

ABSTRACT

The perception of cider is the result of a multitude of biochemical interactions that occur between chemical compounds and sensory receptors that are not always easy to identify. 33 different ciders were made at the pilot plant at the Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science (IKBM) at Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås, with four apple juice mixtures and various fermentation methods, temperature, maturation, filtration and added hops.

The aim of the research was to discover which apple juice mixture and conditions best suited to develop a Norwegian characterized cider with good sensory quality of approximately 4,7 % alcohol or less made from Norwegian apples. The most suited apple juice mixture was B0 using both fermentation methods with the conditions maturation, filtration method and temperature (10-15°C).

The chemical composition of cider is dependent of the quality of the apples, specific stages of ripeness, terroir, fermentation methods and wine yeast strains and aging and filtration methods. It is not necessary the level of components but the composition that has influence of the organoleptic finish quality for cider.

Results from sensory test for B0 (1-10): fruitiness: 4,85 – 6,25, sweetness: 3,7- 6,1, bitterness: 2,8-4,5, and acidity: 4,05-5,75. Cider from B0 had low levels of pyruvic acid (26,1 to 46 mg / L), TF (9 to 15 mg / L) and TP (57,5 to 63,2 mg / L) and increased content of catechin (from 8,3 to 12,2 mg / L) and phloridizin (3,62 -4,08 mg / L). Cider inoculated with cider yeast at 15°C contained more than 100 mg / L volatile components than cider from spontaneous fermentation mostly higher alcohols.

The test using hops were perceived as the best with: fruitiness: 7,75 complexity: 7,2 and aftertaste: 6,9. Hops changed the distribution of components and increased pyruvic acid, acetic acid, acetoin, 1-propanol, ethyl acetate, carboxylic acids (acetaldehyde and acetone), catechin, procyanidin B and rutin.

Sammendrag

Smaken av eplesider er en konsekvens av en rekke biokjemiske interaksjoner som skjer mellom mange kjemiske komponenter og sensoriske reseptorer som ikke alltid er like enkle å identifisere. 33 ulike sider fra 4 epleblandinger med bruk av ulike gjæringsmetoder, temperatur, modning, filtrering og tilsatt humle, ble utviklet ved pilotanlegget til Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU), Ås.

Hensikten med oppgaven var å finne ut hvilken epleblending og betingelser som egnet seg best for å utvikle en norskpreget sider med god sensorisk kvalitet på ca. 4,7 % alkohol eller under, laget av norske epler. B0- blandingen ved bruk av begge gjæringsmetodene ble funnet best egnet som kvalitetssider.

Resultatene tyder på at den kjemiske sammensetningen av sider er avhengig av kvaliteten til eplesortene, modenheten, terroir sammen med gjæringstype og valgt fermenteringsteknologi (Styger et al 2011). I tillegg er betingelsene som modning og filtrering avgjørende for den organoleptiske slutt kvaliteten. Det er ikke nødvendigvis innholdet eller nivået, men sammensetningen som er viktigst for sluttkvaliteten.

Sensorisk test (1-10) for B0-blanding ble: 4,85-6,25 fruktighet, 3,7-6,1 sødme, 2,80-3,55 bitterhet og 4,05-5,75 syrlighet. Sider fra B0 hadde et lavere innhold av pyrodruesyre (26,1-46 mg/L), TF (9-15,5 mg/L) og TP (57,5-63,2 mg/L), og høyere innhold av catechin (8,3-12,2 mg/L) og phloridizin (3,62 -4,08 mg/L) enn de andre. K-sider ved 15°C inneholdt mer enn 100 mg/L flyktige komponenter med høyest andel høyere alkoholer, mens sider med spontangjæring hadde høyest andel estere. Tilført humle i B0 medførte at epleblendingen ble tilført manglende tannin og dermed oppfattet kvalitetsmessig best: 7,2 sødme, 7,75 fruktighet, 7,2 kompleksitet og 6,9 ettersmak. Humle endret sammensetningen av komponentene som resulterte i et noe høyere innhold av pyrodruesyre, eddiksyre, acetoin, 1-propanol, ethylacetat og karboksylsyrene (acetaldehyd og aceton) og catechin, procyanidin B og rutin.

Forord

Masteroppgaven i Matvitenskap har blitt utført ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige universitet ved Ås fra høsten 2015 til våren 2016. Oppgaven kom i utgangspunktet som en idé fra Trude Wicklund, førsteamanuensis, NMBU som for et par år siden tilbragte et studieår i Frankrike med siderproduksjon.

Jeg vil begynne med å takke førsteveileder professor Trude Wicklund for stor tålmodighet, åpenheten for innspill, veiledning, medmenneskelighet, korrekturlesing og oppfølging gjennom hele prosessen. I tillegg vil jeg takke Siv Fagertun Remberg andreveileder for kritisk korrekturlesing.

Jeg takker Kari Olsen for veiledning med analyser og innsamling av dataresultater og May Helene Aalberg ved laboratoriet ved IKBM for hjelp med proteinanalysene og begge for sosialt fellesskap og vennlighet. Jeg takker Kari Grønnerød og Signe Hansen ved fruktlabben på Institutt for plantevitenskap (IPV) som alltid var rede til å svare på spørsmål.

Jeg benytter anledningen til å takke Åke Eitungjerde ved Balholm AS, Balestrand for gode praktiske innspill og Leif Eliassen, Aass bryggeri as, Drammen.

I tillegg vil jeg rette en spesiell takk til Bjørg Egelanddal og Kristian Hovde Liland for enestående og uvurderlig hjelp med statistikken.

En takk rettes også til Silje Johnson og Tina Svendsen som hjalp meg teknisk og sosialt gjennom et intenst år

Masteroppgaven ville ikke vært mulig å gjennomføre uten tilretteleggelse fra min arbeidsgiver Greveskogen videregående skole, Tønsberg. Jeg har hatt en flott mulighet til å fordype meg i et nytt emne og tilegnet meg ny kompetanse som jeg kan bruke videre i mitt daglige arbeid.

Tønsberg, 16.05.2016

Elizabeth Rose Skottheim

Forkortelser

AR	Aroma
DI	Discovery
GC	Gas chromatography
GR	Gravenstein
HCGC	Headspace gas chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
IKBM	Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
IPV	Institutt for plantevitenskap
NMBU	Norges miljø -og biovitenskapelige universitet
JO	Jonagold
SR	Sunrise
SU	Summerred
TA	Total aminosyrer
TDMGC	Thermal desorber gas chromatography mass spectrometry
TF	Total fenoler
TN	Total nitrogen
TP	Total polyfenoler
TO	Torstein

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	9
1.1	Nærmere beskrivelse av problemstillingen.....	10
1.2	Målsetning og problemstilling	10
2	Teori.....	11
2.1	Siderproduksjon i historisk sammenheng.....	11
2.2	Siderproduksjon i verden i dag.....	12
2.3	Epler.....	13
2.3.1	Generelt om epler.....	13
2.3.2	Hovedtyper epler	14
2.4	Biokjemiske komponenter i epler.....	14
2.4.1	Karbohydrater.....	14
2.4.2	Nitrogen og aminosyrer	15
2.4.3	Organiske syrer	16
2.4.4	Fenoler	16
2.4.5	Polyfenoler	17
2.4.6	Flyktige komponenter	19
2.4.7	Ideell epleblanding til siderproduksjon.....	19
2.5	Gjær	20
2.5.1	Gjærcellens oppbygging.....	20
2.5.2	Villgjær og spontangjæring.....	21
2.5.3	Saccharomyces spp og fermentering	22
2.5.4	Gjærkultur (startkultur).....	23
2.5.5	Vekstbetingelsene til gjærsopp.....	24
2.5.6	Vekstfasene til gjær	25
2.6	Alkoholberegning.....	30
2.7	Tilsetningsstoffer	31
2.7.1	Karbondioksid (CO ₂).....	31
2.7.2	Svoveldioksid (E 220).....	31

2.7.3	Humle.....	32
2.7.4	Askorbinsyre (E 300).....	33
2.8	Biokjemiske analyser.....	33
2.8.1	Bestemmelse av flyktige komponenter med Head Space Chromatography 33	
2.8.2	Nitrogenbestemmelse med Kjeldahl metode.....	33
2.8.3	Bestemmelse av frie aminosyrer og sukker med høytrykks væskekromatografi.....	34
2.8.4	Bestemmelse av flyktige forbindelser med HSGCFID\TDGCMS..	34
2.8.5	Bestemmelse av fenoler med Folin - Ciocalteau`s metode	36
2.9	Sensorikk.....	36
2.10	Statistiske analyser	37
2.10.1	Analysering av Varians, (ANOVA)	37
2.10.2	Multivariate analyser.....	38
2.10.3	Principal Component Analysis (PCA)	38
2.10.4	Generalisert lineær modell (GLM).....	39
2.11	Kvalitetsparameter for sider.....	39
2.11.1	Farge	40
2.11.2	Tørrstoff	40
2.11.3	pH	40
2.11.4	Syreprosent	41
2.11.5	Fryselagring	41
3	Materialer og metode	42
3.1	Råvarer	42
3.1.1	Eplesorter	42
3.1.2	Kulturgjær.....	44
3.1.3	Temperatur.....	44
3.1.4	Volum	44
3.1.5	Humle.....	45
3.1.6	Kjøle- og fryserom	45

3.2	Utstyr	46
3.3	Sider prosessen	47
3.3.1	Generell beskrivelse av forsøkene	48
3.3.2	Detaljert beskrivelse av forsøkene	49
3.4	Metoder	51
3.5	Analyse av ytre kvalitet.....	52
3.5.1	Farge	52
3.5.2	Fasthet	52
3.5.3	Stivelse.....	53
3.5.4	Syreprosent.....	53
3.5.5	pH.....	53
3.5.6	Tørrstoff (°Brix).....	54
3.6	Biokjemiske analyser.....	54
3.6.1	Total protein (Kjeldahl /HPLC).....	54
3.6.2	Frie aminosyrer ble bestemt med HPLC.....	55
3.6.3	Organiske syrer og sukker og ble bestemt med HPLC.....	56
3.6.4	Karbohydrater ble bestemt med HPLC.....	58
3.6.5	Totale fenoler ble bestemt med Folin- Ciocalteu`s – metode (TF).....	59
3.6.6	Polyfenoler ble bestemt med HPLC	60
3.6.7	Flyktige forbindelser ble bestemt med HSGC.....	61
3.6.8	Flyktige forbindelser med HSGCFID/TDGCMS	62
3.7	Sensoriske analyser	63
3.8	Databehandling og statistiske analyser	64
4	Resultater.....	65
4.1	Fysiske analyser av eplesortene	65
4.1.1	Eplesortene og lagring	65
4.1.2	Forholdet mellom pH og syreprosent	66
4.2	Biokjemiske analyser av eplesortene	67
4.2.1	Innholdet av total nitrogen og totale fenoler.....	67

4.2.2	Oversikt over komponentene i eplesortene	72
4.3	Fermenteringsprosessen i epleblandingene.....	73
4.3.1	Fysikalske analyser	73
4.4	Biokjemiske analyser.....	75
4.5	Overordnet oversikt av fermenteringsprosessen og sider	80
4.5.1	Sammenheng mellom epleblandingene og variablene.....	80
4.6	Sensorikk.....	82
4.6.1	Sensorisk test av sider	82
5	Diskusjon.....	85
5.1	Fysikalske analyser	85
5.1.1	Vurdering av fysikalske analyser	85
5.1.2	Vurdering av fysikalske forhold under fermenteringsprosessen ...	86
5.2	Vurdering av biokjemiske komponenter fra eplesortene til sider	87
5.2.1	Nitrogen.....	87
5.2.2	Aminosyrer	88
5.2.3	Karbohydrater.....	89
5.2.4	Organiske syrer	91
5.2.5	Totale fenoler (TF).....	94
5.2.6	Polyfenoler (TP)	95
5.2.7	Flyktige komponenter	97
5.2.8	Modning.....	102
5.2.9	Filtrering	104
5.3	Sensorikk.....	105
5.3.1	Utføring av testen	105
5.3.1	Karbonering.....	107
6	Konklusjon.....	110
7	Referanser	111
8	Vedlegg.....	121

1 Innledning

De siste 10 årene har det vært en økende interesse og etterspørsel etter lokal og regional produsert mat og drikke i Norge. Økt betalingsvillighet og etterspørsel etter mangfold har medført produkter med "bedre" smak og kvalitet. I kjølvannet av dette har sider kommet i søkelyset, og med det min interesse.

Epler er en underutnyttet råvare i Norge (Eidhammer, 2015) som anses å være av førsteklasses kvalitet fordi klimaet medfører lang veksttid. Det bidrar med å gjøre dem velegnet som råvarematerial til videre foredling av blant annet juice og sider som ikke krever førsteklasses epler utseendemessig.

Søk etter relevant litteratur avdekket at det foreløpig finnes minimalt med forskning på sider i Norge, og lite internasjonalt på bruk av norske eplesorter. Internasjonale undersøkelser ved bruk av andre eplesorter kan ikke sammenlignes direkte på samme måte som vinproduksjon i ulike land ved bruk av samme druesorter på grunn av terroir og klimatiske forhold.

Det ble funnet to rapporter fra prosjektsamarbeidet mellom Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO), Ullensvang og Hardanger siderprodusentlag med fokus på sider med lavt alkoholinnhold (maks 4,7 % alkohol). Første undersøkelse (2012-2013) fant ut at bruk av enzym og filtrering bedret kontrollen over fermenteringsprosessen, men ikke nødvendigvis smaken og at sideren hadde en tendens til å smake eplejuice (Vangdal, 2013). Andre forsøket (2013-2015) fant ut at ca. 80 % epler til fersk konsum iblandet 20 % gamle eplesorter som Torstein eller Bramley Seedling, fermentert helt ut (til 12-13 % alkohol), deretter justert ned til ca. 4,7 % alkohol og karbonert ga et godt grunnlag for en god sider med mild bitter ettersmak (Vangdal et al 2015).

Egge gård i Buskerud driver stor satsning på produktutvikling innen alle former for drikkevarer av epler og interessen er økende også andre steder på Østlandet. I Hardanger har de holdt på utvikling av siderproduksjon i ca. 20 år og til nå er ca. 30 siderprodusenter tilknyttet Hardanger siderprodusentlag, som stadig utvides. De fleste håndverkssider produseres i småskala og omsettes på Vinmonopolet på grunn av høyt alkoholinnhold > 4,7 % alkohol.

I butikken i Norge omsettes hovedsakelig industrielt fremstilt sider fra store utenlandske (svenske) bryggerier, men det er kanskje i ferd med å snu. Det finnes i dag 89 ulike sider varianter fra 6 land derav 19 norske på vinmonopolet, men de fleste finnes i bestillingsutvalget. I 2014 ble det omsatt ca. 50 000 liter, derav 75 % norskprodusert sider (Vinmonopolet, 2015). De siste 5 årene har salget økt fra ca. 7 tonn til ca. 10,5 tonn. Oppdaterte tall fra drikkeglede.no i mai 2016 viste at sider omsetningen i 2015 økte mest (37,46 %) i utelivsbransjen og Vinmonopolet (ca. 27 000 L) og mindre i butikk (3,05 %). Dette er kanskje i ferd med å snu med den nye høringen (Prop. 116L (2015-2016)) som har gått igjennom og medfører at siderprodusentene kan selge inntil 15 000 L med sider opptil 22 % alkohol direkte fra gården

1.1 Nærmere beskrivelse av problemstillingen

I Hardanger jobber produsentene og forskere sammen med å tilegne seg økt kompetanse i siderproduksjon. Norske siderprodusenter arbeider med å utvikle kvalitetssider produsert av norske råvarer «*med lavt alkoholinnhold*» som ikke er kopier av fransk eller engelsk sider. Det gjenstår ennå mer utprøving og utvikling for å finne frem til tilfredsstillende kvalitetsvarianter med karaktertrekk som gir en sider som ikke er for enkel, for søt eller sur (Vangdal, 2015).

1.2 Målsetning og problemstilling

Masteroppgavens hovedmål var å finne ut hvilken epleblanding og betingelser som egnet seg best for å utvikle en norskpreget sider med god sensorisk kvalitet på ca. 4,7 % alkohol eller under, laget av norske epler.

Oppgaven har hatt følgende delmål:

- Undersøke hvilken av epleblandingene og betingelsene, ulike gjæringsmetoder, temperaturer, modning, filtreringsmetoder og tilsetning av humle, som egnet seg best til videreutvikling av sider.
- Undersøke hvilken betydning fordelingen og innholdet av ulike biokjemiske komponenter for sluttkvaliteten (organoleptisk) til sider.

2 Teori

2.1 Siderproduksjon i historisk sammenheng

Sider kan spores mer enn 1000 år tilbake til landene rundt Middelhavet. Frankrike (Bretagne og Normandie), Storbritannia (West country og sør vest) og Spania (Asturia) som har lange tradisjoner for siderproduksjon (Lea & Drilleau 2003).

De første spor i Norge av villepler stammer fra Vikingtiden (ca. år 830) og ble funnet i Osebergskipet i 1903 (Redalen & Vestrheim, 1991). Det er usikkert hvor lenge sider har vært produsert i Norge, men allerede i år 940 fastsatte Frostatingsloven bøter for dem som stjal epler eller humle fra andres eiendom (Skog og landskap, 2015), som antyder eplets betydning. I Sogn var det flere fabrikker som fremstilte sider fra midten av 1800-1920, da det ble alkoholforbud i Norge med strenge regler for salg og markedsføring (Bleie, 1947; Vangdal et al 2015). Etter forbudet ble fabrikkene nedlagt og epleprodusentene produserte i mange år kun sider til eget forbruk.

Gjennom historien er spontangjæring, kalt tradisjonell gjæring/fermentering, den eldste metoden for utvikling av alkohol, med kanskje ikke beste kvalitet. I mange år ble spontangjæring sett på som et under, og i 1830 fant vitenskapsmenn ut at gjær var en sopp som formerte seg i alkoholholdige drikke (Ringnes.no). Først i 1880 kartla Louis Pasteur gjærsopp og de andre mikroorganismenes virkeområder og vekstbetingelser, sammen med pasteurisering (Carlsberg bryggeri, 2016).

I 1883 klarte vitenskapsmannen Emil Chr. Hansen ved Carlsberg bryggeri i Danmark å rendyrke en egen gjærstamme (*Saccharomyces*) fra villgjær, som senere ble betegnet som kulturgjær (Carlsberg bryggeri, 2015). Det var starten på industrielt fremstilt kulturgjær for brygging av alkoholholdig drikke. Kulturgjærens inntog gjorde det mulig å styre og kvalitetssikre alkoholfermenterings prosessene på en helt annen måte enn før.

Schønberg Erkens kokebok fra 1918 inneholder resept på eplevin. I resepten benyttes rognebær som erstatning for mangel på tannin, og næringssalt (proteiner og fosfor) for mangel på næring (Erken, 1918). Det viser at de allerede på den tiden hadde tatt i bruk kulturgjær og var oppmerksomme på norske dessertepplers mangel på astrigens, tannin

og næringsstoffer. I Norge startet utprøving og forskning på sider opp igjen rundt 1990 i Hardanger, der flere produsenter slo seg sammen og samarbeidet med Bioforsk (nå NIBIO), på Lofthus i Ullensvang. I 2003 ble Hardanger siderprodusentlag opprettet og i 2009 etablerte de merkevaren «Sider frå Hardanger», som har fått beskyttet geografisk betegnelse. Det betyr at produktbetegnelsen og måten produktet produseres på er beskyttet etter en egen forskrift i matloven. Sider frå Hardanger må bl.a. produseres av ren eplejuice dyrket i Hardanger uten tilsetning av vann.

2.2 Siderproduksjon i verden i dag

Sider produseres i tempererte soner over store deler av verden, der det er gode vekstvilkår for epledyrking. England anses for å være den største produsenten av sider med mer enn 350 registrerte siderprodusenter (Lea, 2015). På verdensmarkedet finnes et mangfold av sider fra stille til kullsyreholdige, grumsete til klare, fargeløse til brune, pasteuriserte og upasteuriserte, konvensjonelle, økologiske og biodynamiske. Engelsk sider er lettere uklar og karbonert med varierende sukkerinnhold og inneholder mellom 1,2-8,5 % alkohol. I Frankrike er sider produsert fra eplejuice, sprudlende, og med lav alkoholprosent med karakter av restsødme fra eple og tannin. Spansk sider kan være oksidert med enten eddikaroma eller smaksbilde av hestesvette og silo I Tyskland og Sveits forventes tørrere, mer alkoholholdige og syrlige sidere, mens i Nord-Amerika produseres fermenterte, grumsete og upasteurisert eplesider (Lea & Driellau 2003).

Den største forskjellen på sider er allikevel mellom industriell- og håndverksbrygget sider som henholdsvis brygges fra 1-14 dager og fra 14 dager (kulturgjær) til 18 måneder, avhengig av fermenteringsprosess (Lea 2015; Vangdal 2012). Industriell sider fremstilles av alt fra eplekonsentrat til utvannet eplejuice eller i blanding med eplekonsentrat og vann, ofte tilsatt sukker, aroma og kullsyre (Vangdal et al 2015). Håndverkssider produseres av eplejuice med eller uten tilsatt gjær som kan justeres med sukker ved behov. I dag utprøves ulike metoder i Norge for forskjellige varianter av eplesider med norsk råvare. Utfordringen for siderprodusentene er trolig først å utvikle unike produkter som er tilpasset ulike anledninger, med jevn kvalitet som kan omsettes gjennom samme kanaler som mikrobryggeriøl eller vin.

2.3 Epler

2.3.1 Generelt om epler

Eple tilhører slekten *Malus* i rosefamilien (*Rosaceae*), opprinnelig fra Sentral-Asia der de har blitt dyrket i mange tusen år (Stuestøl, 2013). Helt siden antikken har eple vært den viktigste frukten i tempererte regioner i Asia og Europa (Redalen&Vestrheim 1991). I Norge ble epledyrking mer alminnelig etter kristendommens inntog sammen med munkene.

Det finnes i dag kun 405 villepletrær (*Malus sylvestris* (L.) Mill) spredt i et lite belte fra Østfold langs kysten til Nord-Trøndelag og på noen få øyer på Sørlandet, men de er i ferd med å forsvinne (Tollefsrud et al. 2014). Bruk av 10-20 % villepler i siderproduksjonen vil kunne medføre både at de ulike villeplene beholdes og tilføre sider manglende astrigens.

I dag dyrkes hundrevis av sorter fra den domestiserte arten *Malus domestica*. (Borkh) over hele verden. Arten nedstammer sannsynligvis fra en blanding av ulike villeplesorter (NIBIO, 2015). I Norge dyrkes det ca. 300 ulike eplesorter (Skoglandsskap.no, 2015), men få i store volum. Epler er og har i mange år vært den viktigste kommersielle frukten som dyrkes i Norge og mesteparten av det som dyrkes går til direkte konsum. I 2014 ble det totalt omsatt 7580 tonn hvorav 160 tonn gikk til industrien (Eidhammer, 2014). Sortene som ble solgt mest av omsatt i tonn var: Aroma rød (1750), Summerred (1556), Aroma (1061) og Discovery (1196) (Eidhammer, 2014). Norske epler er i sterk konkurranse med importerte epler som ofte er søtere og billigere ifølge Eidhammer (2015).

I Norge blomstrer epletrærne vanligvis (avhengig av klimaet) tidlig og eplefrukten modnes saktere på grunn av det kjølige klimaet sammenlignet med sør Europa (Redalen&Vestrheim, 1991). Det medfører syrligere epler og friskere sider, enn sider produsert i sørligere strøk. Sukkerinnholdet i eplene påvirkes gjennom vekstperioden av bl.a. klima, lysforhold, tynning og gjødsling. Tilgangen på norske epler er ofte begrenset til et par måneder etter innhøsting, avhengig av eplenes modningsgrad ved innhøsting og videre lagringsforhold (Stuestøl, 2013). Epler er levende produkter, også etter høsting, og under lagring oksiderer organiske syrer, proteiner og stivelse, og omdannes til enklere komponenter og forbrukes (Redalen 1991; Stuestøl 2013).

2.3.2 Hovedtyper epler

I Norge har sider tradisjonelt blitt produsert av dessertepler og med et høyt alkoholinnhold, i motsetning til Frankrike, der sider produseres av ulike sorter siderepler og med lavt alkoholinnhold (Vangdal, 2013). Siderepler gir ofte mer kompleksitet og fyldig sider enn husholdnings- og dessertepler, fordi de har et høyt innhold av polyfenoler (procyanidiner) som gir tannin (Lea&Drilleau, 2013). Det gjør dem spesielt godt egnet til siderproduksjon fordi det medfører mer karakter, munnfølelse og kompleksitet (kropp: astrigens og tannin). (Leforestier et al. 2015; Sanoner et al 1999). Sidereplene inndeles i 4 grupper: søte (veldig søte, lavt innhold av tannin og syre), bittersøte (høyt innhold av tannin og sukker og lavt syre) eller bitre (høyt innhold av tannin og syre) og syrlige (høyt innhold av syre og noe tannin). Sidereplene har et høyt innhold av cellulose som gir god holdbarhet og gjør dem enklere å presse og gir dem mer klar eplejuice enn dessertepler (Lea, 2015).

2.4 Biokjemiske komponenter i epler

Epler inneholder ulike biokjemiske komponenter som blant annet karbohydrater, polyfenoler, aminosyrer og organiske syrer. Innholdet og fordelingen av disse påvirkes av blant annet genotype, eplesort, geografisk plassering, jordsmonn, og befruktning. I tillegg til epletrænes alder, mikroflora, dyrkingsforhold, gjødsling (nitrogen), sesong, klima, modenhet (innhøsting) og lagringsforhold (Stuestøl 2013; Lea 2015).

2.4.1 Karbohydrater

Eple består hovedsakelig av de fermenterbare karbohydratene fruktose, glukose og sukrose med spor av maltose, xylose og sorbitol. Innholdet og fordelingen av karbohydrater i epler kan være: 60 g/L fruktose, 25 g/L sukrose og 17 g/L glukose (Buglass, et al 2013). Relativ søthet i karbohydratene rangeres: sukrose 1, glukose 0,74, fruktose 1,73 og andre sukker ca. 0,4 og epleblandingen med høyest andel fruktose og sukrose er søttest. Xylose er en naturlig bestanddel av eplejuice og finnes i mengder fra 0,01 til 0,11 % (Fuleki et al. 1994).

Av de sukkerfrie tørrekstraktene (polyfenoler, organiske syrer etc.) er det hovedsakelig sorbitol og glyserol som bidrar med etanol konsentrasjoner i dannelsen av aroma og smakskomponenter (Fuleki et al. 1994). Sukkeralkoholen sorbitol (primær metabolitt) derivert gjennom den fotosyntetiske veien regnes som transportsukkeret i eple og finnes i størst mengder av de ikke fermenterbare sukker (Buglass 2015).

2.4.2 Nitrogen og aminosyrer

Nitrogeninnholdet i epler er ca. 0,3 % protein, som tilsvarer mellom 10- 250 mgN/L løselig protein (vanligvis under 100 mg/L) (Lea, 2015). Innholdet er lavere enn i mye annen frukt som for eksempel druer (Lea & Drilleau 2003). Nitrogeninnholdet er i direkte samsvar med aminosyreinnholdet og det finnes lite oppløst peptidmateriale eller oppløst protein (Lea & Drilleau 2003). Mellom 85 og 90 % finnes hovedsakelig som asparagin (ca 79%) med mindre mengder glutaminsyre, asparaginsyre, serine og proline (Lea 1998; Lea, 1972). Nitrogeninnholdet i eplejuice anses som en begrensende vekstfaktor for *Saccharomyces cerevisiae* og gjæren trenger minst 75 mg/L nitrogen (dos Santos et al. 2015). Undersøkelser viser at både for høyt og lavt nitrogeninnhold er ugunstig. Ved for høyt nivå kan gjærveksten påvirkes med høy produksjon av etylkarbammat og overskudd av høyere alkoholer (>400 mg/L) som er ugunstig for siderkvaliteten (Alberti et al 2011; Beltran et al. 2005). For lavt nivå kan medføre at fermenteringen stopper opp eller at sideren blir uklar (dos Santos et al, 2015; Lea, 2003). Ved for lavt nitrogeninnhold kan ammoniumsalter eller tiamin tilsettes for å forsterke gjæringen, og ved for høyt iblandes eplejuice med lavere proteininnhold.

Ved bruk av dessertepler i siderproduksjon benyttes ofte proteinspaltende enzym, pekinase for å forenkle pressingen og få mer klar sider. Det skjer ved at enzymene α - og β - amylase enzymatisk hydrolyserer α -1,4 - glykosidiske bindingene som et lim og bunnfeller.

Aminosyreinnholdet står for kun 20 % av total innholdet i nitrogen og er i eplejuice relevant for biosyntese i dannelsen av flyktige komponenter (Ardö, 2006). De fleste primære aminosyrene metaboliseres av gjæren og forsvinner ved slutten av fermenteringen (Ardö 2006).

dos Santos (2015) undersøkelse med lavt nitrogeninnhold (<75 mg/L) medførte at sider ble uklar og utviklet 50 % mindre flyktige komponenter (avhengig av gjærstamme), hovedsakelig estere og 3-metyl-butanol (isoamyl alkohol). Undersøkelsen avdekket også at ved bruk av dessertepler har gjærsoppen bruk for et høyt innhold av aminosyrene asparagin, asparaginsyre, glutaminsyre og alanin, for dannelse av ester og fusel. Bestemmelsen av frie aminosyrer kan utføres for å identifisere eplenes innhold og deres geografiske tilhørighet.

2.4.3 Organiske syrer

Opprinnelig ble syrer definert som stoffer som oppløst i vann gjorde at vannet smakte surt, men i dag omfatter syrene langt flere stoffer. Organiske syrer brukes ofte som en parameter for kvalitet fordi de er viktige for hele smaksopplevelsen (organoleptisk), farge, pH, kjemisk stabilitet (cellene produsere cellemembraner) og lagringsholdbarhet (Berry & Slaughter 2003). De seks viktigste gruppene av organiske syrer i sider er: L- og D-eplesyre, melkesyre, kininsyre, pyrodruesyre, sitronsyre og ravsyre. Syreinnholdet i epler er ofte mellom 0,18-1,4 % og av dette er 80 %, eplesyre, 0,04-0,46 % kininsyre med spor av citra eplesyre og shikimic syre (Buglass 2015). De fleste organiske syrene er med fra starten, men for eksempel melke-, rav-, og pyrodruesyre dannes under fermenteringsprosessen i ulike synergiske forbindelser med gjæren. Ravsyre regnes som en typisk metabolitt fra gjær. Innholdet og fordelingen av syrene er meget viktig for sluttsmaken og synergisk sammen med involverte polyfenoler med å gi astrigens i alkoholholdige drikkevarer og sider (Symoneaux et al 2015). Sammensetning og konsentrasjon av organiske syrer i sluttproduktet er avgjørende for balansen og den kjemiske stabiliteten i sluttproduktet (Ye et al 2014). Innholdet av organiske syrer endres gjennom fermenteringsprosessen fra råvarer til ferdig produkt, de fleste øker mens ravsyre ofte avtar og det metaboliseres acetat estere (Ye et al 2014).

2.4.4 Fenoler

Epler inneholder mange ulike fenoler og undergrupper som klassifiseres etter deres kjemiske struktur. Ofte kjennetegnes fenoler igjen på rødfargen som oppstår med jernklorid.

Fenolene er selv i små mengder ansvarlige for farge og bitterhetsbalansen (astrigens) som bidrar til munnfølelse (Lea& Driellau 2003). Fenolene i epler inndeles ofte i to hovedgrupper hydroksykaneltsyre og flavonoider som igjen inndeles i undergrupper. Hydroksylkanelgruppen består av: klorogensyre (5-kafeoylkininsyre) og *p*-kumarinsyre som er konjuganter til koffein og *p*-kumarinsyre med kininsyre. Avhengig av oksidasjonsgraden dannes blant annet flavoner, flavonoler (quercetin), antocyaniner og catechin. Fenolene er involvert som metabolitter for å unngå feil under fermentering og sekundær malolaktisk fermentering. De vanligste fenolene i dessertepler er procyanidiner, antocyaniner og flavanoler (Vidal et al 2003).

2.4.5 Polyfenoler

En av de viktigste kvalitetsparametere for sider er polyfenolene som selv i små mengder bidrar med organoleptisk (munnfølelse) sluttkvalitet (Alonso-Salces et al 2001; Alonso-Salces et al 2001; Verdu et al 2013). Polyfenolene er involvert i dannelsen av kolloidalstabilitet i interaksjoner med proteiner (Vidal et al 2003; Mengqi et al 2014) og procyanidins fungerer som antioksidanter som forhindrer uønskede mikroorganismer og fjerner frie radikaler som dermed øker holdbarheten.

Fordelingen og innholdet av polyfenoler varierer mye mellom eplesorter (mellom ulike eplesorter >tidoblet), blandinger, territorium og fysiske betingelser (Macheix et al 1991; Santoyo et al 2003), sammen med klimatiske forhold, dyrkingsforhold, lagring og fermenteringsprosessen (Lea &Drilleau 2003). Valavanidis (2009) undersøkelse av økologisk dyrkede epler med hensyn til polyfenoler og antioksidanter viste ingen signifikant forskjell i forhold til konvensjonelt dyrket.

Epleskallet har et høyere innhold enn eplekjøttet (Ćetković et al 2008) og inneholder essensielle oljer, aroma, syre, tannin, bitterstoffer, gjær og pigmenter. Klorogensyre finnes hovedsakelig i fruktkjøttet og noe catechin mens phloridizin i frøene (Awad, et al 2000). Kvernede epler (ufiltrert) har høyere konsentrasjonen av polyfenoler og antioksidanter enn eplejuice, likt som for jordbær og annen juice (Karaman et al 2013; Oszmiański et al 2008).

Sidereplejuice har et høyere innhold av polyfenoler som gir tannin, enn desserteplejuice (Kahle et al. 2005). Bruk av dessertepler uten tannin kan ofte gi karakterløs sider med høyt innhold av syre og sødme, uten nødvendig astringens og bitterhet som gir kompleksitet og munnfølelse (Lea, 2015; Vangdal, 2013). Tannin kjennetegnes av en tørr og snerpende (astringerende) karakter og bidrar på samme måte som for vin med å gi struktur og kompleksitet i sider. Effekten av tannin medfører at sider og vin virker tørrere og friskere enn de faktisk er (Lea, 2015). Unge umodne viner kan være dominert av tannin, men modning gjør dem bløtere og mildere.

I følge Lea (1974), er sammensetning av polyfenoler fra eplejuicen til utviklingen i fermenteringsprosessen viktig for farge, syrebalanse, tannin (snerpende), smak og aroma. Lichtenfeld (2011), fant et høyere innhold av antioksidanter, fenoler og tannin i gamle eplesorter som Bramley Seedling og Torstein enn i nyere sorter som Discovery, Aroma og Jonagold (Vangdal, 2013). Jakobeks (2013), undersøkelse fra Balkan av eldre eplesorter påviste store mengder polyfenoler, mens Oszminskis (2008), undersøkelse av gamle og nye eplesorter ikke avdekket noen forskjell. Kahles (2005), undersøkelse fant klorogensyre som den mest dominerende hydroksykanelnsyren av polyfenolene i både dessertepler (57 til 68 mg/L) og siderepler (134 to 593 mg/L).

Tannin kommer fra polyfenolene procyanidiner (Verdu et al 2013) og i kombinasjon med 5- kaffeoylkininsyre (polymer procyanidins) (Lea et al 1978). Symoneaux (2014), fant ut at polymeriseringsgraden til procyanidin i interaksjoner med andre komponenter i eplesider kun har innvirkning på astringens og bitterhet, men ikke på sødme og surhet ved mengder >750 mg/L. Graden av polymerisering påvirker forholdet mellom astringens og bitterhet og små procyanidiner (<DPn) er bitre mens de store (DPn 5-9) er snerpende (Lea & Arnold 1978).

Legurienel (1988) og Randkine (1968), fant ut at mesteparten av polyfenoler utvikles i fermenteringsprosessen av gjærstammene. Xu et al (2005) undersøkelse fant ut at det var mulig å kontrollere dannelsen av polyfenoler i fermenteringsprosessen ved å benytte sekvensiell inokulering av *Saccharomyces cerevesiae* og *Hansensiaspora valebyensis*.

2.4.6 Flyktige komponenter

Flyktige aromakomponenter blir hovedsakelig derivert fra mange forskjellige komplekse mikrobielle og biokjemiske reaksjoner som skjer under fermenteringsprosessen og i sekundær fermentering, malolaktisk melkesyrefermentering (MLF) (Styger et al 2011). Bestemmelse av disse kan derfor være noe kompleks fordi de ofte dannes i reaksjoner mellom mange ulike komponenter med forskjellige kjemiske egenskaper (Styger et al 2011).

I sider finnes ofte etanol, glyserol, eddiksyre og de sekundære metabolittene høyere alkoholer, estere, fettsyrer, terpenier og karbonyler (Ye et al 2014; Styger et al. 2011; Satora et al 2009). Det finnes også mindre mengder fenoler, derivater og terpenier og mest dominerende er etanol, 1-hexanol, 3- metylbutanol acetat, 1-butanol, 2-fenyl acetat og hexansyre (Xu et al 2007). Disse komponentene er viktige bidragsyttere i bestemmelsen av kvalitet og pris til fruktvin sammen med andre bestanddeler (salter, laktoner, organiske syrer, sukker (Satora et al 2008).

Etanol bidrar med fylde, laktoner med fruktig lukt og estere med fruktsmak. Høyere alkoholer bidrar i små mengder med å komplementere smaken og i store mengder >400 mg/L med uønsket fuselsmak (hestesvette, fjøs etc.) (Le Quéré et al 2006; Vidrih& Hribar 1999). I forbindelse med oppfattelse av smak og lukt i alkoholholdig drikke som sider benyttes terskelverdier som bidrar med å gi en indikasjon på hvor små mengder som er utslagsgivende. Komponentene har ulik terskelverdier med hensyn til alkoholprosent, ulike produkter og de bidrar synergisk langt under terskelverdiene med å gi sluttproduktet karakter ved å enten fremheve eller undertrykke hverandre (Styger et al 2011). Det er derfor noe vanskelig å fastsette bestemte terskelverdier.

2.4.7 Ideell epleblanding til siderproduksjon

I følge Lea&Drilleau, (2003) inneholder den optimale eplejuiceblandingen for sider pr: "7-11 (g/100ml) fruktose, 1,5-3 (g/100ml) glukose, 2-4,5 g sukrose, 0,2-1 (g/100ml) sorbitol, 0 (men <2% kan aksepteres) stivelse, 0,1-1 (g/100ml) pektin, 500-2000 (mg/L) aminosyrer, 1200 (mg/L) kalium, 0,3-0,5 (g/100ml) titrerbar syre, 3,3-3,8 pH,

300-700 (mg/L) klorogensyre, 100-200 (mg/L) phloridizin syre og 1000-1500 (mg/L) epicatechin and procyanidin.”

2.5 Gjær

2.5.1 Gjærcellens oppbygging

Gjær er en encellet soppart som er ca. 1/100 mm i tverrmål (10 * større enn en bakterie) er rund, oval eller langstrakt og formerer seg med knoppkyting (henger sammen i kjeder) eller vanlig todeling. Et gram gjær inneholder ca. tjue billioner gjærceller. Gjærstammer identifiseres og kategoriseres ofte etter morfologi, sporer og sporebærende strukturer, gjæringsmønster, metabolske egenskaper og seksuell og aseksuell formering ved hjelp av mikroskopering (Valles et al 2007). Gjærceller er kjemoheterotrofe, eukaryote celler som er oppbygd med en cellevegg med membran som inneholder mange indre organer med ulike funksjoner, blant annet cytoplasma, membran og en cellekjerne med DNA (snl.no, 2015).

Cellemembranen består av proteiner, steroler og fosfolipider med et polart hode som går utover og en hydrofob hale som går innover. Proteinene samarbeider med adenoisintriphosfataser i gjærcellens cellemembraner med transport av oppløste stoffer (sukker og aminosyrer) ut og inn av cellen. Proteinzymer spalter proteiner til mer smaksrike aminosyrer og peptider. Sterolenes funksjon i cellen er å stabilisere og stive opp membranene med tilførsel av molekylær oksygen for sin biosyntese. Membranlipidenes komposisjon er avhengig av vekstbetingelsene i gjærcellen som også påvirker alkoholtoleransen.

Aerob fermentering medfører at mitokondriene i gjærcellene respirerer mens anaerob fermentering medfører det motsatte, samtidig som mitokondriene endres til enkle strukturer. Ved anaerob fermentering kan gjærsoppen vokse tilfredsstillende med tilførsel av fettsyrer og steroler.

2.5.2 Villgjær og spontangjæring

Villgjær finnes utenpå råvarene (epler inneholder ca. $5 \cdot 10^4$ celler), i utstyret og omgivelsene (Lea, 2015). Nypresset eplejuice som blir stående noen dager med rette vekstbetingelser (10°C) vil spontantgjære (tradisjonell fermentering). Starten av fermenteringsprosessen domineres ofte av 100 000 ulike gjærstammer (sorter) pr /ml (Valles et al 2007). Avhengig av geografisk plassering, eplesorter og eplejuiceblandinger kan disse villgjærsoppene være til stede: *Kloekera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* og *Hansenula* (Lea et al 2003).

Villgjærstammene formerer seg raskt samtidig som de produserer store mengder gass, alkohol og smakskomponenter, (etyl acetat, smørsyre og estere). De dør ofte ved 2-4 % alkohol (Lea, 2015), men flere forsøk har avdekket at de (ikke- *Saccharomyces*) har høyere alkoholtoleranse enn først antatt, avhengig av de fysiologiske egenskapene (Liu et al 2015; Xu et al 2006). Når villgjærstammene dør overtar ofte de mer alkoholtolerante, *Saccharomyces spp (uvarium eller bayanus)*, som har vært til stede i små mengder fra starten (Valle et al 2007). Det er ofte *S. bayanus* som starter prosessen og *S. cerevisiae* som overtar og avslutter (Valles et al 2007; Lea, 2003) prosessen med å omdanne resten av sukkeret til alkohol og vinlignende smakskomponenter.

Tradisjonell fermentering kan gi meget komplekse og smaksrike sider til sammenligning med inokulert, men det krever lang erfaring og ofte blir resultatet motsatt (Lea, 2015). Problemet med spontangjæring er at den er uforutsigbar og lite kontrollerbar. Det er omtrent umulig å forsikre seg at de ønskede gjærsoppene er tilstede i store nok mengder til å utkonkurrere uønskede (Lea, 2015). Dersom mengden er for lav er det stor risiko for at uønskede mikroorganismer kan overta fermenteringen og produsere uønskede smakskomponenter som høyere alkoholer (smak av silo og hestesvette) eller andre uønskede flyktige komponenter (Lea, 2015).

Eller i verste tilfelle gjøre sider udrikkelig. Dersom f.eks. *Kloekera* får dominere starten av fermenteringen kan sider få et høyt innhold av etyl acetat som gir en ubehagelig løsemiddel smak med eddikaroma (Lea, 2015).

I blant annet Bretagne og Normandie i Frankrike sverger lidenskapelige siderprodusenter til tradisjonell fermentering som de har drevet med i en årrekke (erfaring og kompetanse). De benytter ofte ”Keeving” en metode for å trekke ut mer smakskomponenter ved at den knuste eplemassen (siderepler) tilsettes enzymet, PME (Pektin Metyl Esterase) sammen med kalsium ioner og masereres i et døgn (Lea, 2015). Prosessen bidrar til å danne en geleaktig nettverk som fanger opp pektin og andre viktige næringsstoffer som filtreres vekk (Lea, 2015). Dette medfører at eplejuicen blir påført næringsmangel som bidrar med å forsinke fermenteringsprosessen mellom 6-18 måneder ved 4-10°C (Lea, 2015). Metoden bidrar til høyere innhold av flyktige komponenter, forbedret farge og medfører mer komplekse og smaksrike sider med bedre munnfølelse (fet) (Lea, 2015). I tillegg får sideren naturlig sødme fordi gjæren ikke er i stand til å metabolisere alt sukkeret (Lea, 2015).

Lea (2015), anbefaler uerfarne siderprodusenter som ønsker å prøve ut spontangjæring å tilsette halv parten av anbefalt dosering av SO₂ fra starten av fermenteringen for å ha en større mulighet for å lykkes. Det medfører at all uønsket mikroflora drepes og *Saccharomyces spp* som kun finnes i små mengder får noe lengre tid på lagfasen (oppformering). I tillegg blir eplejuicen mer homogen og kontrollerbar, samtidig som sider beholder noe av sin egenkarakter (Lea, 2015). Dersom fermentering ikke har skjedd i løpet av 3 uker (uten igangsetting av gjær eller fat) må fatene ristes eller tilføres ekstra næring (Lea, 2015).

2.5.3 Saccharomyces spp og fermentering

Ulike stammer og arter av *Saccharomyces cerevisiae* (*S. ssp*) har vært brukt innen matindustrien siden slutten av 1800 tallet til produksjon av alkoholdig drikke og gjærbakst og i dannelsen av enzymer og proteiner (snl.no, 2016).

Kulturgjær ble rendyrket med tanke på produkt, egenskaper og høy alkoholtoleranse (til ca. 14 %) etter professor Chr. Hansens metode (1883) (Carlsberg bryggeri AS, 2016). *S. ssp* blir regnet som de mest effektive gjærstammene i smaksutvikling og etanoldannelse, begrenset av tilgang på fermenterbart sukker (Lea, 2003).

Saccharomyces spp bygger opp et gjærslag, som etter sigende skal bygges opp i overflaten etter endt fermentering, som enkelt kan fjernes og benyttes videre. Gjærsopp kan benyttes 5-20 ganger avhengig av antall celler og levedyktighet (Nybraaten, 1998). Dersom gjæren skal gjenbrukes må den vaskes korrekt og oppbevares kjølig, og minst 90-95 % av gjæren må være levedyktig. De fleste store drikkevareprodusenter (Carlsberg, Aass bryggeri etc.) rendyrker sin egen kulturgjær fra ulike arter og gjærstammer fra gjærsoppen *Saccharomyces cerevisiae* som opprinnelig var på råstoffet. Gjærstammene vernes meget godt fordi ofte anses gjærestammen som minst like viktig eller viktigere enn råstoffet for sluttkvaliteten (Nykanin, 1986; Cordente, 2012). I dag rendyrkes også andre gjærstammer fra andre gjærsopper.

2.5.4 Gjærkultur (startkultur)

I utvelgelse av gjærsopp eller blanding, er det viktig å velge stammer og arter med tanke på både utvikling av aroma og smaksprofil, samt antall gjærceller og levedyktighet som raskt kan utkonkurrere uønsket mikroflora (Lea & Drilleau 2003). Ulike gjærtyper har ulike betingelser for flokkulering, attenuasjon (minskning), alkoholtoleranse og temperatur (Charoenchai et al 1998; Berry & Slaughter 2003). Gjærkulturen er ansvarlig for mange hundre (400) av de totalt 1000 aromastoffene (råstoffet er ansvarlig for resten) som dannes under fermenteringsprosessen (Romano et al. 2003). Sluttkvaliteten er helt avhengig av gjærens egenskaper, mengde og funksjon sammen med eplejuicens næringsinnhold, pH og temperatur (Lea & Driellau; Styger et al 2011).

Det finnes i dag et mangfold av ulike kulturgjær (startkulturer) fra ulike gjærproduksjonsselskaper som blant annet Wyeast fra USA og Mangrove Jack`s Craft serie som produseres i New Zealand og Australia. Selskapene har over mange år utviklet mange ulike kvalitetskulturer med blandinger av ulike gjærstammer og - arter for ulike typer alkohol (Lea, 2015).

Ofte er blandningene sammensatt av *Saccharomyces cerevisiae* stammer og eller andre typer *S. ssp* med tanke på å øke dannelsen av flyktige komponenter (Ciani, 1997). De aromatiske kulturgjærene er ofte tilsatt stabilisatorer og kan inneholde mineraler eller vitaminer.

Omsetningen av fersk og frysetørkede kulturgjær har økt formidabelt de senere årene. Årsaken til den økte bruken skyldes sannsynligvis et ønske om en mer forutsigbar fermenteringsprosess, bedre kvalitetskontroll og redusert risiko for ødeleggelse (Lea, 2015). Ulempen ved bruk er at de ofte gir mer ensartede sluttprodukter med manglende kompleksitet og karakter (Lea & Drilleau 2003).

De senere årene har flere forsøk med blandinger av *Saccharomyces spp* og villgjærstammer blitt utført for å utvikle mer komplekse og spennende sider, uten å miste kontrollen over fermenteringsprosessen (Domizio et al 2011; Ciani et al 2011). Blanding med *ikke-Saccharomyces* stammer og arter ser ut til å øke dannelsen av ønskede glyseroler, estere og høyere alkoholer (Fleet, 2003). I 2015 utførte Liu med flere et forsøk med en blanding av *S. cerevisiae* og 3 ulike *Williopsis saturnus* arter (NCYC 2728, NCYC 22 og NCYC 500), som resulterte i mere komplekse sider med høyere innhold av flyktige komponenter enn ved kun bruk av *S. cerevisiae*. På NIBIO i Ullensvang har de over tid forsket på å isolere gjærfloraen fra diverse eplsorter som benyttes i siderproduksjon (Vangdal, 2015).

2.5.5 Vekstbetingelsene til gjærsopp

Gjærsopp er ofte fakultativ anaerobe og trives best med oksygen. Optimumstemperatur er mellom 20-30°C, men den kan vokse helt ned til 2°C og dør ved ca. 55°C. Til siderproduksjon anbefales temperaturene 4-10°C for spontangjæring og 15-25°C kulturgjær. Ideell pH er mellom 3,5-6, men den kan vokse helt ned til 2 og ideell pH for siderproduksjon er mellom 3,3-3,8. For lav pH vil gi for syrlig sluttproduktet, for høy (>pH 3,8) kan medføre uønsket mikrobiell oppblomstring og 4 eller mer kan gi uønsket fuselsmak (Lea, 2015).

Gjærsoppens næringsgrunnlag er karbohydrater, nitrogen og uorganiske stoffer som klorid, svovel og fosfat og ulike B -vitaminer. I tillegg trenger gjærsoppen ulike metaller som zink, magnesium, natrium og kalium (Lea, 2015; Nybraaten, 1998). Gjærsoppen absorberer næringen gjennom celleveggen og skiller ut hydrolytiske enzymer som bryter ned polysakkarider.

Nitrogen anses som en begrensende faktor for fermentering for *Saccharomyces spp*, men den er i stand til å utnytte ulike nitrogenforbindelser med unntak av nitritt og nitrat (Lea & Drilleau 2003). Maltose og lav glukose oligomerer er av varierende grad fermenterbar avhengig av gjærstamme (Thomas, 2004).

2.5.6 Vekstfasene til gjær

Første fase i fermenteringsprosessen, lagfasen, bør foregå aerobt (respirasjon med oksygen) ved ca. 20°C for å komme raskt i gang, og deretter fortsette over tid ved lavere temperatur. Det er viktig å få prosessen raskt i gang for å utvikle riktige smakskomponenter og aroma og for å forhindre en svekket formering med lav alkoholdannelse, eller at sider infiseres slik at det dannes bismak som medfører tap i friskhet og fruktsmak (Lea & Drilleau 2003).

Cellekulturen (startkulturen) bruker først litt tid på å akklimatisere seg og tilpasse seg det nye miljøet avhengig av blant annet forbehandling, cellekonsentrasjon og gjærstammer (Lea & Drilleau 2003). Deretter forbrukes glykogenlageret i gjærcellene og det syntetiseres tilstrekkelig mengder steroler (fettsyrer) for å gjøre celleveggen gjennomtrengelig til fermenteringsprosessen (Berry & Slaughter 2003; Palmer 2006). Fettsyrene bidrar med å forsterke celleveggene til gjærsoppen, og reduserer utviklingen av uønskede derivater fra eddiksyre under fermentering, men de kan bidra negativt med å ødelegge holdbarhet i for store mengder (Berry & Slaughter 2003). Fermenteringen kan skje i løpet av noen timer med optimale næringsforhold og temperatur over 10°C.

I andre fase, vekstfasen, reproduseres gjærcellene, og energiomsetningen til gjærsoppen omdanner sukkeret til alkohol og karbondioksid. Energien frigis som varme, mens etanolen blir igjen i produktet. Gjærsoppen omdanner et suktermolekyl til to kuldioxidmolekyler som tapes som varme mens to alkoholmolekyler forblir i den alkoholholdige drikken.

Anaerob alkoholfermentering forenklet forklart:



Celleveksten kan beregnes ved å bruke en base og en eksponent: $N=N_02^n$. Basen er: et tall og eksponentene er antall generasjoner: n . N_0 og N er antall celler ved start og slutt. Til beregning av antall generasjoner kan ligning 1. benyttes.

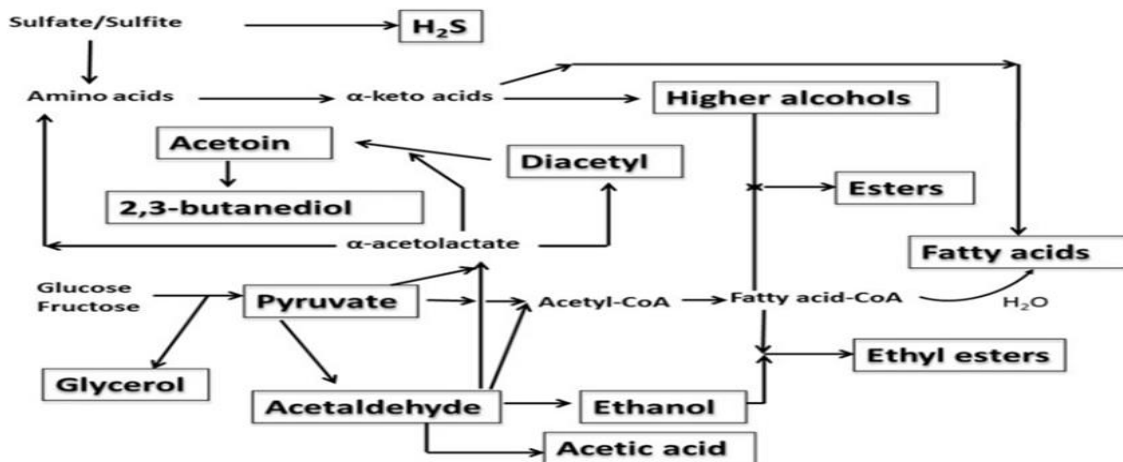
$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \sim 3,3 (\log N - \log N_0)$$

$\log 2$

Ligning (1.)

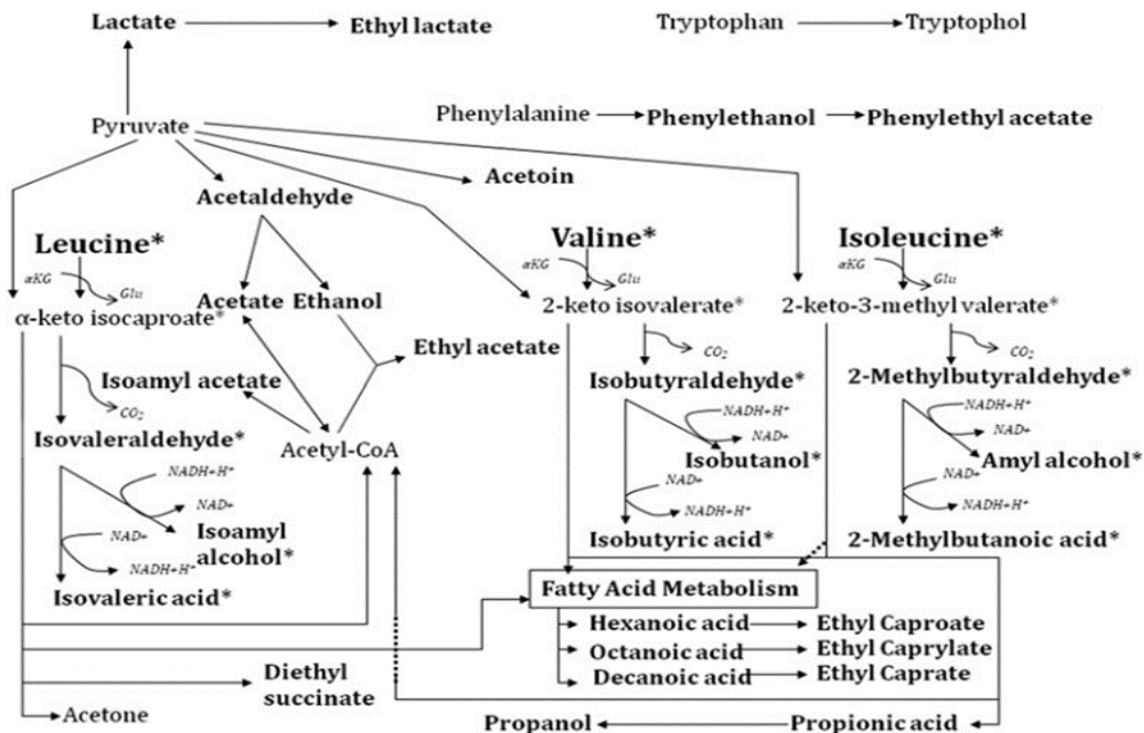
I starten av vekstfasen forbruker gjærcellene glukose og fruktose direkte, mens sukrose spaltes ved hjelp av invertase enzymer til glukose - og fruktoseenheter (Berry & Slaughter 2003). Enzymet melibiase spaltes melibiose til glukose og galaktose som fraktes gjennom cellemembranen (Berry & Slaughter 2003). Dersom fermenteringsprosessen foregår anaerobt blir all ATP som er nødvendig for utvikling generert gjennom glykolysen. Sukrose og monosakkarider nedbrytes og danner alkohol i glykolysen eller også kalt Embden- Meyerhof- Parnas pathway (EMP pathway) (Berry & Slaughter 2003).

Spaltet sukker nedbrytes først til pyruvat som dekarboliseres og danner acetaldehyd som reduseres til etanol. Kraftig fermentering og lav gjærvekst øker dannelsen av acetaldehyd. Nedbrytelsen av acetaldehyd er begrenset av mangel på sink som er en viktig co-faktor for enzymet dehydrogenase til *S. cerevisiae* som også styrer fermenteringshastigheten (optimalt nivå er 0,2-0,3 mg/l) (Palmer 2006).



Figur 2.1. Noen av de viktigste gruppene av aromakomponenter (i boksene) produsert i løpet av alkohol fermenteringsprosessen av gjær (Bartowsky&Henschel, 2004).

Flere komponenter bidrar direkte eller indirekte i utvikling av estere som karbonylkomponentene acetaldehyd og diacetyl og fettsyrene acetat. Noen estere dannes gjennom fermenteringsprosessen i likevekten mellom alkoholer og syrer, men de fleste dannes i reaksjoner mellom alkoholer og acyl-CoA molekyler, som også er nøkkelen til produksjon av frie organiske syrer (Berry& Slaughter, 2003). Hvor mye estere som produseres er avhengig av mengden av korresponderende alkoholer og acyl CoA molekyler som er produsert av gjæren, og enzymene som katalyserer produksjon og nedbrytning av dem (Berry&Slaughter, 2003; Korvald, 2015). I tillegg vil høyere temperatur og alkoholprosent øker mengden estere og motsatt (Berry&Slaughter, 2003). Bevegelse under fermentering, tilgang på oksygen og fermentering under trykk minker dannelsen (Berry& Slaughter 2003; (Nybraaten, 1998)). Selv meget små konsentrasjoner av estere bidrar med noen av de viktigste smakskomponentene i alkoholholdig drikke.



Figur 2.2. "Et forenklet kart over kjente metabolske sammenhenger som indikerer gjærens sammensatte produksjon. Komponentene med uthevet skrift representerer viktige aromatiske forbindelser. Stjerne markerer veien til Erlich pathway som er ansvarlig for produksjon av høyere alkoholer og flyktige syrer. Kursiv skrift viser kofaktorer og overgangen til metabolittene. Glu er glutamat og AKG er en keto –glutamat" (Lilly et al. 2006).

Fra energimetabolismen og celledelingen omdannes små mengder til biprodukter som glyserol (store mengder) og organiske syrer (ravsyre) (Berry&Slaughter, 2003). Glyserol dannes når dihydroksyaceton fosfat reduseres og for lite acetaldehyd regenererer NAD+.

I tredje fase, stasjonærfasen har gjærcellene begynt å flokkulere seg, og formeringen går langsommere på grunn av mangel på essensielle næringsstoffer som sink, B-vitamin eller aminosyrer (Berry&Slaughter, 2003). Avfallsstoffene har begynt å hope seg opp og gjærcellene begynner å dø som følge av næringsmangel. Det kreves nitrogen i alkoholdannelsen for å stimulere sukker transportsystemet (Berry&Slaughter, 2003).

I denne fasen kan uønskede komponenter absorberes og bunnfelle sammen med død gjær og gjærceller som har flokkulert. Karbondioksidutviklingen har stoppet opp og resulterer i at massen blir lettere.

I fjerde fase, dødsfasen opphoper avfallsstoffene seg fordi oksygen og næringen er oppbrukt og gjærsoppen dør. Gjæren pakker seg sammen og faller til bunnen i fatet samtidig som sedimentasjonen øker. I denne fasen dannes fuselstoffer som er en blanding av høyere alkoholer fra avføringen, og gjærcellene nedbrytes av nitrogenkjedene til svovelforbindelsene som medfører metanlukt (promp). De frie aminosyrene er viktig som næring til gjærcellene, men antallet reduseres under fermenteringsprosessene. Det kan dannes så store konsentrasjoner av organiske syrer og alkoholer at de er skadelige for noen av de andre komponentene (Lilly et al 2006).

Biproduktene høyere alkoholer dannes gjennom to veier fra karbonskjelettet til aminosyrene, som er koblet sammen med gjærens aminosyresyntese og aminosyretransaminering og dermed proteinsyntesen. Kraftigere tilvekst hos gjæren øker intensitet i aminosyredannelsen og danner mer høyere alkoholer, hovedgruppen av flyktige komponenter (Nybraaten, 1998). Fuselalkoholer kan syntetiseres både fra aminosyrene i eplejuice og fra fermenteringsprosessen (figur 2.2). Ved høyere temperatur og mer oksygentilgang desto større mengde dannes og omvendt. Det dannes store mengder ved liten næringstilgang. Ulike aromakomponenter som produserer enzymer omgjør smakløse aromakomponenter til smaksrike komponenter og små mengder fuselalkoholer bidrar til å høyne og fullende smaksbilde og motsatt. De vanligste fuselalkoholene i sider er: isobutanol, aktiv amylalkohol, phenylethyl alkohol og 1 propanol (skarp smak av alkohol) > 400 mg/l, isoamyl alkohol (løsemiddelsmak) >40 mg/l og phenylethyl alkohol (bitter og kjemisk smak) >40 mg/L.

Mer enn 50 flyktige svovelkomponenter har blitt identifisert i alkoholholdige drikke (Lea, 2003). De fleste stammer fra råvarene, mens andre blir dannet gjennom svovelmetabolismen til gjær (Berry & Slaughter, 2003). Hydrogensulfid kan dannes av gjærens autolyse eller proteinomsetning som nedbryter og frigjør metionin og cystein, eller dannes dersom uorganisk svovel er til stede (Berry & Slaughter, 2003).

Gjærsoppen er involvert i modifisering av svovelkomponentene, som gir smak og lukt av råtne egg (promp), eller fenylalanin som stimulerer fenyletanol produksjon som medfører roselukt (Berry & Slaughter, 2003).

2.6 Alkoholberegning

Alkoholberegning kan utføres på flere måter. Det finnes flere metoder for å beregne alkoholinnholdet i alkoholholdig drikke. Det kan benyttes destillering, oksidasjon, gaskromatografi, kokepunkt, enzymatisk analyse eller tas utgangspunkt i forskjellen i egenvekt ved starten og slutten på fermenteringen. For å benytte kokepunktmetoden anvendes et instrument kalt ebullimeter som inneholder et termometer som er kalibrert med alkohol konsentrasjonen.

Betegnelser

- O= original
- OG = Original gravity (opprinnelig egenvekt)
- G = Gravity, måling av tetthet *Figur 2.3. Ellbulimeter, hentet fra*
- F = Final (slutt) *http://www.allafrance.com/products/electric-ebullimeters-c-116_130.html.*
- FG = Final gravity. Den siste målingen som tas av massen som sammen med OG danner grunnlaget for alkoholberegning.
- % (ABV) = Alkohol by volum
- 1 g CO₂ fremstiller 1,05 g etanol. Tettheten til etanol = 0,79.



Alkoholinnhold kan utregnes på følgende måte:

- Alkoholprosent (ABV) = $((1,05 * (OG - FG) / FG) / (0,79 * 100))$

$ABV = (OG \text{ (original gravity)} - GS / FG \text{ (final gravity)}) / 7,36$

Det finnes flere andre metoder for å beregne alkohol blant annet kan analyseinstrument Anton Paar anvendes og på nettet finnes ulike alkoholkalkulatorer.

2.7 Tilsetningsstoffer

2.7.1 Karbondioksid (CO₂)

Innvirkningen til karbondioksid på sider er avhengig av tilført konsentrasjon karbondioksid, involverte flyktige komponenter, syreinnhold og sukkernivå. Symoneaux (2015), undersøkte betydningen av karbondioksid på oppfattelse av bitterhet, astrigens, syre og sødme i sider. Den viste at 5 g/L CO₂ ikke hadde noen innflytelse på økt bitterhet, men sødmen ble redusert og astrigens økte noe ved sukkerinnhold på minst 60 g/L. Det skyldes at pH synker ved tilsetning av karbondioksid (Thuillier, 2007). Den oppfattede syrligheten økte ved lav pH 3,48 og sank ved høy pH 3,94. Dersom forutsetningene (nok sødme og tannin) er tilstede vil tilsetning av en liten mengde CO₂ bidra til å heve den organoleptiske sluttsmaken.

2.7.2 Svoveldioksid (E 220)

En av de viktigste tilsetningene i sider er svoveldioksid også kjent som Campden tabletter og SO₂. Tilsetning og brenning av fat med svoveldioksid kan spores helt tilbake til antikkens Hellas (Lea, 2015). Svovel finnes naturlig i epler og dannes under fermenteringsprosessen. Bruken av tilsatt svovel er omdiskutert, fordi det påvirker (ødelegger) smaken og noen er overfølsomme (intolerante). De fleste anser det som et helt nødvendig konserveringsmiddel mot oksidasjon og uønsket mikroflora for å få nødvendig kontroll over fermenteringsprosessen (Lea, 2015). Mengde svoveldioksid er regulert og bestemmes ut i fra eplejuicens pH 3,1-3,8, ved lavere pH enn 3,1 tilsettes ingenting og ved høyere enn 3,8 brukes epletsyre til å redusere pH (Lea, 2013). I følge merkeforskriften må all tilsatt svoveldioksid merkes. Det er mulig å bestemme total mengde fritt og bundet SO₂, ved å hydrolysere svovel for titrering med jod løsning og stivelse.

2.7.3 Humle

Humle (*Humulus Lupulus*) en flerårig kulturplante (slyngplante) har vært dyrket i Norge siden Vikingtiden, og har vært brukt i ølbrygging fra 1100-tallet av munkene (Rignes.no). I dag brukes humleplanten kun som prydplante og alt av humle importeres, men det er kanskje i ferd med å endre seg. Humleplanten inneholder det aromatiske stoffet lupulin (et harpikslignende stoff) som sammen med garvestoffer og aromatiskeoljer gir en frisk, karakteristisk bittersmak og aroma (Nybraaten, 1998).

Det er hunnplantens blomster, de gulgrønne konglene og deres kjertler, som benyttes. Kjertlene inneholder harpiks med humolon og lupulon henholdsvis α - og β -syrer og eteriske aromatiske oljer som inneholder mindre α -syrer (Nybraaten, 1998). Det finnes mer enn 40 ulike varianter som benyttes i blandinger eller alene og de tilsettes ofte i form av importerte konsentrerte humlepellets (pressede humleblomster) eller humleekstrakter (sirup). Humle må lagres uten oksygen ellers oksiderer smaksstoffene som medfører mindre smak.

Humle er ølets krydder og det skilles mellom to typer: bitter- og aromahumle. Smaksmessig er aromahumle mindre bitter og rundere enn bitterhumle. Uten tilsetning av humle eller andre urter (pors, einer etc.) som gir bitterhet og aroma ville øl blitt for søtt og mektig (Rignes.no. 2015). I tillegg bidrar humle til å skape et antibakterielt miljø sammen med alkoholen som øker holdbarheten og gir bedre skumholdbarhet (Nybraaten, 1998).



Figur 2.4. Humleblomst, hentet fra, Rolv Hjelmstad.

Figur 2.5. Humle pellets, hentet fra, Brewshop.no

2.7.4 Askorbinsyre (E 300)

Askorbinsyre (100-250 mg/L) tilsettes for å motvirke oksidasjon, lysne fargen og øke holdbarheten.

2.8 Biokjemiske analyser

Oversikt over analysemetodene.

2.8.1 Bestemmelse av flyktige komponenter med Head Space Chromatography

Gasskromatografi (GC) er en kromatografisk analysemetode som tar utgangspunkt i at flyktige komponenter og gasser i en løsning separeres og fordeler seg kontinuerlig mellom stasjonær- og mobilfase. Separasjonen skyldes stoffenes ulike kjemiske og fysiske egenskaper som molvekt og kokepunkt. Mobilfase er en bæregass og de vanligste er hydrogen, nitrogen og helium. Prøven injiseres i det forvarmede kammeret der det fordampes og de kjemiske komponentene blir med bæregassen gjennom kolonnen. Hastigheten til de ulike prøvene gjennom kolonnen er ulik og avhengig av deres kjemiske og fysiske egenskaper. Stoffer med lavt kokepunkt vil bruke kort tid og motsatt på grunn av fordelingen mellom gass og væske i prøvematerialet.

2.8.2 Nitrogenbestemmelse med Kjeldahl metode

Kjeldahls metode benyttes for å bestemme total innholdet av nitrogen i organiske forbindelser. Prøvene tilsettes en bestemt mengde destillert vann avhengig av fuktigheten i prøvematerialet og konsentrert svovelsyre. Deretter kokes prøven i 1,5 time ved 420°C som medfører at det organiske materialet i prøven oksiderer til kuldioxid og vann, mens nitrogenet spaltes til ammoniumioner. Ved tilsetning av natriumhydroksid omdannes disse til ammoniakk, som destillerer over i en beholder med en kjent mengde syre. Mengden ammoniakk er et mål for total nitrogen som bestemmes med tilbake titrering med tilsatt natriumhydroksid. Eksempel på utregning vedlegg 3.

Figur 2.6. Kjeldahls titreringsapparat, hentet fra no.vwr.no

2.8.3 Bestemmelse av frie aminosyrer og sukker med høytrykks væskrokromatografi

Høytrykksvæskrokromatografi (HPLC) egner seg til bestemmelse av prøvemateriell som sider med mange kjente stoffer. Disse identifiseres ved sammenligning av elueringstidene til stoffene med kjente standarder. Identifisering av stoffene utføres ved å sammenligne stoffenes separasjon, som skyldes at de har ulik affinitet til den stasjonære fasen og får ulik vandringshastighet. I omvendt fasekromatografi er den stasjonære fasen lipofil og den mobile fasen hydrofil. De mest polare fasene har størst retensjon (vandringsmotstand). Det skyldes svake van der Waalseke krefter som øker med størrelse på molekylet, og i en ulik blanding vil den minst hydrofobe komponenten først elueres ut. Det samme skjer når det er komponenter med ulik størrelse og samme funksjonelle gruppe eller rettkjedede grupper. Mobilfasens sammensetning som temperatur, pH, ionestyrke og stasjonærfase gir utslag på hastigheten når komponentene elueres gjennom kolonnen.



2.8.4 Bestemmelse av flyktige forbindelser med HSGCFID\TDGCMS

Massespektrometri og gasskromatografi er en semi kvantitativ (omtrentlig nivå) metode som ofte brukes til identifisering av prøvemateriale med en eller mange ukjente stoffer. Sider er eksempel på et produkt som består av en kompleks blanding stoffer og egner seg til analyser med bruk av gasskromatografi tilkoblet et massespektrometer (GC-MS). Forbindelsene identifiseres ved gjenkjennelse på molekylnivå med andre tilsvarende stoffer som finnes i et bibliotek.

Kromatograf består av en mobil og en stasjonær fase. Prøvene plasseres i den stasjonære fasen og den mobile fasen setter prøvens molekyler i bevegelse ved hjelp av en inert gass, som for eksempel helium eller nitrogen. Gassen frakter stoffene med seg gjennom kolonnen som er et tynt, oppkveilet og langt rør.

Inne i kolonnen er det ofte benyttet kuler med belegg eller en ru overflate som holder stoffene tilbake. Stoffenes ulike motstand mot bevegelse gjør at de får ulik fart over den stasjonære fasen.

Prøven som skal analysere kan enten injiseres som gass (headspace GC-MS) eller væske som er mest vanlig. Prøven i headspace GC-MS oppbevares i en tett beholder og en sprøyte tar prøven fra gassfasen. Etter hvert oppnås likevekt mellom gass og væske. Etter injisering holdes stoffene tilbake på kulene i den stasjonære fasen når de befinner seg i væskefasen, mens de fraktes videre med gassfasen når de fordamper. Ulike stoffer separeres og like molekyler forlater kolonnen samtidig. Stoffene som forlater kolonnen blir registrert og antall registreringer er det samme som antall ulike stoffer i prøven. Tiden stoffene bruker gjennom kolonnen sammenlignes med kjente standarder for identifikasjon. Stoffene som har blitt separert i gasskromatografen føres deretter inn i massespektrometeret der en elektronstråle ioniserer stoffene som injiseres. Kation radikaler dannes ved at elektronene i strålen slår løs stoffene. Se ligning 2.



Det brukes ofte 70 eV i massespektrometer. Strålingen ioniserer molekylene og bryter de kjemiske bindingene, samtidig som det dannes noen negative og positive partikler, vist i ligning 3.



Etter ioniseringen settes stoffene i bevegelse ved hjelp av et elektrisk felt, og de passere et magnetfelt som medfører at banen til stoffene avbøyes. Forholdet mellom masse og ladning (m/z) medfører ulik avbøyning. Det er kun de ladde partiklene som registreres fordi banen til de nøytrale partiklene ikke avbøyes. Partikler med høye verdier for m/z avbøyes mindre enn motsatt. Intensiteten i massespektrene representerer mengdene til de ulike stoffene ved funksjon av m/z for hvert stoff som har gått gjennom.

2.8.5 Bestemmelse av fenoler med Folin - Ciocalteau`s metode

For kvantifisering av total mengde fenoler benyttes ofte Folin - Ciocalteau`s metode, som er rask og enkel. Metoden baseres på reduksjon av fenolene wolframoksider og molybden i en basisk løsning som medfører at det fenoliske protonet skiller seg og det dannes et anion som reduserer Folin- Ciocalteaus reagens. Ulempen ved metoden er at den ikke skiller de ulike fenolgruppene, noe som kan medføre at andre komponenter (karotenoider, aminosyrer, karbohydrater etc.) kan medregnes og mengden kan bli forhøyet. Det totale fenolinnholdet blir uttrykt som mg gallesyre ekvivalenter (GAE)/100 ml.

2.9 Sensorikk

Det er sammenheng mellom sammensetningen til mat- og drikkevarer, smaksopplevelsen og sensoriske analyser. Smaksopplevelse er i utgangspunktet subjektivt og det kreves mye trening for at den skal bli objektiv.

Smaksopplevelse og sansene kan påvirkes av:

Kjemiske egenskaper:

- Sammensetningen av fett, proteiner, karbohydrater, mineraler, vann, fargestoffer, tilsetningsstoffer og pH i produkter bidrar med hvordan produktet vil føles i munnen sammen med lukt og smak.

Mikrobiologiske egenskaper:

- Innholdet av gjær, bakterier og mugg i produkter bidrar i dannelsen av kjemiske forbindelser som påvirker smaksopplevelsen.

Fysiske egenskaper:

- Form, farge, tekstur og temperatur bidrar i berøring med munn, tunge, tenner, mengde saliv (spytt/fuktighet i munnen) og hender.

Personlige egenskaper:

- Erfaring, genetisk, trening, mengde saliv (spytt) i munnen, luktesans, hukommelse, forventninger, sykdom, etc.

Sensorisk analyse kan inndeles i to metoder kvantitative eller kvalitative. Den kvantitative metoden også kalt subjektiv kan utføres av alle og gir svar på om produkt er godt eller vondt eller hvilket produkt som foretrekkes. Den kvalitative metoden også kalt objektiv kan kun utføres av spesielt utvalgte og trenede dommere som er i stand til å kjenne, gradere og forklare ulikheter som sødme, syre, bitterhet etc. i produktene.

Beskrivende tester utføres ofte ved bruk av mellom 8 til 12 trenede dommere (trenet dommerpanel). En forutsetning for bedømmelsen er at de er kalibrert slik at de har felles forståelse for skala, standard og produkt egenskapene. I forkant av nye produkt trenes dommerpanelet for å oppnå samme oppfatning av graderingen av de ulike betingelser. Et sensorisk dommerpanel med trenede dommere skal kun bedømme produktene objektiv, og ikke vurdere om de liker eller ikke liker produktet.

Beskrivende tester brukes ofte til å beskrive produktenes ulikheter med hensyn til bestemte egenskaper. De kan også benyttes til utarbeidelse av sensoriske karakteristikk for ulike produkter for å finne ut hvilke egenskaper som er viktige for kunde aksept (Waldenstrøm, 2015). Før sensorisk bedømmelse av et produkt velges først egenskapene som ønskes testes og utfra dette velges den beskrivende metoden. Det finnes i dag et bredt utvalg av beskrivende metoder med ulikt innhold og fremgangsmåte som stadig utvides (Waldenstrøm, 2015).

2.10 Statistiske analyser

Multivariate analyser er en statistisk metode som observerer og analyser når flere variabler skjer samtidig og omsetter disse til tolkbar informasjon (Næs, 2010).

2.10.1 Analysering av Varians, (ANOVA)

Variansanalyse er en fellesbetegnelse for mange ulike statiske metoder. Metodene tester ulikheter og likheter mellom to eller flere utvalg, der en eller flere faktorer er gjeldene. Variansanalysenes grunnleggende former består av to faktorer som beskrives som enveis eller toveis variansanalyser. Enveis brukes når det kun er en faktor som varierer systematisk og toveis brukes når to uavhengige faktorer varierer.

Når flere enn to faktorer varier kan også variansanalyse benyttes (Næs et al 2010). Tukeys` s test benyttes ofte til å finne forskjeller i prøvematerialet.

2.10.2 Multivariate analyser

Multivariate statistiske metoder benyttes ved å bruke korrelasjonene mellom variablene for å oppsummere kompliserte datamatriser i todimensjonale plott (Næs, et al 2010). Det antas at mye av informasjonen beholdes i dataene selv om komponentene hovedsakelig er utvalgt etter variansens størrelse og representerer variansen. Det velges ulike programmer som for eksempel PanelCheck og The Unscrambler for å utvelge hovedkomponentene i datasettet som hovedsakelig står for variansen. Dataene kan deretter fremstilles og analyseres ved bruk av ulike analysemetoder som i dette tilfelle Principal Component Analysis (PCA).

2.10.3 Principal Component Analysis (PCA)

PCA benyttes ofte til kompliserte datamatriser og sensoriske profileringsdata for å analysere systematisk variasjon i flere datamatiser. Metoden går ut på å redusere datainformasjonen til et datasett_x, variable_p, prøver_n, «struktur del» og en «støy del», såkalt Principal Components. Metoden er i stand til å identifisere de mest interessante underliggende variablene, dimensjonene eller retningene. Prinsipalkomponentene inneholder en stor mengde av systematisk informasjon som gis som prosent av forklart varians og sammenhengen kan ses mellom plottene og aksene. Komponentene fremstår i form av to eller tre akser (PC1, PC2 og PC3) der sammenhengen mellom variablene vises. PC1 til høyre i bi-plottet er dominerende faktor. Prøvene som ligger nær hverandre er mest like og motsatt, og prøvene rundt origo tas ikke med. Resultatene kan vises med ladningsplot der egenskapene vises eller skåringsplot der prøvene vises eller ved bi-plot der både egenskapene og prøvene vises (Næs& Tomic 2010). En forutsetning for å bruke PCA er at det er funnet signifikant forskjell mellom prøvene.

2.10.4 Generalisert lineær modell (GLM)

GLM kan benyttes når datamaterialet har annen fordelingsmodell enn normalfordeling, fordi den har en fleksibel generalisering til lineær regresjon. Metoden anvendes til å tilpasse lineære modeller ved å gi en symbolsk beskrivelse av den lineære modellen og feilfordelingen (variansen) via en koblings funksjon.

2.11 Kvalitetsparameter for sider

Smaken av sider er et resultat av et mangfold av interaksjoner mellom ulike kjemiske, mikrobiologiske og sensoriske reseptorer og spesifikke miljøfaktorer (temperatur) fra råvare via fermenteringsprosessen til ferdig modnet og lagret produkt. I fermenteringsprosessen samhandler ulike komponenter med å undertrykke eller fremheve hverandre i mange ulike interaksjoner (som er vanskelig å forstå) (Styger et al 2013).

Kvaliteten til sider påvirkes av en rekke faktorer fra eplekvalitet, epleblanding, gjærstammer (mengde og vitalitet) og arter via hele fermenteringsprosessen (teknisk, sukkernivå, temperatur, filtrering, kullsyre, pasteurisering til modningsforhold. Viktige kvalitetsparameter for sider er utseende, viskositet, farge, smak og aroma. I Norge anses god organoleptisk kvalitet for sider smak av syre, sødme, bitterhet og astrigens med ettersmak av frukttoner.

For å ivareta og styre fermenteringsprosessen mot ensartede produkter med jevn kvalitet er det viktig å tilegne seg grunnleggende kunnskap fra råvare til ferdig produkt. Det innebærer å finne ut hvilke betingelser som skal til for å oppnå riktige mengder av de ønskede aromatiske forbindelsene (estere, fuselalkoholer, organiske syrer) som er avgjørende for kvaliteten til sluttproduktet. Det er kunnskap om små detaljer som er avgjørende for sluttproduktet.

2.11.1 Farge

Fargen til sider er et resultat av eplejuicens grad av oksidering under kverning og pressing forårsaket av oksidasjonsfenolene phloridizin, epicatechin og procyanidiner (Lea, 2003).

Dersom eplemassen ikke settes for noe oksidasjon kan sider bli hvit som vann (Lea & Timberlake 1978; Lea 1982). I prosessen burde opprinnelse fargen avta med rundt 50% grunnet kreftene til gjæren som omdanner kinongruppene til hydroksylgrupper med dertil tap av kromoforen (Lea, 2003). Dette skjer allikevel ikke fordi karbonyl amino kromoforer fra Maillard bruningen motvirker effekten slik at fargen avtas med kun med 10 % (Lea 2003).

Figur 2.7. Forskjellen i farge ved bruk av SO₂ og tilsatt sukker i AS0 og uten i ASe.



2.11.2 Tørrstoff

°Brix er et kjemisk kjemisk begrep for måling av totalt oppløstbart tørrstoffet (sukker, organiske syrer, fenoler, proteiner etc.) i en væske (g tørrstoff/100 g løsning) og måles med et refraktometer. Temperatur korreksjoner kan være nødvendig fordi refraktometer er kalibrert for 20°C. Refraktometeret måler brytningsindeksen til sukker og sukkerinnholdet beregnes ofte fra mengde løselig faste stoffer. Dersom løsningen er 12°brix betyr det at det er 12 g sukker 100 g væske og ca 85 % av dette er tørrstoff.

2.11.3 pH

pH er en omvendt logaritmisk målemetode, som ble innført i 1909 (Sørensen), for å måle konsentrasjonen av frie hydrogenioner i et biologisk eller kjemisk system. Skalaen går fra 1 til 14 der 1-7 er sure løsninger, 7 er nøytral og 8-14 er basisk. Innen bruk må pH -metret kalibreres med buffere av kjente pH verdier (4 og 7) og temperaturen bør korrigeres. Måling av pH anses for å være en av de kritiske faktorene i alkohol fremstilling av frukt og bær som starter allerede under modningsprosessen og avsluttes ikke før produktet er ferdig.

2.11.4 Syreprosent

Konsentrasjon av syre bestemmes med titrering og er en indikator for mikrobiell ødeleggelse av sider. Metoden er basert på damp destillasjon av flyktige syrer i væsken og titrering av destillatet. Bestemmelsen gir et mål på antall syreioner som finnes i eplejuice og brukes for å beregne (nivået) hvor surt et produkt oppfattes i munnen. Epler til konsum må ikke være surere enn <0,31 %. Det er ikke noen direkte forbindelse mellom pH og titrert syre i eplejuice, selv om når pH går opp går syre ned og omvendt. Titrering er en kvantitative analysemetode og utføres ved at en titrant (standard løsning) med kjent konsentrasjon reagerer med et identifisert analytt med ukjent konsentrasjon som går frem til et endepunkt.

Utgangskonsentrasjonen av analyttet bestemmes i følgende formel (Gateland&Bjørnstad, 2013). Forklaring:

$$VA \text{ (g/L)} = 60x (V_b * N) / (V_c * F)$$

V_b = NaOH ml, benyttet i titrering V_c = ml eplejuice benyttet

N = NaOH, normalt (0,1N)

F = Normal faktor hvis NaOH konsentrasjonen er ulik 0,1 N

$N = 0,1N$ dersom eplejuice er 10 ml $VA \text{ (g/L)} = 0,6 * V_b$

2.11.5 Fryselagring

Fryselagring er en metode hvor temperaturen til produktet blir redusert til under frysepunktet og vannet omdannes til iskrystaller. Rask nedfrysing (i små beholdere) ved -30°C danner mindre iskrystaller enn motsatt og er mer skånsomt for kvaliteten, samtidig som kjemiske og enzymatiske reaksjoner stopper opp. Ved fryselagring utvides produktet fordi is har 9 % større volum enn rent vann. Fryselagring inaktiverer ikke enzym aktivitet som kan medføre tap av polyfenoler og fenoler som gir endret farge og smak i produktet. Nedfrysing av frukt fører til skarpe iskrystaller som gjør at celleveggene ødelegges og cellemembranene kollapser. Ved opptining faller produktene sammen og slipper mye vann og mellom -1-5°C er det mest kritisk der skjer det mest ødeleggelse av produktet.

3 Materialer og metode

Prosjektet gikk fra starten bredt ut med et stort utvalg for å få bedre oversikt og forståelse for faktorer med betydning for slutt kvaliteten i sider. Det medførte at analyse materialet ble noe ubalansert fordi gjær har en tendens å oppføre seg ulikt i ulike fat selv med lik epleblanding. Etter hvert begrenset utvalget seg til kun betingelsene med relevans for problemstillingen.

3.1 Råvarer

3.1.1 Eplesorter

Eplesortene (7) som ble benyttet i forsøket var dyrket og podet i 2001 ved Institutt for plantevitenskap (IPV) ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) i Akershus (10°77' E, 59°67' N). Eplesortene ble høstet med hånd fra september til oktober sesong 2015, etter hvert som de ble modne. Modenheten ble undersøkt ved å dyppe halve epler i jodløsning som ble sammenlignet med et modningskart som fungerte som referanse. Eplene ble lagret og videre modnet ved 3°C med 85 % relativ fuktighet, mellom 16 til 65 dager og presset og fermentert fra midten av oktober til begynnelsen av november i 4 forsøk. Det ble ikke tatt spesielle hensyn til modning og eplesortene ble utvalgt etter tilgjengelighet.

De 7 eplesortene i forsøket var:

- 'Discovery' (DI)
- 'Sunrise' (SR)
- 'Summerred' (SU)
- 'Aroma' (AR)
- 'Torstein' (TO)
- 'Jonagold' (JO)
- 'Gravenstein'(GR)
- 'Torstein' (TO)



Figur 2.8. Epler fra forsøket.

Alle eple sortene regnes som spise-, bord- eller dessertepler, med unntak av 'Torstein' som inneholder noe tannin og regnes som husholdningseple. Eple sortene vil fra nå av omtales som dessertepler selv om betegnelsen er noe upresis.

Tabell 3.1. Referanse for eple sortene med hensyn til sesong-, bunn- og dekkfarge, størrelse, form og kjennetegn, samt lagrings holdbarhet.

Eple sorter	Sesong	Bunnfarge	Dekkfarge	Størrelse, form og kjennetegn	Holdbarhet/lagring
'Sunrise'	September-oktober	Kremgul til grønnhvit	Halvparten er rød	Middels stort med regelmessig fasong og glatt skall. Smakfullt, sprøtt, saftig og søtt.	Kort holdbarhet
'Discovery'	September-oktober	Gulgrønn	Rød	Middels store, flatrunde og velformede. Fruktkjøttet er sprøtt, hvitt og aromatisk. Gir litt astrigens.	Ganske god
'Summerred'	September-desember		Rød	Middelstor og oval. Syrlig og aromatisk. Gir rød farge og fruktsmak.	God
'Aroma'	Oktober (november)-desember	Gul	Rød	Aromatisk smak, egner seg som hovedeple i siderproduksjon iblandet med sorter med syre og astrigens.	God
'Gravenstein'	Oktober-desember	Gult eller rødt	Rødt eller gult	Store, runde og litt knudrete rundt blomsterenden. Skallet virker fett fordi det svette.	God
'Torstein' (200 år i Norge)	Oktober-desember	Gul	Store deler med rødt	Middelsstore med flatrund form. Fast og gammelmodig smak. Noe astrigens.	Veldig bra
'Jonagold'	Oktober-desember	Gult	Røde striper	Stort med sprøtt og litt myk konsistens med søt og aromatisk smak.	God

Merking og koding av fatene i forsøket:

- Første bokstav i kodene er epleblandingene. 0 (null) henviser til råstoffet/utgangsmateriale, tabell 3.2.
- Andre bokstav er gjæringsmetodene K-kulturgjær eller S- spontangjær, se tabell 3.2.
- Fatene (prøvene) er merket etter antall fat med abcde, se tabell 3.6.
- De 7 eplesortene er merket med forkortelser, se kapittel 3.1.1.

Gjær

- Spontangjæring (S), fra nå av kalt S.
- Inokulert (tilsatt) gjær (K), fra nå av kalt K.

3.1.2 Kulturgjær

Kulturgjærtypene benyttet i forsøket:

- Sidergjær, inneholder *S. bayanus*, vitaminer og sorbitan monosterate E 491, Craft series MO2, Mangrove Jacks, UK. Fra nå av kalt SI.
- Champagnegjær, inneholder *S. cerevisiae*, WLP 715 fra White Labs Inc. USA. Fra nå av kalt CH.
- Hvitvinsgjær, inneholder *S. cerevisiae*, WLP 720 fra White Labs Inc. USA. Fra nå av kalt HV.

3.1.3 Temperatur

Temperaturen ble på forhånd bestemt til å være 10°C for S-fermentering og 20°C for K-fermentering som var i samsvar med anbefalingene på henholdsvis 4-10°C og 17-25°C.

3.1.4 Volum

Det ble benyttet 5 og 30 liters fat, volumet ble endret etter første forsøket (A) fra 5 liter til 5,8 L og 30 til 35 L (fylt til randen) for å begrense og minimalisere kontakten med oksygen.

Tabell 3.2 Oversikt over forsøkene, epleblandingene, fatene og koder.

Forsøk	Koder	Epleblandinger	Fat	Start, pH
1	A0	50%SR:50%DI	AKabc/ ASabcde BKabcde/	3,50
2	B0	40%AR:40%SU:20%GR	BSabcce	3,30
3	D0	15%TO:15%JO:20%AR:20%SU:30GR	DKabc	3,30
4	AA0	50%SR:50%DI	AAKabc	3,57

3.1.5 Humle

Humle ble tilsatt som erstatning for manglende tannin og astrigens i fatene BKd (etter omstikking) og i DKb og DKd etter filtrering.

Tabell 3.3 Oversikt over fat med mengde tilsatt humle fat, antall dager med ulik temperatur.

Fat	Humle	Mengde (g/L)	Temperatur (°C) og antall dager
BKd	Aroma humle: Amarillo	0,9	1 dag 20°C og 4 dager 20°C
DKa	Aroma humle: Cascade	0,9	1 dag 20°C og 4 dager 20°C
DKa	Aroma humle: Amarillo	1	2 dager 20°C og 2 dager 3-4°C
DKa	Aroma humle: Saaz	1	2 dager 20°C og 2 dager 3-4°C

Andre tilsetningsstoffer og hjelpestoffer

- Dan sukker, www.dansukker.no
- Vinsvovling, Saga, www.lkhaaland.no
- Gjærstopp, Saga, www.lkhaaland.no

3.1.6 Kjøle- og fryserom

Det ble benyttet ulike kjølerom og fryserer/fryserom fra -80°C±2 til 20°C±2 som var tilknyttet en alarmstasjon som ble utløst ved for høy temperatur.

3.2 Utstyr

Tabell 3.5 Maskiner og fermenteringsutstyr

Maskiner	Leverandør
Speidel sentrifugal fruktmølle	Speidel, Tyskland http://www.speidels-braumeister.de/de/
Speidel hydropresse	Speidel, Tyskland http://www.speidels-braumeister.de/de/
Filtreringsmaskin, Colombo-18 INOX, Rover pumpe 230-50Hz, 550-800 L/H	Rover, Italia http://www.roverpompe.com/
Rover pumpefilter: Filter: 4, 10 µm, store partikler, filter: 12, 1,5 µm, store partikler og filter 24, 0,25 µm, veldig små partikler	Rover, Italia http://www.roverpompe.com/
Kapsel påsetter, Bordmodell MAX 26 mm-forsterket	Bryggeland.no
Fermenteringsutstyr	Leverandør
Alt av utstyr var av næringsmiddelgodkjent kvalitet. 5 og 30 liter gjæringsdunker i plast med gjærlås og korker.	Bryggeland.no

3.3 Sider prosessen

Det ble produsert 33 ulike sider ved hjelp av mange betingelser. En av betingelsene skjedde utilsiktet da filtreringsmaskinen gikk i stykker og etter reparasjon fungerte bedre enn før. Vedlegg 1 gir nærmere beskrivelse av hele fermenteringsprosessen og vedlegg 7 gir en sensorisk bedømmelse av de 33 siderne.

Tabell 3.6. Produksjons designe med oversikt over sider fatene. Merking, fat volum, gjærtype, temperaturer, SO₂, fermenteringstid, antall dager modning og klaringsmetoder.

Koder	Fat (L)	Gjær- type	Dgr rom C	Humle	°Brix	Temp.C	SO ₂	Dgr (ferm)	Dgr modning	Antall x omstukket	Filter 4 eller 12
AKa	5	SI			13,5	20		10	43	3	
AKb	5	SI			13,5	20		10	43	3	
AKc	5	SI			13,5	20		10	43	3	
ASa	5	S			13,5	10	X	66	34	2	12
ASb	5	S			13,5	10	X	66	34	2	12
ASc	5	S			13,5	10	X	66	32	2	12
ASd	30	S			13,5	10	X	56	32	2	4
ASe	5	S			10,9	10	X	56	32	3	4
AAKa	5,8	SI	2		13,5	10		24	15	3	4
AAKb	5,8	SI	2		13,5	10		24	15	3	4
AAKc	5,8	SI	2		13,5	10		24	15	3	4
BKa	5,8	SI			13,7	20-15-10		13	38	3	
BKb	5,8	SI			13,7	20-15-10		13	38	3	
BKc	5,8	SI			13,7	20-15-10		13	38	3	
BKd	33	SI		x	13,7	20-15-10		13	38	2	4
BKe	5,8	SI			13,7	20-15-10	X	13	38	3	
BSa	5,8	S			13,7	10	X	66	10	2	12
BSb	5,8	S			13,7	10	X	66	10	2	12
BSc	5,8	S			13,7	10	X	66	10	2	4
BSe	5,8	SI			10,6	10	X	39	26	2	4
CKa	5,8	SI	1		13,7	10	X	24	23	2	12
CKb	5,8	SI	1		13,7	10	X	24	23	2	12
CKc	5,8	SI	1		13,7	10	X	24	23	2	12
DKa	35	SI	2	x	13,5	10		29	27	2	4
DKb	35	CH	2		13,5	10		29	27	2	12
DKc	35	HV	2		13,5	10		18	18	2	12

3.3.1 Generell beskrivelse av forsøkene

Sider ble produsert i fire forsøk kalt A, B, D og AA. Fatene ble merket etter fermenteringsmetode S (spontangjæring 10°C) eller K (inokulert kulturgjær 20-15-10°C) og abcde etter antall fat. I forsøk A og B ble begge fermenteringsmetodene (S og K), benyttet og for D og AA ble kun K benyttet. Alle 4 forsøkene ble gjennomført ved at hver eplesort ble vasket og kvalitets sortert (råtne epler og bøss ble fjernet), før de ble kvernet med hjelp av en fruktmølle (kvern), Seidel og presset gjennom en 20 L fruktpresse, Seidel. Kvernen, pressen og resten av utstyret ble rengjort mellom hver eplesort.

Eplejuicen ble sjekket for tørrstoff og pH før og etter blanding og tørrstoffet ble justert til mellom 13,5-13,7 for alle blandingene unntatt ASe (10,6) og BSe (10,9) med sukkerlake av eplejuice, som ble nedkjølt før bruk. pH ble benyttet til beregning av mengde SO₂ (1,3 til 2.5 g) tilført S- fatene og for å forebygge mikrobiell ødeleggelse. K-fatene ble inokulert i tråd med anbefalingen fra gjærprodusenten 10g/15l, bortsett fra CK-fatene som kun ble tilsatt 50 % av gjærmengden. Gjæren ble tilsatt direkte i fatet, blandet godt (30 L) og eller videre fordelt i mindre fat (5 L) og satt til fermentering, se tabell 3.6. K- fatene ble fulgt tett i starten og på slutten av fermenteringsprosessen både visuelt med målinger av tørrstoff og pH, mens S –fatene ble fulgt med målinger ca. hver 14 dag.

Fermenteringsprosessen ble ansett ferdig når tørrstoffet var mellom 3,5-5,5 som vil gi en alkoholprosent på maks 4,7. Prosessen ble avsluttet ved at fatene ble nedkjølt til 3-4°C i 3 døgn før de ble omstukket, med unntak av AK-fatene som ble tilsatt gjærstopp og stående i 6 døgn på grunn av uklarhet. Alle fatene ble nedkjølt til 0°C før de ble omstukket og videre lagret (modnet) fra 10-43 dager, se tabell 3.6. AK- og BK – fatene ble kun omstukket unntatt BKd, se tabell 3.6.

Nesten alle fatene unntatt AK og BK ble karbonert ved at en Blichmann Beergun pistol ble plassert i bunnen av fatet og fylt opp med karbondioksid til det ikke var plass til mer (skummet over). I tillegg ble flaskene flushet med karbondioksid før de sakte på skrå ble fylt med sider og korket omgående. Siderflaskene ble pasteurisert ved 66°C og holdt ca. 30-60s, og sakte nedkjølt ved romtemperatur et døgn, liggende loddrett for å pasteurisere korken samt forsikre at de var forsvarlig lukket (hermetisert). Deretter ble de lagret ved 2-4°C frem til sensorisk analyse og testet i slutten av mars og midten av april 2016.

3.3.2 Detaljert beskrivelse av forsøkene

Første forsøk A, dag 0 ble utført med epleblanding 50 % DI:50 % SR med tørrstoffet justert til 13,5. 15 liter ble tilført 10 g sidergjær og 15 liter ble tilsatt 1,3 g SO₂ (25 % av anbefalt mengde) og blandet godt før de ble fordelt i 3 fat a 5 liter merket AKabc og ASabc.

Det ble i tillegg satt to fat merket ASd (30 l) og ASe, se tabell 3.6. Fatene ble stående ved romtemperatur ca 6 timer før de ble satt til fermentering ved 10°C for S-fatene og 20°C for K-fatene. K-fatene var ferdig fermentert etter 10 dager og samtidig ble ASe omstukket pga mugg i overflaten og fermentert videre i 46 dager.

Andre forsøk B, dag 0 ble utført tilsvarende A med noe endrede betingelser. Fatene ble fylt til randen for å forhindre oksidasjon og alle S –fat ble tilsatt SO₂. BSd (23 L) og BSe (5 L) ble silt gjennom en finmasket sil før fermentering. Dag 6 ble temperaturbetingelsene endret for alle BK- fatene fra 20°C til 15°C i 4 dager og deretter 3 dager ved 10°C som medførte 13 dager fermentering. Dag 13 ble BKd tilsatt Amarillo humle pellets, stående et døgn ved 20°C og 4 dager ved 10°C før fatet ble omstukket. Den 10 dagen ble BSD (23 liter, silt eplejuice, tilført SO₂) inokulert med halvparten av mengden sidergjær og fordelt på 3*3 fat a 5,8 liter, merket CKabc.

I tredje forsøk D ble TO, JO, SU og AR maserert 4 timer etter kverning før de ble presset, for å forsøke å få ut mer smak, siden en del av polyfenolene sitter i skallet og frøene. Det er verdt å nevne at SU pakket seg under pressing slik at pressen måtte rengjøres mellom hver pressing og eplejuicen ble silt før bruk. Eplejuicen ble fylt i 30 liters fat (35 l) fylt til randen og abcd ble inokulert med henholdsvis gjærtypene SI, CH og HV, som ble stående to dager ved romtemperatur før de ble fermentert videre ved 10°C. Det er verdt å nevne at fatene med CH og HV skummet veldig. Etter omstikking ble 2* 5 liter av DKa fatet tilsatt humletypene Cascade, Saaz og Amarillo. Se tabell 3.6 for mer utdypende detaljer.

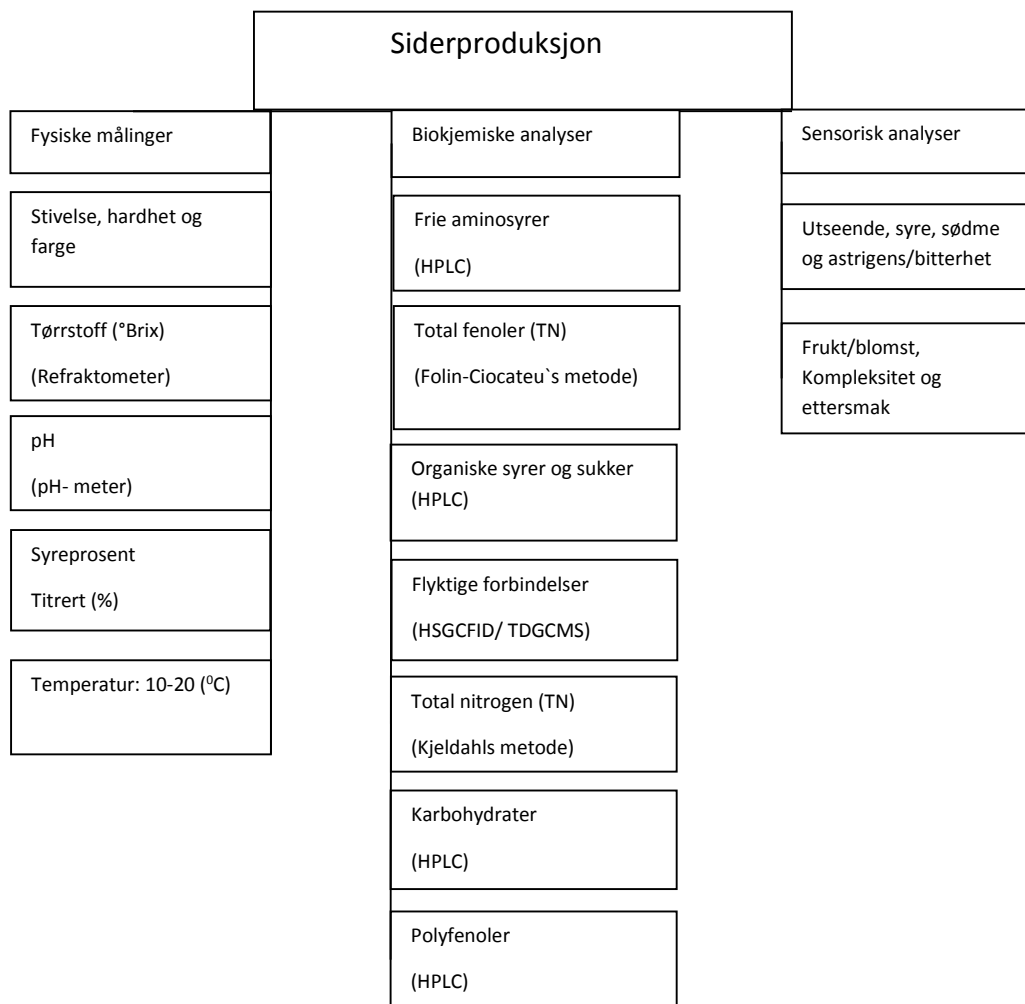
I fjerde forsøk AA med lik epleblanding som A var eplene mer modne, noe som medførte at SU også pakket seg under pressing. Fatene ble fylt til randen (5,8 l) satt 2 dager ved romtemperatur og fermentert ved 10oC. Fermenteringsprosessen tok 24 dager mot 10 dager for A- fatene. Det dannet seg mye mer løst bunnfall i AA og sideren ble mer klar enn i A.



Figur 2.9. Et utvalg fra siderproduksjonen som viser noe av prosessen og forskjellen mellom omstukket og filtrert sider.

3.4 Metoder

Det ble tatt ut prøvemateriell, i to 15 ml Nunc rør og 2 *40 ml glassflasker Duran, til biokjemiske analyser av de ulike eplejuicene, eplejuice blandingene, etter at de var omstukket første gang og av ferdig sider. Prøve materialet ble nedfrosset til -30°C og tint over natten i kjølerom ved 3-4°C før de ble benyttet videre.



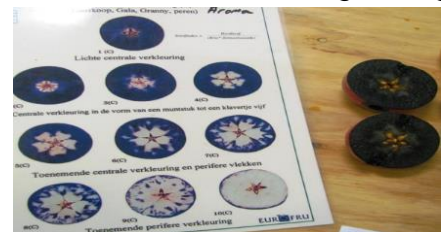
Figur 3.1. Oversikt over analysene og metodene benyttet i forsøket av eplesortene, epleblandingene, etter omstukket og av ferdig sider.

3.5 Analyse av ytre kvalitet

3.5.1 Farge

Utstyr: Fargekart (Kleurenkaart voor bepaling) og epler

Utførelse: Grunnfargen ble bestemt ved bruk av fargekart for grunnfarge (Golden Delicious, Belgia). Fargeskalaen gikk fra 1 (helt grønn) til 9 (helt gul). Dekkfargen ble skjønnsmessig bestemt ved å se hvor stor del av eplet som var dekket av rødt fra 1 til 9. Hele eple dekket med rødt (9 poeng), halve eple (6 poeng) og ingen rødfarge (1 poeng). Gjennomsnittsverdiene for de ulike eplesortene med standardavvik ble utregnet og benyttet videre.



Figur 3.2. Fargekart for aromaeppler og modning (www.nir.no).

3.5.2 Fasthet

Utstyr: Penetrometer, epler, potetskreller

Utførelse: For å måle fastheten til eplene ble 5 epler skrelt med potetskreller på 3 punkter rundt "ekvator" på hvert eple. For å måle fastheten i hvert punkt ble det benyttet et penetrometer (Fruit pressure tester FT 327, Italia) med stempeldiameter på 1 cm. Stempelet ble trykket inn til merket på stempelet og fastheten ble avlest i kg/cm². Penometeret ble nullstilt mellom hver måling. Gjennomsnittsverdiene ble utregnet og benyttet videre.



Figur 3.3. Penetrometer for å måle fastheten i eplene. Foto: Facchini sri.

3.5.3 Stivelse

Utstyr: Kalsiumjodid, ionevann, jod og epler

Utførelse: Mengde stivelse ble målt ved hjelp av en jodstivelse test der amylosen i stivelsen ble blå med jod (Sekse, 1992). 10 g kaliumjodid ble oppløst i 100 ml vann og blandet med 2 g jod og deretter uttynnet med vann til totalt 1000 ml. 5 epler ble delt i to over ekvator. Stilkdelen ble dyppet ca. 10 sekunder i jod oppløsningen og deretter lagt med snittflaten opp på et trekkpapir. Varierende stivelsesinnhold ble uttrykt i poeng fra 1 mørke blå farge (umoden) over hele snittflaten til 9 ingen blåfarge (overmoden) (Quast, 1991). Gjennomsnittsverdiene ble utregnet og benyttet videre.

3.5.4 Syreprosent

Utstyr: Vann, eplejuice, 0,1M NaOH, fenoftalein og byrette

Utførelse: Til analysering av epletsyre ble 10 ml eplejuice filtrert og fortynnet med litt vann i et 100 ml begerglass som ble fylt opp $\frac{3}{4}$ med ionevann og satt i en automatisk titrator. (Titrator 716 DMS Titran. Metrohm, Sveits). Begerglassene ble tilsatt 0,1M NaOH (lut) og titrert til omslagspunktet for fenoftalein (ble rosa) som indikator. Resultatet oppgis i prosent eller milliekvivalene (meq). Prosentregningen baseres på den dominerende syren som er epletsyre i eplejuice med molekylvekt 134 og ekvivalent 67, som gir milliekvivalentvekt 0,067. Eksempelvis tilsvarer 0,0067 epletsyre 1 ml 0,1M NaOH. Alle analysene ble utført i triplikat og gjennomsnittet med standardavvik ble utregnet og benyttet videre.

3.5.5 pH

Utstyr: Destillert vann, pH – meter (691 pH-meter, Metrohm, Sveits), plastglass, buffere 4 og 7, kleenex tørkepapir, reagensrør, reagensrørstativ, eplejuice

Utførelse: pH- meter ble kalibrert før bruk med bufferne 4 og 7, og når avlesningen ikke var innenfor referansen ble elektroden vasket og kalibrert på nytt. pH – meteret ble også kalibrert for temperatur.

Fatene ble målt ved å stikke elektroden ned i prøven og elektroden ble skylt i destillert vann og tørket med kleenex papir mellom hver prøve. Fatene ble utført i triplikat og gjennomsnittverdiene og standardavvikene ble utregnet og benyttet videre.

3.5.6 Tørrstoff (°Brix)

Utstyr: Refraktometer, MilliO, papirtørkle, sterile pipetter, reagensrørstativ, eplejuice

Utførelse: Refraktometeret ble kalibrert med ionevann som ble tilført prismeplaten i ca 30 sekunder før det ble avlest og fjernet med et mykt papir. Det ble pipettert ut en epledråpe på prismeplaten og avlest. Prismeplaten ble rengjort med ionevann og tørket mellom hver prøve. Temperaturen til prøven var $\pm 20^{\circ}\text{C}$ fordi refraktometeret var innstilt til 20°C . Gjennomsnittsverdier med standardavvik ble utregnet og benyttet videre.

3.6 Biokjemiske analyser

3.6.1 Total protein (Kjeldahl /HPLC)

Innholdet av total nitrogen ble utført i henhold til standard prosedyre for Kjeldahl (1883) med følgende modifiseringer (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Analysene ble gjennomført ved bruk av Kjeldahl-apparat. Ved opparbeidelse av prøvematerialet ble 1,0 g eplejuice veid inn i oppslutningsrøret og tilsatt en Kjeldahl tablett (Inneholder 1,5g K_2SO_4 og 0,0075g Se) og 3 ml konsentrert H_2SO_4 til oppslutningsrøret. Det ble veid opp 0,5 g, 10 % skummet melk som kjent standardløsning og benyttet 2 blanke rør til kalibrering som ble behandlet tilsvarende prøvene ved at total nitrogen (TN) i prøvene ble identifisert og kvantifisert. Stativet med oppslutningsrørene ble satt i en forvarmet varmeblokk med avsug ved 420°C i 1,5 time. Vannstrålepumpen ble stående med full trykk i 10 minutter på maks temperatur og deretter ble vannstrålen strupt for å få bedre nedvasking av røret. Rørene ble avkjølt i 15 minutter før de ble tatt vekk fra varmen. Deretter ble oppslutningsrøret satt i destillasjonsapparatet der det ble automatisk tilført 10 ml destillert vann og 15 ml 33% NaOH. Etter en liten forsinkelse startet destillasjonen. Ved hjelp av kjøleavdelingen kondenseres destillatet ned i et forlag på 20 ml 1% borsyre og indikator.

Under destillasjonen endrer borsyreforlaget farge fra rødt til grønt. NH₃ i Borsyreforlaget titreres deretter med 0,05 M HCl, til prøven blir rød. Deretter kan prøvesvaret leses av (Sode-Mogens, 1947).

Utrekning av nitrogen:

- %TN= mL titer*0,07/(g) som omregnes til mgN/kg: 1000mg/0,1kg – 10000mg/kg og resultatet multiplisere med 10000.

3.6.2 Frie aminosyrer ble bestemt med HPLC

Identifisering og kvantifisering av frie aminosyrer ble gjennomført i et utvalg av eple-sortene, epleblandingene og av ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Analysene ble gjennomført ved bruk av (HPLC), en metode beskrevet av Bütikofer et al (1999) med noen modifikasjoner. Ved opparbeidelse av prøvene ble 5,00 g veid inn i et 15 ml sterilt Nunc-rør og tilsatt 5,00 ml indre standardløsning (0,4 µmol/ml L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) i 0,1 M HCl (Merck, Tyskland)). Prøvene ble mikset i omlag 1 minutt på MS1 Minishaker (Ika, Staufen, Tyskland) og satt i en vendemaskin MultiRS-60 BIOSAN (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 15 minutter. De ble deretter plassert i et ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland) i 30 minutter før de ble sentrifugert (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R, Tyskland) i 40 minutter ved 2500 x g (3400 rpm) og en temperatur på 4 °C.

Det ble tilsatt 0,5 ml 4 % trikloreddiksyre (Merck) til 0,5 ml av supernatanten i et 1,5 ml eppendorfrør og blandingen ble mikset i en minishaker (Gene 2, Scientific Industries, New York, NY) før de ble satt på is i 30 minutter. Prøvene ble sentrifugert i en Eppendorf 5415D Microsentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 15600 x g i 5 minutter ved 4°C. Prøvene ble overført til en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) og deretter filtrert med 0,2 µm cellulose acetat-filter (VWR, USA) over i et HPLC-rør. 50 µl av dette ble overført til et analyserør og lagt på fryser før analysering (-20°C). Resten av prøven ble lagret på fryser som backup.

Før separering ble prøvene tilsatt 350 µl boratbuffer (0,4 M med pH 10,2, Agilent Technologies, Tyskland). Separeringen ble gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument bestående av utstyret Agilent 1200 serie pumpe (Agilent Technologies, Singapore), Agilent 1200 serie autoinjektor (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie kolonneovn (Agilent Technologies), Agilent 1200 serie termostat (Agilent Technologies) og en Agilent 1200 serie fluorescensdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies).

Før injisering ble prøvene derivatisert, 5 µl prøve ble mikset med 5 µl OPA-løsning (Agilent), reaksjonstiden var 0,15 min før injisering. 10 µl av hver prøve ble injisert i instrumentet og analysert med en XTera RP 18 kolonne (150 x 4.6 mm; Waters, Milford, MA) ved hjelp av to mobile faser, A (30 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck), 0,1 mmol/l titriplex III (Merck), pH 7,2 og 0,25 % tetrahydrofuran (Merck) og B (100 mol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mol/l titriplex III (Merck) pH 7,2, tilsatt 80 % acetonitril (Merck)). Kolonnen holdt en temperatur på 42 °C og hastigheten på mobilfasen var 0,7 ml/min. Gradienten på mobilfasen var: fra 3,3-20,7 % B i 13 min, 20,7-30 % B i 12 min og 30-100% B i 4 min. Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som fatene som ble analysert, og komponentene i fatene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. De kjente aminosyrene var: L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-asparagin, L-serin, L- glutamin, L- histidin, glycin, L-treonin, L-citrullin, L-arginin, L-alanin, GABA, L-tyrosin, L- valin, L- metionin, L-norvalin, L-isooleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin løst i 0,1 M HCl (Merck).

3.6.3 Organiske syrer og sukker og ble bestemt med HPLC

Innhold av organiske syrer og karbohydrater ble analysert i eplesortene, epleblandingene og av ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Analysen ble gjennomført ved bruk av high pressure liquid chromatography (HPLC) etter en metode av Marsili et al (1981) , beskrevet av Narvhus et al (1998) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid ut i syrevaskede 10 ml Belcorør, tilsatt 2,5 ml ionebyttet vann, 200 µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) og 8 ml acetonitril (Merck). Etter tilsetning av acetonitril ble fatene umiddelbart ristet for hånd, før de ble satt i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min. Prøvene ble sentrifugert ved romtemperatur i 15 minutter ved 1470 x g (3400 rpm) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan). Supernatanten ble tatt opp i en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) og deretter filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør (Agilent Technologies, USA). Prøven ble forseglet med Chromacol 8-SV plastkork med Chromacol 8-ST101 septa. 25 µl av prøven ble injisert i HPLC-instrumentet.

Etter opparbeidelse ble prøvene analysert ved hjelp av en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) oppvarmet til 32 °C. For beskyttelse av kolonnen ble fatene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnen var koblet til en Perkin Elmer serie 200 pumpesystem (Perkin Elmer, Waltham, MA), en Perkin Elmer Series 200 autosampler (Perkin Elmer) og en Perkin Elmer LC 101 kolonneovn (Perkin Elmer). Den mobile fasen som ble benyttet var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som fatene som ble analysert, og komponentene i fatene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var laktose, glukose og galaktose (Merck) og standardløsning av organiske syrer var sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, eplesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina). Karbohydratene ble detektert ved hjelp av en Perkin Elmer Serie 200 RI-detektor (Perkin Elmer), mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS-detektor (Perkin Elmer).

3.6.4 Karbohydrater ble bestemt med HPLC

Innhold av karbohydrater ble analysert i eplesortene, epleblandingene og i et utvalg av sider etter at de ble omstukket og av ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Analysen ble gjennomført ved bruk av high pressure liquid chromatography (HPLC), etter en metode av Knudsen et al (1997) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før 1,00 g ble veid ut i 15 ml Greiner bio-one rør (Tyskland) og tilsatt 9,0 ml ionebyttet vann og 30 ml 96 % etanol (PROLABO, BDH, VWR). Fatene ble mikset i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min, og deretter satt på kjølerom i en time. 4.0 ml av supernatanten ble tilsatt 2.0 ml med indrestandardløsning (arabinose 1.00 mg/ml). Prøvene ble filtrert gjennom Sep-Pak Plus C18 kolonne (Waters, Ireland). Før filtrering ble kolonnene vasket med 2 ml metanol (Merck, USA) og 5 ml ionebyttet vann. De første 2 ml prøve ble samlet opp i eppendorfrør, og videre tørket i en vakuumsentrifuge (Savant SPD2010, SpeedVac concentrator, Thermo Fisher Scientific, USA) ved 55°C. Pelleten ble løst i 400 µl ionebyttet vann. Prøven ble deretter filtrert med 0,22 µm Millex-GV filter (Millipore, Ireland) over i et HPLC-rør forseglet med plastkork med silikon/PTFE septa (VWR). 10 µl av prøven ble injisert i HPLC-instrumentet. Etter opparbeidelse ble prøvene separert ved hjelp av en Nucleogel Suger Pb kolonne (Macherey-Nagel, Tyskland) oppvarmet til 80°C. HPLC-systemet var Agilent 1200 series, bestående av pumpesystem, autosampler med kjøling, kolonneovn og RI-detektor. Fatene ble oppbevart ved 5°C i autosampleren før injisering. Som mobilfase ble det benyttet ionebyttet vann, med en hastighet på 0.4 ml/min.

Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som fatene som ble analysert, og komponentene i fatene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid og respons sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var sukrose, glukose, arabinose og fruktose (Merck)

3.6.5 Totale fenoler ble bestemt med Folin- Ciocalteu`s – metode (TF)

Eplesortene, epleblandingene, et utvalg av omstukkede og ferdig sider ble bestemt med Folin – Ciocalteu`s –metode (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Til analysen av totale fenoler ble det veid opp 0,5 g væske (eplejuice eller sider) (METTLER PM,480DeltaRange, Sveits) i et reagensrør som ble fortynt 1:10 med 4,5 g ionevann. Reagensrørene ble ristet i en SI-T256 Whirlmikser (Vortex -T Genie^R 2, Scientific Industries, Inc. Bohemia N.Y., USA) i 30 sek før fatene ble flusket med N₂-gass for å forhindre oksidering. For å få knust samtlige celler til analysering av alle målbare substanser i etanolekstraktet ble reagensrørene satt i BANDELIN Sourorex RK 100 ultralydbad (Berlin, Tyskland) ved 0°C i 15 minutter.

Det ble kun analysert 6 flasker om gangen for å opprettholde -20°C. Prøvene ble håndristet godt før de ble overført 2 ml Sarstedtrør (Tyskland), som ble innsatt i en Eppendorf sentrifuge (5415 R, Taiwan) og sentrifugert ved 1320 rpm i et minutt ved 4°C. Etter sentrifugeringen ble Sarstedrørene plassert i stativer og satt inn i spektrofotometeret (Konelab, 30 i, Thermo Electron Corp. Vantaa, Finland). Totale fenoler ble målt ved bruk av Folin- Ciocalteu`s – metode (FC) (Wrolstad et al. 2005). Før fatene ble analysert ble det laget en standardløsning (gallesyre), Folin- Ciocalteu`s fenolreagens (TF) og natriumkarbonat (vedlegg) som ble satt inn i spektrofotometeret. I spektrofotometeret ble det først pipettert 100 µl FC-reagens og deretter 20 µl standardløsning eller prøve. Dette ble blandet og inkubert i 1 min ved 37°C. Deretter ble 80 µl kaliumkarbonat tilsatt og blandet før det ble mikset igjen og inkubert i 1 min ved 37°C. Det ble først laget en standardkurve med konsentrasjonene 20, 50, 71,4, 100, 167 og 250 µg/ml før en og en prøve ble analysert. Absorpsjonsintensiteten ble målt tre ganger for hver prøve ved 765 nm, der fenolene medførte en kjemisk reduksjon av FC- reagensen som resulterte i en blåfarge. Totale fenoler ble benevnt som mg gallic acid equivalents (GAE)/100 ml prøve. Alle analysene ble utført i triploid og gjennomsnittverdier med standardavvik ble utregnet og benyttet videre.

3.6.6 Polyfenoler ble bestemt med HPLC

Innhold av polyfenoler ble analysert i eplesortene, epleblandingene, etter at de hadde vært omstukket og av ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Polyfenolene ble analysert ved bruk av high pressure liquid chromatography (HPLC).

En metode beskrevet av Sylvain Guyot et.al (1998) med noen modifikasjoner. Prøvene ble godt blandet før 0,7 ml ble pipettert ut i 1.5 ml eppendorfrør og tilsatt 0,7 ml surgjort metanol, 1% eddiksyre (Merck, Tyskland) i metanol (Merck). De ble deretter plassert i et ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland) i 20 minutter før de ble sentrifugert (Eppendorfsentrifuge) i 4 minutt ved 10000 rpm (9280 g), og ved romtemperatur. Supernatanten ble tatt opp i en 10 ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A.) og deretter filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et 1.5 ml HPLC-rør (VWR), og forseglet plastkork med silikon hvit/PTFE rød septa (VWR). Etter opparbeidelse ble prøvene separert ved bruk av et HPLC-instrument bestående av utstyret Perkin Elmer serie 200 pumpesystem (Perkin Elmer, Waltham, MA), Perkin Elmer Series 200 autosampler (Perkin Elmer), Perkin Elmer LC 101 kolonneovn (Perkin Elmer) og Perkin Elmer Serie 200 UV/VIS-detektor (Perkin Elmer). Prøvene ble detekter ved 280 nm. Programvaren som ble benyttet var TotalChrom, versjon 6.2.1 (Perkin Elmer).

10 µl av hver prøve ble injisert i instrumentet og analysert med en Purospher STAR, Hibart RT kolonne (250 x 4.6 mm, Merck) ved hjelp av to mobilfaser, A (2.5 % eddiksyre fortynnet med Milli-q-vann, Merck) og B (100 % acetonitril, Merck). Kolonnen holdt en temperatur på 30°C og hastigheten på mobilfasen var 1.0 ml/min. Gradienten på mobilfasen var: fra 3-9 % B i 5 min, 9-16 % B i 10 min, 16-50 % B i 30 min, 50-90 % B i 3 min. Kolonnen renses med 90 % B i 4 min. Standardløsninger for kalibrering ble preparert på samme måte som prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene.

Polyfenoler benyttet til standardløsning var (+) -catechin, (-) -epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2, phloretin, phlorizin dihydrate, chlorogenic acid, rutin hydrate, caffeic acid and quercetin (Sigma) (Guyot et al. 1998).

3.6.7 Flyktige forbindelser ble bestemt med HSGC

Kvantifisering av flyktige forbindelser ble gjennomført i eplesortene, blandingene, etter første omstikking og i ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering). Fatene ble analysert ved bruk av headspace gas chromatography (HSGC), en modifisering av metode tidligere beskrevet av Narvhus et al. .

Prøvene ble godt blandet før innveiling av 10,00 g i headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland). Headspaceflaskene ble forsegleet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Fatene ble plassert i en Agilent Technologies 7679A automatisk headspace sampler med et 6890 GC system (Agilent Technologies) og en flamme ioniseringsdetektor. Programvaren som ble benyttet var Open LAB EZChrom (Agilent Technologies).

Som bæregass ble det benyttet helium grad 6.0 (Aga, Norge) med en konstant bæregassflow på 5.0 ml/min. Headspace badtemperatur var 50°C, manifoldtemperatur var 60°C. Ekvilibreringstiden var på 45 minutter, og fatene ble mikset under oppvarming med 70 shakes/min. Headspaceflaskene var trykksatt til 10 PSIG før injeksjon og injeksjonstiden var på 0.5 minutt. Injektoren var satt til 180°C og detektoren til 200°C.

En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble benyttet for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, med indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Det ble benyttet følgende temperaturprogram under analysen: 35°C, 5 min; økning med 10°C min⁻¹ til 40°C, 2 min; økning med 15°C min⁻¹ til 70°C, 2 min; økning med 30°C min⁻¹ til 130°C, 4 min; økning med 30°C min⁻¹ til 160°C, 4 min; økning med 10°C min⁻¹ til 180°C, 2 min; økning med 10°C min⁻¹ til 200°C, 2 min.

De flyktige komponentene ble separert basert på komponentenes ulike flyktighetsgrad og affinitet til kolonnens stasjonære fase.

Identifisering og kvantifisering av de ulike forbindelsene ble gjennomført ved kalibrering med standardløsninger med kjent konsentrasjon av følgende komponenter: acetaldehyde, diacetyl, ethylacetate, 2-butanon, 2-hexanol, 2-methyl-butanal, 2-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanal, 3-methyl-butanal, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, isobutyl acetate, hexanal, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, 3-carene, R-(+)-limonene, ethyl heptanoate,

ethyl octanoate, β -citronellol, ethyl nonanoate, ethyl decanoate, phenylethyl alcohol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol, dimetylsulfide, og 2.3-pentadion (Merck, Tyskland).

3.6.8 Flyktige forbindelser med HSGCFID/TDGCMS

Flyktige forbindelsene i eplesortene, blandingene, etter at de var omstukket og i ferdig sider (prøvene hadde vært nedfrosset og tint i kjølerom over natten før analysering) ble analysert ved bruk av Thermal Desorber Gas Chromatography Mass Spectrometry (TDGCMS).

Siderprøvene ble godt blandet før innveiling av 10,00 g i al-skåler (volum 106 ml, Plus Pack As, Odense DK). Skålene ble plassert i et mikroemmisjonskammer (Micro-Chamber/Thermal Extractor M-CTE250, Markers International Ltd. Llantrisant, UK). De flyktige forbindelsene ble oppkonsentrert over på adsorbenttrør, Tenax TA/Carbograph 1TD (Markers International). Adsorbenttrørene ble videre plassert i et automatisk termisk desorpsjonsinstrument (Thermal Desorber, TD-100, Markers International), med et 7890B GC system (Agilent Technologies Inc. Wilmington, De, USA) og koblet til MS Systems, 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Som bæregass ble det benyttet helium grad 6.0 (Aga) med en flow på 1 ml/min. Programvaren som ble benyttet var Masshunter GC/MS Acquisition B.07.00.1413 (Agilent Technologies).

Oppkonsentrering av de flyktige komponentene i siderprøven over på adsorbenttrør, ble gjort i mikroemmisjonskammeret, ved 50°C i 20 min, og med en N₂-flow på 50 ml/min. Videre ble adsorbenttrøret overført til et automatisk termisk desorpsjonsinstrument. Her ble siderprøven desorbert fra røret ved 280°C, 10 min, N₂-flow 30 ml/min over på en elektrisk kjølefelle som holdt minus 10°C.

Prøven ble videre desorbent fra kjølefella (Peltier cell), hvor temperaturøkningen var 100°C/s til 280°C, holdetid 3 min., split 10 ml/min. til kolonnen. De flyktige komponentene ble separert på en DB-WAXETR GC kolonne (Agilent Technologies). Kolonnen hadde en lengde på 30 meter, med indre diameter på 0,25 mm og filmtykkelse på 0,5 µm. GC temperatur programmet var som følger: 35°C, 3 min; økning med 5°C min⁻¹ til 40°C, 2 min; økning med 15°C min⁻¹ til 70°C, 2 min; økning med 10°C min⁻¹ til 130°C; økning med 10°C min⁻¹ til 160°C,

3 min; økning med 30°C min⁻¹ til 200°C, 15 min. Komponentene ble detektert med en 5975 inert XL Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Massespektrometeret parametere var, elektronisk ioniserings mode (70eV), ionekildetemperatur på 230°C og kontinuerlig skanning i masseområdet m/z 33-400. Software programmet som ble benyttet var MassHunter GC/MS Acquisition B.07.00.1413. Identifikasjon av de flyktige komponentene ble gjort ved hjelp av NIST 11-database (Agilent Technologies).

3.7 Sensoriske analyser

Det ble utført en beskrivende sensorisk test på et utvalg av 9 av 34 sider som var representativ for alle forsøkene og betingelsene (vedlegg 7). Siderne ble valgt ut etter prøvesmaking og representerte smakspreferanser fra sidergjær, spontangjær, alle temperaturene, mengde inokulert gjær, ulik filtrering, ulik modning og tilsatt humle. Sider inokulert med champagne - og hvitvinsgjær ble ikke sensorisk testet. Testen ble utført fordi det var forventet forskjeller som det var ønskelig å gradere og sjekke for signifikant forskjell. Det ble utarbeidet et skjema med poeng fra 1-10 for å beskrive utseende (klarhet), lukt, sødme, syrlighet, bitterhet /astrigens (snerpende), frukt/blomst, kompleksitet og ettersmak (vedlegg 8). Det ble ordnet 2 serveringskoder for hver av de 9 produktene som ble servert i egnet rekkefølge der det var tatt hensyn til smaksstyrke.

Kombinasjonene av kodene som ble benyttet for sider:

AKc: 102 og 539

CKa: 876 og 158

BKd: 346 og 945

DKa: 404 og 617

AAKa: 295 og 359

ASd: 683 og 891

BKe: 762 og 463

BKc: 973 og 721

BSe: 512 og 234

Kombinasjonene til alle prøvene ble benyttet.

Dommerpanelet besto av 20 utrente dommere som var ansatt ved IKBM, IPV og Greveskogen videregående skole. De fleste hadde begrenset erfaring med sidersmaking, men flesteparten hadde erfaring med sensorikk. Før testen startet ble dommerpanelet presentert Somersby dry apple cider 4,7 % alkohol fra Ringnes bryggeri, Norge for å få bedre forståelse for bruk av poengskalaen.

Det ble servert 4 ml prøve som ble skjenket 10 minutter før servering ved $60\text{C}\pm 1$. Prøvene ble servert i to omganger med henholdsvis 4 og 5 prøver. Dommerne ble servert kaldt vann og kapteinkjeks.

3.8 Databehandling og statistiske analyser

Microsoft Excel 2013 ble benyttet til registrering av rådata og utarbeidelse av gjennomsnittsverdier med standard avvik, og til å illustrere sammenhenger og ulikheter ved hjelp av ulike diagram og tabeller.

Til å analysere eplesortene ble det benyttet toveis variansanalyse (ANOVA) med Minitab Statistical Software versjon 17 og Basic Statistic Correlasjon.

Fermenteringsprosessen ble analysert ved en kombinasjon av ANOVA, General Linear Model med Fit General Linear model og Comparisons med Tucker-plot for å finne signifikante forskjeller. For å få mer oversikt over datamaterialet ble det benyttet Multivariate Principles Component og Multirespons PLS (PLS2-modell). Teori tilknyttet dataanalysene se kapittel 2,10.

P-verdien som ble benyttet i denne oppgaven var $p=0,05$ som betyr at signifikansnivået for de statistiske testene var 5%. P-verdiene er sannsynligheten for at testresultatet stemmer dersom nullhypotesen er sann det vil si lik eller lavere enn $p=0,05$, dermed forkastes nullhypotesen og resultatet er statistisk signifikant.

4 Resultater

Resultatdelen vil konsentrere seg om de viktigste funnene knyttet til hovedmålet og delmålene med oppgaven. Signifikant nivå $p < 0,05$ er benyttet.

4.1 Fysiske analyser av eplesortene

4.1.1 Eplesortene og lagring

I løpet av 2 måneder modnet eplene noe som medførte at komponent innholdet endret seg og epleblandingene oppførte seg ulikt under pressingen. Det ble allikevel besluttet å kun ta en analyse av hver eplesort til frie aminosyrer og TN. For å skille mellom samme eplesortene benyttet i flere forsøk vil bokstaven fra forsøket stå bak eplesort forkortelsen.

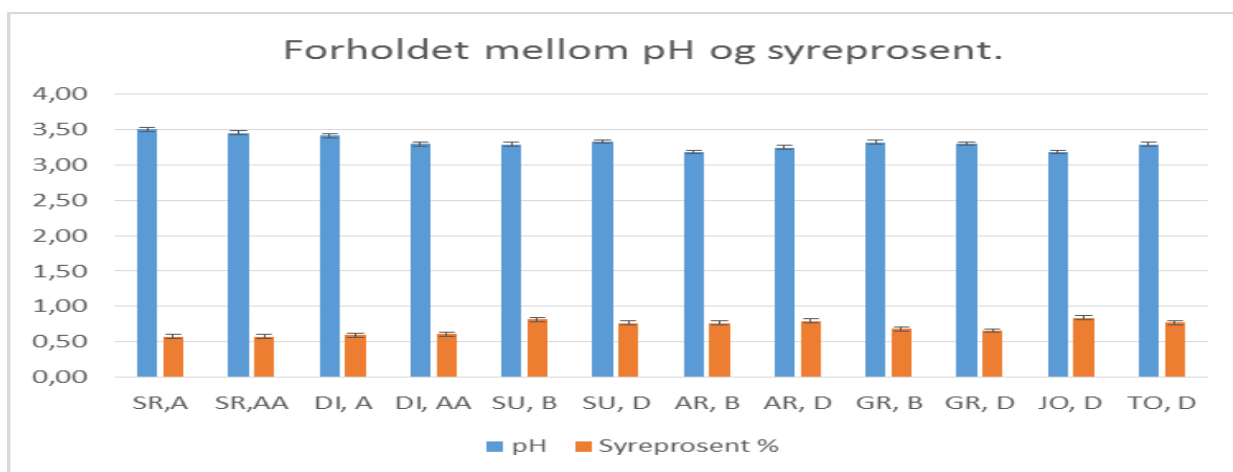
Tabell 4.1. Oversikt over lagring og fysiske egenskaper i eplesortene.

Fysiske analyser av eplesortene før fermentering.							
Forsøk	Eplesorter	Dager lagret	Fasthet (kg /cm ²)	Grunnfarge (1-8)	Dekkfarge (0-9)	Stivelse (1-10)	°Brix
A	Sunrise	16	7,26±0,42 ^{cd}	6,7±1,36	4,2±0,98	7,9±1,5 ^b	12,1±0,40 ^{bc}
AA	Sunrise	59	5,37±0,18 ^{efg}	7,9±0,09	4,8±0,34	10 ^a	12,0±0,40 ^{bc}
A	Discovery	22	8,16±0,33 ^{bc}	8	7,8±0,43	10 ^a	11,8±0,20 ^{bcd}
AA	Discovery	65	6,07±0,94 ^{ef}	8±0,28	7,1±0,62	10 ^a	11,7±0,21 ^{bcd}
B	Summerred	24	5,37±0,33 ^{efg}	7,3±0,34	5,9±0,41	9,7±0,12 ^a	10,9±0,25 ^{de}
D	Summerred	42	4,54±0,10 ^e	7,4±0,33	6±0,43	10 ^a	10,5±0,64 ^e
B	Aroma	14	6,19±0,02 ^e	7,1±0,25	4,3±0,25	9,4 ^a	11,9±0,21 ^{bcd}
D	Aroma	32	5,68±0,33 ^{ef}	6,9±0,66	4,1±0,62	10 ^a	11,2±0,06 ^{cde}
B	Gravenstein	21	6,40±0,03 ^{de}	6,2±0,28	2,6±0,91	9,9±0,35 ^a	11,5±0,47 ^{bcd}
D	Gravenstein	39	5,12±0,26 ^{fg}	7,2±0,16	3,4±0,75	9,9±0,12 ^a	11,5±0,50 ^{bcd}
D	Jonagold	21	8,54±0,11 ^a	6,5±0,09	1,9±0,77	6,9±0,76 ^a	13,9±0,15 ^a
D	Torstein	38	9,31±0,19 ^a	7,3±0,34	7,7±0,09	9,7±0,12 ^b	12,4±0,31 ^b

Verdiene er et gjennomsnittet av 5 epler og 3 paralleller for tørrstoff (°brix) med standard avvik. Fysiske analyser ble analysert ved bruk av toveis variansanalyse (ANOVA) Tukey's test. Statistiske forskjeller med signifikansnivå ($P < 0,05$) vises med forskjellige bokstaver i hver kolonne. Tabellen viser grunn- og dekkfarge (gir indikasjon på sider farge), men benyttes ikke videre i resultatdelen. Bokstavene i forsøkene viser forskjell på utviklingen i eplesorter som var benyttet i flere epleblandinger. Det høyeste stivelsesinnholdet ble funnet i SR, A (7,95) og JO, D (6,9) som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

TO hadde høyeste nivå fasthet som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$) fra de andre eplesortene med unntak av JO (8,54). Nedbrytelsen av stivelse i eplene i løpet av forsøket medførte at SU, D (4,54) og SR, AA (5,14) pakket seg i pressen, fordi de hadde blitt omdannet til enklere komponenter og blitt forbrukt (Kavara, 1998). Det ble funnet høyest innhold av tørrstoffet i JO (13,9) som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$) fra de andre eplesortene. Det var positiv korrelasjon mellom fasthet (0,779) i alle eplesortene som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

4.1.2 Forholdet mellom pH og syreprosent



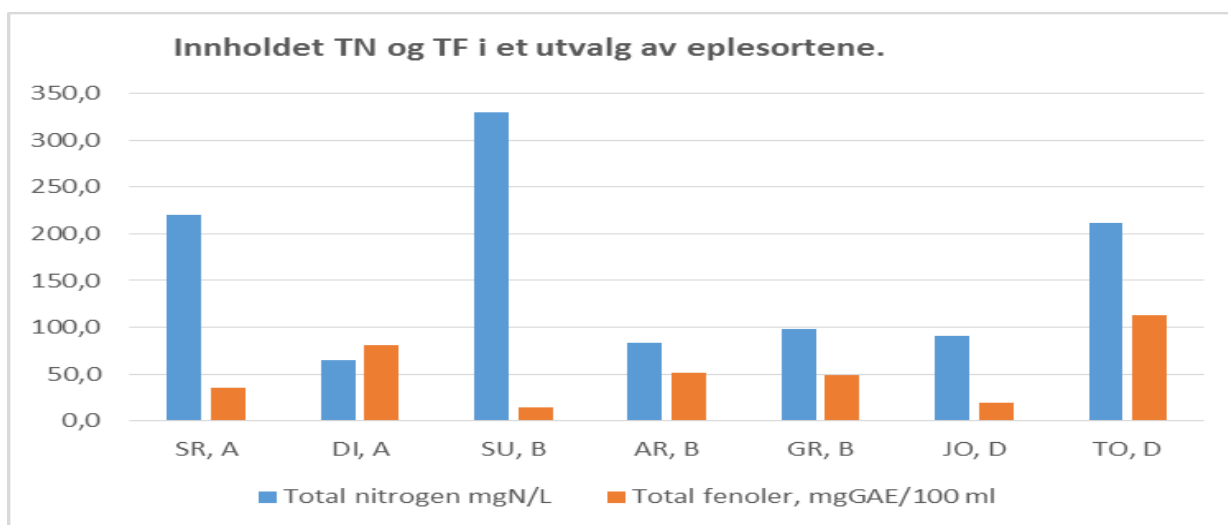
Figur 4.1. Sammenhengen mellom pH og syreprosent. Verdiene er et gjennomsnitt av 3 paralleller

Forholdet mellom pH og titrert syre prosent viste at det ikke var noen spesiell forbindelse mellom dem, men når pH gikk opp gikk syreprosent ned og motsatt (vedlegg 2). pH var høyest i SR, A (3,5) og SR, AA (3,45) som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$) fra de andre eplesortene. I løpet av fermenteringsprosessen gikk pH sakte opp og stabiliserte seg mellom 3,4-3,61, bortsett fra i A- og AAK-fatene som først hadde et fall i pH som ikke endret seg før dag 8 for deretter å stabiliserte seg noe høyere enn utgangs- pH 3,51 til 3,7. Syreprosenten var lavest i SR, AA og DI, AA 0,57 og høyest i JO, D 0,842 som var signifikant forskjellig $P < 0,05$. Ideelt nivå for syreprosent i siderproduksjon er mellom 0,3-0,5 (g/100 ml) og for pH mellom 3,3-3,8 (Lea, et al. 2003).

Det var negativ korrelasjon mellom pH (-0,456) og syreprosent (0,469) i eplesortene som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

4.2 Biokjemiske analyser av eplesortene

4.2.1 Innholdet av total nitrogen og totale fenoler



Figur 4.2. Sammenhengen mellom TN og TF. Verdiene er gjennomsnitt av tre paralleller.

TN nivået i eplesortene varierte fra $64,6 \pm 1$ til $329,2 \pm 18$ mgN/L med gjennomsnittlig nivå på $137,1 \pm 29$ mgN/L. DI hadde lavest nivå og SU hadde høyest som var signifikant forskjellig ($P < 0,05$). Ideelt TN nivå for siderproduksjon er minst 75 mg/L (Alberti et al. 2011). Høyest nivå av TF ble funnet i TO $81,46 \pm 12$ mgGAE/100ml og laveste i JO $11,3$ mgGAE/100 ml (vedlegg 2). Det ble funnet signifikant forskjell mellom TO, DI og SU både med hensyn til TN og TF ($P < 0,05$).

Tabell 4.2. Sammenhengen mellom TN, TA og de syv viktigste aminosyrene i eple-sortene.

Sammenhengen mellom TN (mgN/L) og aminosyrer i et utvalg av eple-sortene (mg/L).							
Eple-sortene	SR	DI	SU	AR	GR	JO	TO
Total Nitrogen	220,3±6	64,6±1	329,2±18,2	83±72,6	98,1±12,8	91,1±13,1	212,1±15,2
L-asparaginsyre	133,9	74,1	317,7	78,5	84,7	136,7	141,6
L-glutaminsyre	51,8	49,1	43,1	44,4	61,6	108,3	85,2
L-asparagin	296,7	62,4	746,4	175,3	225,5	320,7	634,7
L-serin	13,8	9,4	8,6	6,1	22,2	7,5	13,3
L-glutamin	9,5	3,5	13,4	3,4	10,8	6,3	11,2
L-arginin	0,2	0,6	1,5	n.d.	0,4	0,6	0,6
L-alanin	16,9	2,1	11,2	3,7	19,2	5,4	22,6
Σ av alle aminosyrene	534,2	223,5	1163,2	349,7	435,7	595,2	924,3

Verdiene er fra tre paralleller for TN og en for aminosyrene. Det ble totalt identifisert 17 aminosyrer og total mengden (TA) i eple-sortene var fra 224 mg/L i DI til 1165 mg/L i SU. Asparagin, asparaginsyre og glutaminsyre representerte mellom 85,3% til 95,1% av TA. Det ble funnet signifikant forskjell mellom asparagin og de andre aminosyrene ($P < 0,05$). TN var positivt korrelert til asparaginsyre (0,874), asparagin (0,819) og glutamin (0,759,) med signifikant forskjell $P < 0,05$. Asparaginsyre var korrelert til asparagin (0,845) og glutamin og glutamin var korrelert til asparagin (0,862) og alanin (0,754,) med signifikant forskjell $P < 0,05$.

Tabell 4.3. Innholdet av tørrstoff, karbohydrater og organiske syrer i eple-sortene.

Innholdet av tørrstoff (g/L), organiske syrer (mg/L) og karbohydrater (g/L) i eple-sortene.						
Eple-sortene	Tørrstoffg/L	Fruktose	Sukrose	Glukose	Sitronsyre	Ravsyre
SR, A	1049	50,2	28,5	5,0	46,4	1200
SR, AA	1048	53,3	27,5	6,3	74,0	1296
DI, A	1048	56,9	18,7	15,0	0,0	865
DI, AA	1047	46,7	31,4	5,5	0,0	815
SU, B	1044	43,1	37,5	6,9	59,0	1282
SU, D	1042	39,2	27,8	6,6	62,4	1359
AR, B	1048	36,5	18,2	6,6	32,3	1149
AR, D	1045	51,5	29,7	8,0	33,2	1359
GR, B	1046	42,2	12,1	11,2	53,2	1828
GR, D	1046	52,3	12,2	14,3	72,9	1546
JO, D	1056	60,5	40,5	12,8	48,4	1046
TO, D	1050	46,8	23,4	19,8	55,0	1587

Verdiene er tre paralleller av tørrstoff og en av karbohydratene og de organiske syrene, n.d. betyr ikke identifisert. Høyest innhold av karbohydratene ble funnet i JO, D 113,83 g/L og lavest i AR, B 61,29 g/L. JO var søttest med høyest nivå av fruktose og sukrose, mens GR, B og AR, B var minst søte av eplesortene. Det var signifikant forskjell mellom SR og JO med $P < 0,05$. Fordelingen av karbohydrater både økte og ble redusert i eplesortene under lagring. Sitronsyre i eplesortene varierte mellom ulike eple sorter fra 32,29 til 74,02 mg/L og det ble dannet sitronsyre i løpet av lagringen. Ravsyreinnholdet varierte fra 815,49 til 1827,55 mg/L som var signifikant forskjellig. I løpet av lagringen økte innholdet i nesten alle eple sortene og ble redusert i GR, D og DI, AA.

Tabell 4.4. Innhold og fordeling av polyfenoler i eple sortene.

Polyfenoler i eple sortene (mg/L).									
Eple sorter	(+)- catechin	(-)- epicatechin	B1 procyanidin	B2 procyanidin	Klorogen- syre	Koffein- syre	Phlorizin	Rutin	Σ TP
SR, A	1,92	6,56	7,97	10,53	36,96	0,88	0,11	0,11	65,0
SR, AA	2,39	6,88	2,02	10,13	24,16	0,87	0,05	n.d.	46,5
DI, A	4,83	2,32	14,27	26,97	196,84	2,07	0,24	0,18	247,7
DI, AA	4,07	2,33	11,61	38,77	310,68	2,32	0,3	0,06	370,1
SU, B	1,71	1,68	7,34	3,82	22,33	0,19	0,01	0,34	37,4
SU, D	2,45	0,13	1,06	8,1	n.d.	0,09	0,5	0,05	12,4
AR, B	3,34	0,02	8,4	3,93	35,78	0,35	0,28	0,41	52,5
AR, D	3,49	4,95	3,66	4,44	38,7	0,43	0,33	0,61	56,6
GR, B	7,17	6,81	12,1	17,49	63,68	1,09	9,31	0,34	118,0
GR, D	101,45	2,68	5,89	11,34	50,22	2,07	6	0,47	180,1
JO, D	39,57	1,07	2,88	1,12	17,29	0,99	7,48	0,39	70,8
TO, D	3,1	8,65	0,39	16,19	n.d.	0,33	0,31	0,07	29,0

Verdiene er fra en parallell av hver eple sort og n.d. betyr ikke identifisert. Resultatene viser at polyfenol innholdet i eple sortene endret i løpet av lagring fra oktober til november (16-65 dager) 2015. Innholdet av TP i eple sortene varierte fra 12,38 (SU, D) til 370,14 mg/L (DI, AA). Det var ingen tydelig sammenheng mellom reduksjon og økning i TP eller fordelingen av polyfenoler eple sortene. TO som anses en av de best egnede eple sortene for lagring hadde laveste TP innhold. I GR, B økte innholdet av catechin fra 7,17 (GR, B) til 101,45 mg/L GR, D mens innholdet av klorogensyre i SU, B og SU, D ble redusert fra 22,3 mg/L til ikke identifisert (n.d.). Quercetin og phloretin ble ikke identifisert i eple sortene.

Tabell 4.5. Innholdet av flyktige komponenter i eplesortene.

Innholdet av flyktige komponenter i eplesortene, mg/L.												
Komponenter	SR,A	SR, AA	DI, A	DI, AA	SU, B	SU, D	AR, B	AR, D	GR, B	GR, D	JO, D	TO, D
Acetaledehyde												
Acetaldehyde	0,858	0,988	2,162	1,123	2,454	2,562	3,475	3,248	1,367	2,083	2,758	8,460
Ketone												
Acetone	0,055	0,061	0,130	0,003	0,091	0,114	0,180	0,137	0,040	0,145	0,111	0,116
Estere												
Diacetyl	n.d.	n.d.	n.d.	0,007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,049	0,264	n.d.	0,241
2-butanone	n.d.	n.d.	0,010	0,010	n.d.	0,009	n.d.	0,012	0,013	0,011	0,008	0,013
Hexanal	0,00	0,087	0,003	0,074	0,063	n.d.	n.d.	0,073	0,060	0,002	0,031	n.d.
Butyl acetat	2,211	3,302	3,518	3,533	0,002	0,008	3,831	3,604	0,003	0,002	1,389	3,827
trans-2-hexen-1-al	0,801	1,049	1,940	1,736	0,894	1,027	2,294	2,050	1,999	2,342	0,102	0,113
Ethyl octanoate	n.d.	0,002	0,004	n.d.	0,026	0,033	0,009	n.d.	n.d.	0,010	n.d.	n.d.
Beta-citronellol	0,006	0,005	0,010	0,674	0,008	0,441	0,018	0,280	0,097	0,010	0,007	0,104
Ethyl acetate	0,00	0,014	0,072	0,031	0,031	0,022	0,110	0,120	n.d.	0,021	0,043	0,227
2.3-pentadione	n.d.	n.d.	0,056	0,037	n.d.	0,011	n.d.	n.d.	0,014	n.d.	0,053	0,077
Isobutyl acetate	0,017	0,037	0,019	0,031	0,004	0,004	0,019	0,018	0,004	0,005	0,051	0,032
Høyere alkoholer												
Phenylethyl alcohol	n.d.	0,264	0,146	n.d.	n.d.	0,312	2,353	2,221	0,188	n.d.	0,221	n.d.
2-butanol	0,484	0,850	1,082	1,289	1,051	1,146	1,263	1,361	0,792	1,373	0,760	1,591
2-methyl-1butanol	0,073	n.d.	1,824	1,236	0,744	1,043	0,261	0,234	0,437	0,865	0,271	0,178
1-propanol	0,399	0,752	3,576	2,785	0,422	0,443	0,740	0,672	0,697	0,783	0,410	0,558
2-methyl-1-propanol	0,069	0,104	0,111	0,261	0,102	0,144	0,136	0,130	0,236	0,431	0,155	0,156
1-hexanol	1,117	1,089	3,085	2,759	4,994	7,429	3,197	2,923	4,196	5,702	3,945	4,531
Isoamyl acetate	0,075	0,044	0,481	0,436	n.d.	n.d.	0,144	0,139	n.d.	n.d.	0,297	0,138
Butyl butyrate	0,014	0,019	0,106	0,142	0,567	0,775	0,345	0,347	0,128	0,282	0,062	0,109
Hexyl acetat	0,596	0,592	1,258	0,656	n.d.	0,001	1,383	1,395	0,002	n.d.	0,684	0,189
Σ flyktige komponenter	6,78	9,26	19,59	16,82	11,45	15,52	19,76	18,96	10,32	14,33	11,36	20,66

Verdiene er en parallell av eplesortene, n.d. betyr ikke identifisert. Det ble totalt identifisert 26 flyktige komponenter og ethyl hexanoate, 3-methyl-butanol, acetoin og 3-methyl-1-butanol ble ikke funnet i eplesortene (vedlegg 4). TO, D hadde høyest total innhold av flyktig komponenter 20,66 mg/L og derav acetaldehyd 8,46 mg/L og SR, A lavest 6,78 mg/L og 0,85 mg/L som var signifikant forskjellig fra de andre ($P < 0,05$).

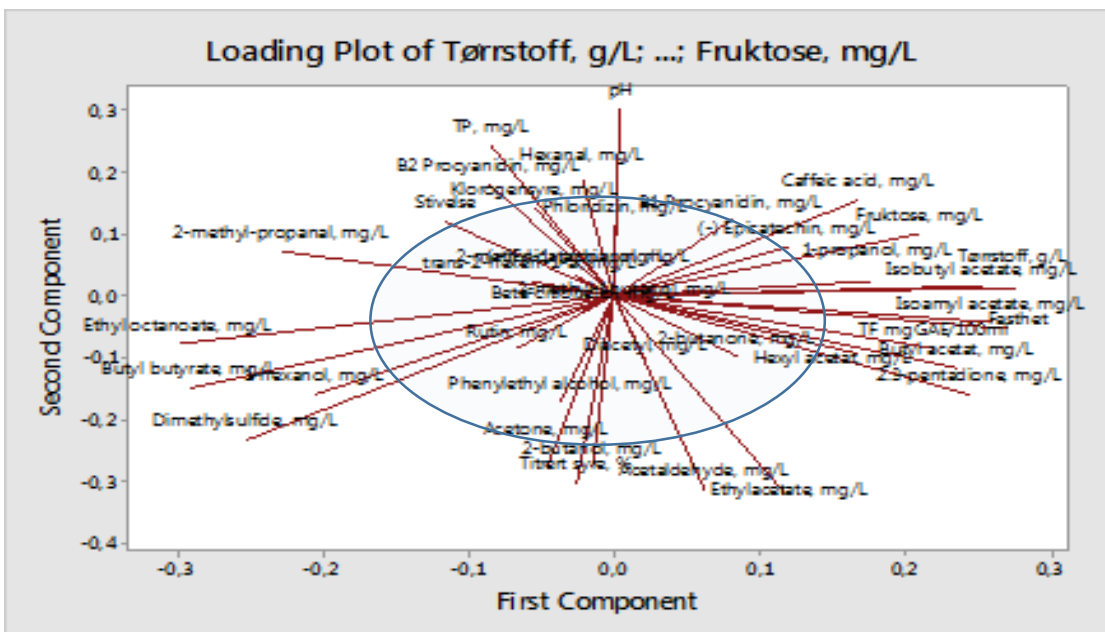
AR, B og AR, D hadde høyest andel flyktige komponenter (6,28 og 6,16 mg/L) og SU, B og SU, D lavest (1,03 og 1,56 mg/L). DI, A og SU, D hadde høyest andel høyere alkoholer (11,67 og 11,29 mg/L) og SR, A og SR, AA lavest (2,83 og 3,71 mg/L). I løpet av lagringen ble det dannet 2-butanol, butyl butyrate i alle eplesortene og 1-propanol og 2-metyl-1-propanol i nesten alle unntatt AR, D.

Tabell 4.6. Innholdet av "ukjente" flyktige komponenter i et utvalg av eplesortene.

Komponenter		Flyktige komponenter i et utvalg av eplesortene.															
		SU, B		AR, B		GR, B		SU, D		AR, D		JO, D		GR, D		TO, D	
		Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal	Match faktor	Areal
Acetic acid, butyl ester	Sterk ubehagelig smak			81	9006691	94,8	535852	91,8	111295	98,8	53396736	98,7	19760204	92,2	140106	98,8	52300064
Acetic acid, hexyl ester	Sterk ubehagelig smak			98,5	40594116	85,9	453761			98,7	20149943	98,8	13664511	84,8	893871	98,0	3495744
2-Hexenal, (E)-Butanoic acid, butyl ester	Grønn fruktsmak	97	13239957	97,3	21922741	97,3	44434532	97,2	4266537	96,8	5907808			97,2	17584884	96,8	3098038
	Besk syresmak	97	29141169	96,3	1583672	91	994477	97,1	4366563	94,5	4404960			93,1	1073775		
	Søt, mandel, grønn frukt																
Hexanal	smak	95,6	29548061	95,7	18081597	95,8	16587101	95,3	11289311	96,3	1217117	87,3	1117714	95,8	9379188	89,3	1529697
2,4-Hexadiene	Asparges selleri, fruktig	92,9	1201789			94,7	4707581	92,5	5505429	94,8	1511836	93,2	8023920	94,7	1891332	93,6	987610
n-Propyl acetate	fusel jordbær, pære			94	364912					92,8	701853	90,7	541689			87,4	609004
1-Butanol, 3-methyl-1-Butanol, 2-methyl-	Whisky											86,1	845036				
Octanoic acid	Vin	92,1	20845619			94,8	19409505	90,9	29976395	85,7	903474	90,2	10740605			92,9	1169591
Butanoic acid, ethyl ester	Munnfølelse																
Butanoic acid, propyl ester	Fruktig, eple	97	29141170	94,2	1893804	91	994476,7	95,6	24332332	93,1	2397772					93,9	3179881
	Fruktig, søt	94,4	354103,3			95,5	336736,3	95,9	360817					93,6	303362,6	80,6	1149669

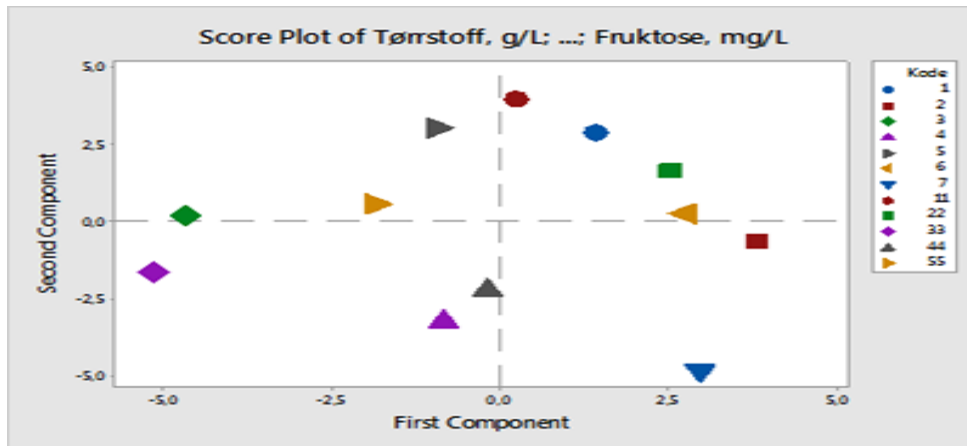
Verdiene er en parallell av hver eplesort. TDMGC er en semi kvantitativ metode for analysering av ukjente flyktige komponenter mot en kjent database. Resultatene oppgis i areal og match faktor brukes som bekreftelse for riktig identifisering. Det ble benyttet et utvalg med match faktor mellom 80,6 til 98,8 % som viser sannsynligheten for korrekt identifisering. Det ble identifisert 12 nye flyktige komponenter som forbindes med eple og sider kvalitet og bidrar med fruktighet og munnfølelse med lave terskelverdier (0,01-10 mg/L). Eplesortene inneholdt mellom 7-9 nye komponenter som ble noe endret i løpet av lagringen.

4.2.2 Oversikt over komponentene i eplesortene.



Figur 4.3. Ladningsplottet gir oversikt over fordelingen av komponentene og viser egenskapene til prøvene unntatt aminosyrene.

Første komponent er styrende og forklarer mest av variansen mellom prøvene og andre komponent er sekundær. Plottet viser hvordan prøvene fordelte seg utefra komponentene som var mest beskrivende for prøvene (figur 4.4). Egenskapene nærmest origo forklarer ikke variasjonene mellom prøvene godt nok og tas ikke med. Ved å sammenligne ladningsplottet og score-plottet som skiller eplesortene karakteriseres SU med mye ethyl octanoate, mens DI ikke har disse forbindelsene, men derimot et høyt innhold av isoamyl acetat. SR, AA har høy pH og AR har lav. TO skiller seg fra de andre ved å ha et høyt innhold av ethylacetat og acetaldehyd.

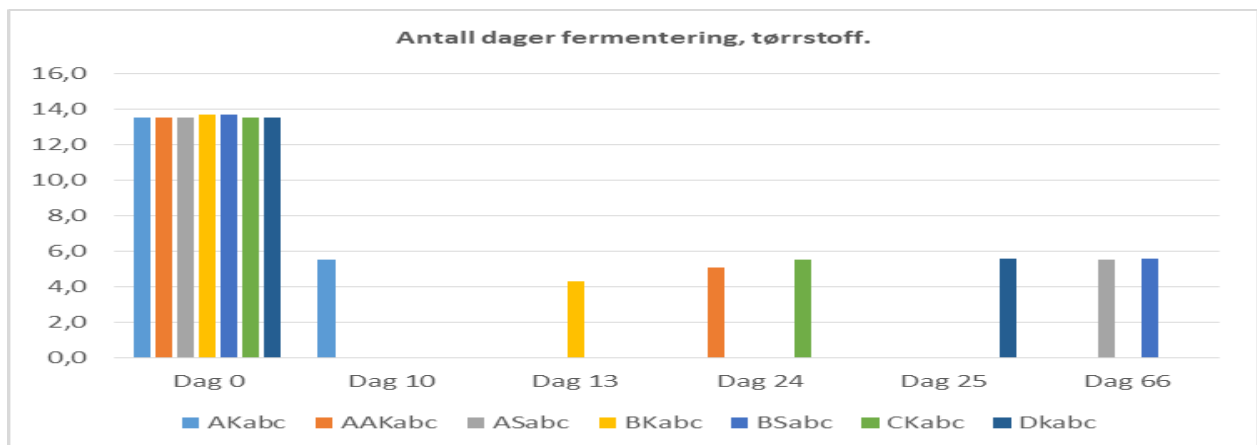


Figur 4.4. Score-plottet skiller eplestortene og viser likheter og ulikheter. Forklaring av eplekodene: 1 SR, A (11 SR, AA), 2 DI, A (22 DI, AA), 3 SU, B (33 SU, D), 4 AR, B (44 AR, D), 5 GR, B (55 GR, D), 6 JO, D og 7 TO, D.

Score-plottet viser at det er større forskjell mellom SU og DI og SU, GR og AR er mer like. SU, B er negativt korrelert til JO.

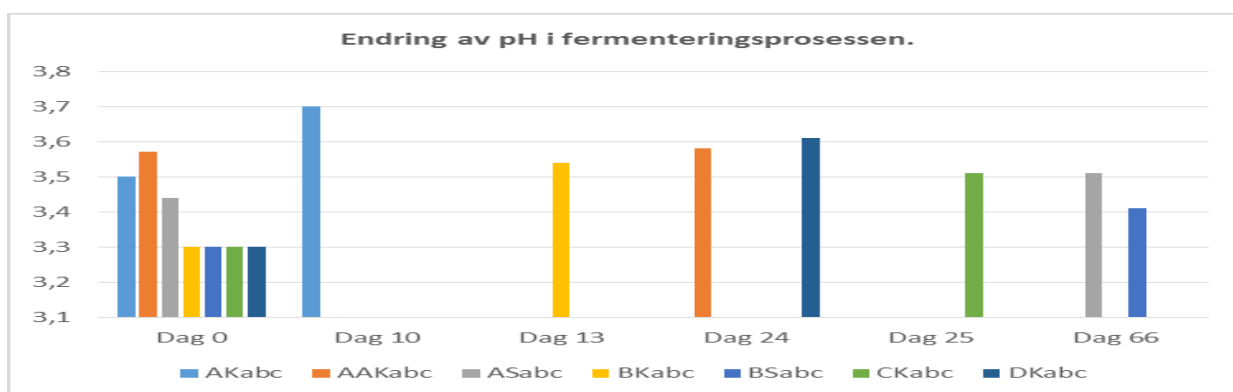
4.3 Fermenteringsprosessen i epleblandingene

4.3.1 Fysikalske analyser



Figur 4.5. Endring av pH fra dag 0 til endt fermentering. Verdiene er gjennomsnittet av 3 paralleller.

Fra dag 0 var pH nesten lik i alle fat unntatt i A- og AA-fatene som var noe høyere. pH gikk gradvis opp og stabiliserte seg i alle fatene bortsett fra A-fatene der pH gikk ned i stedet. På slutten av fermenteringsprosessen gikk pH opp og stabiliserte seg litt over utgangs - pH. Referanseverdi for pH i siderproduksjon er mellom 3,3 og 3,8 (Lea, 2015) og alle fat var innenfor referanseverdien.

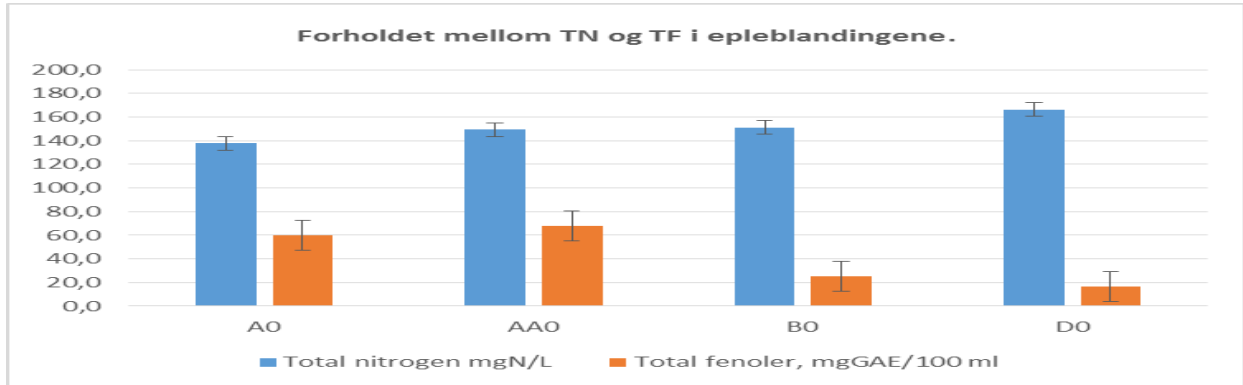


Figur 4.6. Endring av tørrstoff fra dag 0 til endt fermentering. Verdiene er gjennomsnitt av 3 paralleller.

Endrede temperatur betingelser fra 20°C til 10°C (etter BK-fatene) medførte at sider fra AAK- fatene brukte 14 dager lengre fermenteringstid enn sider fra AK-fatene. Sider fra C-fatene som var inokulert med halv mengde sidergjær brukte 24 dager. Sider fra DK-fatene benyttet ulik tid på fermenteringsprosessen (tabell 3.6). Epleblandingene var positivt korrelert (0,335) til gjærtype og volum (0,458) med signifikant forskjell $P < 0,05$. Tørrstoffet i epleblandingene varierte mellom 1042-1044 g/L og var relativt lite påvirket av lagring.

4.4 Biokjemiske analyser

TN ble kun analysert av epleblandingene og aminosyrer ble tatt av epleblandingene og et utvalg av omstukket og sider.



Figur 4.7. Forholdet mellom TN og TF i epleblandingene. Verdiene er fra tre paralleller med standard avvik.

Det laveste innholdet av TN (tabell 4.7) ble funnet i A0, 137,9 mgN/L og det høyeste i D0, 166,3 mgN/L) som også hadde laveste innhold av TF 16,54 mgGAE/ 100 ml (vedlegg2). Lagring medførte at innholdet av TN økte fra 138 til 149,5 mgN/L og TF fra 60,1 til 67,7 mgGAE/100 ml fra A0 til AA0 (samme epleblanding).

Tabell 4.7. Endring av aminosyreinnholdet og TA fra epleblandingene til sider.

Forholdet mellom TN og aminosyrer og endring av av aminosyreinnholdet, (mg/L).										
Komponenter	Epleblandingene				Ferdig sider					DKa, amarillo humle
	A0	AA0	B0	D0	BKc	BSac	DKa	DKb	DKc	
Total Nitrogen, mgN/L	137,9±3,3	149±2,7	151,18±15,1	166,28±9,7						
L-asparginesyre	87,72		140,96	147,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,27
L-glutaminsyre	57,53		49,88	62,24	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,73
L-asparagin	176,49		370,67	424,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,16
L-serine	12,61		10,51	10,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-glutamin	5,70		8,04	8,62	n.d.	0,22	0,29	0,29	0,29	0,73
L-arginine	0,42		0,84	0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63
L-threonin	2,74		2,62	2,74	n.d.	0,24	n.d.	0,36	0,36	0,36
L-alanin	9,09		10,51	12,30	n.d.	n.d.	0,09	n.d.	0,09	0,71
Σ aminosyrer	361,34		605,19	681,22	0,44	0,46	0,38	0,65	0,74	3,59

Verdiene er fra en parallell av epleblandingene, gjennomsnittet av to paralleller for BS-fatene og en parallell for DK-fatene. Det ble totalt identifisert 14 aminosyrer og 8 er presentert i tabellen over (vedlegg 5). Innholdet av TA i epleblandingene varierte fra lavest i A0, 359,92 mg/L til høyeste i D0, 680,17 mg/L. I alle epleblandingene representerte asparagin, asparaginsyre og glutamin mellom 89% til 93,3% av TA. I løpet av fermenteringsprosessen ble de fleste aminosyrene metabolisert unntatt i DK - fatene tilsatt humle, fordi humle inneholder aminosyre forbindelser. Det ble funnet signifikant forskjell mellom asparagin og de andre aminosyrene og i TN innholdet mellom epleblandingene A0 og D0.

Tabell 4.8. Endring av organiske syrer og karbohydrater fra epleblanding til sider.

Endring i organiske syrer og karbohydrater fra epleblandingene til sider.								
Komponenter	Sitronsyre	Pyrodruesyre	Ravsyre	Melkesyre	Eddiksyre	Fruktose	Sukrose	Glukose
Epleblandingene	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	g/L	g/L	g/L
A0	27,77	n.d.	1004,72	n.d.	n.d.	31,70	15,57	6,11
AA0	46,65	n.d.	1130,55	n.d.	n.d.	81,21	25,51	15,37
B0	56,05	n.d.	1369,64	n.d.	n.d.	34,75	20,94	6,72
D0	70,79	n.d.	1545,18	n.d.	n.d.	52,37	24,64	13,05
Omstukket								
AKabc	49,7	93	1872,2	n.d.	144,8			
AAKabc	28,2	30	705	n.d.	n.d.			
ASabc	44,6	74,6	1390,4	60,2	141,9			
BKabc	77,5	60,9	2048,4	n.d.	100,6			
BSabc	64,04	32,15	1609,49	28,37	97,89			
DKabc	43,21	30,9	1451	16,1	91,8	12,65	0,36	0,42
Sider								
AKabc	37,4	74,7	1792,2	n.d.	145,4	8,49	0,13	2,34
AAKabc	59,5	60,4	1563,1	21,7	98,3	9,13	11,46	1,80
ASabcd	119,9	69,5	1320,5	55,1	181,7	6,66	8,10	2,30
BKabc	99,9	46	1831,8	n.d.	111,8	1,79	4,45	1,46
BSabc	76,3	26,1	1233,1	23,8	88,7	2,66	10,96	0,54
DKabc	108,3	49	2112,4	41,2	110,1	6,95	9,31	2,71
DK, humle	131,1	49,9	1728,5	49,2	85,4	8,78	6,82	3,10

Verdiene er fra en parallell av epleblandingen og gjennomsnittet av tre paralleller fra omstukket og sider (abc), n.d. betyr at komponenten ikke har blitt identifisert. Under lagring økte innholdet av karbohydrater fra 53,4 g/L i A0 til 122,1 g/L i AA0. I løpet av fermenteringsprosessen ble mesteparten av glukose og sukrose metabolisert. Karbohydratinnholdet hadde blitt redusert mellom 68,1 – 81,7 % i sider.

Sider fra BS-fatene hadde laveste innholdet av glukose og fruktose og sider fra AAK-fatene hadde høyeste innhold av fruktose mens sider fra DK- tilsatt humle hadde høyest innhold av glukose. Sukrose vurderes ikke fordi nesten alle siderne unntatt AK-fatene var blitt justert med sukker. Lavest innhold av sitronsyre og ravsyre ble funnet i A0-blandingen og høyeste i D0-blandingen. Pyrodruesyre, eddiksyre og melkesyre ble metabolisert i løpet av fermenteringsprosessen. I sider hadde innholdet av sitronsyre og ravsyre økt i B0- og A0-blandingene og blitt redusert i AA - og D0-blandingene. Det var blitt dannet melkesyre i AS-BS og DK-blandingene og eddiksyre i alle unntatt AAK. A0-blandingen ble funnet signifikant forskjellig fra de andre blandingene i produksjon av organiske syrer. Det ble funnet forskjell mellom A0- og B0-blandingen i produksjon av melkesyre og fruktose, mellom de andre og A0- og AA0-blandingen med sitronsyre og mellom A0- og AA0-blandingen med eddiksyre.

Tabell 4.9. Endring av polyfenolinnholdet gjennom fermenteringsprosessen til sider.

Endring i polyfenolinnholdet fra epleblandingene til sider.												
Komponenter	(+)-catechin	(-)-epi catechin	B1 Procyan idin	B2 Procyan idin	Klorogen-syre	Koffein-syre	Phloridizin	Phloretin	Quercetin	Rutin	ΣTP	ΣTF
Epleblandingene	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mgGAE/100 ml
A0	2,78	4,44	8,12	17,66	108,54	1,01	0,12	n.d.	n.d.	0,25	142,9	60,1
AA0	4,09	1,00	9,27	15,07	89,33	1,69	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	120,6	67,5
B0	1,38	2,00	8,07	4,30	27,63	0,11	0,19	n.d.	0,04	n.d.	43,7	25,7
D0	3,27	4,40	2,74	4,86	13,19	0,10	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	28,7	16,5
Omstukket												
AKabc	1,54	3,71	6,89	14,07	117,08	1,30	0,73	0,12	0,06	0,03	145,5	45,9
AAKabc	3,54	3,61	4,07	16,84	177,17	1,32	0,11	0,05	n.d.	2,29	209,0	47,9
ASabc	23,84	24,71	23,59	23,77	133,23	0,98	16,33	0,26	0,38	3,37	250,5	47,7
BKabc	1,19	3,00	7,27	4,32	28,47	0,52	0,30	0,05	n.d.	1,93	47,0	17,7
BSabc	1,08	3,31	5,78	5,96	38,57	0,45	0,95	0,05	0,01	1,45	57,6	23,5
DKabc	3,72	2,58	3,66	5,75	27,53	0,35	0,04	n.d.	0,04	0,03	43,7	17,9
Sider												
AKabc	1,56	5,85	6,58	15,14	120,54	1,18	0,62	n.d.	n.d.	1,55	153,0	41,1
AAKa	4,65	1,42	n.d.	18,12	199,82	2,91	0,08	0,23	n.d.	6,88	234,1	37,9
ASabc	1,50	3,98	5,04	12,28	87,01	1,12	0,27	0,12	0,03	0,86	112,2	22,5
BKabc	12,23	4,79	8,95	5,03	26,62	0,37	3,62	0,09	0,09	1,43	63,2	14,1
BKd-HUMLE	17,79	5,34	6,47	4,04	28,24	0,49	5,79	0,10	n.d.	2,93	71,2	15,5
BSabc	8,27	5,71	4,05	4,76	27,97	0,64	4,08	0,06	0,01	1,99	57,5	9,4
DKabc	2,10	1,98	6,05	7,20	19,19	0,33	0,97	0,04	n.d.	0,45	38,3	11,0
DKabd, humle	3,50	1,82	8,83	6,63	29,99	0,17	0,09	0,04	n.d.	0,85	51,9	13,4
Ref. Wojdylo	2-145	13-551		29,2-400		3-592	(1-61)	2,7-41	tr-138	n.d-19		

Verdiene er fra en parallell av epleblandingene og gjennomsnittet av 3 fat for omstukket og sider, n.d. betyr at komponenten ikke ble funnet. Det høyeste innholdet av polyfenoler ble funnet av klorogensyre, procyanidin B2 og procyanidin B1. A0-blandingen hadde høyest nivå av TP 142,9 mg/L og D0-blandingen lavest i 28,7 mg/L. Phloretin, rutin og quercetin ble metabolisert i fermenteringsprosessen. Innholdet av TP økte i løpet av fermenteringsprosessen mest i AS-fatene og minst i BK - og AK -fatene.

I sider hadde innholdet av TP økt i nesten alle fatene unntatt AS som var blitt redusert med mer enn 50 % fra 250 til 112 mg/L og i DK-fatene 5,4 mg/L. Bruk av PCA-plott ga en bedre oversikt og viste at filtrering var negativ korrelert til spontangjæring (figur 4.8 og 4.9). Sider fra B0 og D0- blandingene hadde lavest innhold av klorogensyre, koffeinsyre og TF. Det høyeste innholdet av procyanidin B1 ble funnet i sider fra BK-fatene.

Sider fra B0-blandingen hadde høyest innhold av catechin og phloridizin og sider tilsatt humle (BKd) aller høyest. Sider fra DK-fatene med humle hadde høyere innhold av TP, klorogensyre og catechin enn DK-fatene. Det ble funnet signifikant forskjell i produksjon av TP og TF mellom A0 og AA0-blandingen og de andre epleblandingene.

Tabell 4.10. Endring av flyktige komponenter fra epleblandingene til sider, mg/L.

Endring av flyktige komponenter fra epleblanding til sider, mg/L.																
Acetaldehyde	Smak	Epleblanding				Sider						BK, humle	BSabc	BSe	DKabc	DKabc, humle
		A0	AA0	B0	D0	AKabc	AAKa	ASabc	BKabc	BKe						
Acetaldehyde	Sur råttten eplekart	1,63	1,07	2,75	4,28	11,63	26,32	10,67	6,53	7,65	26,65	11,76	7,73	19,99	22,04	
Ketone																
Acetone	Neglilakk	0,14	0,04	0,12	0,13	0,33	0,30	0,27	0,30	0,26	0,57	0,32	0,21	0,39	0,51	
Estere																
Diacetyl	Smør	0,01	n.d.	0,22	0,01	0,05	0,01	0,02	n.d.	n.d.	0,08	n.d.	n.d.	0,08	0,03	
	Neglilakk høye nivåer, frukt lave nivåer	0,04	0,02	0,06	0,11	14,59	17,58	12,58	21,96	16,01	22,91	21,44	19,27	24,92	23,36	
Butyl acetat	Moden frukt	2,99	3,27	1,42	1,46	1,12	1,12	0,02	0,66	0,87	0,62	0,35	1,05	0,84	0,63	
Isoamyl acetate	Banener	0,47	0,24	0,06	0,08	1,01	3,21	0,01	2,86	2,24	2,05	1,30	2,80	3,94	2,26	
Butyl butyrate	Fruktig, eple	0,08	0,08	0,37	0,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Ethyl hexanoate	Moden frukt, rødt epler, anis Eple og pærearoma, søtsmak	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,65	0,33	0,19	0,66	0,52	0,48	0,30	0,58	0,59	0,60	
Hexyl acetat		1,01	0,64	0,50	0,28	0,42	0,25	0,31	0,82	1,03	0,72	0,42	2,02	1,04	0,80	
Ethyl octanoate	Frukt, gress	0,00	0,00	0,01	0,01	0,05	0,03	0,03	0,06	0,04	0,03	0,04	0,07	0,06	0,04	
Acetoin	Melk, smør	0,51	n.d.	n.d.	n.d.	1,92	1,62	1,15	0,87	n.d.	2,86	2,06	0,83	1,55	2,08	
Høyere alkoholer																
Phenylethyl alcohol	Blomsterakt ig, søt, roser, brød Skarp lukt, våt korn eller	0,10	n.d.	n.d.	0,18	25,38	19,20	21,10	34,26	24,00	34,54	19,23	14,59	45,02	27,09	
2-methyl-1-propanol	fiber/nøtter Vinlignende,	0,17	0,17	0,15	0,21	14,86	12,08	22,03	30,98	23,88	26,42	17,93	14,03	19,82	10,15	
2-butanol	mugg Blomster,	1,00	0,99	1,17	0,40	0,01	0,01	0,01	0,01	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	0,01	0,03	
1-propanol	søt Fruktig, moden, neglilakk	2,52	1,92	0,54	0,66	7,90	7,37	5,65	11,93	7,28	13,33	8,87	6,26	8,75	9,76	
3-methyl-1-butanol		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	116,5	90,4	125,6	165,8	134,6	148,7	96,8	91,3	140,3	98,2	
2-methyl-1butanol	Whisky Blomster,	1,17	0,58	0,52	0,58	25,13	0,02	21,30	31,63	27,51	27,70	17,24	7,41	16,73	18,46	
1-hexanol	frukt	2,54	1,78	4,28	6,38	2,31	0,01	1,18	3,25	3,91	3,50	3,92	3,35	3,15	2,99	
Σ totale komponenter		14,4	10,8	12,2	15,1	223,9	179,9	222,2	312,6	249,8	311,2	202,0	171,5	287,2	219,0	

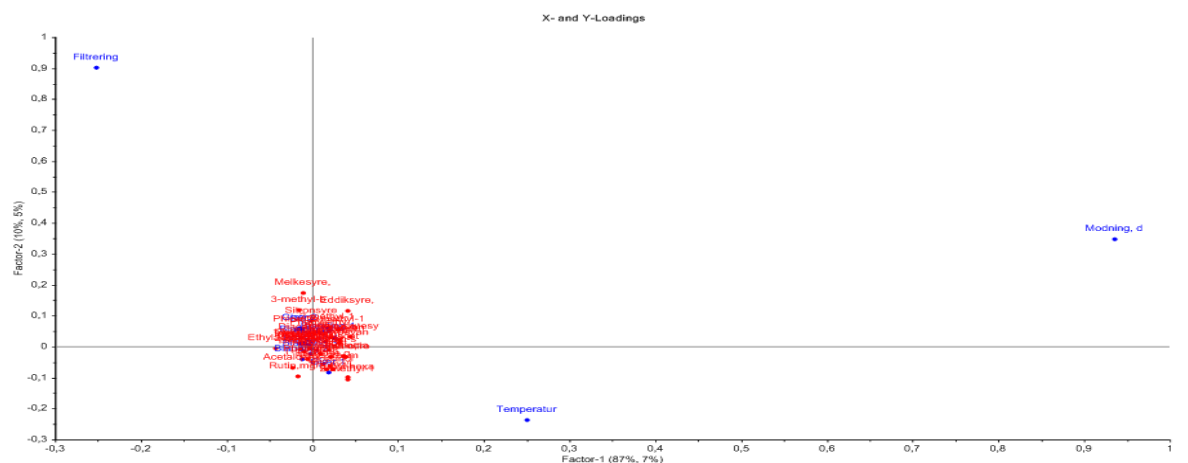
Verdiene er fra en parallell av epleblandingene og gjennomsnittet av tre paralleller fra sider (abc). Sytten flyktige komponenter ble identifisert og kvantifisert i epleblandingene og innholdet varierte mellom 10,8 til 15,1 mg/L. I løpet av fermenteringsprosessen ble det gjennomsnittlig produsert 243 mg/L flyktige komponenter, lavest i AAK-fatene 194,6 og høyest i BK-fatene 287,8 mg/L (vedlegg 6). Høyere alkoholer var representert med mellom 50,4- 55,6% av total innholdet. I sider hadde innholdet av flyktige komponenter økt til 312,61 mg/L i BK-fatene derav høyest andel høyere alkoholer 277,9 mg/L. Sider fra AA-fatene var redusert til 179,9 mg/L og sider fra DK-fatene hadde høyeste andel estere 33 mg/L. De fleste av flyktige komponentene var signifikante med hensyn til epleblandingene, gjæringsmetode, temperatur (10-15°C), filtrering og modning (P<0,05).

Tre ekstra fat er tatt med i resultatdelen fordi de ble sensorisk testet. BKd tilsatt humle (BKd), BKe tilsatt SO₂ og BSe ikke tilsatt sukker (tabell 3.6.). Sider fra BKd fatet har langt høyere produksjon av høyere flyktige komponenter (311 mg/L) derav høyere andel

høyere alkoholer med tilsvarende andel estere enn sider tilsatt humle fra DK-fatene (219 mg/L). BKd-fatet inneholdt 0,5 mg/L mer flyktige komponenter derav 1,86 mg/L høyere innhold av esterne phenylethyl alkohol og 1-propanol og 20,47 mg/L av karboksylsyrene: acetaldehyd, acetone og acetoine og 23,7 mg/L mindre høyere alkoholer enn sider fra BK-fatene. Det er verdt å merke seg BSe med lavest innhold av flyktige komponenter 171,5 mg/L, men derav ganske høy andel estere 26,62 mg/L.

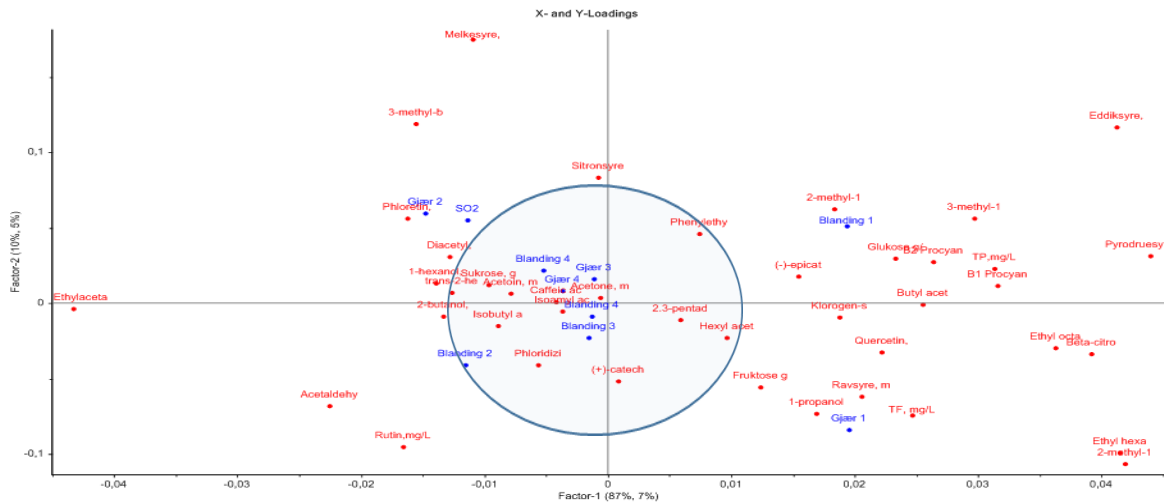
4.5 Overordnet oversikt av fermenteringsprosessen og sider

4.5.1 Sammenheng mellom epleblandingene og variablene.



Figur 4.8. PLS2 plott med oversikt over epleblandingene, betingelsene og komponentene i sider.

PLS2 plottet viser korrelasjoner mellom observasjonene, og måten de ulike variablene fordeler seg i forhold til hverandre viser egenskapene som beskriver prøvene. I faktor 1 er modning viktigste faktor som har sammenheng med temperatur og melkesyre. I faktor 2 er filtrering dominerende.



Figur 4.9. Zoomet PLS2 -plot med oversikt over epleblandingene, betingelsene og biokjemiske komponenter i sider.

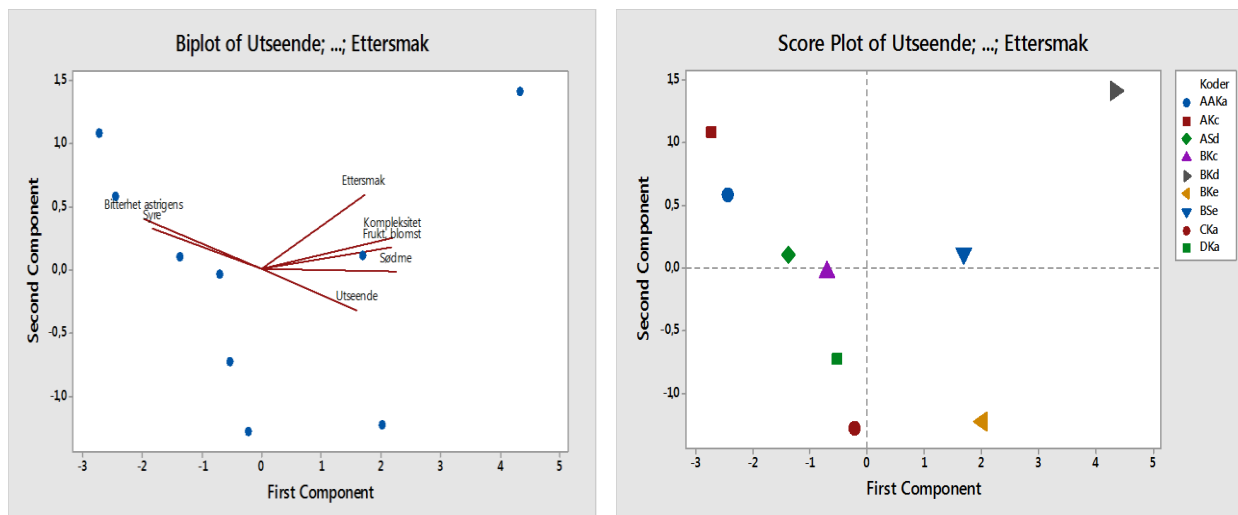
Første faktor er dominerende og forklarer 87% av variansen mens andre faktor forklarer 10% av variansen. Dermed er 97 % av variansen i det opprinnelige datasettet forklart. Komponentene rundt origo tas ikke med fordi de forklarer ikke variansen godt nok. I første faktor vises en sammenheng mellom blanding 1 (A0) eddiksyre, pyrodruesyre, og beta citronella. Andre faktor 10 % viser en negativ korrelasjon med gjær 2 (spontan gjær), SO₂ og phloretin. Gjær 1 (sidergjær) har sammenheng med produksjon av 1-propanol, ravsyre og TF. Ethylacetat er dominerende av estere. I blanding 2 (AA0) er det en sammenheng mellom stor produksjon av acetaldehyd og rutin og lite phloridizin.



Figur 4.10. Et utvalg av sider belyser forskjeller i farge og konsistens.

4.6 Sensorikk

4.6.1 Sensorisk test av sider

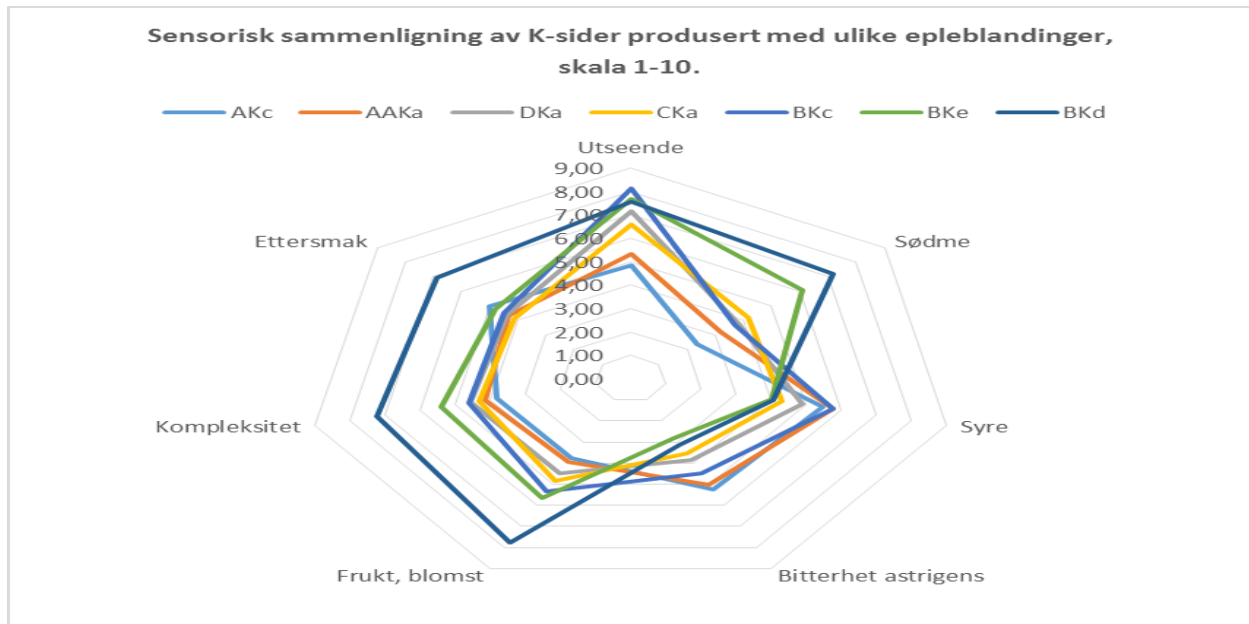


Figur 4.11. Bi-plottet viser egenskapene og siderprøvene. Figur 4.12. Score-plot skiller siderprøvene.

Første komponent (faktor 1.) er styrende og viser positive variasjoner mellom prøvene, mens andre komponent er sekundær og viser negative egenskaper. Figurene 4.11 og 4.12 viser hvordan de ni siderprøvene fordelte seg utefra de beskrivende egenskapene. Prøvene som ligger nærmere hverandre er mest like og motsatt og mest beskrivende for prøvene er egenskapene som ligger nærmest. Den vannrettaksen (first component) er styrende og forklarer mesteparten av variansen. Det er større forskjell mellom BKd og AKc enn AAKa og CKa. BKd og BSe beskrives med egenskapene ettersmak, kompleksitet, frukt, blomster og sødme, mens AKc og AAKa beskrives med bitterhet, astrigens og syre. Egenskapene i nærheten av origo (midt i prøven) forklarer ikke variasjonen mellom prøvene godt nok og tas ikke med.



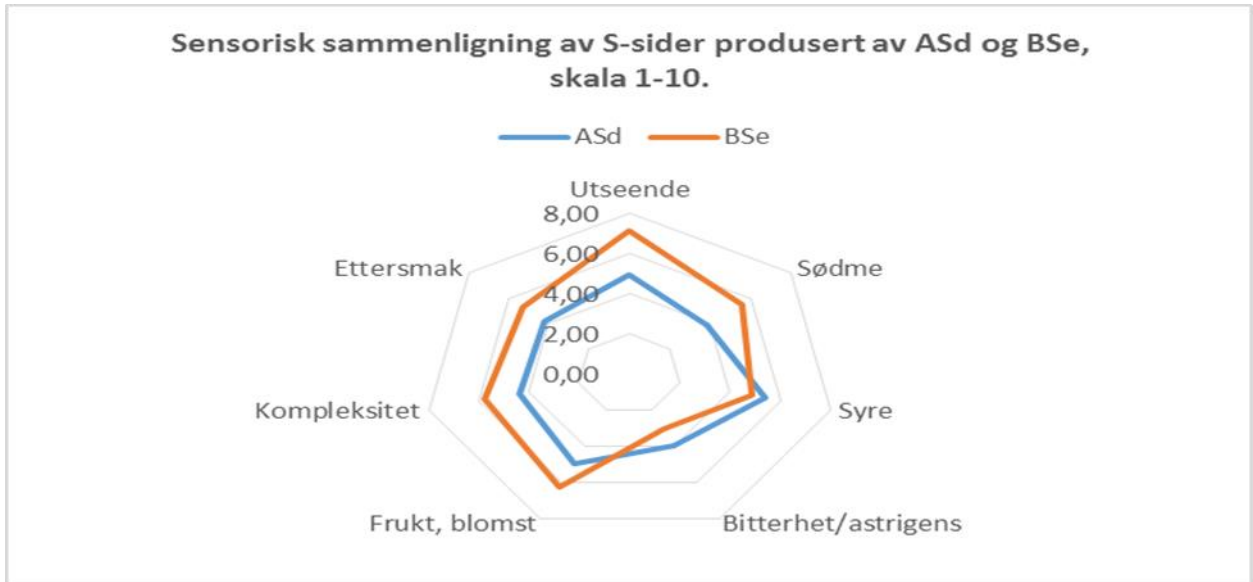
Figur 4.13. Gjennomføring av sensorisk analyse.



Figur 4.14. Spaidet diagram med oversikt over siderprøvene inokulert med sidergjær, skala 1-10.

Siderne produsert fra B0- blanding (BKc, BKd, BKe og CKa) ble oppfattet best og skåret høyere på frukt/blomst, kompleksitet og ettersmak, som er noen av kriteriene for sider kvalitet (vedlegg 9-10). Sider fra A0- og AA0- blandingene (AKc og AAKa) ble dårligst likt og ble oppfattet som lite søte, veldig syrlige og bitre med sterk ettersmak av syre.

BKd tilsatt Amarillo humle (blomst og sitrus) skilte seg vesentlig fra de andre og fikk 1,45 til 1,6 poeng høyere enn BKe nummer to i kriteriene blomst/frukt, kompleksitet og ettersmak. B0-blandingene ble oppfattet mer søte og visuelt med et mer tiltalende utseende enn de andre.



Figur 4.15. Spaiider diagram med oversikt av ASd og BSe med oversikt av betingelsene, skala fra 1 til 10.

Siderprøvene med spontangjær fra epleblandingene A0 og B0 viser at fruktighet, kompleksitet, ettersmak (ikke for mye syre eller bitterhet) og sødme ble oppfattet som positiv for smaken og vice a versa.

BSe ble sensorisk oppfattet mer fruktig, kompleks, søt og mindre syrlig og bitter med mer ettersmak og et mer tiltalende utseende. Det var ingen stor forskjell mellom syre, men sødmen og resten av smaksbetingelsene gjorde at ASd ble oppfattet mindre god enn BSe.

5 Diskusjon

Første del av vurderingen gir en oversikt over eplesortenes fysikalske oppbygging og en del av fermenterings betingelsene.

- Forklaring: For å forstå hvilke forsøk det dreier seg om vil bokstaven fra forsøket stå bak eplesortene, enten A, B, D eller AA. Torstein og Jonagold ble kun benyttet i forsøk D.

Andre og tredje del er relatert til hovedmålene og delmålene i oppgaven kapittel 1.3.

Siste del er en oppsummering av prosjektet og forslag til veien videre.

5.1 Fysikalske analyser

5.1.1 Vurdering av fysikalske analyser

For å opprettholde god fruktkvalitet under lagring er det av stor betydning at eplene høstes til riktig tid og modningsgrad, og lagres ved optimal temperatur og luftfuktighet (Stuestøl, 2013). Det ble funnet store endringer i eplesortene i løpet av lagringen både med hensyn til mengde og fordeling av de ulike komponentene (Cintia et al 2013). Det var sannsynligvis en kombinasjon av klimaet i fjor sommer og høst (kaldt og vått) som medførte at eplene ikke utviklet seg som de burde og ble innhøstet noe sent. Torstein og Jonagold var signifikant fastere enn de andre eplesortene og dermed enklere å presse enn Sunrise, (AA) og Summerred, (D). De to siste pakket seg i pressen i 3. og 4. forsøk, noe som medførte en del ekstra arbeid ved at pressen måtte rengjøres mellom hver pressing. I følge en av siderprodusentene i Ulvik (Lekve, 2015) er dette vanlig for Summerred, men den brukes allikevel på grunn av andre egenskaper som høyt nitrogeninnhold og god aroma. I utvelgelse av epler til siderproduksjon verdsettes presseegenskapene ofte på samme måte som epleblandingen fordi det gir mindre svinn og bedre avkastning (Lea, et al 2015).

pH i eplesortene var mellom 3,18 og 3,50 som var ganske ideell i epleblanding til siderproduksjon. Lea, (2015) anbefaler mellom 3,3-3,8. Ved for lav pH kan eplejuicen justeres med andre eplesorter med høyere pH for å forebygge et for surt sluttprodukt. pH

og syreprosent gir en god indikasjon for å forhindre sidersyke og mikrobiell infeksjon i sider (Lea, 2003). Syreprosenten brukes som parameter for oppfattet syresmak i eplejuice eller sider (Lea 2003). Dersom den er lavere enn 0,31 eller pH er over 3,8 bør de justeres (Lea, 2015). Syreprosenten i epleblandingene var mellom 0,57 - 0,84 som var noe i overkant av anbefalt syreprosent 0,3-0,5 prosent for siderproduksjon (Lea et al 2003), men ble ansett akseptabelt med hensyn til pH. Ofte benyttes pH målinger i fermenteringsprosessen for å forsikre at nivået ikke er for høyt til å danne flyktige komponenter (Charoenchai et al 1998).

Det ble observert en liten nedgang i oppløst tørrstoff og syreinnhold i de lagrede eplesortene fra september til november 2015, som er vanlig under lagring av epler hvor lager reservene har blitt utnyttet i respirasjonsprosessen (Stuestøl, 2013). Tørrstoff nivået har sammenheng med eplesort, lysforhold, modenhet og klima og har stor betydning for lagring og fermentering (Lea et al 2003). Laveste nivå av oppløst tørrstoff ble funnet i Summerred (D), 10,5 % og høyeste i Jonagold, 13,9 % som var signifikant forskjellige fra de andre eplesortene. Tørrstoffet gir en god indikasjon på sukkerinnholdet i eplene. Jonagold kunne ha vært benyttet til siderproduksjon uten å justere sukkernivået, men manglende tannininnhold ville sannsynligvis gitt sideren for lite kompleksitet.

5.1.2 Vurdering av fysikalske forhold under fermenteringsprosessen

Epleblandingene hadde et gjennomsnittlig tørrstoff på 11,79 som var noe lavere enn anbefalt nivå 13,5 for alkoholprosenten maks 4,7 % og alle epleblandingene unntatt ASe og BSe ble justert med sukker (tabell 3.6). Fermenteringsprosessen ble fulgt med jevnlig tørrstoffmålinger, som ble avsluttet mellom 3,6 -5,6 og tok mellom 10 til 66 dager avhengig av gjæringsprosess (tabell 3.6) som anses normalt. Det ble funnet signifikant forskjell mellom epleblandingene B0, D0 og A0/AA0 og gjæringsmetodene sidergjær og spontangjær og temperaturen 10°C og 15°C.

Fermenteringstemperaturen ble på forhånd bestemt til å være 10°C for S-fermentering og 20°C for K-fermentering, som var i samsvar med anbefalingene til gjærproduzentene og siderproduzentene (Lea, 2015).

I forsøk B ble temperaturen allikevel endret for at fermenteringsprosessen skulle gå langsommere, og for å undersøke hvilken betydning dette hadde for dannelse av ulike komponenter. Dette medførte at fermenteringsprosessen brukte fra 13 dager ved 15°C og 17-34 dager ved 10°C i stedet for 10 dager ved 20°C, og medførte en høyere produksjon av flyktige komponenter. Temperatur er essensielt for dannelse av flyktige komponenter og høyere temperatur medfører ofte høyere produksjon. Flere undersøkelser er utført med hensyn til temperatur. I dag utforskes det på blandinger av vill- og kulturgjær med lavere temperatur toleranse fordi det medfører dannelse av mer ønskede komponenter. Eksempelvis eddiksyre produseres i mindre grad mellom 22-27°C, men da produseres maksimalt melkesyre, som igjen kan medføre dannelse av andre uønskede fusel komponenter.

5.2 Vurdering av biokjemiske komponenter fra eplesortene til sider

5.2.1 Nitrogen

Et utvalg av eplesortene og epleblandingene ble analysert for totalnitrogen og aminosyrer som anses som en begrensende faktor for gjærcelle vekst (Bailey & Ollis 1986), og forhindre at eplejuicen inneholdt for lave mengder (Lea, 2003). Nitrogenkildene er viktig for metabolisering av fermenterbart sukker i den stasjonærfasen og har stor betydning i dannelse av flyktige komponenter med betydning for sluttproduktet (Ardö, 2006). Gjær er i stand til å assimilere nitrogenkildene ammonium og aminosyrer, men det er stor forskjell i utnyttelses evnen mellom ulike gjærstammer (Lea, 2003). Gjennomsnittlig verdi for TN i eplesortene var 153,8 mgN/L (tabell 4.2.) som samsvarte med forsøket til Jakobek, (2013) med dessertepler 154-178 mgN/L og var tilfredsstillende for gjærvekst. Det høyeste innholdet ble funnet i SU og laveste i DI som var signifikant forskjellig. Dersom DI (64 mgN/L) hadde vært benyttet alene burde blandingen blitt tilført nitrogen. Den relative store variasjonen i TNinnholdet hadde sannsynligvis sammenheng med terroir, jordsmonn, befruktning, gjødsling, klima eller epletrærnes alder (Kahle et al. 2005).

Nitrogeninnholdet i eplejuiceblandingene var gjennomsnittlig 153,8 mgN/L og varierte mellom 137,9– 166,3 mgN/L. TN analyse viste at innholdet i løpet av 2 måneder lagring

hadde økt fra 137,9 -149,4 mgN/L i henholdsvis A0 til AA0 (samme blanding). TN innholdet var i overenstemmelse med anbefalingene for siderproduksjon på minst 75 mgN/L (Alberti et al. 2011) og maksimum 574 mgN/L (Cruz et al 2002; Drielleau, 1999) for å forhindre at fermenteringen stopper eller at sider blir uklare. Lea, (2015) anbefaler 100 mgN/L, men hevder samtidig at noen av de beste siderne produseres uten tilføring av noe form for næring (side 34).

Forskjellige undersøkelser viser at både for lavt og for høyt nitrogeninnhold kan være ugunstig. For høyt nitrogeninnhold (Beltran et al. 2005; Goñi&Azpilicueta, 1999; Nogueira et al 2008) kan bidra til å eskalere fermenteringen slik at den går for raskt og ikke stopper når fermenterbart sukker er brukt opp. Det kan påvirke gjærveksten med en "høy produksjon av etylkarbamid som kan gi et overskudd av acetaldehyd og andre uønskede (>400mg/L) høyere alkoholer" (Alberti et al 2011; Beltran et al 2005; Goñi&Azpilicueta, 1999; Ough&Bell 1980; Williams, 1974) som er negativ for sider kvalitet. Dette kan kun fjernes ved bruk av filter som fjerner gjær, men ikke bakterier (Williams, 1974). Eplejuiceblandingen bør derfor kontrolleres i forkant av fermentering før eventuelt justering den ene eller andre veien.

5.2.2 Aminosyrer

Det ble identifisert 17 aminosyrer i eplesortene og epleblandingene. Totalinnholdet av aminosyrer (TA) i eplesortene var mellom 223,5 -1163,2 mg/L. Santos (2015) fant lignende resultater for dessertepler, men med et noe lavere nivå. Variasjonen var i overenstemmelse med at aminosyreinnhold varierer mye mellom eplesorter (Zhang, et al 2010), terroir, befruktning, klima, lysforhold, med mer (Lea &Drilleau, 2003). I epleblandingene representerte asparagin, asparaginsyre og glutamin mellom 361,3 - 681,4 mg/L som var 89%-93% av TA (Le Quéré &Drilleau, 1998). Funn gjort av Ough (1991), oppdaget at noe av nitrogeninnholdet utnyttes for å forsterke membran gjennomtrengingen og samtidig senke farten på dannelse av alkohol. I løpet av fermenteringsprosessen ble aminosyrene utnyttet av gjæren til proteinsyntese og andre metabolske prosesser til dannelse av fuselalkoholer og estere (Sanos, et al. 2015).

Aminosyresammensetningen har stor betydning både for kinetikk i alkohol fermenteringsprosessen og for dannelse av de aromatiske komponentene, glyserol og etanol (figur 2.1) (Bartowsky&Henschel, 2004; Hernandez- Orte, et al. 2005). De metaboliseres til høyere alkoholer i Ehrlich pathway (reaksjon) sammen med andre flyktige komponenter som syntetiseres direkte eller indirekte (Vilanova et al 2007) som er i samsvar med dannelsen av komponenter i forsøket.

I reaksjoner med kofaktorer og overgangsmetabolitter har ulike aminosyrer ansvaret for dannelsen av forskjellige flyktige komponentene (figur 2.2.) (Lilly et al 2006). Det finnes flere veier for aminosyrene å metabolisere flyktige komponenter. Asparaginsyre kan gjennomgå en deaminering (avspalting) for å danne oksalsyre acetat og prosessen kan fortsette videre ved at andre bakterier kan metabolisere oksalsyre acetat videre til aceton, diacetyl og 2.3 butandiol (Ardö 2006). Flere komponenter kan også dannes med cystein i en Maillard reaksjon under modningsprosessen som medfører at aminosyrene metaboliseres (Lea 2003). 2.3 butandiol ble ikke identifisert i sider fra BK- og BS-fatene og diacetyl ble kun funnet i sider fra BK-fatet tilsatt humle (0,08 mg/L).

Analyseringen av sider viste at nitrogeninnholdet ikke hadde vært begrensende for gjæren og mer enn 90 % av aminosyrene ble metabolisert (Le Quéré &Drilleau 1998; Santos et al. 2015). Det ble kun funnet små mengder av aminosyrene glutamin, threonin og alanin i noen av siderne fra DK- og BS- fatene (tabell 4.8.). Sider fra DK –fatet tilsatt humle skilte seg ut med høyest nivå TA, 3,59 mg/L og med innhold av flest aminosyrer. Det skyldes sannsynligvis at humle inneholder aminosyrer og tilførsel etter endt fermentering reduserte metabolisering.

5.2.3 Karbohydrater

Saccharomyces spp og andre gjærstammer er i stand til å ta opp og metabolisere karbohydratene glukose, fruktose, mannose og galaktose i små mengder (Berry& Slaughter 2003). Sukrose og melibiose kan utnyttes ved hjelp av enzymene invertase og α - galaktosidase som hydrolyseres eksternt til bestanddelene hexoser som assimileres (Berry& Slaughter 2003). Glukose induserer syntesen av noen enzymer som medfører både positive og negative kovalente modifikasjoner av eksisterende enzymer (Berry&

Slaughter 2003). Blant annet enzymet plasma membranen ATPase som lager en kryss membran proton konsentrasjon gradient er ansvarlig for opptak av aminosyrer (Berry& Slaughter 2003).

Det ble identifisert fruktose, glukose og sukrose ved hjelp av to metoder, men ingen av metodene egnet seg til å identifisere andre sukker som for eksempel sorbitol eller xylose.

Madrera et al (2003), undersøkte hvilken metode som egnet seg best til identifisering av sukker og alkohol i eplejuice og sider, og fant ut at aminosyrebundet silica-kolonner ikke egnet seg til å separere glukose og sorbitol. Det gjorde derimot kation (harpiks) utvekslings kolonne i kalsium, som både skilte glukose, sorbitol, sukrose, glyserol og etanol fra hverandre og var samtidig lettvin og rask i bruk med gode gjentak (repetierbar). For å få full forståelse og kontroll over fermenteringsprosessen er det viktig å vite hvilke karbohydrater som er tilstede og forbrukes. Grunnet klimatiske endringer er innholdet av karbohydrater og sammensetningen i ferd med å endre seg noe som kan medføre store innvirkninger både på vin- og siderproduksjon (Charonchai et al 1998). Det var stor variasjon i fordeling og nivået av karbohydrater i eplesortene som er ganske vanlig i forhold til sort, klima, lysforhold og terroir med mer (Madrera et al 2003).

Undersøkelsen til Suni (2000), hvor karbohydratinnholdet ble undersøkt i ulike eplejuice samsvarer med at fordelingen av fritt sukker varierte mye mellom eplesorter og spesielt med hensyn til fruktose og sukrose. Dette samsvarer med at B0-blandingen hadde et betydelig lavere innhold av karbohydrater enn AA0 -blandingen som igjen var 128,7 % søtere enn A0-blandingen som var signifikant forskjellig. Allikevel dannet blandingen betydelig høyere mengde flyktige komponenter som kan antyde at det ikke er nivået av karbohydrater som er essensielt, men andre faktorer som temperatur, eplekvalitet og modenhet. I følge Gomis et al (1988) er det av stor interesse å benytte karbohydrat analyser både i forkant for å ha holde kontroll med modenheten til eplene og for å få kontroll over karbohydrat innholdet og fordelingen i fermenteringsprosessen (Gomis et al 1988). I nedbrytningen av pektin og andre celluloseholdig material fra eplejuice dannes varierende mengder av løselige og uløselige sukker (Lea&Drilleau 2003). Mengden som dannes er avhengig av mengde pektin tilstede i råstoffet og fermenteringsmetoden. Siderne fra A0 -blandingen hadde mest sannsynlig en del pektin igjen noe som medførte

at de ble meget klar. Karbohydratinnholdet i sider ble redusert mellom 77 til 87% til 7,7 og 22,4 g/L i alle blandingene som er normalt. Sider fra BK-fatene hadde laveste innholdet av fruktose 1,8 g/L og sider fra AAK-fatene høyest 9,13 g/L.

På slutten av modningen kan fruktose syntetiseres av sorbitol ved hjelp av sorbitol dehydrogenase og glukose blir akkumulert av stivelse hydrolyse (Gomis et al 1988).

5.2.4 Organiske syrer

Organiske syrer er helt essensielle for å fremheve "alle" komponentene i alkoholholdige drikkevarer som sider for å danne kompleksitet. Uten syre ville disse fremstått for søte og kjedelig smaksmessig, samt lysere i farge og mer utsatt for mikrobiell ødeleggelse. Alle de organiske syrene er like viktige og bidrar med hver sin karakteristiske syresmak og fordelingen og nivået av hver komponent påvirker sluttsmaken og kvaliteten i sluttsmaken til sider (Herrero et al 1999).

Hovedsyrene i eplejuice og sider er D- og L-eplesyre som er nært knyttet sammen (Zuriarrain et al 2014). De bidrar med syre og friskhet i sider, men for høyt innhold kan gi for syrlige sider eller harsk smak (Lea et al 2003). L-eplesyre er forbundet med ønskelige effekter, mens D-eplesyre er knyttet til motsatt (Lea & Drilleau 2003). Eplesyrenivået diskuteres ikke i denne oppgaven på grunn av problemer med identifisering og standard for areal beregning under analysering.

Det kan allikevel påpekes at det ble dannet melkesyre i sider fra alle AS-, et av BS -, 2 av DK- (hvitvins- og champagnegjær) og 1 av AA-fatene. Dette betyr at noe av eplesyren ble syntetiseres til melkesyre ved hjelp av *S. cerevisiae* som nedbryter eplesyre til etanol, amylalkohol, ravsyre, melkesyre og isobutanol med hjelp av CO₂. (Ye et al. 2015). Melkesyre er endeproduktet i glykolysen og dannes enten i synteseringen av pyrodruesyre under anaerobe forhold eller i transformeringen av eplesyre til melkesyre. Det er ofte ønskelig med en melkesyrefermentering ved bruk av dessertepler fordi de inneholder mye syre (Lea, 2015), og melkesyre er "bløtere" og ikke så skarp som eplesyre. Valles et al (2007) fant en sammenheng mellom innhøstning av eplene (modenhet) og produksjon av melkesyre, ravsyre og metanol. Andre undersøkelser har funnet en sammenheng mellom konsentrasjonen av melkesyre med eplesorten og

modenheten (Blanco et al 2002; Valles et al 2007). Det kan stemme overens med sider fra AA0- og D0- blandingene som hadde vært lagret i ca. to måneder, men ikke for A0-blandingene som inneholdt en del stivelse og pektin.

Det hadde sannsynligvis sammenheng mellom 34 dager modningen på fat med gjenværende næring og noe gjærrester (autolyse) og manglende tilførsel av SO₂ som resulterte i en reduksjon i syre prosent og økning i pH (Berry & Slaughter 2003).

Det høyeste nivået av melkesyre ble funnet i AS-fatene etter fermentering som ble redusert fra 60,2 til 55,1 mg/L etter omstikking. Det ble funnet en positiv korrelasjon mellom epleblanding A0 med gjæringsmetoden spontangjær i dannelsen av melkesyre, pyrodruesyre og eddiksyre ved 10°C.

Eddiksyre regnes som en av de viktigste syrene i alkoholholdige drikkevarer og tilfører sider smaken av harpikssmaken som er en viktig del av sider kvaliteten (Zhang et al 2008). Eddiksyre i store mengder kan forårsake for syrlige sider eller i verste tilfelle omdanne dem til epleblanding. Dersom melkesyrebakteriene ikke er under kontroll etter melkesyrefermenteringen kan det dannes store mengder eddiksyre (Duenås et al 1994; Zuriarrain et al 2014). For å redusere dannelsen av eddiksyre anbefales temperaturene mellom 22-27°C (Lea & Drilleau 2003).

Sider fra AS-fatene dannet høyest nivå eddiksyre 181,7 mg/L og sider fra DK-fatene tilsatt humle lavest 85,4 mg/L. Det var under lovbestemt innhold på 1,5 g av reststoffer i Norge (Forskrift om alkoholsterke og aromatiske drikke mv.). Etter melkesyrefermentering endres ofte smaksbilde avhengig av hvilken bakteriekultur og kan gi innslag av frukt, nøtter eller blomster (Lea & Drilleau, 2003). I denne undersøkelsen ble det ikke identifisert tydelig smaksforskjell mellom sider fra AS- og AAK-fatene begge var dominert av høye syre nivåer, som mest sannsynlig hadde sammenheng med innholdet av klorogensyre, procyanidin B2 og B1, koffeinsyre, eddiksyre og pyrodruesyre. Melkesyrefermentering skjer ikke dersom pH er lavere enn 3,1 selv om det ofte kan være ønskelig for å få mildere smak. Det kan være medvirkende årsak til at AK-fatene ikke dannet melkesyre, men både A0 og 2 av fatene til AA0-blandingene burde ha gjennomgått en melkesyrefermentering for å dempe syre og bitterhet og forsøke å få frem fruktigheten. Dersom syreprosenten er

for lav er det ikke ønskelig med melkesyrefermentering fordi det medfører for lite syrlighet og for høy pH som medfører at det blir mer utsatt for kontaminasjon (Lea 2015).

Melkesyrefermentering i bittersøte sider kan ved visse bakterie sammensetninger gi aromatiske forbindelser fra krydder eller lær som kan minne om gamle hester (hestesvette) (Lea, 2015).

Pyrodruesyre er mellomprodukt i glykolyzen, som metaboliseres gjennom nedbrytning av glukose i løpet av fermenteringsprosessen. Det er en av de mest sentrale organiske syrene som er ansvarlig for mange metabolske prosesser (Zhang et al 2008) og komplementere sider med en viss sur smak. Produksjon av pyrodruesyre påvirkes av gjærstamme og sammensetning av mikroflora. I løpet av fermenteringen ble pyrodruesyre metabolisert i alle blandingene mellom 30-93 mg/L og i sider hadde innholdet økt i noen av blandingene og blitt redusert i andre. Sider fra BS-fatene hadde lavest innhold 26 mg/L og sider fra AK-fatene med lavest innhold av aminosyrer hadde høyest 74,7 mg/L. Det burde være tilstrekkelig for gjæren, men det har vist seg at det er sammenheng mellom nitrogeninnhold og for liten mengde av enkelte aminosyrer som kan settes i forbindelse med økt produksjon av pyrodruesyre (Zhang et al 2008).

I undersøkelsen til Whiting (1976), av organiske syrer ble det oppdaget at det dannes mer pyrodruesyre ved høyere temperatur og ved høy pH enn lav som samsvarte med sider fra AK-fatene pH 3,7 fermentert ved 20°C. Det er vanlig at pyrodruesyre innholdet på slutten av prosessen varierer mye og påvirkes av flere faktorer. Tilsetning av svoveldioksid for å forhindre oksidering og mikrobiell aktivitet kan medføre mangel på tiamin som øker produksjonen (Zhang et al 2008). Det var ingen tydelig sammenheng mellom forskjell i produksjon mellom gjæringsmetodene eller ved tilførsel av humle.

I sitronsyresyklusen også kalt Krebs syklusen skjer en rekke kjemiske reaksjoner der sitronsyre er et viktig mellomprodukt. I en av de tre metabolske prosessene involveres katabolismen (omsetning) av næringsstoffer og produksjon av ATP (Valle et al 2007). Det høyeste innholdet av sitronsyre i epleblandingene ble funnet i D0, 70,8 mg/L, og det laveste i A0 27,8 mg/L. I løpet av fermenteringsprosessen ble sitronsyre redusert i sider fra AA- og D-fatene og økte i de andre blandingene.

Sitronsyre utvikles ofte sent i anaerob fermentering av ulike gjærstammer (*S. spp*) (Whiting, 1975), og kan syntetiseres av gjæren og kataboliseres (nedbrytes) i cellene i løpet av fermenteringsprosessen eller metaboliseres til eddiksyre.

De fleste sider dannet mer sitronsyre etter modning unntatt sider fra AK-fatene som ble redusert fra 49,7 til 37,4 mg/L. Sitronsyre brukes ofte til å justere syrligheten og forbedre stabiliteten i eplejuice og eller sider før eller etter fermentering.

Det er ikke å anbefale fordi det endrer smaksbilde jfr. Lea (2015), epletsyre egner seg bedre fordi det er en del av smaksbilde i sider.

Ravsyre bidrar med en "uvanlig salt bitter smak" (natrium klorid) som komplimenterer sidersmaken (Whitning, 1975). Ravsyre metaboliseres i store mengder av gjæren gjennom alkohol - og glyserol-pyrodruesyre fermenteringen (Valles et al 2007). Ravsyre varierte i epleblandingene fra 1004,7 mg/L (A0) til 1636 mg/L (B0). I løpet av fermenteringsprosessen gikk ravsyre opp og ned i de ulike fatene og i sider varierte nivået mellom 1233 mg/L (BS) og 2112,4 mg/L (DK). Sider inokulert med kulturgjær var positivt korrelert til ravsyre og hadde høyest mengde og motsatt. Dette var i overenstemmelse med Giudici et al (1995) som fant ut at produksjon av ravsyre var arvelig forbundet til arten *Saccharomyces*. I følge funn gjort av San et al (2009), ble det funnet en sammenheng mellom redusert isoamyl acetat produksjon og økt ravsyre som samsvarer med dette forsøket.

5.2.5 Totale fenoler (TF)

Fenoler er en gruppe av sekundære plantemetabolitter som utgjør en stor del av antioksidanter i epler. De kan inndeles i fenolske syrer og flavonoider (Robards et al 1999). De er viktig bidragsgivere for smaken av sider (Lea, 1990). Det var stor variasjon og signifikante forskjeller mellom innholdet av TF i eplesortene som varierte mellom 11,2 til 113,3 mgGAE/100 ml. Den relativ store forskjellen var påvirket av sort, modenhet, sesong, lysforhold, alder på trær og klima (Lea, 2003). I løpet av lagringen ble TF innholdet redusert i nesten alle eplesortene unntatt DI som økte fra 81,5 til 101,7 mgGAE/100 ml. Funn gjort av Stuestøl (2013), hvor lagringen av DI ble undersøkt viste at DI egner seg ganske godt for lagring.

TF nivået har omvendt sammenheng med epletrærnes næringsinnhold (Lea & Beech 1978). B0-blandingen hadde det nest laveste nivået som var mer enn 50 % lavere enn A0 og AA0. I løpet av fermenteringsprosessen ble TF innholdet redusert mellom 7- 38% unntatt for DK-fatene som økte med 7,6%.

Dette skyldes mest sannsynlig adsorpsjonen (overflaten) og absorpsjonen (innvendig) evnene til gjæren (Morata et al 2003). I sider ble innholdet redusert mellom 9,4 til 41,1 mgGAE/100 ml, se tabell 4.7. Den relativ store variasjonen mellom siderne var sannsynligvis en konsekvens av opprinnelses innholdet i eplesortene, lagring, prosessering og videre behandling (Lata, 2007).

5.2.6 Polyfenoler (TP)

Polyfenoler er viktige bidragsgiver i smaksutviklingen og den organoleptiske (munnfølelsen) kvaliteten for sider, og bidrar samtidig med å hemme at eplene blir slimete under modning (Lea & Drielleau 2003; Lea 1990). Innholdet i eplesortene varierte mellom 12,4 til 370,1 mg/L, og innholdet og fordelingen endret seg en del i eplesortene under lagring (tabell 4.5). Det stemmer omtrent med funn gjort av Sanoner (1999), hvor ulike eplesorter ble undersøkt for innholdet av polyfenoler og det ble funnet signifikante forskjeller mellom eplesortene og små endringer under modning. Flere undersøkelser har funnet forskjeller mellom ulike eplesorter, epletrær, terroir og fysiske tilstander (Dolge et al. 2014; Alonso et al 2015). Det stemmer derimot ikke med undersøkelsen til Oszimaski (2008), som fant ut at modning og lagring hadde ingen eller liten effekt på polyfenol innholdet. Undersøkelsen fant ut at den største reduksjonen av polyfenoler skjer under prosessering og derav pressing, som forårsakes av at polyfenolene binder seg til celluloseinnholdet og blir silt vekk (Sanoner et al 1999). Det stemmer overens med denne undersøkelsen og med undersøkelsen til Lata (2007), som fant ut at innholdet og profilen av polyfenoler påvirkes av eplesort, lysforhold, klima, modenhet, lagring og prosessering.

I epleblandingene ble det funnet 4 flavan -3-ols (catechin, epicatechin og procyanidin B1 og B2), 2 hydroksykanelysyrer (klorogensyre og koffeinsyre), 1 dihydrocalcones (phloridizin) og 2 flavanols (quercetin og rutin). Innholdet av TP varierte fra lavest i D0 28,66 mg/L til høyest i A0 142,92 mg/L.

Funn gjort av Lata (2009), som undersøkte variasjonen mellom polyfenol innholdet i epleskallet og hele frukten fant signifikant forskjeller mellom ulike eple sorter og fordeling av polyfenoler. Undersøkelsen fant også ut at fruktskallet har et langt høyere innhold av polyfenoler enn fruktkjøttet med unntak av polyfenolen klorogensyre.

Denne undersøkelsen samsvarte med funnet av klorogensyre og samtlige epleblandinger hadde høyest innhold av klorogensyre som var representert fra 46 til 76 % av TP innholdet. Klorogensyre regnes som den viktigste hydroksylkanelnsyren både for dessert- og siderepler, sammen med epicatechin og procyanidin B2 (Alonso-Salces et al 2001; Alonso –Salces et al 2001 b). Det ble funnet positivt korrelasjon mellom epleblanding A0 og spontangjæring i metabolisering av polyfenoler og signifikant forskjeller mellom A0 og B0 og gjæringsmetodene. I løpet av fermenteringsprosessen økte innholdet av TP og fordelingen endret seg og phloretin og rutin ble identifisert. AS-blandingen dannet mest av alle polyfenolene med unntak av klorogensyre og koffeinsyre som AAK- blandingen stod for. A0- og AA0-blandingene var signifikant forskjellig med hensyn til TF og procyanidin B2. Polyfenol komponentene og kanskje spesielt procyanidin B1 og B2 er meget viktige for munnfølelse og påvirker sødme, surhet, syre og bitterhet (Symoneaux et al 2014).

I sider hadde TP innholdet økt i alle siderne unntatt DK- og AS-fatene, som henholdsvis var blitt redusert med 12,33 og 51,21 %. Klorogensyre var fremdeles dominerende (Kahle et al 2005). Laveste innhold ble funnet i sider fra DK-fatene 19,19 mg/L og høyeste i AAK-fatene 199,8 mg/L som var noe høyere enn Kahle (2005), fant i sin undersøkelse av dessertepler 57-68 mg/L. Ved sammenligning med undersøkelsen til Wojdylo (2008), var alle polyfenolene i nederste grense med unntak av rutin. Innholdet og fordelingen av polyfenoler varierte mye mellom de ulike siderne. Det ble funnet negativ korrelasjon mellom BK- fatene i dannelsen av procyanidin B1, catechin, phloridizin og quercetin.

I sider fra AS-fatene ble TP mer enn 50 % redusert etter modning og filtrering og nesten alle polyfenolene ble redusert unntatt koffeinsyre. Sider fra BS-fatene hadde omtrent samme TP, men fordelingen var endret under modning, polyfenolene klorogensyre og procyanidin B1 og B2 hadde blitt redusert mens de andre hadde økt.

Sider fra BK-fatene økte etter fermentering fra 47,1 mg/L til 63,2 mg/L og sider (BKd) med tilsatt humle økte noe mer til 71,2 mg/L. Dette medførte at sider med humle fikk et noe høyere tannininnhold som medførte astrigens og bitterhet som ga mer kompleksitet, munnfølelse og ettersmak.

Forskjellen var sannsynligvis at humle inneholder fenoliske forbindelser som medførte økning i catechin, epicatechin og phloridizin og reduksjon i procyanidin B1, B2 og quercetin ble metabolisert. Sider fra DK-fatene tilsatt humle viste ikke samme tendens, med 19,3 mg/L lavere TP og noe høyere innhold av procyanidin B1 og B2 og klorogensyre.

5.2.7 Flyktige komponenter

Flyktige komponenter anses selv i meget små mengder for å være noe av de viktigste bidragsgiverne i alkoholholdig drikke som sider for fruktighet og sluttkvalitet (Styger et al 2011; Plutowaska&Wardencki 2008). GC avdekket noen ukjente komponenter med relativ høye topper og det ble derfor valgt ut noen prøver av eplesortene til identifisering med TDMGC. Det resulterte i identifisering av 12 flyktige komponenter med en sikkerhetsmargin mellom 85,7-97,2 %, og det ble funnet mellom 7-9 komponenter i eplesortene og fordelingen av disse endret seg under lagring og modning. De fleste av disse er helt vanlige i sider og har ganske lave terskelverdier ofte fra 0,01 til 10 mg/L. N-propyl acetat 2-hexanal og hexanal forbindes med fruktighet og decanoic acid forbindes med munnfylde (konsistens) i små mengder. I store mengder gir de en sterk smak av syre som kan kjennes ubehagelig og noen har høy intensitet og andre har lav som betyr at det skal lite eller litt mere til før de kan smakes (William et al 1974). For å finne ut hva om skjer under fermentering og modning vil det være interessant å følge opp med flere analyser av sider, men det ble ikke prioritert i dette forsøket.

Det ble identifisert totalt 35 flyktige komponenter med GC, men de som hadde lavere konsentrasjoner enn 0,01 mg/L tas ikke med. I eplesortene ble det identifisert 26 flyktige komponenter og det høyeste innholdet ble funnet i TO, D 20,66 mg/L og det laveste i SU, A 6,78 mg/L. I løpet av lagringen ble det dannet 2-butanol, butyl butyrate i alle eplesortene og 1-propanol og 2-metyl-1-propanol i nesten alle unntatt AR, D.

Det ble benyttet PCA for å en bedre oversikt over fordelingen av de ulike komponentene i forhold til eplesortene og for å få en bedre oversikt over hva som skjedde i løpet av lagring. Ladningsplottet viser hvilke prøver som ligner hverandre og hvilke som er mest ulike. De som ligger lengst fra hverandre er mest ulike.

Faktor en er styrende. TO skiller seg fra de andre eplesortene ved å ha et mye høyere innhold av acetaldehyd 8,46 mg/L, 2-butanol 1,59 mg/L og butyl acetat 3,2 mg/L som gir mye fruktighet og eple smak i små mengder. Eplesort analyser av flyktige komponenter bidrar til å gi en god oversikt over hvilke som egner seg både for lagring og i epleblanding, men det vil ikke diskuteres i denne oppgaven.

Høyere alkoholer

Den største gruppen av flyktige komponenter i alkoholholdig drikke er høyere alkoholer. 3-methyl-1-butanol ble ikke identifisert i epleblandingene og phenethyl alkohol ble ikke funnet i AA0- og B0-blandingen. De fleste høyere alkoholer som ethylacetat og 1-propanol stammer opprinnelig fra eplene og metaboliseres ofte i løpet av fermenteringsprosessen som et resultat av gjærens aktiviteter (Verdu et al 2013). Det kan skje ved hjelp av dannede ketoner som involveres i metabolismen av aminosyrer (valine, threonine, isoleucine etc.) via Erlich pathway eller via biosyntetisk vei fra karbonkilden (figur 2.2) (Ye et al 2013).

I løpet av fermenteringsprosessen økte innholdet av høyere alkoholer til mellom 76,4 til 88,1 % av totale flyktige komponenter og i sider ble innholdet mellom 77,7 til 88,9 %. Etter fermenteringsprosessen ble butyl butyrate syntetisert av gjæren og 2-butanol ble kun funnet i meget små mengder. Reduksjon kan skyldes en kjemisk reaksjon mellom acetyl-Coa i forbindelse med syntetisering av estere ved hjelp av alkohol acetyltransferase (Mauricio et al. 1993). Sider fra BK-fatene produserte høyest nivå av høyere alkoholer 277,89 mg/l og sider fra AA-fatene lavest 129,11 mg/L. Amyl alkoholene, 3-methyl-1-butanol og 2-methyl-1-butanol dannes ofte gjennom deaminering- og dekarboriseringsreaksjoner mellom leucin og isoleucin (Boulton et al 2013). Sider fra BK-fatene produserte høyeste mengde av de flyktige komponentene: 3 methyl- 1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 1-hexanol, 1-butanol og 1-propanol, som alle har stor betydning for fruktighet og sidersmaken (Boulton et al 2013).

De har ofte ulik aroma intensitet som for eksempel 2 phenethyl alkohol har høy aromaintensitet >5, men lav smaksterskel 0,25 mg/L med fruktig smak og er derfor en ønsket komponent (Xu et al 2007).

Det ble funnet korrelasjon mellom epleblandingene, temperatur og gjæringsmetodene sidergjær og spontangjær som var signifikant forskjellig (P, <0,05). Produksjonen av høyere alkoholer er ofte høyere hos *Saccharomyces cerevisiae* enn av ikke *Saccharomyces* stammer eller i blandede kulturer (Ciani, 1997), som stemmer med dette forsøket bortsett fra sider fra DK-fatene med tilsatt humle som hadde en meget lav produksjon. Det kan kanskje relateres til den kraftige fermenteringen i starten av prosessen som kanskje medføre en svekket produksjon av flyktige komponenter. Sider fra DK-fatene med og uten tilsatt humle produserte henholdsvis 233,8 og 166,7 mg/L som hovedsakelig var forårsaket av reduksjon i nivået av phenylethyl alkohol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol.

Ved å se på ulikhetene mellom sider fra D0-fatene med bruk av ulik gjærtyper er det en markant forskjell på produksjon av flyktige komponenter med bruk av HV- gjær Etter omstikking var produksjonen 435 mg/L som var ca. 50% ± mer enn de andre fatene. I sider ble innholdet redusert til 406,9 mg/L, mens og SI -gjær var 208,6 mg/L og CH -gjær 230,2 mg/L (vedlegg 11.). Den store forskjellen var hovedsakelig relatert til en mye høyere produksjon av: isoamyl acetat (6,66 mg/L), isobutyl acetat (0,13 mg/L), phenethyl alkohol (85 mg/L), 3 -methyl-1-butanol (224 mg/L) og 2-methyl-1-propanol (40,1 mg/L), som også var betydelig høyere enn B0-blandingen. Sider tilsatt HV- gjær burde vært testet sensorisk, men det ble den ikke kanskje på grunn av det forholdsvis høye innholdet av høyere alkoholer.

Sider fra BS-fatene hadde en noe høyere produksjon av høyere alkoholer i løpet av fermenteringsprosessen enn sider fra AS-fatene som sannsynligvis kan relateres til epleblandingen. I sider endret dette seg på grunn av ulik modnings tid (10 og 34 dager) som ble funnet essensiell og var signifikant forskjellig. Sider fra AK og -AAK-fatene produserte henholdsvis 192,1 og 129,1 mg/L og AAK hadde en noe lavere produksjon av 2-methyl-1-butanol.

Estere

Estere finnes ofte i små mengder allerede i eple og eplejuice (Rikestina-Dolge et al. 2011). Lang kjedede fettsyrene ethyl hexanoate og ethyl octanoate forbindes med fruktighet og dannes gjennom esterifisering (alkohol og syre) i fermenteringsprosessen (Ye et al. 2013) eller via acetyl -Coa gjennom fettsyre syntetisering (Nykanin, 1986). De har meget lave terskelverdi og bidrar selv i meget små mengder med å komplementere smaksbilde. Det har blitt utført undersøkelser for å finne ut om stor produksjon av disse kan være giftig for gjæren og medføre at fermenteringen stopper opp eller blir uklar, men det viste seg å ha motsatt effekt (Bardi et al 1999; Styger et al 2011).

Butyl butyrate ble kun funnet i epleblandingene og ble syntetisert av gjæren og ble borte i fermenteringsprosessen. Estere representerte mellom 15,3 til 39,4% i epleblandingene, etter fermentering fra 7,13 til 12,8% og i sider fra 7,3 til 17,9 % av flyktige komponenter. I alle blandingene ble det dannet høyest nivå av ethylacetat og isoamyl acetat, som sammen med phenylethyl acetat, isobutyl acetat, ethyl hexanoate og hexyl octanoate regnes som noen av de viktigste esterene for fruktighet og sider kvalitet (XU et al 2007) Ethylacetat har en viktig effekt på den organoleptisk karakteristikk av både vin og sider og bidrar med fruktigsmak (pære) ved terskelverdi lavere enn 150 mg/L (Apostolopoulou et al. 2005). Estere bidrar synergisk med andre komponenter både med å fremheve og dempe hverandre selv under terskelverdien (Styger et al 2011).

Produksjon av estere påvirkes av blant annet av temperatur, pH, oksygen tilgang, gjærmengde, gjærtype, alkoholprosent, tilgang på næring og flerumettede fettsyrer (Styger et al 2008; Verstrepen et al. 2003). Økt temperatur medfører vanligvis høyere produksjon av flyktige komponenter (Peddi, 1990; Anderson&Kirsop, 1974), men er disse ønskelig i siderproduksjon? Undersøkelser har vist at ved 20°C produseres det maksimalt ethylacetat (fruktig) og phenylethyl acetat og ved 15°C produseres isoamyl acetat og ethyl octanoate (ethyl caprylate) (Hammond, 1993; Norstedt, 1975). Det stemte ikke med denne undersøkelsen som produserte mest butylacetat og acetaldehyd ved 20°C, mest ethylacetat og isoamyl acetat ved 10°C og mest ethyl octanoate og ethyl hexanoate ved 15°C. Det tyder på at produksjonen påvirkes av faktorene epleblanding (modning), gjæringsmetode og modning som ble funnet signifikant forskjellig. Underveis i

fermenteringsprosessen og spesielt på slutten vil en del estere (flyktige komponenter) fordampe og høy temperatur vil mest sannsynlig eskalere denne prosessen (Verstrepen et al. 2003). Nedsettelse av temperatur sammen med epleblandingen var sannsynlig årsaken til at sider fra BK-fatene hadde høyere produksjon av flyktige komponenter derav mest høyere alkoholer som gir fruktig smak med terskelverdier under 400 mg/L (Verstrepen et al 2003). Med høyere nivå av etylacetat, etyl hexanoate og ethyl octanoate som gir fruktig sidersmak. Humle i BK-fatet tilførte høyere nivå av acetaldehyd, aceton, diacetyl, ethylacetat og aceton. BS-fatene hadde et høyere innhold av ethylacetat, isoamyl acetat, hexyl acetat (søttsmak og pære -og eplearoma) og aceton enn AS-fatene etter fermentering. Dette endret seg i sider sannsynligvis fordi mye skjer under modning og sider fra BS- fatene ikke var blitt modnet, men lagret kun i 10 dager før tapping (modning 5.3.).

Produksjon av høye mengder 1 propanol og ethylacetat kunne ha vært en indikator på bakteriell ødeleggelse på grunn av lang lagringstid av eplene (Apostolopoulou et al. 2005). 1 propanol gir smak av blomster og søttsmak (<306 mg/L) og ethylacetat (12 mg/L) gir nødvendig fruktighet (pære) i lave nivåer som representerer sider. Det var ikke skjedd i denne undersøkelsen BK-fatene representerte høyest nivå for 1 propanol 11,93 mg/L og AS-fatene lavest 5,65 mg/L og etylacetat var mellom 12,58 til 23,36 mg/L som ikke representerte noe fare for ødeleggelse.

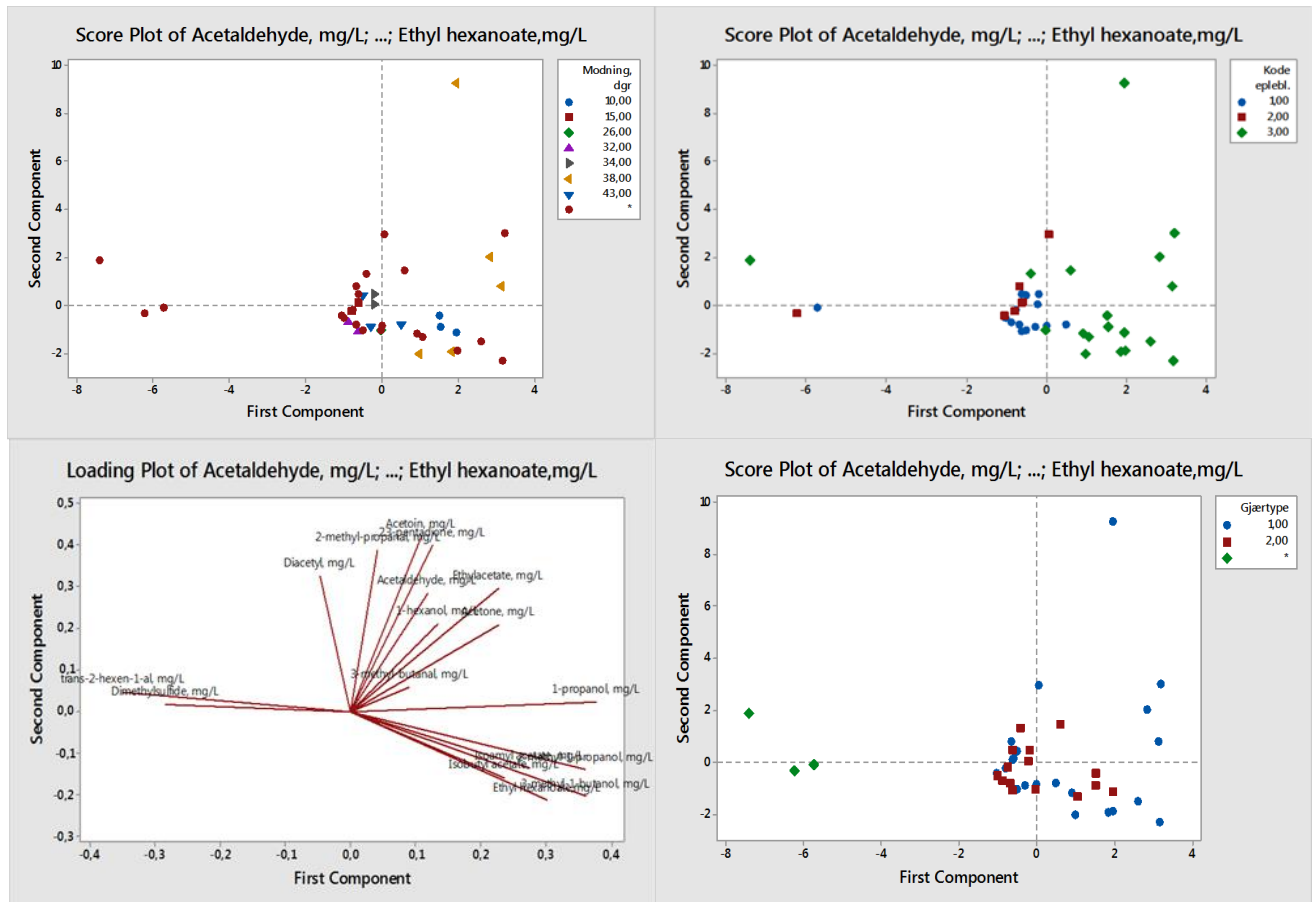
Karbonylgruppe

Acetaldehyd dannes under nedbrytningen av pyruvat og deltar i syntetiseringen av acetoin, acetat og etanol (figur 2.1.). Acetaldehyd og diacetyl kan spille en stor rolle for smakssammensetningen i sider og andre alkoholholdige drikkevarer (Berry& Slaughter 2003). Acetaldehyd gir behagelig smak av grønn frukt i lave nivåer, men stikkende og irriterende lukt i høye nivåer (Myiake, 1993). Lavest innhold ble funnet i sider fra BK-fatene 6,53 mg/L og høyest i sider fra AAK-fatene 26,32 mg/L og sider fra BK -fatet med humle 26,65 mg/L. Det var sannsynligvis en konsekvens av bruk av mer modne epler i sider fra AAK-fatene og tilsetning av humle i BK-fatene. I følge Herreo et al (2003), undersøkelse skyldes forskjellene i acetaldehyd produksjon gjærstammene, temperatur og tilgang på oksygen. "Acetaldehyd er meget reaktiv og kan binde opp proteinene eller

aminosyrene og produsere en hel rekke med ubehagelige smaks -og luktkomponenter" (Herreo et al 2003).

5.2.8 Modning

Sammenhengen mellom tre av epleblandingene og betingelsene gjæringstype og modning for produksjon av flyktige komponenter med PCA.



Figur 4.16. Score-plot 1 viser hvordan prøvene fordeler seg i forhold til antall dager modning. Den nederste røde prikken er dag 0 og tas ikke med.

Figur 4.17. Score-plot 2 viser hvordan tre av epleblandingene grupperer seg. 1 er A0, 2 er AA0 og 3 er B0.

Figur 4.18. Loading-plot viser fordelingen av flyktige komponenter i forhold til betingelsene.

Figur 4.19. Score-plot 3 viser fordeling av gjærtypene. Den grønne firkanten er dag 0 og tas ikke med.

Faktor 1 er styrende og faktor 2 er sekundær. Det ble ved hjelp av PCA funnet en sammenheng mellom modning i faktor 1. (87%) skala 0,35 og bruk av ulike filtreringsmetoder i faktor 2. (10%) skala 0.9 og temperatur mellom faktor 1 og faktor 2 skala -0,25. Det indikerer at antall dager modning var den viktigste faktoren og hadde sammenheng med økning og reduksjon av flyktige komponenter i sider og at filtreringsmetode og temperatur var viktigst i faktor 2 som er sekundært.

I løpet av modningsprosessen som anses for å være ganske lik vin, ble en del flyktige komponenter som var tilstede i små mengder modifisert (Styger et al 2011). Det var meget viktig med hensyn til aroma og smak (krydder og søthet) for sluttproduktet (Styger et al 2011). I noen av siderne ble det utviklet en del mer estere og høyere alkoholer og fordelingen endret seg. Figur 4.16 viser at mellom 10 og 15 dager lagring (modning) ved 3-4°C skjedde en systematisk forflytning av flyktige komponenter som medførte at de grupperte (samlet) seg.

I BK-fatene som hadde vært lagret i 38 dager økte flyktige komponenter med 24,7 mg/L. Mellom 38 og 43 dager skjedde en ganske stor reduksjon som rammet sider fra AK-fatene lagret i 43 dager (figur 4.16). Hexyl acetat, etyl oktanoate og etyl decanoate ble redusert, sammen med de organiske syrene sitron-, rav- og eddiksyre som burde ha økt på grunn av mikroflora (bakterie) aktivitet. Dersom vin lagres for lenge kan fruktigheten som forbindes med druene og fermenteringen reduseres og medføre at smaken får et mer preg av årgangsvin (De Simón et al 2003). Dette funnet kan stemme overens med at fruktigheten ble borte, men det kan også vært forårsaket av oksidering fordi fatene ikke var helt fulle. Dessuten lagres ofte vin over lengre tid, men det kan hende at sider ikke tålte lagring like godt, spesielt dersom det var gjærrester igjen som begynte å autolysere eller oksygen tilstede.

Figur 4.19 viser en høyere produksjon for B0-blandingen av flyktige komponenter i første faktor som er noe spredt fordi den viser begge gjæringsmetodene og alle fat, men den viser en klar tendens for høyere produksjon i B0-blandingen. Villgjærtypene har ofte lavere temperatur toleranse enn kulturgjær og produserer mer flyktige komponenter ved lave temperatur.

AS- og BS-fatene var mer gruppert enn K-fatene som sannsynligvis var forårsaket av den bakenforliggende årsak tilførsel av SO₂ som fjernet uønsket mikroflora og medførte at eplejuiceblandingen ble mer homogen og kontrollerbar (Lea, 2003).

5.2.9 Filtrering

Det ble funnet en sammenheng mellom filtreringsmetodene som ble benyttet i faktor 2, skala 0,9 (10 %) med PLS2. Etter modningsprosessen var valg av filtreringsmetode avgjørende for å beholde flyktige komponentene, farge og konsistens. Filtreringsmetodene omstukket og filter 4 ble funnet forskjellig fra filter 12.

Sider fra AK-fatene ble mer uklar enn de andre selv med tilførsel av gjærstopp. Det hadde sammenheng med modenheten til eplene og at pektinet ikke var godt nok nedbrutt før fermentering. Det samsvarer med undersøkelsen til Lea (2003), at epler til siderproduksjon ikke bør inneholde mer enn < 2 % stivelse og pektinet bør være nedbrutt, ellers kan det medføre uklar og syrlig sider og overmodne kan gi smak av kokte epler og lite syre. I følge Lea (2003) er også pektin vanskeligere å fjerne med alkohol tilstede og medføre ofte uklar sider. Sider fra AAK-fatene (modnere epler) av samme epleblanding som A0 ble betydelig mere klar, men inneholdt mer løse segmenter som selv ikke filtrering fjernet og fikk en noe mer flat og kokt smak. Ved bruk av dessertepler er dette ofte vanlig og årsaken til at mange benytter proteolytiske enzymer (Lea, 2003). Bruk av disse kan også medføre en noe annen smak derfor ble det ikke benyttet i dette forsøket.

Sider fra AK- fatene ble kun omstukket som resulterte i en del bunnfall, men AS-fatene filtrert med filter 12 ble klar, men på bekostning av farge og konsistens. I tillegg ble polyfenol innholdet i sider fra AS-fatene redusert ca. 50%, butyl acetat og TF som sannsynligvis også hadde sammenheng med en noe kortere modning.

Sider fra BK-fatene inneholdt mindre partikler og ble ganske klar etter omstikking og sider fra BKd -fatet tilsatt humle filtrert med filter 4 mistet minimalt med komponenter, farge og konsistens. Sider fra DK-fatene oppførte seg veldig forskjellig, SI-fatet ble klart etter filtrering (filter 4) mens CH- og HV-gjær forble uklare og ble filtrert igjen med filter 12. Sider fra fatene ASe og BSe som ikke var justert med sukker hadde betydelig mindre bunnfall enn de andre og ble helt klare etter omstikking.

Sider fra DK- fatene tilsatt humle beholdt TP komponentene etter filtrering bedre enn DK-fatene sannsynligvis fordi humle inneholder fenoliske forbindelser.

Filtreringsprosessen spesielt filter 12 medførte tap av flyktige komponenter, TF, farge (fenoler) og konsistens som var signifikant forskjellig. Derfor bør fordeler og ulemper ved filtreringsmetodene vurderes i forkant av produksjon spesielt med tanke på munnfølelse, farge og sluttsmak. Det er også verdt å merke seg at noen av siderne etter filtrering hadde fått en aromatisk "papp-aroma" som kan tyde på at filtrerne migrerte noe.

5.3 Sensorikk

5.5.1. Utføring av testen

Det ble benyttet 20 dommere i stedet for 6-8 som anbefales til graderingstester (Sensorisk gruppe 2015), dette fordi sannsynligheten å få et representativ resultat var høyere ved bruk av utrente dommere. Dommerne arbeidet innenfor opplæring i mat, drikke og service, og de fleste var vant med smaking. Det har vist seg at tidligere erfaring med ulik mat og drikke kultur kan gjøre det enklere å gjenkjenne og identifisere smaker (Sensorisk gruppe 2015). Allikevel kan det være vanskelig å skille mellom syrlighet og bitterhet som også kan maskere fruktigheten. Derfor ble dommerne presentert en nøytral sider (Somersby apple cider) i forkant av testen og det ble benytte noe tid til forklare forskjellene mellom smakspreferansene og skjemaet.

Beskrivende analyse av sider

I figur 4.11 viser bi-plottets første akse egenskapene som ble foretrukket ettersmak, kompleksitet, frukt/blomst og sødme, mens andre akse viser egenskapene som ikke ble foretrukket bitterhet/astrigens og syre. Siderne fra B0 – blandingen (5) med bruk av begge gjæringsmetodene ble foretrukket, fordi de ble oppfattet mer fruktige med bedre balansert sødme, syre og bitterhet.

Sensorisk test for B0-blandingene ble: fruktighet: 4,85-7,75, sødme: 3,7-7,20, bitterhet 2,80-3,55 og syrlighet: 4,05-5,75. B0-blandingene tilsatt humle (BKd) ble oppfattet best og skåret: 7,2 sødme, 7,75 for fruktighet, 7,2 for kompleksitet og 6,9 for ettersmak. Sannsynlig har tilsetning av humle i eplejuiceblandingene (dessertepler) bidratt med

manglende bitterhet og astrigens (kropp) og bidratt til å gjøre sideren mer kompleks. I tillegg har humle tilført mer fruktighet, gitt mer fylde og kompleksitet og ettersmak.

Den ble oppfattet søtteste, men sannsynligvis kamufleres sødmen av kompleksiteten eller at dommerpanelet foretrekker komplekse sider med mer sødme (Symoneaux 2013). Humle tilførte en noe høyere andel estere, 1-propanol og karboksylsyrer.

Siderne fra B0- blandingen hadde et lavt innhold av pyrodruesyre og TP var mellom 57,5-71,2 mg/L, men med høyere innhold av catechin og phloridizin enn de andre. K -sider ved 15°C inneholdt mer enn 100 mg/L flyktige komponenter, derav høyest andel høyere alkoholer enn S- sider, derav høyere andel estere. S- sider hadde økt produksjon av melkesyre, eddiksyre, pyrodruesyre og mindre ravsyre ($P < 0,05$). K- sider inokulert med sidergjær hadde en større produksjon ravsyre, acetaldehyd, catechin, procyanidin B1 og B2 og flyktige komponenter.

A0 og AA0-blandingene hadde høyest innhold av karbohydrater, TP og TF fra starten som var signifikant forskjellig fra de andre. Sider fra A0 og AA0- blandingene AKc og AAKa kom dårligst ut både smak- og utseendemessig (bunnfall) med poengskårene: 5-5,25 for syrlighet, 5,45 -5,75 for bitterhet og 3,75-3,95 for fruktighet. AKc fikk 5 poeng i ettersmak, men det var ikke positivt, da den ble regnet som den bitreste og mest syrligste. Årsaken til syrligheten var sannsynligvis en konsekvens av en betydelig høyere andel TP med klorogensyre, koffeinsyre, epicatechin og procyanidin B2, pyrodruesyre og forholdsvis høyt nivå med eddiksyre og at den ikke ble justert med sukker etter fermentering. For å ikke glemme epleblanding, volum og temperatursom produserte disse komponentene. Kombinasjonen av dette sammen med for lite sødme kamuflerte mest sannsynlig fruktigheten.

En av de mest spennende variantene var BSe som var fermentert uten ekstra sukker og ikke igangsatt. Den skåret nest høyeste verdier på frukt, kompleksitet og ettersmak (brandy). Smaksmessig ble den oppfattet som mer syrlig og mindre bitter enn BKe som var tilsatt SO_2 og ble tredje best likt. BKe skåret lavest på syre og bitterhet og tredje høyest på frukt og flere kommenterte at den smakte nærmest som Riesling. Professor Wicklund og undertegnede synes den smaksmessig var tilnærmet lik eplejuice. Det var ganske interessant at alle B0-blandingene med ulike betingelser og biokjemisk oppbygging ble

sensorisk oppfattet best fordi de hadde en ganske ulik sammensetning av biokjemiske komponenter.

Det tyder på at den kjemiske sammensetningen av sider er avhengig av kvaliteten til eplesortene, modenheten, terroir sammen med gjæringstype og valgt fermenteringsteknologi (Styger et al 2011). I tillegg er betingelsene som velges etter fermenteringsprosessen som modning og filtrering avgjørende for den organoleptiske slutt kvaliteten.

DK-fatene ble ikke diskutere inngående og heller ikke sensorisk fordi de tre gjærtyperne oppførte seg meget ulikt og kun et av fatene ble testet. Det samme gjelder CK-fatene tilsatt kun 50 '5 sidergjær.

5.3.1 Karbonering

Det minst vellykkede med forsøket var karboneringens metodene som resulterte i at de fleste av siderne ble flate eller minimalt karbonert. For de mest syrlige vinene var det kanskje greit, men for de mer søte ville karbonering mest sannsynlig ha hevet den organoleptiske sluttsmaken og kvaliteten betraktelig. Det bør derfor utprøves andre metoder for karbonering som for eksempel flaske karbonering og eller gå til innkjøp av overganger til gassflaskene som egner seg til sider karbonering.

Oppgavens hovedmål og delmål

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke hvilke epleblanding og betingelser som egnet seg best for å utvikle en norskpreget sider med god sensorisk kvalitet på ca. 4,7 % alkohol eller under, laget av norske epler.

Undersøkelsen fant ut at B0- blandingen med begge gjæringsmetodene er verdt å videreutvikle, men det gjenstår ennå flere detaljer for å få på plass en kvalitetsmessig jevn sider med god organoleptisk sluttsmak. Det første er selvsagt å produsere flere batcher for å gjenskape samme produkt.

Betingelsene som ble funnet signifikant forskjellige og avgjørende for både produksjon og for å beholde komponentene som ble dannet var temperaturene 10°C og 15°C for henholdsvis S- og K-fermentering, modning rundt 38 dager og bruk av filtreringsmetodene

omstukket eller filter 4. I tillegg var det viktig at eplesortene var passe modne av god kvalitet og mest sannsynlig at fatene var fylt til randen for å minske kontakten med oksygen, men det ble ikke undersøkt. Forsøket med humle som erstatning for manglende tannin i dessertepleblandingen ble funnet vellykket i B0-blandingen, men ikke like vellykket i D0-blandingen. Ved bruk av samme humletype Amarillo var det sannsynligvis sammenhengen mellom epleblandingen, og modenheten på eplene i blandingen, sammen med temperatur 10°C og filtreringsmetoden som ble benyttet. Humletypene Saaz og Cascade hadde for mye karakter og var for dominerende for eplesmaken. De kunne kanskje ha vært benyttet i mindre mengder, men det anbefales ikke.

Hvilken betydning hadde fordelingen og innholdet av de biokjemiske komponenter for sluttsmaken.

Sider fra BK-blandingene dannet mer enn 100 mg/L flyktige komponenter derav høyere andel høyere alkoholer, enn sider fra BS-blandingene derav høyere andel estere. Sider fra B0 med bruk av begge gjæringsmetodene hadde et høyere innhold av catechin og phloridizin og redusert innhold av pyrodruesyre, fruktose og glukose ved sammenligning med de andre siderne. Rav-, melk-, pyrodrue-, og eddiksyre var korrelert med spontangjæring, men sider fra BS-fatene hadde lavere nivå enn sider fra AS-fatene. A0- og AA0-blandingen inneholdt betydelig mer polyfenoler og TP enn de andre blandingene, men det var ikke dermed positivt for sluttsmaken. Resultatene tyder på at den kjemiske sammensetningen av sider er avhengig av kvaliteten til eplesortene, modenheten, terroir sammen med gjæringstype og valgt fermenteringsteknologi (Styger et al 2011). I tillegg er betingelsene etter fermenteringsprosessen som modning og filtrering avgjørende for den organoleptiske slutt kvaliteten. Det er ikke nødvendigvis innholdet eller nivået, men sammensetningen som er viktigst for sluttkvaliteten.

Veien videre

Masteroppgaven har vært et utviklingsprosjektet med et stort utvalg (mange betingelser) som har gitt bedre forståelse for betydningen av disse i samspill med gjæren. Det har vært prøvd ut ulik temperatur, volum, gjæringsmetode, filtrering, SO₂, karbonering, sødme og tilsatt humle (astrigens).

Fruktighet, kompleksitet og ettersmak oppfattes som viktig organoleptisk for siderkvalitet. Resultatene fra oppgaven kan mest sannsynlig være nyttige bidrag for fremtidige sideprosjekter.

Det gjenstår fremdeles mange løse tråder med hensyn til flyktige komponenter og andre komponenter og deres viktighet for smaken av sider som kan være interessante å forske videre på, spesielt ved bruk av norske epler. Ingen av epleblandingene var helt ideelle og karboneringen var ikke optimal. Derfor vil jeg i videre arbeid anbefale B0- blandingen med begge gjæringsmetodene i blandet 10-15% siderepler (villepler) for å få tannin (astrigens) som bygger ut smaken og danner kompleksitet (kropp) og ettersmak.

Det vil også være spennende å prøve ut B0-blandingene ved temperaturene 10°C og 15°C både med og uten tilsatt samme humletype, men med varierende slutt sødme (lavere nivå). I tillegg til å ikke juster sukkernivået fra starten. Det bør prøves ut ulike metoder for flaske karbonering eller innkjøpes overganger til CO₂ flasken som forenkler prosessen.

Et annet forsøk kan være å prøve hvitvinsgjær i stedet for sidergjær.

Jeg vil anbefale å inngå et tett samarbeid med IPV for å få tilgang til epler som er riktig modne av god kvalitet fordi det er essensielt for produksjon av ønskede komponenter og sluttsmaken. Deretter å opparbeide et samarbeid med andre aktuelle samarbeidspartnere innenlands (NIBIO, Ullensvang) eller utenlands for å tilegne seg mer faglig kunnskap og bredde gjennom erfaringsutveksling og samarbeid. Når det gjelder analysemetodene bør det finnes frem til egnede metoder for identifisering av flere interessante komponenter (polyfenoler, karbohydrater og flyktige komponenter), da det ble funnet en del uidentifiserte topper. Med hensyn til analysearbeid bør det tas ut mindre mengder og flere glass som bør analyseres fortløpende. For å dobbel sikre analysene (gjær oppfører seg ulikt) bør det tas 3 gjentak og produseres flere (9) like prøver. Sist, men ikke minst for å få mulighet til utprøving og oppskalering er det helt nødvendig å opparbeide et samarbeid med en siderprodusent.

6 Konklusjon

Resultatene fra undersøkelsen viste at B0-blandingen både med og uten inokulert sidergjær tilfredsstilte kvalitetskriteriene for en norskpreget sider med god organoleptisk kvalitet på ca. 4,7 % alkohol eller under, laget av norske epler.

Den kjemiske sammensetningen og kvaliteten til sider var en konsekvens av kvaliteten til eplesortene, modenheten, terroir sammen med gjæringstype og valgt fermenteringsteknologi. De viktigste og styrende betingelsene for å danne og beholde komponentene viste seg å være med 97 % varians; epleblandingene, temperaturene 10°C og 15°C, antall dager modning og filtrering. I tillegg var betingelsene etter fermenteringsprosessen som modning og filtrering avgjørende for den organoleptiske slutt kvaliteten. Det er ikke nødvendigvis innholdet eller nivået, men sammensetningen som var viktigst for sluttkvaliteten.

Resultatene tydet på at det skjedde mest økning av komponenter rundt 38 dager og mellom 38 og 43 dager skjedde en reduksjon. Siderne fra B0-blandingen hadde et høyere innhold av catechin og phloridizin og redusert innhold av pyrodruesyre. Sider fra BK-blandingene dannet mer enn 100 mg/L flyktige komponenter, enn sider fra BS-blandingene og derav mest høyere alkoholer.

Valget av filtreringsmetode viste seg å være avgjørende å beholde komponentene. Bruk av filter 12 viste seg å fjerne noen av polyfenolene, TF og flyktige komponenter og endret samtidig konsistens og farge.

Sensorisk test viste at B0-blandingene ble sensorisk oppfattet kvalitetsmessig bedre enn de andre blandingene. De ble ansett mer fruktige og med en bedre balanse mellom sødme, syre og bitterhet som ga mer kompleksitet. Utprøvingen av humle i B0-blandingen som erstatning for manglende tannin i dessertjuiceblandingen medførte en kvalitetsmessig mer fruktig og kompleks sider med ettersmak. Den biokjemisk sammensetningen endret seg noe og medførte et høyere innhold av polyfenoler, pyrodruesyre, eddiksyre og karboksylsyrer samt en noe høyere andel estere grunnet acetoin.

7 Referanser

- Alberti, A., Vieira, R. G., Drilleau, J. F., Wosiacki, G. & Nogueira, A. (2011). Apple wine processing with different nitrogen contents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (3): 551-558.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B. & Vicente, F. (2001). Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (8), 3761-3767.
- Alonso-Salces, R., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L., Gallo, B. & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of chromatography A*, 933 (1): 37-43.
- Alonso, S., Laca, A., Rendueles, M., Mayo, B. & Diaz, M. (2015). Cider Apple Native Microbiota Characterization by PCR-DGGE. *Journal of the Institute of Brewing*, 121 (2): 287-289.
- Apostolopoulou, A. A., Flouros, A. I., Demertzis, P. G., & Akrida-Demertzi, K. (2005). Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food control*, 16 (2): 157-164.
- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24 (2): 238-242.
- Awad, M. A., de Jager, A. & van Westing, L. M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83 (3): 249-263.
- E. J. & Henschke, P. A. (2004). The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International journal of food microbiology*, 96 (3): 235-252.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A. & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (4): 996-1002.
- Berry, D. R. & Slaughter, J. C. (2003). *Alcoholic beverage fermentations. Fermented beverage production*, 25-39: Springer.

- Blanco-Gomis, D., Mangas Alonso, J. J., Margolles Cabrales, I. & Arias Abrodo, P. (2002). Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (5): 1097-1100.
- Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J. J., Exposito-Cimadevilla, Y. & Gutierrez-Alvarez, M. D. (2010). Characterization of cider by its hydrophobic protein profile and foam parameters. *Food Chemistry*, 121 (1): 220-226.
- Bleie, J. (1897). Frå Opedalsmunkane til Ullensvang Hagebrukslag. Hagebrukslag, 1947, 9-56.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking*: Springer Science & Business Media.
- Buglass, A. J. (2015). Chemical Composition of Beverages and Drinks. *Handbook of Food Chemistry*, 225-300.
- Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin-FIL-IDF*, Belgium.
- Campbell-Sills, H., El Khoury, M., Favier, M., Romano, A., Biasioli, F., Spano, G., Sherman, D. J., Bouchez, O., Coton, E. & Coton, M. (2015). Phylogenomic Analysis of *Oenococcus oeni* Reveals Specific Domestication of Strains to Cider and Wines. *Genome Biology and Evolution*, 7 (6): 1506-1518.
- Carlsberg bryggeri AS (2016).
<http://www.carlsberggroup.com/Company/heritage/Pages/OldCarlsbergvsNewCarlsberg.aspx> (lest 3.05.2016).
- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Savatović, S., Mandić, A. & Tumbas, V. (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109(2): 340-347.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H. & Henschke, P. A. (1998). Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3): 283-288.
- Ciani, M. (1997). Role, enological properties and potensial use of non *Saccharomyces* wine yeast. *Recent Res Dev Microbiol*, 1: 317-331.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I. & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage

wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International journal of food microbiology*, 147(3), 170-180. fujimori
Eidhammer, B. Personlig henvendelse, November 2015.

Erken, H.S. (2002). *Stor kokebok*. 12 utgave, 1951, H. Ascheoug & CO, 890, 745

Fuleki, T., Pelayo, E., & Palabay, R. B. (1994). Sugar composition of varietal juices produced from fresh and stored apples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(6), 1266-1275.

Garcia, Y. D., Valles, B. S. & Lobo, A. P. (2009). Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry*, 117 (4): 731-738.

Giudici, P., Zambonelli, C., Passarelli, P., Castellari, L., 1995. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 143–147.

Gomis, D. B., Alvarez, M. G., Alonso, J. M., & Vallina, A. N. (1988). Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 25(8), 701-706.

Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P. & Drilleau, J. F. (1998). Direct Thiolysis on Crude Apple Materials for High-Performance Liquid Chromatography Characterization and Quantification of Polyphenols in Cider Apple Tissues and Juices. *Methods in enzymology*, 335.

Hammond, J.R.M. (1993). Brewer's yeasts. In: A.H. Rose, J.S. Harrison (Eds.), *The Yeast, Yeast Technology*, vol. 5, Academic Press.

Herrero, M., Garcia, L. A. & Diaz, M. (1999). Organic acids in cider with simultaneous inoculation of yeast and malolactic bacteria: effect of fermentation temperature. *Journal of the Institute of Brewing*, 105 (4): 229-232.

Herrero, M., García, L. A. & Díaz, M. (2003). The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (11): 3455-3459.

Jakobek, L. et al (2013). Variability of the polyphenol composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 (21): 199-211.

Jakobek, L., García-Villalba, R. & Tomás-Barberán, F. A. (2013). Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of food composition and analysis*, 31(2): 199-211.

Kahle, K., Kraus, M.R & Richling E. (2005). Polyphenol profile of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49 (8): 797-806.

Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K. S. & Apak, R. (2013). Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (4), 867-875.

Kelkar, S. & Dolan, K. (2012). Modeling the effects of initial nitrogen content and temperature on fermentation kinetics of hard cider. *Journal of Food Engineering*, 109 (3): 588-596.

Łata, B. (2008). Apple peel antioxidant status in relation to genotype, storage type and time. *Scientia Horticulturae*, 117 (1): 45-52.

Łata, B., Trampczynska, A. & Paczesna, J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121 (2): 176-181.

Lea, A. G. H. (1972). *The science of cider making.* [http. ourworld. CompuServe, com/homepages/andrew~ lea lferments. htm.](http://ourworld.com/homepages/andrew~lea/ferments.htm)

Lea, A. & Arnold, G.M. (1978). The phenolic of ciders: bitterness and astringency. *Journal of Food AND Agriculture*, 29 (5): 478-483.

Lea, A. G. H. & Piggott, J. (2003). *Fermented beverage production*. Second edition. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Springer Science & Business Media, 59-87.

Lea, A. (2015). *Craft cider making*. Third edition. Crowood.

Leforestier, D., Ravon, E., Muranty, H., Cornille, A., Lemaire, C., Giraud, T., Durel, C. E. & Branca, A. (2015). Genomic basis of the differences between cider and dessert apple varieties. *Evolutionary Applications*, 8 (7): 650-661.

Leksikon, S.N. (2015). Konveksjon. *Mikrobiologi*. Store norske leksikon.

Lekve, N. (2015) Siderproduksjon. Personlig henvendelse. Ulvik.

Le Quéré, J. M., Husson, F., Renard, C. M. & Primault, J. (2006). French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (9): 1033-1044.

Lichtenfeld, K. (2011). Vurdering av kvalitet i historiske eplesorter. IPV, Ås

Lilly, M., Bauer, F.F., Styger G., Lambrechts M.G. & Pretorius I.S. (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res*, 6:726–743.

Lilly, M, Lambrechts MG, PretoriusLiu, S. Q., Aung, M. T., Lee, P. R., & Yu, B. (2015). Yeast and volatile evolution in cider co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *Annals of Microbiology*, 1-9.

Llorente, D. D., Abrodo, P. A., Gonzalez-Alvarez, J., de la Fuente, E. P., Alonso, J. J. M., Alvarez, M. D. G. & Gomis, D. B. (2013). A New Analytical Method to Volatile Compounds in Cider Apples: Application to Evaluate the Starch Index. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (9): 2447-2454.

Løvås, G. G. (2003). *Statistikk for universiteter og høyskoler*. 2 utgave. Universitetsforlaget, Oslo.

Madrera, R. R., Gomis, D. B. & Alonso, J. J. M. (2003). Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (19): 5709-5714.

Madrera, R. R., Lobo, A. P. & Alonso, J. J. M. (2010). Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. *Food Research International*, 43 (1): 70-78.

Madrera, R. R. & Valles, B. S. (2009). Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD. *Food Control*, 20 (2): 139-143.

Food and Chemical Toxicology, 46 (3): 1143-1151.

Marsili, R., Ostapenko, H., Simmons, R. & Green, D. (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science*, 46 (1): 52-57.

Mauricio, J. C., Moreno, J. J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M. & Ortega, J. M. (1993). Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11): 2086-2091.

Michel, A., Bizeau, C. & Drilleau, J. (1988). Flore levurienne présente dans les cidreries de l'ouest de la France. *Sciences des aliments*, 8 (3): 359-368.

Moe, K., Porcellato, D. & Skeie, S. (2013). Metabolism of milk fat globule membrane components by nonstarter lactic acid bacteria isolated from cheese. *Journal of dairy science*, 96 (2): 727-739.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B. & Suárez, J. A. (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (25): 7402-7409.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B. & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14): 4084-4088.

Miyake, T. & Shibamoto, T. (1993). Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11): 1968-1970.

Narvhus, J., Østeraas, K., Mutukumira, T. & Abrahamsen, R. (1998). Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International journal of food microbiology*, 41 (1): 73-80.

Nogueira, A., Guyot, S., Marnet, N., Lequere, J. M., Drilleau, J. F. & Wosiacki, G. (2008). Effect of Alcoholic Fermentation in the Content of Phenolic Compounds in Cider Processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51 (5): 1025-1032.

Norstedt, C., Brengtsson, A., Bennet, P., Lindström, I. & Åyräpää, T. (1975). Technological measures to control the formation of esters during beer fermentation. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, 581-600.

Nykanin, L. (1986) Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverage. *Am. H. Enol Victic*, 37; 84-96.

Nybraaten, G. (1998). *Kompendium i Ølproduksjon*. Institutt for næringsmiddelfag, HiST Trondheim, 59 (2): 4-6: 28-31: 34-35.

Oszmiański, J., Wolniak, M., Wojdyło, A. & Wawer, I. (2008). Influence of apple purée preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 107 (4): 1473-1484.

Palmer, J. J. (2006). *How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time*. Brewers Publications.

Peng, B. Z., Yue, T. L. & Yuan, Y. H. (2009). Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (3): 610-615.

Perez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Oliveira, R. P. D. & Dominguez, J. M. (2015). Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management*, 40: 72-81.B.

Plutowska, B. & Wardencki, W. Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review *Food Chemistry*, 107 (2008): 449–463

Rankine, B. C. (1968). The importance of yeasts in determining the composition. *Vitis*, 7, 22-49.

Redalen, G. & Vestrheim, S. (1991). *Lær å dyrke frukt*. Grøndahl Søn Forlag AS, Oslo.

Rignes, Bryggeri.AS. (2015). Rignes historie. <http://www.ringnes.no/omringnes/historie/Sider/Historie.aspx> (lest 12.12.2015).

Riekstina-Dolge, R., Kruma, Z., Cinkmanis, I., Straumite, E., Sabovics, M. & Tomsone, L. (2014). Influence of *Oenococcus oeni* and oak chips on the chemical composition and sensory properties of cider. *Science and Technology*, 178-183.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401–436

Sablayrolles, J. M. & Ball, C. B. (1995). Fermentation Kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 53, 71-78.

San, K.-Y., Sanchez, A., Bennett, G. N. & Dittrich, C. R. (2009). Simultaneous anaerobic production of isoamyl acetate and succinic acid. Google Patents.

Santoyo, M. C., Loiseau, G., Sanoja, R. R. & Guyot, J. P. (2003). Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α -amylase production at pH 4.0. *International journal of food microbiology*, 80 (1): 77-87.

Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D. & Drilleau, J. F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (12): 4847-4853.

Satora, P., Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Tuzynski, T. A. D. E. U. S. Z. & Czepielik, M. (2009). Influence of prefermentative treatments and fermentation on the antioxidant and volatile profiles of apple wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (23): 11209-11217.

Scott, J. A. & Swaffield, C. H. (1998). Observations on the influence of temperature, dissolved oxygen and juice source on stored alcoholic cider flavour development, *Food Biotechnology*, 12:1-2, 13-26.

Sensorisk studiegruppe. (2015). Sensorikk, måling med menneskelige sanser. Allkopi AS.

Sinha, N. K., Sidhu, J. S., Barta, J., Wu, J. S. B. & Cana, M. P. (2012). Handbook of fruits and fruit processing. Second edition, Wiley-Blackwell.

Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (1): 49-55.

Stuestøl, A. I. (2013). Effekten av lagringstemperatur på kvaliteten hos eplesorten Discovery. IPV, Ås.

Styger, G., Prior, B. & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38 (9): 1145-1159.

Suni, M., Nyman, M. N., Eriksson, N., Bjork, L. & Bjork. I. (2000). Carbohydrate composition and content of organic acid in fresh and stored apples. *SCI Food Agric* 80 (1): 438-544.

Symoneaux, R., Chollet, S., Bauduin, R., Le Quere, J. M. & Baron, A. (2014). Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 2): Degree of polymerization and interactions with the matrix components. *Lwt-Food Science and Technology*, 57 (1): 28-34.

Symoneaux, R., Chollet, S., Patron, C., Bauduin, R., Le Quere, J. M. & Baron, A. (2015). Prediction of sensory characteristics of cider according to their biochemical composition: Use of a central composite design and external validation by cider professionals. *Lwt-Food Science and Technology*, 61 (1): 63-69.

Symoneaux, R., Guichard, H., Le Quere, J. M., Baron, A. & Chollet, S. (2015). Could cider aroma modify cider mouthfeel properties? *Food Quality and Preference*, 45: 11-17.

Symoneaux, R., Le Quere, J. M., Baron, A., Bauduin, R. & Chollet, S. (2015). Impact of CO₂ and its interaction with the matrix components on sensory perception in model cider. *Lwt-Food Science and Technology*, 63 (2): 886-891.

- Tollefsrud, M. M. & Sønstebo, J. H. (2014). Registrering og genetisk karakterisering av villeple i Norge. 18. Norsk institutt for skog og landskap, Norsk genressurssenter, skog og landskap, 21-22.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q. & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24 (1): 25-31.
- Verdu, C. F., Gatto, J., Freuze, I., Richomme, P., Laurens, F. & Guilet, D. (2013). Comparison of Two Methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the Quantification of Polyphenols in Cider Apple Juices. *Molecules*, 18 (9): 10213-10227.
- Verdu, C. F., Childebrand, N., Marnet, N., Lebail, G., Dupuis, F., Laurens, F., Guilet, D. & Guyot, S. (2014). Polyphenol variability in the fruits and juices of a cider apple progeny. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (7): 1305-1314.
- Verdu, C. F., Guyot, S., Childebrand, N., Bahut, M., Celton, J. M., Gaillard, S., Lasserre-Zuber, P., Troggio, M., Guilet, D. & Laurens, F. (2014). QTL Analysis and Candidate Gene Mapping for the Polyphenol Content in Cider Apple. *Plos One*, (10): 9
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and biotechnology*, 61 (3): 197-205.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R. & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (6): 564-573.
- Vidrih, R. & Hribar, J. (1999). Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry*, 67(3), 287-294.
- Vinmonopolet. (2015). Omsetning av sider. Oslo.
- Whiting, G. C., & Coggins, R. A. (1975). Estimation of the monomeric phenolics of ciders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26 (12): 1833-1838.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15): 6520-6530.
- Xu, Y., Zhao, G. A. & Wang, L. P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora*

valbyensis yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(3): 192-196.

Xu, Y., Fan, W. & Qian, M. C. (2007). Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8): 3051-3057.

Ye, M. Q., Yue, T. L. & Yuan, Y. H. (2014). Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. *European Food Research and Technology*, 239 (1): 67-77.

Ye, M. Q., Yue, T. L. & Yuan, Y. H. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (14): 2951-2957.

Ye, M. Q., Yue, T. L., Gao, Z. P., Yuan, Y. H. & Nie, G. (2015). Analysis of Changes in Minerals Contents during Cider Fermentation Process by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 35 (1): 229-233.

Vangdal, E. & Knutsen, I. K. (2013). Sider med lågt alkoholinnhold. *Bioforsk Rapport*, VOL. 8, Bioforsk, Ullensvang.

Vangdal, E. (2015). Kvalitetssider med lågt alkoholinnhold-2. *Bioforsk Rapport*, VOL. 10, Bioforsk, Ullensvang.

Zhang, H., Zhou, F., Ji, B., Nout, R. M., Fang, Q. & Yang, Z. (2008). Determination of organic acids evolution during apple cider fermentation using an improved HPLC analysis method. *European Food Research and Technology*, 227 (4): 1183-1190.

Zuriarrain, A., Zuriarrain, J., Puerias, A. I., Duenas, M. T. & Berregi, I. (2014). Quantitative determination of lactic and acetic acids in cider by H-1 NMR spectrometry. *Food Control*, 52: 49-53.

8 Vedlegg

Vedlegg 1. Oversikt over siderprosessen med forklaring av flytskjema.

Vedlegg 2. Fysiske analyser av eplesortene

Vedlegg 3. Eksempel på utregning av protein i eplesortene SR, DI og epleblanding AO.

Vedlegg 4. Flyktige komponenter i eplesortene.

Vedlegg 5. Aminosyre innholdet i epleblandingene og i et utvalg av sider

Vedlegg 6. Oversikt over flyktige komponenter i epleblandingene etter omstikking og i sider.

Vedlegg 7. Oversikt over 34 produserte sider med sensorisk bedømmelse

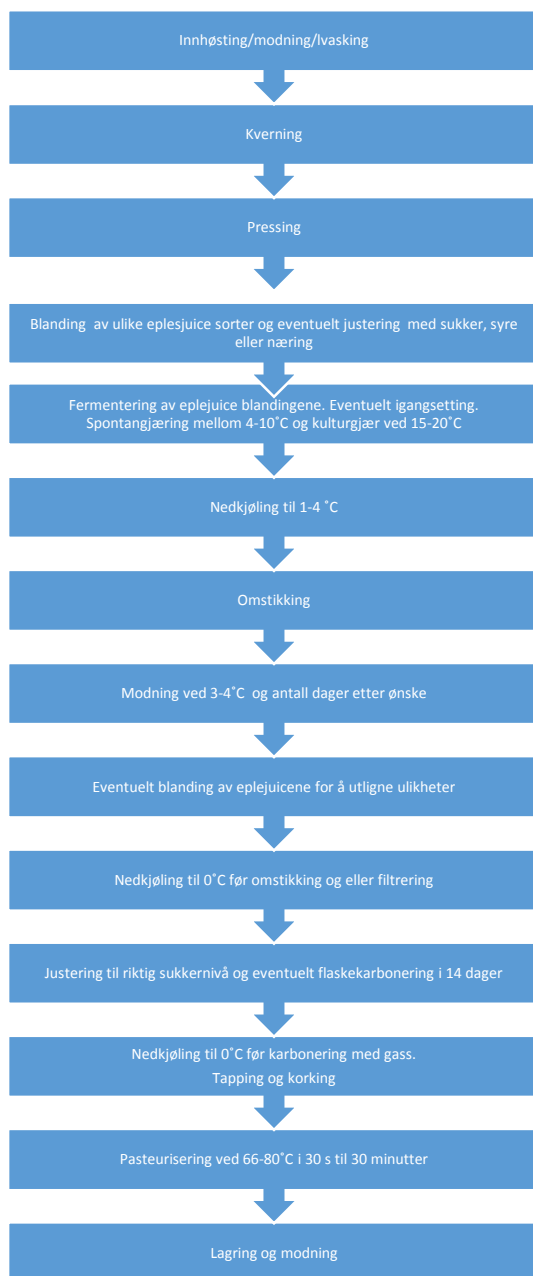
Vedlegg 8. Skjema for sensorisk analyse

Vedlegg 9. Oversikt over poengfordelingen av AKc, DKa, BKc, ASd og CKa med gjennomsnitt og standardavvik.

Vedlegg 10. Oversikt over poengfordelingen av AAK, A, BKe, BSe og BKd.

Vedlegg 11. Oversikt over flyktige komponenter i DK-fatene.

Vedlegg 1. Oversikt over siderprosessen med forklaring av flytskjema.



Figur 4.20. Flytskjema over siderprosessen.

Innhøsting, modning og vasking av epler

Epler er klimakteriske frukter og til lagring høstes eplene før de er spisemodne og ettermodnes på lager. Hvor fort dette går avhenger av modningsgraden og temperaturen på lageret. Eplene lagres ofte ved 2-4°C med luftfuktighet på 85 %. I løpet av modningen nedbrytes klorofyllet i epleskallet og grunnfargen endres fra grønn til mer gul og eplene blir søtere og utvikler bedre smak (Kavara, 1998). Før pressing fjernes alle ytre forurensninger og råtne og mugne epler sorteres vekk for å ikke ødelegge siderkvaliteten. Det er viktig at det ikke benyttes eplekart eller umodne epler i siderproduksjon fordi det kan medføre at sluttproduktet blir for surt eller at pektinstoffene løses ut i eplejuicen og gir illeluktende smakskomponenter og uklar sider (Lea, 2015). Nedfallsfrukt i produksjon kan inneholde de aktive bakteriene for eddikproduksjon, *acetobacter*, og resultere i at eddikfermentering kommer i gang og omgjør produktet til eddik.

Kverning

For å få høyt utbytte av eplejuicen blir eplene kvernet. Desto finere kvernet desto større saftutbytte, men med risiko for uklar sider. Effekten av enzymatisk oksidering ses umiddelbart ved at eplemosten brunfarges. Det er under kverning og pressing polyfenol- og spesielt procyanidininnholdet reduseres fra eple til eplejuice (Guyot et al. 2003). En uklar sider inneholder derfor mer polyfenoler sammenlignet med en klar. For å redusere oksidasjon kan eplejuicen pasteuriseres eller tilføres svoveldioksid, askorbinsyre eller enzymer før fermentering (Lea, 2003). Dersom det skal trekkes ut mer smak av eplemassen (maserasjon) gjøres det ved å kverne eplemassen og la den få ligge noen timer eller inntil et døgn før pressing.

Pressing

Det finnes ulike pressmetoder og ofte deles de inn i to hovedtyper satsvis (batch) der fruktmassen (epleskall, kjerner etc.) må fjernes mellom hver sats og kontinuerlig der det brukes et beltbånd som transporterer eplemassen ut og gjennom en sylinder. Det finnes mange ulike typer fra enkle hånddrevne til datastyrte og fra åpne til lukkede. Satsvis regnes for å være den mest skånsomme metoden for å beholde fenoliske forbindelser.

Tradisjonelt brukes ulike treskruepresser for pressing av den kvernedede eplemassen. Pressene er ofte bygd opp lagvis med 6-12 former (ca. 5 cm), som er bekledd med sileklede og over hver form er det en pressfjøl. Massen fordeles mellom alle formene og når pressen er fylt opp strammes den fra toppen med en stor skrue. Dermed presses eplemassen sammen slik at eplejuicen renner ut mellom hvert lag. Dette kan ta fra timer til et døgn avhengig av pressens kapasitet, kraft og utbytte.



Figur 4.21. Trepresse, hentet fra, <http://www.supercook.org/cookbook/cider.htm>

I dag finnes tilsvarende automatiserte elektriske presser som gir større utbytte, er raskere, og mer kostbare, f.eks. Voranpresser basert på bånd og hydroplate. Ved bruk av hydropresse blir den kvernedede massen overført til juicepressens trommel som er bekledd med et sileklede. Trommelen lukkes med et lokk, og en duk tres over utsiden av trommelen for å forhindre spruting. Umiddelbart etter at den kvernedede eplemassen has over i pressen begynner eplejuicen å renne ut, og når vanntrykket og maskinen startes øker farten. Pressingen tar fra 15-30 minutter, avhengig av presseegenskapene til eplene.

Blandingsprosessen

Gjæringsfatene som benyttes til siderproduksjon må være rene og av godkjent næringsmiddelkvalitet, eksempel glass, plast eller rustfritt stål som ikke migrerer, irrer eller setter uønsket smak, farge eller aroma.

Derfor må ikke aluminium, kobber, jern eller galvanisert stål må ikke benyttes (Lea, 2003). Før fermentering sjekkes vanligvis pH, sukkerinnhold og syreinnhold i eplejuicen. Opprinnelig inneholder eplejuice de fleste næringsstoffene til gjæringsprosessen, men ved kalde og regnfulle sommer bør det vurderes å tilsette sukker og næringsstoffer. Dersom sukkernivået er for lavt justeres det til et visst nivå avhengig av ønsket alkoholprosent i det ferdige produktet ved bruk av °brix og Original Gravity.

En balansert og velsmakende sider er ofte sammensatt av flere eplesorter og sider varianter (Lea 2003) Utfordringen er å finne en blanding som inneholder nok sødme og nok tannin til å gi en fruktig organoleptisk slutt smak med kompleksitet og ettersmak.

Blanding av eplesortene kan skje på forskjellige trinn i prosessen: før kverning, etter pressing, før fermentering eller etter fermentering (Lea 2003). Den siste gir kanskje mest kontroll over sluttproduktet (Lea 2003).

Fermentering

Fermentering av sider kan skje naturlig av tilstede værende gjærstammer fra luften, utstyret eller på eplene eller ved å inokulere kulturgjær i eplejuicen. For å igangsette fermenteringsprosessen raskt, bør gjæringen skje ved ca. 20°C. Når fermenteringen er kommet godt i gang lukkes fatet med gjærlås og resten av prosessen foregår anaerobt, ved ulik temperatur avhengig av gjæringsmetode for å danne og beholde smaksbestanddelene. For å utvikle optimale smaks- og aromabestanddelene er temperatur under fermenteringsprosessen viktig. Det anbefales mellom 4-10°C for spontanfermentering og 17-25°C for kulturgjær.

Fermenteringsprosessen kan pågå fra 10 dager til flere måneder (6-18 måneder) avhengig av fermenteringsmetode, temperatur og tilgang på næringsstoffer som protein, zink og B-vitaminer. Fermenteringen avsluttes ved ønsket alkoholnivå eller når tilgangen på næring tar slutt. Eller etter endt fermentering kan "Lees" metode benyttes. Dette går ut på å virvle opp den døde gjæren og alle partiklene (bunnfallet) i fatet for å få ut mer smaksbestanddelene og aroma. Deretter lagres sideren i maks 14 dager før den (omstikkes) has over i et nytt rent fat. For å forhindre melkesyrefermentering kan askorbinsyre eller svoveldioksid tilsettes.

Nedkjøling

Fermenteringsprosessen anses ferdig når gjæren ikke omsetter mer sukker og sukkernivået er stabilt eller ønsket alkoholnivå er oppnådd. Sideren nedkjøles til 1-3°C i 2-6 døgn for at gjærceller, sedimenter av proteiner og andre uønskede komponenter utfelles og faller til bunnen. Dersom sideren er veldig uklar kan det brukes ulike typer gjærstopp (kaliumsorbit eller svovel) for å hjelpe til med utfellingen (se «filtrering»).

Omstikking

Sideren blir omstukket for å fjerne døde gjærceller og andre uønskede partikler i det gamle fatet. For å minske overflatens kontakt med oksygen bør det nye fatet være mindre og fylles til randen. Når sideren er omstukket forbrukes det gjenværende sukkeret som medfører at det dannes små mengder karbondioksid. Etter endt fermentering er det viktig å minimalisere kontakt med oksygen som kan medføre harskning, dannelse av mørkere farge, tap av friskhet og flyktige aromakomponenter. Store mengder oksygen medfører først dannelse av høyere alkoholer og deretter eddiksyrebakterier som i verste tilfelle kan endre sider til et nytt produkt eplesidereddik. For å forhindre oksidering og kontaminering brukes ofte svoveldioksid eller askorbinsyre som samtidig gjør sider mer motstandsdyktig og lysere i farge.

Modning

Under modningsprosessen utvikles finere smaks- og aromakomponenter, uønskede smaksstoffer blir ofte fjernet, og epletsyren blir mindre fremtredende. Under lagring skjer en Maillardreaksjon (bruning) når fruktfenoler kobles til polyfenoler fordi fenoloksidaser øker innholdet av aminosyrer. Med hensyn til fargeutvikling, munnfølelse, smak og aroma er det viktig at spesielt polyfenolene oligomere flavonoidene (procyanidin), klorogensyre og epicatechin utvikles. Sider modnes fra uker til flere måneder avhengig av type, alkoholprosent og egenskaper.

Sider lagres kaldt under modningen og pH bør være lavere enn 3,8 for å forhindre ”sidersyke”, som skyldes en lidelse forårsaket av bakterier fra slekten *Zymomonas*.

Når sykdommen setter inn medfører den en voldsom gjæring som fører til at smak og aroma ødelegges og sider blir uklar. Mest utsatt er søt sider og sider produsert med lavt syreinnhold.

Blanding av ulike fat

For å oppnå stabilitet i massen bør blanding av ulike fat skje i god tid før filtrering. Blanding av fat er helt vanlig og nødvendig for å oppnå jevn sluttkvalitet, da dette vil utjevne ulikheter mellom de forskjellige fatene.

Filtrering (klaring)

Metoder for fjerning av uklarheter er gjentatte omstikkinger, sentrifugering eller filtrering avhengig av bedriftens filosofi. Filtrering regnes for å være en kostbar metode fordi filterplatene ikke kan gjenbrukes. I storskala brukes ofte kombinasjoner av sentrifugering og filtrering med ulik grovhetsgrad, mens for småskala blir fatene ofte omstukket opptil flere ganger og/eller filtrert. Dersom kun sentrifugering benyttes kan sider utsettes for kuldeuklarheter og bli uklar (Nybraaten, 1998). Klaring av sider er avhengig av partikkelstørrelsen, da store partikler sedimenteres raskere enn små. Redusert viskositet korrelerer med filtrenes porestørrelse fra små (0,2 μm) til store (1,5 μm) (Zhao et al. 2015).

Før filtreringsprosessen nedkjøles sider til ca. 0-2 °C fordi lav temperatur fremskynder klaringsprosessen. Dersom sider ikke blir klar etter filtrering kan klaringsmidler som kiselgur, kitosan, gelatin og isingglass eller pektinase enzymer benyttes. De hjelper til ved å tiltrekke seg partiklene i sider og fører dem til bunnen av fatet. På dette trinnet kan sukkernivået justeres ved behov.

Karbonering

Sider som skal karboneres bør være nedkjølt til rundt 0-2 °C, for at karbondioksid lettere skal tas opp. Karbonering kan utføres enten ved å karbonere fatene eller flaskene. Ved flaske karbonering tilsettes ca. 1/2 ts sukker pr 0,5 L flaske som korkes og lagres 14 dager ved romtemperatur ca. 20 °C før de eventuelt lagres kaldt eller pasteuriseres.

Karbondioksid tilsettes for å få et friskere produkt med bedre munnfølelse, samtidig som det forhindrer misfarging og oksidering og pH reduseres.

Tapping

Flaskene, korkene og utstyret må være desinfisert for å forhindre mikrobiell vekst før tapping. Under tappingen fylles flaskene sakte opp fra bunnen uten at det spruter for å minimalisere kontakten med oksygen. Deretter korkes de omgående og videre lagres kjølig eller pasteuriseres.

Pasteurisering

Sider pasteuriseres for å inaktivere sporer av tilstedeværende mikroflora, og for å øke stabiliteten og holdbarheten. Pasteurisering forhindrer oppblomstring og infeksjon av uønskede mikroorganismer og villgjærtyper. Pasteurisering medfører endret smak, mørkere farge og endret fysikalsk og kjemisk kvalitet. Skadevirkningene minimaliseres ved lav temperatur. Det er delte meninger om hvilken grad og lengde det skal pasteuriseres, og alt fra 66 til 80 °C og 30 sekunder til 10 minutter er mulig.

Lagring

Flaskene lagres for modning og smaksutvikling i flere måneder kaldt og mørkt. Dersom sider ikke er pasteurisert vil den videreutvikles under lagring. Upasteurisert sider har ofte ca. et års holdbarhet. Dersom den lagres lengre vil den få preg av eplevin og deretter hetvin.

Vedlegg 2. Fysikalske analyser av eple-sortene

Fysikalske analyser av eple-sortene				TF (mgGAE/100
Sort	Tørrstoff (°brix)	pH	Syreprosent	ml)
SR, A	12,1	3,5	0,58	35,3
SR,AA	11,8	3,4	0,57	27,1
DI, A	11,8	3,4	0,57	81,5
DI, AA	11,8	3,3	0,61	101,7
SU, B	10,9	3,3	0,82	15,0
SU, D	10,5	3,3	0,77	12,1
AR, B	11,9	3,2	0,77	51,9
AR, D	11,2	3,2	0,80	11,2
GR, B	11,5	3,3	0,68	49,2
GR, D	12,4	3,3	0,66	44,8
JO, D	13,9	3,2	0,84	19,4
TO, D	11,8	3,3	0,77	113,3

Vedlegg 3. Eksempel på utregning av protein i eple-sortene SR, DI og epleblandingen A0

Utregning av protein i epleblandingen SR, DI og A0							St. avvik
Eple-sortene	Verdi, g	mL titer	fortynningsfaktor HCl	%TN=titer*0,07/(g)	Gj.sn	N mg/kg	
A1/SR	0,538	0,1743	0,07	0,022678439	0,022032916	220,3	6,1
A1	0,501	0,1572	0,07	0,021964072			
A1	0,537	0,1646	0,07	0,021456238			
A2/DI	0,515	0,0467	0,07	0,006347573	0,006459715	64,6	1,0
A2	0,525	0,0491	0,07	0,006546667			
A2	0,530	0,0491	0,07	0,006484906			
A3/A0	0,998	0,2014	0,07	0,014126253	0,013790134	137,9	3,3
A3	1,086	0,2088	0,07	0,013458564			
A3	1,110	0,2186	0,07	0,013785586			

Vedlegg 4. Flyktige komponenter i eple-sortene.

Flyktige komponenter i eple-sortene, mg/L.																										
Eple sortene	Acetaldehyde	Acetone	Dimethyl sulfide	2-methyl-propanal	1-propanol	Diace-tyl	2-butanol	2-butanol	Ethyl acetate	2-methyl-1-propanol	3-methyl-butanol	2,3-pentadi-ol	Acetoin	2-methyl-1butanol	Isobutyl acetate	Hexan-ol	Butyl acetate	trans-2-hexen-1-ol	1-hexanol	Isoamyl acetate	Butyl butyrate	Hexyl acetate	Ethyl heptanoate	Phenylethyl alcohol	Ethyl octanoate	Beta-citronellol
SR,A	0,858	0,055	0,009	0,003	0,399	n.d.	n.d.	0,48	n.d.	0,069	n.d.	n.d.	n.d.	0,073	0,017	n.d.	2,21	0,801	1,12	0,075	0,014	0,596	n.d.	n.d.	0,001	0,006
SR, AA	0,988	0,061	0,012	0,008	0,752	n.d.	n.d.	0,85	0,014	0,104	0,002	n.d.	n.d.	n.d.	0,037	0,09	3,3	1,049	1,09	0,044	0,019	0,592	0,001	0,264	0,002	0,005
SR, AA	0,982	0,031	0,012	0,009	0,824	n.d.	n.d.	0,02	0,008	0,128	0,002	n.d.	n.d.	0,014	0,034	n.d.	3,47	0,996	1,11	0,045	0,031	0,758	0,003	0,101	n.d.	0,018
DI,A	2,162	0,13	0,005	n.d.	3,576	n.d.	0,01	1,08	0,072	0,111	0,001	0,056	n.d.	1,824	0,019	0	3,52	1,94	3,09	0,481	0,106	1,258	n.d.	0,146	0,004	0,01
DI,A	2,119	0,076	n.d.	n.d.	3,65	n.d.	0,01	n.d.	0,067	0,117	n.d.	n.d.	0,66	1,775	0,017	0,01	3,8	1,882	3,16	0,823	0,147	1,605	0,017	6,974	0,009	0,007
DI, AA	1,123	0,003	0,011	0,003	2,785	0,007	0,01	1,29	0,031	0,261	n.d.	0,037	n.d.	1,236	0,031	0,07	3,53	1,736	2,76	0,436	0,142	0,656	0,007	n.d.	n.d.	0,674
DI, AA	1,115	0,087	n.d.	n.d.	2,993	0,002	0,01	0,02	0,021	0,235	0,001	n.d.	1,29	1,209	0,028	0	3,86	1,895	2,55	0,487	0,203	0,888	0,012	0,139	0,011	0,409
SU,B	2,454	0,091	0,029	0,01	0,422	n.d.	n.d.	1,05	0,031	0,102	0,006	n.d.	n.d.	0,744	0,004	0,06	0	0,894	4,99	n.d.	0,567	n.d.	0,012	n.d.	0,026	0,008
SU,B	2,629	0,09	0,022	0,013	0,387	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	0,106	0,006	n.d.	n.d.	0,812	n.d.	n.d.	0	0,799	5,41	n.d.	0,734	n.d.	0,018	n.d.	0,059	0,007
SU,D	2,562	0,114	0,025	0,012	0,443	n.d.	0,01	1,15	0,022	0,144	0,006	0,011	n.d.	1,043	0,004	n.d.	0,01	1,027	7,43	0,001	0,775	0,001	0,013	0,312	0,033	0,441
SU,D	2,382	0,121	0,02	0,013	0,437	0,017	n.d.	0,05	0,016	0,119	0,007	n.d.	0,59	1,03	n.d.	0	0,01	0,689	7,71	n.d.	0,896	0,002	0,018	n.d.	0,066	0,008
AR,B	3,475	0,18	0,032	n.d.	0,74	n.d.	n.d.	1,26	0,11	0,136	n.d.	n.d.	n.d.	0,261	0,019	n.d.	3,83	2,294	3,2	0,144	0,345	1,383	0,007	2,353	0,009	0,018
AR,B	3,369	0,101	n.d.	n.d.	0,794	n.d.	n.d.	0,02	0,112	0,076	n.d.	n.d.	0,91	0,26	0,015	n.d.	3,94	2,093	3,19	0,146	0,43	1,695	0,008	0,338	0,024	0,016
AR,D	3,248	0,137	0,023	n.d.	0,672	n.d.	0,01	1,36	0,12	0,13	n.d.	n.d.	n.d.	0,234	0,018	0,07	3,6	2,05	2,92	0,139	0,347	1,395	0,005	2,221	n.d.	0,28
AR,D	11,096	0,138	n.d.	n.d.	0,877	n.d.	0,01	n.d.	0,233	0,114	0,001	0,015	n.d.	0,283	0,021	n.d.	4,12	0,665	5,94	0,154	0,78	1,279	0,009	0,268	n.d.	0,014
GR,B	1,367	0,04	0,013	0,002	0,697	0,049	0,01	0,79	n.d.	0,236	0,002	0,014	n.d.	0,437	0,004	0,06	0	1,999	4,2	n.d.	0,128	0,002	0,003	0,188	n.d.	0,097
GR,B	1,369	0,052	0,007	n.d.	0,694	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	0,197	n.d.	0,023	0,57	0,435	n.d.	n.d.	0,01	1,819	4,18	n.d.	0,157	0,005	0,004	n.d.	n.d.	0,007
GR,D	2,083	0,145	0,021	0,001	0,783	0,264	0,01	1,37	0,021	0,431	n.d.	n.d.	n.d.	0,865	0,005	0	0	2,342	5,7	n.d.	0,282	0,001	n.d.	n.d.	0,01	0,01
GR,D	2,084	0,118	0,009	0,005	0,814	n.d.	n.d.	0,07	0,016	0,421	0,004	0,022	1,02	0,877	n.d.	0,01	0,01	2,068	5,71	n.d.	0,364	0,001	n.d.	n.d.	0,025	0,008
JO,D	2,758	0,111	0,011	n.d.	0,41	n.d.	0,01	0,76	0,043	0,155	n.d.	0,053	n.d.	0,271	0,051	0,03	1,39	0,102	3,95	0,297	0,062	0,684	0,001	0,221	0,001	0,007
JO,D	3,509	0,125	0,006	0,003	0,341	n.d.	0,01	n.d.	0,051	0,171	n.d.	0,025	n.d.	0,301	0,048	n.d.	1,44	0,298	3,61	0,313	0,09	0,868	0,002	0,06	n.d.	0,013
TO,D	8,46	0,116	0,018	0,004	0,558	0,241	0,01	1,59	0,227	0,156	n.d.	0,077	n.d.	0,178	0,032	n.d.	3,83	0,113	4,53	0,138	0,109	0,189	0,001	n.d.	n.d.	0,104
TO,D	10,012	0,118	0,001	0,004	0,632	n.d.	0,01	n.d.	0,248	0,183	n.d.	0,025	n.d.	0,197	0,031	n.d.	4,33	0,177	5,19	0,154	0,154	0,242	0,003	n.d.	n.d.	0,361

Vedlegg 5. Aminosyreinnholdet i epleblandingene og i et utvalg av sider

Aminosyreinnholdet i epleblandingene og i sider mg/L.														
Aminosyrer	AO	BO	DO	AKa	ASb	ASc	ASd	BKc	BSa	BSc	DKa	DKb	DKc	DK, amarillo
L-asparaginesyre	87,72	140,96	147,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,266
L-glutamin	57,53	49,88	62,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-asparagin	176,49	370,67	424,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,160
L-serin	12,61	10,51	10,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-glutamine	5,70	8,04	8,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,438	0,292	0,146	0,292	0,292	0,292	0,731
L-histidin	n.d.	1,68	3,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glycin	1,43	0,98	1,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,300
L-threonin	2,74	2,62	2,74	n.d.	n.d.	0,238	n.d.	n.d.	n.d.	0,238	n.d.	0,357	0,357	0,357
L-citrulline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-arginin	0,42	0,84	0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,632
L-alanin	9,09	10,51	12,30	n.d.	n.d.	0,178	n.d.	n.d.	0,089	n.d.	0,089	n.d.	0,089	0,713
L-tyrosin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-valin	1,41	1,41	1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-metionin	n.d.	0,60	0,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-isoleucin	1,84	0,39	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-leucin	n.d.	0,26	0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-lysin	4,38	5,84	5,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,662
Σ av aminosyrer	361,34	605,19	681,22	0,00	0,000	0,416	0,000	0,438	0,381	0,384	0,381	0,650	0,739	8,821

Vedlegg 6. Oversikt over flyktige komponenter i epleblandingen, etter omstikking og i sider.

Endring av flyktige komponenter fra epleblandingen til ferdig sider mg/L.																			
Komponenter	Smak	Epleblandinger				Omstukket						Sider						DK, humle	
		AO	AAO	BO	DO	AKabc	AAKabc	ASabc	BKabc	BSabc	DKabc	AKabc	AAKa	ASabc	BKabc	BSabc	DKabc		
Karbonyl																			
Acetaldehyde	Sur råtteneplekart	1,63	1,07	2,75	4,28	13,71	22,79	11,01	8,81	7,96	15,93	11,63	26,32	10,67	6,53	11,76	19,99	22,04	
Ketone																			
Acetone	Negllakk	0,14	0,04	0,12	0,13	0,42	0,22	0,27	0,42	0,15	0,39	0,33	0,30	0,27	0,30	0,32	0,39	0,51	
Estere																			
Diacetyl	Smør Negllakk	0,01	n.d.	0,22	0,01	0,05	0,01	0,02	0,01	0,08	0,06	0,05	0,01	0,02	n.d.	n.d.	0,08	0,03	
Ethylacetate	høye nivåer,	0,04	0,02	0,06	0,11	14,24	17,81	12,94	20,31	24,27	24,30	14,59	17,58	12,58	21,96	21,44	24,92	23,36	
Butyl acetat	Moden frukt	2,99	3,27	1,42	1,46	1,21	1,39	1,28	0,64	0,86	0,98	1,12	1,12	0,02	0,66	0,35	0,84	0,63	
Isoamyl acetate	Bananer	0,47	0,24	0,06	0,08	1,15	1,02	0,55	2,37	4,49	4,72	1,01	3,21	0,01	2,86	1,30	3,94	2,26	
Butyl butyrate	Fruktig, eple vruer	0,08	0,08	0,37	0,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Ethyl hexanoate	frukt, rødt pærearoma,	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,44	0,24	0,71	0,59	0,79	0,65	0,33	0,19	0,66	0,30	0,59	0,60	
Hexyl acetat	søtsmak	1,01	0,64	0,50	0,28	0,52	0,35	0,39	0,76	1,34	1,56	0,42	0,25	0,31	0,82	0,42	1,04	0,80	
Ethyl octanoate	Frukt, gress	0,00	0,00	0,01	0,01	0,19	0,08	0,08	0,13	0,19	0,17	0,05	0,03	0,03	0,06	0,04	0,06	0,04	
Acetoin	Melk, smør	0,51	n.d.	n.d.	n.d.	2,15	1,82	1,22	0,39	3,31	2,16	1,92	1,62	1,15	0,87	2,06	1,55	2,08	
Høyere alkoholer																			
Phenylethyl alcohol	Blomsteraktig, søt, roser, brød Skarp lukt, våt korn	0,10	n.d.	n.d.	0,18	23,12	19,42	23,05	31,46	26,37	48,50	25,38	19,20	21,10	34,26	19,23	45,02	27,09	
2-methyl-1-propanol	eller fiber/nøtter	0,2	0,2	0,2	0,2	14,8	11,3	23,9	26,5	24,7	20,0	14,9	12,1	22,0	31,0	17,9	19,8	10,2	
2-butanol	Vinlignende, mugg	1,00	0,99	1,17	0,40	0,73	0,02	0,03	0,73	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	
1-propanol	Blomster, søt	2,52	1,92	0,54	0,66	7,68	7,25	6,02	11,08	6,40	8,75	7,90	7,37	5,65	11,93	8,87	8,75	9,76	
3-methyl-1-butanol	Røkt, toast	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	113,5	87,5	136,4	151,3	141,3	139,4	116,5	90,4	125,6	165,8	96,8	140,3	98,2	
2-methyl-1butanol	Whisky Blomster,	1,17	0,58	0,52	0,58	24,55	21,60	14,65	29,25	9,00	16,32	25,13	0,02	21,30	31,63	17,24	16,73	18,46	
1-hexanol	frukt	2,54	1,78	4,28	6,38	2,17	1,61	2,43	3,12	3,42	3,02	2,31	0,01	1,18	3,25	3,92	3,15	2,99	
Σ totale komponenter		14,4	10,8	12,2	15,1	220,8	194,6	234,5	287,9	254,5	271,2	223,9	179,9	222,2	312,6	202,0	287,2	219,0	

Vedlegg 7. Oversikt over 33 produserte sider med sensorisk bedømmelse

Sensorisk test med betingelsene skala 1-10.								
Koder	Utseende	Sødme	Syre	Bitterhet	Frukt	Kompleksitet	Ettersmak	Kommentar
AKa	4	1	6	3	3	1	5	Sterk syre og bitterhet, fusel, mye bunfall
AKb	4	1	6	3	3	1	5	Samme
AKc	4	1	6	3	3	1	5	Samme
ASa	5	3	4	4	4	3	4	Syrlig, kjedelig, noe tynn
ASb	5	3	4	4	4	3	2	Samme
ASc	5	3	4	3	4	3	2	Samme
ASd	6	3	4	3	5	4	4	Noe syrlig,
ASe	7	4	3	1	5	5	5	OK, smakte ikke mugg
BKa	7	5	3	2	6	6	4	God smak
BKb	7	6	3	2	8	8	4	Ren smak, god
BKc	7	6	3	2	8	6	6	Mer smak og ettersmak
BKd	8	8	3	3	8	6	8	Kompleks, ettersmak, noe søt
BKe	8	7	2	2	8	6	7	Eplejuice
CKa	6	4	3	2	6	3	2	God, men tynn
CKb	6	4	3	2	6	4	2	Samme
CKc	6	5	2	1	5	4	2	Samme
CKd	6	5	2	2	4	3	2	Vann, filter
BSa	2	2	1	1	1	1	1	Ødelagt
BSb	6	4	3	3	6	5	4	Ren smak av frukt noe svak
BSc	6	4	3	3	7	5	4	Ren smak av frukt noe svak
BSe	7	4	4	2	5	7	5	Brandy
DKa	4	3	4	4	4	4	2	Kjedelig og noe tørr
DKb	4	3	3	3	4	2	3	Noe syrlig
DK, Cascade	2	4	4	4	3	3	2	Noe bitter og lite fruktig,
DKc	2	5	2	2	4	4	1	Noe kjedelig og tørr, lite fruktig
DKC, steril	3	3	3	1	2	2	1	Fremtredende smak av filter
DKd	7	5	3	3	4	3	3	Noe kjedelig og tørr, lite fruktig
DK, Amarillo	5	3	4	5	4	3	4	Kjemikalier, besk
DK, Saaz	5	3	4	5	2	3	4	Sterk syre og bitterhet, fusel
Blanding	5	5	3	3	4	4	3	God, men før tørr
AAKa	6	6	3	3	4	3	1	Kokt eple, kjedelig, overmoden
AAKb	6	5	3	3	4	3	1	Samme
AAKc	6	5	3	3	4	3	3	Samme

Vedlegg 8. Beskrivende test for sidersmaking

Du skal gradere nivået til egenskapene ved bruk av en skala som går fra 1-10.

- 1= ingen fylde, sødme eller ettersmak
- 10 = veldig /utrolig bitter, søt eller syrlig

Begynn å vurdere prøvene fra høyre til venstre og bedøm en prøve av gangen før du begynner på en ny. Egenskapene beskrives med **et tall** (ikke ord) i hver kolonne.

Skyll munnen med vann og spis litt tørr kjeks mellom hver prøve.

NB. Vær spesielt oppmerksom på at du vurderer riktig kode. Glassene er merket.

Kode	Utseende (visuelt)	Sødme	Syre	Bitterhet Astrigens (munn- utørkende)	Frukt, Blomst	Kompleksitet (Kropp: fylde)	Ettersma k	Merknad

Tusen takk for deltagelsen. Elizabeth Rose Skottheim

Vedlegg 11. Oversikt over flyktige komponenter i DK-fatene.

Koder Flyktige komponenter	Dk-fatene, mg/L.		
	DKa, SI	DKb, SI	DKc, SI
Acetaldehyde, mg/L	19,986	16,380	7,574
Acetone, mg/L	0,325	0,471	0,379
1-propanol, mg/L	10,208	9,018	7,018
2-butanol, mg/L	0,000	0,024	0,000
Ethylacetate, mg/L	19,827	29,821	25,122
2-methyl-1-propanol, mg/L	10,016	9,301	40,154
Acetoin, mg/L	0,000	1,173	3,483
3-methyl-1-butanol, mg/L	97,484	99,524	224,025
2-methyl-1butanol, mg/L	21,403	12,985	15,790
Isobutyl acetate, mg/L	0,040	0,045	0,129
Butyl acetat, mg/L	0,793	0,923	0,791
1-hexanol, mg/L	3,191	3,160	3,091
Isoamyl acetate, mg/L	1,975	3,190	6,661
Ethyl hexanoate,mg/L	0,613	0,572	0,580
Hexyl acetat,mg/L	0,829	1,363	0,927
Phenylethyl alcohol,mg/L	21,816	42,127	71,124
Ethyl octanoate,mg/L	0,053	0,060	0,061
Beta-citronellol, mg/L	0,011	0,019	0,015
Σ flyktige komponenter	208,570	230,156	406,924



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway