble påvist. Ved analyse av flyktige aromakomponenter på UMB, visste det seg at referanse fra batch 1 hadde høye verdier av acetaldehyd. Dette kommer antagelig som følge av en uønsket fermentering, før referanseprøven ble fryst ned. Prøvene ble fryst ned med en gang etter prøveuttaket, så hvordan denne fermenteringen kunne skje er uklar. Referanseprøven for batch 2 ble aldri funnet, og hvordan denne forsvant er uvisst. Dette medførte at kun referanseprøve fra batch 3 sine verdier ble benyttet i dette forsøket. Dette har imidlertid ikke store konsekvenser for de grafiske resultatene, da de ulike ekstraktkonsentrasjonene i hver referanse ikke var av stor forskjell. Ekstraktkonsentrasjonene i referansene varierte fra 15,12 % Plato - 15,33 % Plato.

5.2 Fermenteringsforløpet

Resultatene fra fermenteringsforløpet viser at høyere temperaturer gir et raskere fermenteringsforløp. Dette kommer av at høyere temperaturer gir raskere gjærmetabolisme, og dermed raskere produksjon og reduksjon av ulike parametre. Fermenteringstemperaturer for *Saccharomyces cerevisiae* er normalt mellom 14 °C og 25 °C (Kunze 2010).

Fermentering på 9 °C visste seg å være langt fra optimal. Den brukte lang tid, i forhold til de andre bryggene på å redusere innholdet av diacetyl og 2,3-pentandion. Referansetankene brukte i snitt 8 dager på å gjære ut, mens fermenteringstiden på 9 °C forsøksbrygg tok i snitt 12 dager. Ved sekundærfermenteringen i batch 3, klarte ikke gjærgenerasjon DF4 å redusere innholdet til under smaksterskelsgrensen for diacetyl. Selv om en fermenteringstemperatur på 9 °C ikke er ideell for *Saccharomyces cerevisiae*, så indikerer dette likevel at gjærgenerasjonen har noe å si på hvor godt gjæren kan utføre et fermenteringsforløp, og at brukt gjær til slutt må erstattes med ny.

Siden 9 °C er en ugunstig fermenteringstemperatur, blir ikke disse forsøksbryggene videre kommentert i vurderingen. Det nevnes likevel kort at innholdet av acetaldehyd var høyere enn de andre forsøksbryggene og referansene. pH verdiene i 9 °C bryggene var høyere enn de andre bryggene, som også indikerer ugunstige forhold for gjæren, da reduksjon av disse parameterne avhenger av en tilfredsstillende gjærmetabolisme (Kunze 2010).

Forsøksbrygg fermentert på 14 °C brukte omtrent like mange døgn som referansen på fermenteringen. Som nevnt tidligere, fermenterer RECD Dahls Pils ved 16,2 °C. Siden økte temperaturer gir en raskere gjærmetabolisme, burde i prinsippet referansen fra gjæringstanken vært ferdigfermentert før forsøksbrygget fermentert på 14 °C (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Dette var ikke tilfellet, da de var ferdigfermentert etter like mange dager. Grunnen til at disse to var ferdig fermentert etter like mange dager, kan skyldes at den økte gjærkonsentrasjonen i forsøksbryggene gav en raskere fermenteringshastighet, sammenlignet med vanlig gjærtilsetning i produksjon av Dahls Pils. En økt gjærmengde vil gi en raskere fermentering (Kunze 2010). Det kan også skyldes at referansene blir fermentert under trykk, noe som kan inhibere gjæren noe (Verstrepen et al. 2003).

Forskjellen mellom forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C var ikke store. Som forventet, ga økt fermenteringstemperatur raskere nedgang i ekstrakt og pH, og raskere oppgang i alkoholprosent. Forsøksbryggene fermentert ved 18 °C var ferdig fermentert rundt en dag raskere enn forsøksbryggene som fermenterte på 14 °C.

Tidsperspektivet som er forklart, er antagelig ikke helt nøyaktig. Siden ølprøvene ble ansett som ferdig fermentert når forgjæringsgraden (RDF) var 67 % ±4 %, og uforandret to dager på rad. Hvis første måling av en godkjent forgjæringsgrad ble målt på en fredag, ble den likevel ikke kuldestabilisert før etter målingen på mandag, siden det ikke var noen aktivitet ved

RECD i helgene. Skulle man ha fått nøyaktige målinger på fermenteringstiden, burde målinger ha forekommet også i helgene.

pH verdien hos disse forsøksbryggene var ved endt fermentering pH 4,4. Forsøksbryggene ved 18 °C brukte to dager mindre på å nå denne pH verdien. Dette skyldes mest sannsynlig raskere metabolsk aktivitet, som fører til et raskere opptak av ioner, og dannelselse av organiske syrer (Kunze 2010).

5.3 Ester

Resultatene fra gjæringsforløpet, viser at ester dannes i primærfermenteringen. Dette gjelder for alle de flyktige aromakomponentene som det ble analysert for med HSGC. Med det menes at utviklingen og dannelselse av de ulike komponentene skjer samtidig som gjæren fermenterer ekstrakt (Kunze 2010).

Forsøksbryggene fermentert på 18 °C nådde sin høyeste konsentrasjon av isoamylacetat og etylacetat ved dag 3, mens forsøksbryggene fermentert på 14 °C nådde sin høyeste konsentrasjon av disse esterene ved dag 5. Siden man ikke tok prøver fra referansetankene under fermenteringsforløpet, kan man ikke si ved hvilket tidspunkt i fermenteringsforløpet konsentrasjonen av ester i gjæringstankene var høyest, men man antar at konsentrasjonen er høyest etter 3-5 dager. Denne antagelsen kommer av at fermenteringstemperaturen i gjæringstankene ved RECD er 16,2 °C, som er en temperatur mellom de to nevnte forsøksbryggene. Det ble også påvist små konsentrasjoner av isobutyl acetat, langt under smaksterskelsgrensen. Den kan påvirke aromabildet på Dahls Pils noe, da små mengder ester under smaksterskelsgrensen kan ha synergistisk effekt (Verstrepen et al. 2003).

Fra resultatene ser man også at konsentrasjonen i ester hos forsøksbryggene går ned, etter at toppkonsentrasjonen er nådd. En høyere konsentrasjon ester forsvinner ved forsøksbryggene fermentert på 18 °C enn forsøksbryggene fermentert på 14 °C. Dette kan indikere at noe ester har forsvunnet som følge av fordamping. Siden ester har lave kokepunkt, kan noe ester ha fordampet vekk ved sekundærfermenteringen. Teorien tilsier at varmere fermenteringstemperaturer vil produsere mer ester. Selv om forsøksbryggene fermentert på 14 °C ble målt til å ha dannet mer ester enn forsøksbryggene fermentert på 18 °C, så trenger ikke dette være tilfellet. 18 °C er en høyere temperatur enn 14 °C, noe som kan ha ført til at større konsentrasjoner ester har fordampet underveis i fermenteringsforløpet (Verstrepen et al. 2003). Man kan derfor ikke si nøyaktig hvilken av temperaturene som produserte mest ester, men man ser at konsentrasjonen mellom forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C ikke

er store. Skulle man ha funnet ut av dette, burde man ha fermentert forsøksbryggene i lukkede systemer, slik at esterne ikke kunne fordampet noe sted.

Dette viser likevel at fermentering ved 16,2 °C, som er fermenteringstemperaturen for Dahls Pils, antakelig er en god temperatur for høy dannelse av ester, og at det mest sannsynlig er de prosessstekniske endringene som ble gjort i 1981, i form av trykk på tankene og lavere gjærtilsetning, som har forårsaket et lavere innhold ester.

Ut i fra dette kan man ikke ta sikre slutninger, siden referansene ble fermentert på trykktanker, og forsøksbryggene ble fermentert med en høyere gjærdosering. Man vet fra teorien at trykk i fermenteringen senker syntetisering av ester, og at økt gjærtilsetning gir en raskere fermenteringsprosess (Kunze 2010). Man kan derfor ikke dra en sikker slutning på at den økte gjærmengden i forsøksbryggene var årsak til økt esterproduksjon, eller om det er trykket på gjæringstankene som senker esterproduksjonen. Dette kan også være en kombinasjon av begge hendelser, men dette blir kun spekulasjon. Skulle man ha fått sammenlignet dette, måtte også referansebryggene i produksjonen blitt fermentert med høyere gjærkonsentrasjoner.

Dannelse av ester og fuselalkoholer skjer samtidig i fermenteringsforløpet. Forskjellen er at fuselalkoholer dannes i høyere konsentrasjoner. Kunze skriver at økt gjærtilsetning reduserer dannelsen av fuselalkoholer, men øker konsentrasjonen av dannet ester (Kunze 2010). Dette er forvirrende, og teorien på dette er også uklar, da produksjon av ester er en komplisert prosess (Kunze 2010). Det har også blitt rapportert at økt gjærtilsetning senker esterproduksjonen, da et høyt celletall tidlig i fermenteringen raskt bruker opp energiresursene. Dette fører til mindre dannelse av acetyl-CoA, og da også et lavere innhold av ester. Man kan også se på det andre veien. Ved en høy gjærtilsetning forventer man redusert gjærvekst, grunnet at hver gjær-celle har mindre tilgang på oksygen, som igjen vil resultere i en mindre total vekst av gjær. Det kan føre til at acetyl-CoA blir brukt til syntetisering av ester, i stedet for vekst (Boulton og Quain 2008). Det virker som om de lærde strider på dette temaet, og eneste måten for å finne ut om økt gjærtilsetning øker eller senker dannelse av ester, vil være å utføre et forsøksbrygg i storskala ved RECD, med økt gjærtilsetning. Det gjentas at dannelse av ester er svært avhengig av benyttet gjærstamme (Verstrepen et al. 2003), noe som kan være årsaken til uenighetene i teorien om økt gjærtilsetning øker ester-konsentrasjonene eller ikke. Fra et erfaringsmessig ståsted, ser man at økte gjærtilsetninger gir mer ester (Roger Løe, personlig meddelelse 2013).

Det ble ikke oppdaget store variasjoner i konsentrasjon av produsert ester ut fra de ulike gjærgenerasjonene som ble brukt i de ulike forsøksbryggene. Man kan ikke ut fra resultatene se at en eldre gjærgenerasjon produserer mindre ester, da den eldste gjærgenerasjonen (DF4) brukt i dette forsøket produserte mest isoamylacetat og etylacetat.

Som nevnt tidligere, er isoamylacetat den viktigste esteren i Dahls Pils. Snittkonsentrasjonen av isoamylacetat før nedbrygging i referansebryggene var rundt 3,3 ppm. Siden bryggene må nedbrygges etter fermenteringsprosessen, vil konsentrasjonen av isoamylacetat i salgsvare bli lavere enn de målte konsentrasjonene. En gjennomsnittlig alkoholprosent i Dahls Pils før nedbrygging er rundt 6,5 %. Bryggene må nedbrygges til et alkoholnivå på 4,6 %. Dette gjør at konsentrasjoner av aromakomponenter må multipliseres med en faktor på 0,7, for å få den faktiske konsentrasjonen som er i salgsvare. Dette medfører at isoamylacetat innholdet i Dahls Pils vil være rundt 2,3 ppm i salgsvare ($3,3 \text{ ppm} \cdot 0,7 = 2,3 \text{ ppm}$). En konsentrasjon på 2,3 ppm er over smaksterskelsgrensen for isoamylacetat, men konsentrasjon kunne antagelig ha vært høyere for å imøtekomme kravene for pils som ønsker en sterk esterprofil.

For å se hva som skjer med ester konsentrasjonene etter fermentering, ble referanseprøvene analysert for isoamylacetat og etylacetat etter fermentering, og før og etter kuldestabilisering. Resultatene viser at svært lave konsentrasjoner av ester forsvant. Man så en nedgang i konsentrasjoner på rundt 0,1 ppm isoamylacetat, og 2 ppm etylacetat etter endt kuldestabilisering. Ved kuldestabilisering blir temperaturen i brygget senket til $-1,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$, noe som medfører at esterne er langt unna sitt kokepunkt. Dessuten foregår kuldestabiliseringen i et lukket system, slik at konsentrasjoner av ester vil ha vanskeligheter med å fordampe. Ølet har mest ester ved slutten av primærfermenteringen. Et mulig virkemiddel for å ikke miste noe ester etter primærfermenteringen, er å kjøle ned ølet noe, for å redusere muligheten for en eventuell fordamping (Verstrepen et al 2003).

5.4 Fuselalkohol

Resultatene fra dannelse av fuselalkoholer ble som forventet. Fuselalkoholene ble dannet samtidig som esterene, ved primærfermenteringen. Høyere temperaturer gav et høyere innhold av fuselalkoholer, og dette stemmer overens med teorien (Kunze 2010).

I resultatene kommer det også frem at forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C danner mer fuselalkoholer enn bryggene fra gjæringstankene. Dette bekrefter at trykkfermentering reduserer produksjonen av fuselalkoholer, da bryggene fra gjæringstanken fermenterer på 16,2 °C. Dette er det gunstige med trykkfermentering, da man kan holde fuselalkoholkonsentrasjonene på lave nivåer (Kunze 2010).

Hovedgrunnen for å måle dannelsesforløpet for fuselalkoholer var å se når i fermenteringsprosessen de blir dannet. Resultatene viser at de blir dannet samtidig som estere. Fra forsøksbryggene fermentert på 14 °C, ser man at konsentrasjonen av isoamylacetat er høyest ved dag 5, mens fuselalkoholnivået fortsetter å stige etter dag 5. Dette stemmer overens med teorien, som tilsier at 80 % av fuselalkoholdannelsen skjer i primærfermenteringen (Kunze 2010). Dette er kanskje det viktigste resultatet i denne oppgaven. Hvis ester konsentrasjonen er høyest etter 5 dager ved fermentering på 14 °C, og fuselalkoholkonsentrasjonene stiger etter dette, burde det være mulig å redusere konsentrasjonen av fuselalkoholer, uten at dette går utover dannelsen av ester.

Ved å legge sammen konsentrasjonen av de fire aromatiske fuselalkoholene som ble målt fra referansen i dette forsøket, ser man at den totale konsentrasjonen av 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanol og 1-propanol til sammen utgjør ca 110 ppm i Dahls Pils produsert ved RECD. Ved å multiplisere denne konsentrasjonen med fortynningsfaktoren 0,7, finner man ut at fuselalkoholinnholdet i salgsvare er 77 ppm. Dette betyr at konsentrasjonen av fuselalkoholer antagelig ikke bør øke noe mer, siden total konsentrasjonen av fuselalkoholer ikke bør overgå 100 ppm (Kunze 2010), og at ølet mest sannsynlig inneholder flere fuselalkoholer enn de man analyserte for. Skal man øke ester konsentrasjonene i Dahls Pils ved å fermentere med høyere temperaturer, må man også ha i bakhodet at økte temperaturer kan gi økte konsentrasjoner av fuselalkoholer.

5.5 Acetaldehyd

Resultatene fra målinger med HSGC, viser at høyere fermenteringstemperaturer gir rask produksjon, og rask nedgang av acetaldehyd. Acetaldehyd dannes i starten av fermenteringen, og senere i fermenteringsforløpet blir de redusert til fuselalkoholer (Kunze 2010). Som forventet gikk konsentrasjonen opp ved starten av fermenteringen, og etter et døgn begynte konsentrasjonene å synke. Det var ingen store forskjeller i toppkonsentrasjon mellom forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C, men forsøksbrygg fermentert på 18 °C reduserte konsentrasjonen til laveste verdi av acetaldehyd etter tre dager. Dette brukte forsøksbrygg 14 °C 4 dager på. Fra dette ser man at produksjon og reduksjon av acetaldehyd følger gjærmetabolismen, og man ser at høyere fermenteringstemperaturer dannet og forbrukte acetaldehyd raskest (Kunze 2010).

Siden man ikke daglig tok prøver av referansebryggene, kunne ikke dannelsesforløpet av acetaldehyd måles, kun sluttkonsentrasjonen. Sluttkonsentrasjonen av acetaldehyd i referansetankene var rundt 6 ppm. Dette er ansett som en passende konsentrasjon, da øl bør ha konsentrasjoner under 8-10 ppm for acetaldehyd (Kunze 2010)

Hadde man målt dannelsesforløpet av acetaldehyd, kunne man fått enda en indikasjon på hvordan utviklingen av aromakomponenter skjer i fermenteringer under trykk. Kunze skriver at økt gjærdosering gir en høyere konsentrasjon av acetaldehyd (Kunze 2010). Dette kan være grunnen til hvorfor konsentrasjonen av acetaldehyd var relativt lav i referansen, sammenlignet med forsøksbryggene, da forsøksbryggene ble fermentert med en gjærdosering som var 2,5 ganger høyere enn referansen.

5.6 Mikrobielle analyser

Mikrobiologiske analyser ble utført for å påvise om ølet hadde blitt kontaminert av uønskede mikroorganismer. Hvis bakteriell kontaminasjon ble påvist, kunne dette være en årsak til eventuelle usmaker i ølet detektert ved sensorisk test. Dette var ikke tilfellet, da vekst ikke ble påvist i verken YM agar eller NBB®-Agar. Det betyr at verken villgjær, mugg eller ølskadelige bakterier som *Lactobacillus* og *Pediococcus* hadde kontaminert forsøksbryggene. Ved bruk av mediet UBA, var petriskålene overgrodd. Dette kommer av at UBA brukes til å analysere filtrerte ølprøver, hvor en påvisning vil indikere et brudd i en hygienisk barriere, etter filtrering. I dette forsøket var ikke forsøksbryggene filtrert, noe som er en sannsynlig årsak til at petriskålene med UBA var overgrodd, da også gjær vokser i dette mediet.

5.7 Sensorikk

For å se hvordan produksjonsendringene i forsøksbryggene påvirket kvaliteten på Dahls Pils, ble forsøksbryggene og referansene sensorisk evaluert. De sensoriske testene var delt inn i to deler. Den første delen omhandlet hvor godt dommerne likte ølet, på en skala fra 1-9. Resultatene fra dette viser at referansebryggene ble foretrukket fremfor forsøksbryggene fermentert på 14 °C og 18 °C. I denne delen av analysen skulle dommerne også beskrive og klassifisere graden av eventuelle smaksfeil. Her kom det fram at det var et betydelig antall usmaker fra forsøksbryggene, i forhold til referansebryggene, som hadde få usmaker. Dette kan stamme fra den daglige eksponeringen av oksygen som ble påført forsøksbryggene ved uttak av prøvemateriale. Oksygen i øl bidrar med at ølet raskere oksiderer (Oliver 2011). I tillegg til usmaker detekterte panelet at skumkvaliteten på forsøksbryggene var dårlig. Dette kan skyldes det faktum at oksygen kan ha en destruktiv effekt på skumstabilitet i øl (King 2007).

Fra de sensoriske testene kom det fram at panelet syntes forsøksbryggene fermentert på 14 °C hadde flere usmaker enn forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Dette kan forklares med at 14 °C brukte lengre tid på fermenteringen, og flere prøveuttak ble tatt fra disse forsøksbryggene. Forsøksbryggene kom også i kontakt med luft og lys ved fjerning av gjær og ved tapping på flaske, da dette ble gjort manuelt. Ved eksponering av lys, kan øl raskt utvikle lyssmak/skunk, som følge av fotodekomponering av iso- α -syrer (Heyerick 2001), og skape endringer i øl etter 10 sekunder med lyseksponering (Oliver 2011). Dette er antagelig grunnen for lyssmaken som sensorisk ble detektert i forsøksbryggene. Det er lite sannsynlig at forsøksbryggene ble eksponert for lys ved fermentering, da man var nøye med å tildekke gjæringsbøttene mens fermenteringen pågikk.

I referansebryggene ble det påvist få usmaker, da disse ble brygget i et lukket system, hvor ølet ikke blir eksponert for oksygen eller lys. Referansebryggene ble imidlertid eksponert for noe oksygen og lys ved tapping, men antagelig ikke nok, siden usmaker som kan stamme fra slik eksponering ikke ble avdekket ved sensorisk analyse av referansebryggene.

Siden forsøksbryggene hadde et betydelig antall smaksfeil, kan ikke de sensoriske resultatene fra forsøksbryggene sammenlignes med referansen. Skulle man ha sammenlignet forsøksbrygg opp mot referansebrygg, burde også forsøksbryggene blitt produsert i storskala, slik at man hindrer dannelse av ølfeil og uønskede smakskomponenter.

I del to av de sensoriske analysene, var målet å se om panelet kunne påvise konsentrasjonsforskjeller i ester mellom forsøksbryggene og referansene. Resultatene fra del to ble brukt for å se om det var signifikante forskjeller mellom referansene og forsøksbryggene. Etter hver sensorisk test ble smakingen diskutert, for å se om det var andre meninger om ølet som ikke ble nedskrevet på svarskjemaet.

Resultatene viste at det var en signifikant forskjell mellom referansene og forsøksbryggene fermentert på 14 °C. Panelet bedømte at referansen hadde en høyere konsentrasjon ester enn 14 °C. I følge HSGC analysene var forsøksbryggene fermentert på 14 °C de bryggene som inneholdt den høyeste konsentrasjonen ester. I diskusjonen etter smakingen, ble det nevnt at 14 °C bryggene hadde en sterk og udefinerbar lukt, som gjorde det vanskelig å detektere ester. Som nevnt tidligere, så kommer dette høyst sannsynlig fra usmaker dannet fra eksponering av luft og lys.

Resultatene viste at det ikke var signifikant forskjell i ester konsentrasjoner mellom referansene og forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Dette i tross for at HSGC analysene viser at forsøksbryggene fermentert på 18 °C inneholder en klart høyere konsentrasjon ester. Også her var det usmaker som sto i veien for deteksjon av ester. Det var likevel mindre usmaker i forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Dette kan være årsaken til at panelet bedre klarte å detektere ester, i forhold til forsøksbryggene fermentert på 14 °C.

En annen årsak til at panelet ikke kjente de forhøyede ester konsentrasjonene, kan være grunnet det høye innholdet av fuselalkoholer. Siden verdier over 100 ppm for fuselalkoholer kan gi en ubehagelig smaksopplevelse (Kunze 2010), antar man at dette også hemmet fremhevelsen av ester, da konsentrasjonen av målte fuselalkoholer i forsøksbryggene var godt over 100 ppm.

Siden forsøksbryggene inneholdt mange smaksfeil, mener undertegnede at det blir feil å sammenligne disse opp mot Dahls Pils, produsert ved RECD. Skal man sensorisk sammenligne øl produsert på ulike temperaturer, må produksjonsprosessen være identisk for alle bryggene, foruten fermenteringstemperaturen, og utføres i storskala, eller sørge for at prøveuttak, fjerning av gjær og tapping skjer uten luft og lys til stedet.

Undertegnende anser likevel ikke dette som en mislykket sensorisk vurdering, da man nå vet hva man ikke skal gjøre. Med dette ser man hvor viktig det er, med tanke på øl kvaliteten, at fermenteringen skjer under oksygenfrie forhold, slik at man hindrer usmaker i å oppstå.

5.8 Oppsummering og forslag til videre arbeid

Dette kapitlet oppsummerer hva som kan gjøres i produksjonen, som kan føre til økte konsentrasjoner av isoamylacetat i Dahls Pils. Oppsummeringen baserer seg på teori, og resultater fra forsøket. Hvis endringer i produksjonsutførelsen av Dahls Pils skal gjøres, må disse tilrettelegges og tilpasses bedriften, slik at produksjonsprosessen kan utføres på enklest og rimeligst mulig måte.

Fra resultatene fant man ut at forsøksbryggene fermentert på 14 °C dannet mer ester enn forsøksbryggene fermentert på 18 °C. Det vil derfor antagelig ikke være hensiktsmessig å øke fermenteringstemperaturen for Dahls Pils, hvis målet er økte konsentrasjoner av isoamylacetat.

Ved å summere opp resultatene, har man kommet fram til en mulig løsning som kan øke mengden isoamylacetat, uten at fuselalkoholkonsentrasjonen øker i stor grad. Denne løsningen bør imidlertid testes i storskala, og sensorisk analyseres og godkjennes, for å se om endringene faktisk gir en høyere konsentrasjon isoamylacetat. Det er negativt hvis Dahls Pils får for store sensoriske endringer. Hvis forbrukeren detekterer store endringer i et produkt han er vant med, kan dette føre til at forbrukeren velger et annet produkt.

Det gjentas at dette er en mulig løsning som sannsynligvis kan gi økte konsentrasjoner isoamylacetat, men dette kan ikke garanteres.

Denne mulige løsningen omfatter å senke mottrykket på mottrykksventilen i starten av fermenteringen. Trykket kan også reduseres ved og ikke fylle CCT tankene like fulle som de blir gjort i dag, da mer væske vil gi mer trykk i bunnen av tanken, som igjen gir en mer stresset gjær (The Scandinavian School of Brewing 2010a). Det vil være mindre økonomisk gunstig og ikke fylle tankene opp til dagens nivå, da man ikke vil få utnyttet tankenes kapasitet til det fulle.

Redusert trykk kan gi positive utfall i Dahls Pils, slik som økt esterdannelse og redusert gjærsedimentering i starten av fermenteringsforløpet, grunnet en mindre stresset gjær. Et lavere trykk vil antagelig føre til økte fuselalkoholkonsentrasjoner. For å redusere fuselalkoholkonsentrasjonene, anbefales det å senke fermenteringstemperaturen til rundt 14 °C. Denne temperaturen blir nevnt kun for å komme med et forslag til fermenteringstemperatur, og er ikke nødvendigvis optimal fermenteringstemperatur ved senking av trykk. Senkingen av fermenteringstemperatur trenger ikke å gi et lengre

fermenteringsforløp, da resultatene tilsier at redusert trykk antagelig ikke vil hemme gjæren i like stor grad som med nåværende trykk. Det skal også nevnes at et lavere trykk i primærfermenteringen vil mest sannsynlig føre til mindre kullsyre/løst karbondioksid i det ferdige ølet (The Scandinavian School of Brewing 2010a).

I resultatene kom det fram at forsøksbryggene fermentert på 14 °C dannet isoamylacetat fram til dag 5, mens fuselalkoholnivået fortsatte å stige etter dag 5. Dette indikerer at fuselalkoholkonsentrasjon i øl kan begrenses, uten at det går utover ester-konsentrasjonen. Fuselalkoholkonsentrasjonen kan reduseres ved å påføre mer trykk etter endt primærfermentering, eller senke temperaturen ytterligere etter endt primærfermentering. Økning i trykk ved endt primærfermentering må kalkuleres i forhold til når mottrykksventilens mottrykk må økes, slik at gjæren rekker å danne nok karbondioksid til at det hele tatt skal skapes et stort nok trykk i tanken. Økning av trykk eller senking av temperatur ved endt primærfermentering kan hemme gjærens metabolisme noe, slik at fuselalkoholkonsentrasjonen ikke øker i så stor grad etter endt primærfermentering (Verstrepen et al. 2003).

En økt gjærtilsetning kan også øke innholdet ester, selv om teorien er noe uklar på akkurat dette. Hvis ester-konsentrasjonen ikke øker ved økt gjærtilsetning, anbefales det likevel å øke gjærtilsetningen, da dette kan gi en raskere fermenteringsprosess (Kunze 2010).

Hvis disse endringene blir utprøvd, må man også være obs på at konsentrasjonen av acetaldehyd kan bli noe høyere enn det som er nåværende tilfelle i Dahls Pils, da man fra resultatene ser at forsøksbryggene fermentert på 14 °C inneholder mer acetaldehyd enn referansen.

6 Konklusjon

Saccharomyces cerevisiae er en utypisk gjær å bruke for produksjon av pils. I teorien nevnes det at den har lettere for å produsere ester i forhold til undergjæren *Saccharomyces pastorianus*. Det er genetiske forskjeller som utgjør hvor mye ester gjæren klarer å produsere. Ut i fra resultatene fra dette forsøket ser man at innholdet av isoamylacetat i Dahls Pils er rundt 2,3 ppm. Dette er antagelig en for lav konsentrasjon for en pils som ønsker en sterk esterprofil.

Ut i fra resultatene ser man at den mest sannsynlige grunnen for at ester konsentrasjonene i Dahls Pils er lavere enn før, kommer av omlegging fra horisontale tanker, til stående CCT tanker. CCT tankene fermenterer under trykk, og det er dette trykket som antagelig reduserer dannelsen av isoamylacetat i Dahls Pils, da resultatene fra forsøksbryggene visste at fermentering uten trykk gav høye konsentrasjoner av ester og fuselalkoholer. Resultatene fra denne oppgaven tilsier også at en reduksjon i trykk kan øke fermenteringshastigheten.

Endringer som kan øke ester konsentrasjonen i Dahls Pils har blitt foreslått. Disse endringene innebærer en økt gjærdosering, senking av trykk i primærfermenteringen og økning av trykk eller reduksjon i temperatur etter endt primærfermentering. Det foreslås at disse endringene blir testet ut i storskala, for å se om de faktisk bidrar til økte konsentrasjoner av isoamylacetat.

Forsøksbryggene kunne ikke sensorisk sammenlignes med referanseprøvene. Ved prøveuttak, fjerning av gjær og tapping kom forsøksbryggene daglig i kontakt med luft, noe som dannet et antall usmaker. Dette førte til at ester konsentrasjonene var vanskelig å detektere ved smaking. Skal forsøket gjentas, anbefales det at fermentering av forsøksbrygg blir utført på samme måte som vanlig produksjon ved RECD. Dette vil gi et mer korrekt grunnlag for sensorisk og analytisk sammenligning av referansebrygg mot forsøksbrygg.

7 Referanser

- Ahuja, S. (2003) *Chromatography and Separation Science Volume 4*. Academic Press ISBN 978-0-120449-81-1
- Anton Paar (2013) *Measuring Instruments for Analyzing Beer Products* [online] Tilgjengelig fra <http://www.anton-paar.com/Web/Document/download/5416?cLng=en> [lastet ned 21.03.2013]
- Bai, F.W, Anderson, W.A., Moo-Young, M. (2008) *Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks*. *Biotechnology Advances* Volume 26 Issue 1, side 89–105
- Bamforth, C. (2009) *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*. Oxford University Press. ISBN 978-0-199756-36-0
- Baxter, D., Hughes, P. (2001) *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*. *Royal Society of Chemistry paperbacks Vol 28 RSC Paperbacks*. ISBN 978-0-854045-88-4
- Blanchette, M. (2006) *Development of a Method for the LC/MS Determination of Vicinal Diketones in Beer*. Department of Bioresource Engineering. McGill University, Montreal. Side 17–20.
- Boulton, C.M., Quain, D. (2008) *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470999-40-0
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., Stevens, R. (2004) *Brewing. Science and Practice*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology ISBN 0-8493-2547-1
- Brown, A.K., Hammond, J.R.M (2003) *Flavour Control In Small Scale Beer Fermentations*. *Brewing Research International Trans IChemE, Volum 81 Part C*. Institution of Chemical Engineers, Surrey UK.
- Cable, M (2005) *Calibration: A Technicians Guide*. ISA Technician Series. ISBN 978-1-556179-12-9
- DMG (2013) *Danish Malting Group A/S. Quality Report January 2013 DMG Newsletter No 41*.

- Doehler (2013) *Quality & Food Safety Solutions* [online] Tilgjengelig fra http://www.doehler.com/downloads/en/Brochure_Quality_FoodSafety_EN.pdf [lastet ned 13.03.2013]
- Eßlinger, H.M., (2009) *Handbook of Brewing*. John Wiley & Sons. ISBN 978-3-527623-49-5
- FlavorActiv (2002) *Taster Validation Scheme. User Guide Version 1.1* FlavorActive Limited
- Fujii, T., Yoshimoto, H., Tamai, Y. (1996) *Acetate ester production by Saccharomyces cerevisiae lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Volume 81, Issue 6, side 538–542.
- Gros, J., Collin, S. (2012) *Identification of a new light-struck off flavour in "light-stable" beers*. *Cerevisia*, Volume 37 side 10–14
- Gulden, G., Eckblad, F.G., Høiland, K. (2009) *Gjærsopper*. Store Norske Leksikon [online] Tilgjengelig fra <http://snl.no/gj%C3%A6rsopper> [lastet ned 05.04.2013]
- Hauge, J.G. (u.å.) *koenzym A*. Store Norske Leksikon [online] Tilgjengelig fra http://snl.no/koenzym_A [lastet ned 02.04.2013]
- Heyerick, A. (2001) *Unraveling the Mechanism of the Lightstruck Flavour of Beer* [online] Faculty of Science. Universiteit Gent Tilgjengelig fra <https://biblio.ugent.be/input/download?func=downloadFile&recordOid=530875&fileOid=1886656> [lastet ned 26.03.2013]
- King, C. (2007) Part 3 – Oxygen and Fermented Beer. *Scandinavian Brewers' Review*, Volume 64 (4)
- Kobayashi, M., Shimizu, H., Shioya, S. (2008) *Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Volume 106, No. 4, side 317–323
- Kunze, W. (2010) *Technology Brewing & Malting*. 4th International Edition. Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, Berlin. ISBN 978-3-921690-64-2
- Lea, A og Piggott, J.R (2003) *Fermented Beverage Production*. Second Edition Springer. Side 41–58 ISBN 978-0-30-647706-5

- Lodolo, E., O'Connor-Cox, E., Axcell, B. (1999) *Evidence of Antimycin-Insensitive Respiration in a Commercial Brewing Yeast*. Journal of The Institute of Brewing, Volume 105, No 1. side 35–43
- Løvås, G. (2004) Statistikk for Universiteter og Høgskoler, 2 utgave. Universitetsforlaget. ISBN 978-82-15-00224-8
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003) Brock Biology of Microorganisms Tenth Edition. Pearson Education Inc. Side 489–490. ISBN 0-13-049147-0
- Merck (2008) Universal Beer Agar (UBA Medium) Agar for the detection of beer spoilage microorganisms [online] Tilgjengelig fra https://www.google.no/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CDsQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.merckmillipore.com%2Fchemicals%2Fen_US%2FMerck-International-Site%2FUSD%2FViewProductDocuments-File%3FProductSKU%3DMDA_CHEM-113829%26DocumentType%3DAPPL%26DocumentId%3D200512.204.Appl%26DocumentSource%3DGINAPPL&ei=9u1OUZyTNYmu4ASO-4HgBQ&usq=AFQjCNHQEwRUvg_8AI7Dl1cb-XIHngjHcQ&sig2=dS5KI83t7elKrlI3PzRYIQ&bvm=bv.44158598,d.bGE [lastet ned 24.03.2013]
- Millipore (2012) EZ-Pak®Dispenser and Membranes. Dispense sterile membranes immediately with contamination-free and hands-free convenience [online] Tilgjengelig fra [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/a6ee939487ab263a85257a840067cfae/\\$FILE/PB130EN00_mm.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/a6ee939487ab263a85257a840067cfae/$FILE/PB130EN00_mm.pdf) [lastet ned 24.03.2013]
- Oliver, G. (2011) The Oxford Companion to Beer. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-536713-3
- Rosa, C. Peter, G. (2006) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. *The Yeast Handbook Volume 1*. Springer ISBN 978-3-54-026100-1
- Rønning, A. (2011) Har avslørt pilsens hemmelighet. Forskning.no [online] Tilgjengelig fra <http://www.forskning.no/artikler/2011/august/296191> [lastet ned 05.04.2013]

- Saerens, S.M.G, Delvaux, F., Verstrepen, K., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux F.R. (2007) *Parameters affecting Ethyl Ester Production by Saccharomyces cerevisiae during fermentation*. Applied And Environmental Microbiology side 454–461
- Schiller, M., Busch, J. (1993) Reinheitsgebot and the Fifth Ingredient. *BrewingTechniques* May/June. [online] Tilgjengelig fra <http://morebeer.com/brewingtechniques/library/backissues/issue1.1/schiller.html> [lastet ned 05.04.2013]
- Slaughter, B., Smith, S.E., Li, R. (2009) *Symmetry Breaking in the Life Cycle of the Budding Yeast*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Side 1-18
- SNL (u.å.) *Oksidativ dekarboksylering*. Store Norske Leksikon [online] Tilgjengelig fra http://snl.no/oksidativ_dekarboksylering [lastet ned 02.04.2013]
- Soares E.V. (2011) *Flocculation in Saccharomyces cerevisiae*. Chemical Engineering Department from Porto Polytechnic Institute. Kapittel 9 i; Beer in Health and Disease Prevention. Academic Press 2011. Side 103–111. ISBN 978-0-08-092049-8
- Suomalainen (1983) *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*. Volum 3, Handbook of Aroma Research. Springer. Side 18–27. ISBN 978-9-02-771553-1
- The Scandinavian School of Brewing (2010a) Fermentation. Diploma Master Brewer Course Module 2 Binder 1. Valby, Denmark.
- The Scandinavian School of Brewing (2010b) Fermentation. Diploma Master Brewer Course Module 2 Binder 2. Valby, Denmark.
- Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P.A (2012) *Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with Saccharomyces cerevisiae*. Food Chemistry 135 side 2863–2872
- Verstrepen, K.J, Derdelinckx, G., Dufour, J-P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. (2003) *Flavor-Active Esters: Adding Fruitness to Beer*. Journal of Bioscience and Bioengineering Volume 96, No 2, side 110-118
- Wood, W. (1999) *The History of Skunk Defensive Secretion Research*. Department of Chemistry. Chemistry Educator 4, side 44–50

8 Vedleggsliste

Vedlegg 1.	Rådata fra Anton Paar analyse
Vedlegg 2.	pH måling
Vedlegg 3.	Rådata fra HSGC analyse ved UMB
Vedlegg 4.	Loggføring av diacetyl og 2,3-pentandion fra HSGC ved RECD
Vedlegg 5.	Sensorikk resultater
Vedlegg 6.	Esteroppfattelse
Vedlegg 7.	Utdelt sensorisk skjema

Vedlegg 1. Rådata fra Anton Paar analyse

Batch 1

Dato	Temp	Alkohol %	Restekstrakt
14.jan	9 °C	0,00 %	15,33 %
15.jan	9 °C	0,63 %	14,39 %
16.jan	9 °C	1,47 %	13,08 %
17.jan	9 °C	2,48 %	11,55 %
18.jan	9 °C	3,43 %	9,66 %
21.jan	9 °C	6,13 %	6,08 %
22.jan	9 °C	6,39 %	5,66 %
23.jan	9 °C	6,59 %	5,38 %
24.jan	9 °C	6,61 %	5,30 %
Dato	Temp	Alkohol %	Er
14.jan	14 °C	0,00 %	15,33 %
15.jan	14 °C	0,75 %	14,18 %
16.jan	14 °C	2,30 %	12,64 %
17.jan	14 °C	5,00 %	7,59 %
18.jan	14 °C	6,54 %	5,24 %
21.jan	14 °C	6,67 %	5,10 %
22.jan	14 °C	6,67 %	5,08 %
23.jan	14 °C	6,68 %	5,05 %
24.jan	14 °C	På kjøling	På kjøling
Dato	Temp	Alkohol %	Er
14.jan	18 °C	0,00 %	15,33 %
15.jan	18 °C	1,43 %	13,14 %
16.jan	18 °C	4,96 %	7,45 %
17.jan	18 °C	6,57 %	5,12 %
18.jan	18 °C	6,75 %	4,98 %
21.jan	18 °C	6,75 %	4,90 %
22.jan	18 °C	6,75 %	4,90 %
23.jan	18 °C	På kjøling	På kjøling
24.jan	18 °C	På kjøling	På kjøling

Batch 2

Dato	Prøve	Alkohol %	Restekstrakt
23.jan	9 °C	0,00 %	15,29 %
24.jan	9 °C	0,80 %	13,37 %
25.jan	9 °C	1,72 %	12,55 %
28.jan	9 °C	5,18 %	7,21 %
29.jan	9 °C	5,64 %	6,52 %
30.jan	9 °C	5,97 %	6,10 %
31.jan	9 °C	6,20 %	6,05 %
01.feb	9 °C	6,51 %	5,65 %
04.feb	9 °C	6,51 %	5,55 %
05.feb	9 °C	6,51 %	5,55 %
Dato	Prøve	Alkohol %	Er
23.jan	14 °C	0,00 %	15,29 %
24.jan	14 °C	1,66 %	11,68 %
25.jan	14 °C	4,83 %	7,63 %
28.jan	14 °C	6,42 %	5,38 %
29.jan	14 °C	6,42 %	5,30 %
30.jan	14 °C	Kjøling	Kjøling
31.jan	14 °C	Kjøling	Kjøling
Dato	Prøve	Alkohol %	Er
23.jan	18 °C	0,00 %	15,29 %
24.jan	18 °C	2,14 %	10,88 %
25.jan	18 °C	5,42 %	6,72 %
28.jan	18 °C	6,45 %	5,26 %
29.jan	18 °C	6,51 %	5,20 %
30.jan	18 °C	Kjøling	Kjøling
31.jan	18 °C	Kjøling	Kjøling

Batch 3

Dato	Prøve	Alkohol %	Restekstrakt
06.feb	9 °C	0,00 %	15,12 %
07.feb	9 °C	0,34 %	14,50 %
08.feb	9 °C	0,91 %	13,69 %
11.feb	9 °C	3,71 %	9,63 %
12.feb	9 °C	4,25 %	8,84 %
13.feb	9 °C	4,59 %	8,04 %
14.feb	9 °C	5,14 %	7,24 %
15.feb	9 °C	5,78 %	6,66 %
18.feb	9 °C	6,33 %	5,73 %
19.feb	9 °C	6,34 %	5,72 %
20.feb	9 °C	6,34 %	5,72 %
21.feb	9 °C	6,34 %	5,72 %
22.feb	9 °C	6,34 %	5,72 %
Dato	Prøve	Alkohol %	Er
06.feb	14 °C	0,00 %	15,12 %
07.feb	14 °C	0,48 %	14,27 %
08.feb	14 °C	2,31 %	11,47 %
11.feb	14 °C	6,27 %	5,83 %
12.feb	14 °C	6,30 %	5,73 %
13.feb	14 °C	6,31 %	5,70 %
Dato	Prøve	Alkohol %	Er
06.feb	18 °C	0,00 %	15,12 %
07.feb	18 °C	0,78 %	13,84 %
08.feb	18 °C	4,48 %	7,96 %
11.feb	18 °C	6,59 %	5,35 %
12.feb	18 °C	6,59 %	5,35 %

Referanser	Start	Slutt	Er
Batch 1	14.01.2013	21.01.2013	5,21
Batch 2	22.01.2013	28.01.2013	5,23
Batch 3	06.02.2013	14.02.2013	5,32

Vedlegg 2. pH måling

Batch 1	9 °C	14 °C	18 °C
Døgn			
0	4,9	4,9	4,9
1	4,8	4,8	4,7
2	4,7	4,6	4,5
3	4,6	4,5	4,4
4	4,5	4,5	4,4
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
7	4,5	4,4	4,4
8	4,5	4,4	4,4
9	4,5	4,4	4,4
Batch 2	9 °C	14 °C	18 °C
Døgn			
0	4,9	4,9	4,9
1	4,8	4,8	4,7
2	4,7	4,6	4,5
3	4,6	4,5	4,4
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
6	4,5	4,4	4,4
7	4,5	4,4	4,4
8	4,5	4,4	4,4
9	4,5	4,4	4,4
Batch 3	9 °C	14 °C	18 °C
Døgn			
0	4,9	4,9	4,9
1	4,8	4,8	4,7
2	4,7	4,6	4,5
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
Helg	Ikke målt	Ikke målt	Ikke målt
5	4,5	4,4	4,4
6	4,5	4,4	4,4
7	4,5	4,4	4,4

Vedlegg 3. Rådata fra HSGC analyse ved UMB

1-T1 = 9 °C, 1-T2 = 14 °C, 1-T3 = 18 °C, 1-T4 = 9 °C, 1-T5 = 14 °C, 1-T6 = 18 °C.

FT = ferdig tappet. R1= Ferdig fermentert. R2=før nedkjøling R3=etter nedkjøling, n.d = ikke detektert.

	Isoamyl acetat	Etyl acetat	Isobutyl acetat	3-metyl-1- butanol	2-metyl 1-butanol	2-metyl-1- propanol	1- propanol	Acetaldehyd
Prøvenr	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
0 Prøve	0,13	4,1	n.d	3,24	1,4	1,1	0,76	32,28
1-T1	0,16	4,69	0,02	11,87	5,69	3,06	2,44	41,57
1-T2	0,17	4,67	0,01	11,83	24,8	3,43	2,71	32,92
1-T3	0,28	5,53	0,02	20,39	3,46	4,99	4,22	33,15
1-T4	0,32	5,81	0,02	21,08	4,39	5,82	4,88	33
1-T5	0,46	6,79	0,03	29,13	6,89	7,3	5,77	33,84
1-T6	3,13	23,77	0,14	60,13	20,88	18,13	11,86	17,96
1-T7	0,76	9,47	0,04	30,78	7,04	9,38	7,46	32,79
1-T8	2,77	22,49	0,13	58,75	22,6	19,47	12,66	17,92
1-T9	4,52	34,79	0,17	74,83	26,7	22,33	14,81	6,63
1-T10	1,02	14,21	0,06	33	9,87	11,97	10	30,06
1-T11	4,32	35,55	0,18	66	27,91	21,45	14,5	8,68
1-T12	4,75	38,19	0,16	74,8	27,2	21,49	14,31	5,43
1-T13	2,98	31,2	0,14	46,7	19,86	18,17	13,73	16,18
1-T14	4,24	34,33	0,18	64,5	26,28	20,55	14,2	7,06
1-T16	2,99	32,2	0,13	46,88	20,18	18,42	13,85	13,96
1-T17	4,16	34,65	0,17	62,21	25,9	19,68	13,74	6,7
1-T19	2,41	29,5	0,12	39,15	17,75	17,32	12,81	11,85
1-T20	4,41	38	0,18	68,6	27,81	22,02	15,16	7,5
1-T22	2,88	29,93	0,12	44,18	20,65	18,58	13,43	12,56
1-T23	4,63	39,14	0,19	72,81	30,62	23,8	16,49	8,49
1-T24	4,34	40,17	0,17	74,61	27,15	22,86	15,71	6,13
R1	3	26,19	0,09	67,93	22,35	16,27	13,69	14,19
R2	2,72	21,69	0,08	57,42	19,45	13,7	11,57	6,17
R3	3,25	24,26	0,09	63,14	21,76	15,28	12,62	8,04
1FT1	2,78	30,45	0,12	41,98	19,12	17,05	12,58	10,66
1FT2	4,54	37,5	0,19	65,58	27,07	20,75	14,59	6,72
1FT3	4,6	37,51	0,16	74,26	26,64	21,49	14,39	5,12
Batch 2								
2-T1	0,21	2,42	0,01	15,67	2,41	3,07	2,57	23,23
2-T2	0,59	5,24	0,03	30,1	5,27	8,06	5,36	44,45
2-T3	1,19	7,91	0,06	42,77	8,96	10,47	7,09	41,56
2-T4	0,51	5,56	0,03	26,7	4,99	7,16	5,94	35,86
2-T5	4,29	28,44	0,18	60,35	20	17,34	11,16	15,67
2T6	5,7	39,08	0,22	86,25	25,84	22,9	14,72	17,12

2T7	1,38	11,1	0,06	38,56	9,09	10,5	8,24	38,31
2T8	5,29	34,81	0,2	67,13	23,28	19,84	12,46	9,92
2T9	5,93	40,08	0,21	78,67	26,57	22,08	14,04	8,69
2T10	3,21	30,21	0,15	50,33	20,3	19,79	13,69	32,02
2T11	5,53	41,26	0,18	70,08	25,7	20,77	13,4	6,58
2T12	4,64	33,97	0,15	67,62	22,86	18,82	12,26	4,74
2T13	3,37	28,26	0,14	39,1	15,84	14,3	9,96	11,65
2T14	5,1	39,32	0,17	65,8	23,99	19,54	12,61	5,83
2T15	4,92	39,21	0,15	74,61	25,46	20,49	13,53	5,23
2T16	3,75	33,71	0,15	44,27	18,71	17,07	11,4	11,46
2T19	4,16	39,12	0,16	47,95	21,31	18,75	12,65	25,71
2-T22	3,73	34,95	0,14	46,24	20,71	19,21	12,68	10,5
2-T25	4,15	39,21	0,16	47,13	20,4	18,7	12,46	8,98
2R1	3,03	24,23	0,09	59,72	19,75	14,55	13,33	6,99
2R2	3,5	26,52	0,1	62,3	20,35	14,95	12,68	7,26
2R3	3,03	23,11	0,09	56,25	19,06	13,84	12,43	6,02
2FT1	4,49	42,67	0,17	51,78	22,02	20,01	13,67	11,26
2FT2	5,85	48,31	0,19	78,55	29,57	23,54	15,54	8,83
2FT3	4,9	39,96	0,16	73,82	25,02	20,22	13,33	6,45
Batch 3								
3-0 Prøve	0,01	0,01	0,01	0,32	0,1	0,6	n.d.	0,41
3T1	0,05	1,06	n.d.	8,09	1,03	1,67	1,57	23,53
3T2	0,1	1,2	0,01	15,89	1,77	2,72	2,88	33,76
3T3	0,21	1,97	0,01	21,88	2,55	3,9	3,66	34,71
3T4	0,21	2,19	0,02	20,31	2,7	3,91	4,07	31,86
3T5	1,61	9,48	0,06	39,98	9,1	9,22	7,04	28,95
3T6	4,23	25,5	0,14	74,9	20,36	17,74	12,49	30,11
3T7	2,28	19,1	0,09	51,61	15,12	14,77	12,64	52,4
3T8	5,52	39,76	0,18	63,02	23,41	18,24	13,24	8,06
3T9	4,84	38,77	0,14	82,78	27,13	22,86	15,37	5,48
3T10	2,63	19,8	0,09	40,32	13,27	12,39	10,31	26,13
3T11	4,91	35,92	0,16	57,9	20,33	16,81	12,05	8,38
3T13	2,5	20,67	0,1	42,41	14,34	13,21	10,6	23,43
3T14	5,13	36,66	0,16	62,96	23	17,74	13	10,22
3T16	3,13	26,15	0,12	45,83	16,11	14,23	11,86	20,92
3T19	3,29	27,61	0,12	44,09	16,39	13,69	11,85	17,59
3T22	4,07	37,09	0,14	51,68	19,59	16,7	14,2	11,45
3T25	3,75	31,86	0,13	49,88	18,88	15,81	13,9	8,64
3T28	4,15	36,88	0,15	51,97	20,65	17,26	14,48	9,69
3R1	3,94	29,52	0,11	71,02	22,24	17,12	14,23	8,23
3R2	3,24	24,45	0,09	58,72	18,95	13,63	11,83	5
3R3	3,43	26,28	0,1	62,11	19,7	15,28	12,58	5,47
3FT1	3,48	32,07	0,12	45,1	17,65	14,16	12,7	8,36
3FT2	5,37	40,74	0,17	65,42	23,52	18,42	13,9	9,08
3FT3	5,33	40,82	0,16	84,38	28,49	23,76	15,33	7,22

Vedlegg 4. Loggføring av diacetyl og 2,3-pentandion fra HSGC ved RECD.

Batch 1

Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
14.jan	9 °C	0	0
15.jan	9 °C	0,0817	0,057
16.jan	9 °C	0,1788	0,211
17.jan	9 °C	0,2581	0,4157
18.jan	9 °C	0,2711	0,5458
21.jan	9 °C	0,2461	0,4756
22.jan	9 °C	0,2353	0,4344
23.jan	9 °C	0,2231	0,3959
24.jan	9 °C	0,1716	0,3302
25.jan	9 °C	0,1111	0,297
28.jan	9 °C	0,0005	0,2511
29.jan	9 °C	0,0004	0,2232
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
14.jan	14 °C	0	0
15.jan	14 °C	0,1158	0,0789
16.jan	14 °C	0,2085	0,2632
17.jan	14 °C	0,3992	0,5605
18.jan	14 °C	0,3048	0,4241
21.jan	14 °C	0,136	0,2076
22.jan	14 °C	0,1014	0,1532
23.jan	14 °C	0,002	0,1167
24.jan	14 °C	-	-
25.jan	14 °C	-	-
28.jan	14 °C	-	-
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
14.jan	18 °C	0	0
15.jan	18 °C	0,1626	0,1705
16.jan	18 °C	0,4565	0,5674
17.jan	18 °C	0,253	0,3154
18.jan	18 °C	0,0064	0,1686

Batch 2

Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
22.jan	9 °C	0	0
23.jan	9 °C	0,1452	0,1736
24.jan	9 °C	0,2391	0,3476
25.jan	9 °C	0,3778	0,6384
28.jan	9 °C	0,4409	0,7583
29.jan	9 °C	0,424	0,7154
30.jan	9 °C	0,3621	0,6105
31.jan	9 °C	0,2958	0,5512
01.feb	9 °C	0,2231	0,4124
04.feb	9 °C	0,0721	0,1622
05.feb	9 °C	0,0641	0,1321
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
22.jan	14 °C	0	0
23.jan	14 °C	0,2258	0,3133
24.jan	14 °C	0,4914	0,6231
25.jan	14 °C	0,3198	0,4071
28.jan	14 °C	0,1133	0,1719
29.jan	14 °C	0,036	0,0456
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
22.jan	18 °C	0	0
23.jan	18 °C	0,3422	0,4166
24.jan	18 °C	0,3692	0,4328
25.jan	18 °C	0,1988	0,2414
28.jan	18 °C	0,0424	0,0647
29.jan	18 °C	0,0121	0,04132

Batch 3

Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
06.feb	9 °C	0	0
07.feb	9 °C	0,0943	0,0778
08.feb	9 °C	0,1996	0,2354
11.feb	9 °C	0,3263	0,4878
12.feb	9 °C	0,3836	0,5846
13.feb	9 °C	0,4901	0,6825
14.feb	9 °C	0,4604	0,6004
15.feb	9 °C	0,4251	0,5732
18.feb	9 °C	0,2566	0,3617
19.feb	9 °C	0,2321	0,33
20.feb	9 °C	0,217	0,3029
21.feb	9 °C	0,1969	0,2854
22.feb	9 °C	0,172	0,2511
25.feb	9 °C	0,1539	0,2272
26.feb	9 °C	0,1434	0,2078
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
06.feb	14 °C	0	0
07.feb	14 °C	0,1524	0,1279
08.feb	14 °C	0,4055	0,4608
11.feb	14 °C	0,2093	0,2944
12.feb	14 °C	0,1768	0,2518
13.feb	14 °C	0,1279	0,1768
14.feb	14 °C	0,079	0,0987
Dato	Prøve	Diacetyl (ppm)	2,3-Pentandion (ppm)
06.feb	18 °C	0	0
07.feb	18 °C	0,258	0,2213
08.feb	18 °C	0,4821	0,517
11.feb	18 °C	0,031	0,04
12.feb	18 °C	0,011	0,0231

Vedlegg 5. Sensorikk resultater

Batch 1	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	6	3	7	6
Dommer 2	7	5	6	6
Dommer 3	8	5	6	5
Dommer 4	5	6	6	5
Dommer 5	7	6	7	6
Dommer 6	7	7	7	7
Dommer 7	6	5	7	6
Snitt	6,57143	5,28571	6,571428571	5,85714
Std.avvik	0,9759	1,25357	0,534522484	0,69007
Batch 2	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	5	4	7	6
Dommer 2	3	4	8	7
Dommer 3	2	4	6	6
Dommer 4	4	5	7	5
Dommer 5	5	5	7	5
Dommer 6	5	5	6	6
Dommer 7	4	4	5	5
Snitt	4	4,42857	6,571428571	5,71429
Std.avvik	1,1547	0,53452	0,975900073	0,75593
Batch 3	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	2	2	6	6
Dommer 2	3	2	5	5
Dommer 3	3	3	7	6
Dommer 4	2	4	7	6
Dommer 5	2	4	7	6
Dommer 6	1	3	7	5
Dommer 7	3	6	6	6
Snitt	2,28571	3,42857	6,428571429	5,71429
Std.avvik	0,75593	1,39728	0,786795792	0,48795

Vedlegg 6. Esteroppfattelse

Batch 1	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	1	2	4	3
Dommer 2	1	2	3	4
Dommer 3	3	1	2	4
Dommer 4	1	3	3	2
Dommer 5	4	1	3	2
Dommer 6	3	1	4	2
Dommer 7	4	2	2	3
Snitt	2,42857143	1,71428571	3	2,85714286
Std.avvik	1,39727626	0,75592895	0,816496581	0,89973541
Batch 2	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	2	1	3	4
Dommer 2	2	1	3	4
Dommer 3	1	2	3	4
Dommer 4	1	2	4	3
Dommer 5	1	2	4	3
Dommer 6	1	4	3	2
Dommer 7	1	2	4	3
Snitt	1,28571429	2	3,428571429	3,28571429
Std.avvik	0,48795004	1	0,534522484	0,75592895
Batch 3	9 °C	14 °C	16 °C (referanse)	18 °C
Dommer 1	1	3	2	4
Dommer 2	2	1	3	4
Dommer 3	1	2	4	3
Dommer 4	1	2	3	4
Dommer 5	1	2	4	3
Dommer 6	1	2	3	4
Dommer 7	1	4	2	3
Snitt	1,14285714	2,28571429	3	3,57142857
Std.avvik	0,37796447	0,95118973	0,816496581	0,53452248

Vedlegg 7. Utdelt sensorisk skjema.

Avvikende smak									
Prøvenummer									
T=Kodenr	V = Vekting	T	V	T	V	T	V	T	V
Helhetsvurdering:									

Esteroppfattelse			
Prøvenummer			
Vektlegging (1-4)*			
Eventuelle kommentarer			

*Vektlegging 1-4, der 4 er høyest esterinnhold, og 1 er lavest innhold av ester

Gammel skala -3 +1		Ny skala 1-9			
TFS	Karakteristikk	TFS	Karakteristikk	Vekting smaksfeil	Total vekting
+1 SAT	Spesielt god	9	Svært god		
0 SAT	Normalt for denne type øl	8	Veldig god	Maks 1	Maks 2
		7	God	Maks 2	Maks 3
		6	Tilfredsstillende	Maks 2, Maks 1 linje med 2	Maks 4
-1 NQS	Med feil innenfor akseptable grenser	5	OK	Maks 3, Min 1 linje med 2	Min 3 Maks 5
		4	Ikke tilfredsstillende	Maks 3, Min 1 linje med 2, Maks 1 linje med 3	Min 3 Maks 7
		3	Dårlig	Maks 4, Min 1 linje med 3	Min 3 Maks 9
-2 NS	Uakseptable feil	2	Svært dårlig	Min 1 linje med 4 eller Min 2 linjer med 3	Min 4 Maks 10
-3 NS	Graverende feil	1	Udrikkelig	Min 1 linje med 5 eller Min 2 linjer med 3	Min 5

Forklaring smaksfeil
0: Fraværende
1: Svak
2: Moderat
3: Merkbar
4: Markert
5: Sterk