



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp
Fakultet for kjemi og bioteknologi

Effekt av eple-sort og gjærtype på produksjon av smak og aromakomponenter i sider

Effect of apple variety and yeast on the production
of flavors and aroma compounds in cider

Sofie Mejdell Rokstad
Matvitenskap, produksjon og utvikling (KBM)

Sammendrag

Sider er et resultat av fermentert epleråstoff, der mange biokjemiske prosesser påvirker de organoleptiske egenskapene i sluttproduktet. Samspillet mellom gjær og epleråstoffet er avgjørende for produsere karakteristiske og smakfulle sider, som fremmer ønsket aroma med en balanse av sødme, bitterstoff (tannin) og syre. To eplesorter, Aroma og Mutsu ble presset til eplejus og fermentert med tre forskjellige gjærtyper under like betingelser. Det resulterte i 6 forskjellige sidervarianter. Disse ble videre tilsatt sukker eller honning før sekundærfermentering for å fremme sødme og kullsyre i sluttproduktet og ga ytterligere 6 nye sidervarianter.

Hensikten med oppgaven var å studere forskjeller og likheter i produksjonen av smaks og aromakomponenter i de ulike sidervariantene, som resultat av eplesort og/eller gjærtype. I tillegg var det ønskelig å studere effekten på innholdet av flyktige komponenter og polyfenoler som følge av sider tilsatt sukker sammenlignet med honning.

Fermenteringsprosessen ble fulgt daglig gjennom brix målinger frem til endringen av oppløst tørrstoff avtok ved dag 9. Det ble tatt ut prøver av begge eplejustypene før fermentering og av alle sidervariantene etter tilsats av sukker/honning. Innholdet av frie aminosyrer, karbohydrater, organiske syrer, flyktige komponenter, polyfenoler og L-epletsyre ble bestemt gjennom ulike analysemetoder.

Resultatene fra analysene viste noen forskjeller i forekomst av enkelte biokjemiske komponenter for de ulike eplejustypene og sidervariantene. De mest fremtredende og viktige flyktige komponentene som økte fra eplejus til ferdig sider for samtlige av variantene var etyl acetat, isobutyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, etyl octanoat og 3-metyl-1-butanol.

Disse forbindes med fruktig-, blomsteraktig, alkohol- og søtligaroma og er viktig for sluttkvaliteten i sider. Blant polyfenolene økte innholdet av (+)-catechin, phloretin, koffeinsyre og quercetin i samtlige av sidervariantene, som følge av fermentering.

Klorogensyre var den mest vesentlige polyfenolen i alle sidervariantene, men forekom i høyere konsentrasjon i eplejus. Innholdet av de fleste de analyserte organiske syrene økte fra eplejus til ferdig sider. Det ble funnet signifikante forskjeller i forekomsten av enkelte komponenter som følge av eplejusvariant og gjærtype. Sidervariantene som ble tilsatt honning fikk påvist noe høyere konsentrasjon av etyl acetat, etyl octanoat, phloretin, koffeinsyre og quercetin, og noe lavere innhold av isobutyl acetat, isoamyl acetat og phloredzin, sammenlignet med tilsvarende sidervarianter tilsatt sukker.

Abstract

Cider is a result of fermented apples, where many biochemical processes affect the organoleptic properties of the final product. The interaction between yeast and apples is crucial for the production of distinctive and tasteful ciders, which promote the desired aroma with a balance of sweetness, bitterness (tannin) and acidity. Two apple varieties, Aroma and Mutsu, were pressed into apple juice and fermented with three different types of yeast under equal conditions. This resulted in 6 different cider varieties. These were added sugar or honey before secondary fermentation to promote sweetness and carbonation in the final product, which resulted in 6 new cider varieties.

The purpose of the master thesis was to study differences and similarities in the production of flavors and aroma components in the different cider varieties, as a result of apple variety and / or yeast type. In addition, it was desirable to study the effect on the content of volatile components and polyphenols as a result of added sugar compared with honey.

The fermentation process was followed daily through brix measurements until the change in dissolved solids decreased after 9 days. It was taken measurements of both apple juices before fermentation and of all the cider varieties after the addition of sugar / honey. The content of free amino acids, carbohydrates, organic acids, volatile components, polyphenols and L-malic acid were determined through various analytical methods.

The results from the analyzes showed some differences in the occurrence of certain biochemical components for the different apple juice types and cider varieties. The most predominant and important volatile components that increased from apple juice to finished ciders for all of the varieties were ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and 3-methyl-1-butanol. These are associated with fruity, floral, alcohol and sweet aromas and are important for the final quality of ciders. Among the polyphenols, the content of (+) - catechin, phloretin, caffeic acid and quercetin increased in all of the ciders, as a result of fermentation. Chlorogenic acid was the most important polyphenol in all the cider varieties, but occurred in higher concentrations in apple juices.

The content of most of the analyzed organic acids increased from apple juice to finished cider. Significant differences were found in the occurrence of certain components as a result of the apple juice variant and yeast type. The cider varieties which was added honey showed a slightly higher concentration of ethyl acetate, ethyl octanoate, phloretin, caffeic acid and quercetin, and lower content of isobutyl acetate, isoamyl acetate and phloredzin, compared with similar cider varieties that where added sugar.

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende del av Mastergrad i Matvitenskap, med retning produksjon og utvikling av næringsmidler. Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og er gjennomført med tillaging av sider høsten 2020, mens analysene ble utført våren 2021.

Jeg vil takke alle som har hjulpet meg på veien til å fullføre masterstudiet. En ekstra takk til min hovedveileder Trude Wicklund som har hjulpet meg underveis i gjennomføringa av oppgaven. Jeg vil også rette en takk til min tilleggsveileder Siv Fagertun Remberg.

Tusen takk til Kari Olsen for god veiledning og utførelse av analyser i forbindelse med min oppgave.

Moss 15.juni 2021

Sofie Mejdell Rokstad

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	1
Abstract	2
Forord	3
2.0 Teori	7
2.1 Siderproduksjon	7
2.2 Epler	7
2.2.1 Generelt om epler	7
2.2.2 Klassifisering av siderepler	8
2.3.0 Biokjemiske komponenter i epler	8
2.3.1 Nitrogenholdige komponenter og aminosyrer i epler	8
2.3.2 Karbohydrater	10
2.4.0 Honning	10
2.4.1 Honningens sammensetning.....	10
2.5.0 Sideprosessen	11
2.5.1 Høsting og modning.....	11
2.5.2 Sortering, knusing og pressing.....	12
2.5.3 Mulige tilsetninger før fermentering.....	13
2.5.4 Gjærtype	13
2.5.5 Fermentering	14
2.5.6 Malolactic fermentering.....	14
2.5.7 Omstikking, flasking og lagring.....	15
2.6.0 Mikroorganismer og metabolisme	15
2.6.1 Gjær	15
2.6.2 Næringsbetingelser for gjær	16
2.6.3 Karbohydratmetabolisme hos gjær	17
2.7.0 Smaks og aromakomponenter i sider	18
2.7.1 Estere	19
2.7.2 Høyere alkoholer	20
2.7.3 Terskelverdier for relevante flyktige komponenter	20
2.7.4 Organiske syrer.....	22
2.7.5 Fenoler.....	23
2.7.6 Polyfenoler.....	24
2.8.0 Kjemiske analyser	26

2.8.1 Bestemmelse av frie aminosyrer, organiske syrer, karbohydrater og polyfenoler med HPLC	26
2.8.2 Bestemmelse av flyktige komponenter med HCGC	26
2.8.3 Bestemmelse av L-Malic acid innhold ved hjelp av UV-metoden	27
3.0 Materialer og metoder	27
3.1 Råvarer	27
3.1.2 Gjær	27
3.1.3 Honning.....	28
3.2 Beskrivelse av sider produksjon.....	28
3.3 Kjemiske analyser	31
3.3.1 Analyse av alkoholinnhold med Anton Paar	31
3.3.2 Brix	31
3.3.3 Analyse av flyktige komponenter med Headspace Gas Chromatography (HSGC)	32
3.3.4 Analyse av organiske syrer og karbohydrater (HPLC)	33
3.3.5 Analyse av frie aminosyrer (HPLC).....	35
3.3.6 Analyse av polyfenoler (HPLC).....	37
3.3.7 Analyse av epleesyreinhold	38
3.3.7 Databehandling og statistiske analyser.....	40
4.0 Resultater	41
4.1 Brix utvikling før og under fermentering	41
4.2 Frie aminosyrer HPLC	42
4.3 Karbohydrater HPLC	43
4.4 Organiske syrer HPLC	44
4.5 Flyktige komponenter HCGC	45
4.5.1 Karbonyler og svovelforbindelser	46
4.5.2 Ester	47
4.5.3 Høyere alkoholer.....	49
4.5.4 Enveis- og toveis ANOVA for flyktige komponenter.....	50
4.6 Polyfenoler HPLC.....	53
4.6.1 Polyfenoler	53
4.6.2 Enveis- og toveis ANOVA for polyfenoler.....	55
4.7 Anton Paar analyse.....	56
4.8 Innhold av L-Malic acid ved UV-metoden	57
5.0 Diskusjon	58
5.1 Brix	58
5.2 Aminosyrer.....	59
5.3 Karbohydrater	61
5.4 Organiske syrer	63
5.4.1 L-epleesyreinhold gjennom UV-metoden	63
5.4.2 Organiske syrer detektert med HPLC	64
5.5 Flyktige komponenter	66
5.5.1 Høyere alkoholer.....	67
5.5.2 Ester	70
5.5.3 Karbonyler og svovelforbindelser.....	74
5.6 Polyfenoler.....	75

5.7 Anton Paar (alkoholinnhold)	80
6.0 Konklusjon	81
7.0 Kilder	83
8.0 Vedlegg	90
<i>Vedlegg 1</i>	90
<i>Vedlegg 2</i>	91
<i>Vedlegg 3</i>	92
<i>Vedlegg 4</i>	93
<i>Vedlegg 5</i>	94
<i>Vedlegg 6</i>	98
<i>Vedlegg 7</i>	98
<i>Vedlegg 8</i>	99

2.0 Teori

2.1 Siderproduksjon

Sider har en lang tradisjon som alkoholholdig drikke spesielt i deler av verden som har gode vekstvilkår for epler, og er et resultat av fermentert epleråstoff. England og Frankrike er blant landene som har lang historie med siderproduksjon, etterfulgt av Tyskland, Spania og USA. Det finnes en rekke sidervarianter, disse avhenger som regel av opprinnelsesområde, epleråstoff, gjærtype og produksjonsmetode. Ulike land har sin egen definisjon, som må oppfylles for å kunne kalle det sider (Lea, 2010, s. 12-13), som dermed resulterer i et mangfold av sidervarianter. Der karakteristiske smaker og utseende er avgjørende faktorer som påvirker sluttproduktet. Det finnes en mengde varianter deriblant med og uten kullsyre, grumsete, klare, søte, tørre, syrlig, bitter og ikke minst forskjellen mellom industriell- og tradisjonell sider. Industriell sider kjennetegnes for å ha en kort produksjonsprosess på rundt 2 uker, der glukosesirup, eplekonsentrat, kullsyre og aroma ofte er viktige ingredienser (Lea, 2010). Mens tradisjonell sider fremstilles hovedsakelig ved fermentering av presset eplejus eller kvernet eple med bruk av spontanforekommende gjær eller kulturgjær (Merwin et al., 2008, s. 370). Denne prosessen er ofte mer kompleks og langvarig. Sluttproduktet påvirkes i stor grad av eplesort, gjærtype og produksjonsprosess.

2.2 Epler

2.2.1 Generelt om epler

Epler er en av hovedkomponentene i siderproduksjon. Derfor er valg- og forståelse av epleråstoffet en avgjørende faktor for å oppnå et ønsket resultat. Epler tilhører rosefamilien og har sin opprinnelse i tempererte områder (Lea 2008, s.7). Det finnes mange forskjellige eple sorter, som avhenger fra opprinnelsesområdet. Disse klassifiseres ofte videre som desserteple, mateple og sidereple, basert på bruksområdet (Jolicoeur, 2013, s.17; Merwin et al., 2008, s. 370). Desserteple er sorter tilpasset ferskkonsum. Dette skyldes et høyt innhold av løselig tørrstoff (hovedsakelig sukkerarter), lavt innhold av syre og polyfenoler, samt karakteristisk aroma (Merwin et al., 2008, s. 370). Mateple innebærer sorter tilpasset prosessering og matlaging, som gir viktige teksturelle egenskaper. I tillegg har de et lavere innhold av sukker og høyere innhold av syre sammenliknet med dessertepler. Siderepler omfatter sorter spesielt tilpasset produksjon av fermentert epleråstoff. De kjennetegnes for å ha et høyt innhold av polyfenoler (taniner), som gir de en kompleksitet og munnfølelse, en viktig faktor i smaksopplevelsen til sider (Merwin et al., 2008, s.370). Innholdet av

polyfenoler tilfører anstringens (tørrhet) og bitter smak, som gjør siderepler dårlig egnet til ferskkonsum.

2.2.2 Klassifisering av siderepler

Det er vanlig å blande flere eplesorter for å oppnå en sider med ønsket forhold mellom syre (gir skarp smak), sødme, alkoholinnhold og polyfenoler (tannin)(Merwin et al., 2008, s.370). Siderepler klassifiseres ofte i ulike grupper basert på forholdet mellom syre, sødme og polyfenoler (Buglass, 2011, s.233). De fire vanligste kategoriene med siderepler tar utgangspunkt i EUs klassifisering som baserer seg på innhold av titrert syre som epletsyre (TA) og totalt fenol innhold (TPC). Klassifiseringen av sidereplene er presenter i tabell 2.1.

Tabell 2.1. Klassifisering av siderepler basert på % vekt/volum titrert syre (TA) og totalt fenol innhold (TPC)

Klasse	TA (% w/v)	TPC (% w/v)
Sharp	>0,45	<0,20
Bitter-sharp	>0,45	>0,20
Bitter-sweet	<0,45	>0,20
Sweet	<0,45	<0,20

(Buglas, 2011. s.233)

2.3.0 Biokjemiske komponenter i epler

Epler består av en rekke biokjemiske komponenter deriblant aminosyrer, karbohydrater, organiske syrer, fenoler og polyfenoler. Sammensetningen av disse komponentene i epler varierer som følge av blant annet eplesort, miljøforhold, terroir (geografiske betingelser), dyrkningsmetoder, miljøbetingelser, lagring og modning (Lea, 2008; Jolicoeur, 2013). Organiske syrer, fenoler og polyfenoler er beskrevet under avsnitt 2.7.0.

2.3.1 Nitrogenholdige komponenter og aminosyrer i epler

Hovedgruppen av nitrogenholdige komponenter i epler er proteiner, løselig nitrogen og aminosyrer (Jolicoeur, 2013, s. 192). Proteiner omfatter en klasse nitrogenholdige kilder som ikke kan forbrukes av gjær, i tillegg kan de være med på å gi uklar sider (Buglas, 2011, s. 237). Gjær er avhengig av nitrogenholdige kilder for vekst og formering. Aminosyrer og ammoniumioner utgjør den viktigste, naturligforekommende nitrogenkilden til gjær i eplejus

(Ma et al., 2018, s.467). Hvorav frie aminosyrer omfatter den mest vesentlige bestanddelen. Ofte defineres disse nitorgenkildene som gjær assimilert nitrogen (YAN) og utgjør de løselige nitrogenfraksjonene, som gjær metaboliserer under fermentering (Dos santos et al., 2015, s. 1171). Innholdet og sammensetningen av YAN omfatter en vesentlig faktor for fermenteringshastigheten, produksjonen av flyktige komponenter- samt den mikrobielle stabiliteten i sluttproduktet. Mangel på YAN i eplejus kan føre til treg og ufullstendig fermentering og følgelig produksjon av uønskede svovelforbindelser (Ma et al., 2018, s.467). Sammensetningen av aminosyrer i eplejus er viktig ettersom enkelte komponenter foretrekkes av gjær, samt er viktige forløpere i dannelsen av flyktige komponenter. Typisk blir aminosyrer metabolisert i følgende rekkefølge arginin → serin → glutaminsyre → theronin → asparaginsyre og lysin (Ma et al., 2018, s.467). Ved å tilsette asparaginsyre og glutaminsyre i eplejus før fermentering, kan det resultere i produksjon av estere som fremmer fruktig aroma til sluttproduktet (Ma et al., 2018, s. 467). Mens tilsats av metionin kan redusere hydrogensulfidproduksjonen som oppstår under fermenteringsprosessen, og følgelig vil bedre de sensoriske egenskapene til sluttproduktet (Ma et al., 2018, s. 467).

Innholdet av YAN i epler påvirkes av flere faktorer deriblant, bruk av gjødsel/ikke bruk av gjødsel, terroir (geografiske betingelser), sort, miljøbetingelser, lagring og modning (Ma et al., 2018, s. 467; Jolicoeur, 2013, s.191-193; Merwin et al., 2008, s. 377). Nitrogen er regnet som en begrensende faktor for *Saccharomyces* arter. YAN påvirker fermenteringen, ved lavere enn 75mg/L kan fermenteringen stoppe opp eller gi uklar sider (Dos santos et al., 2015, s. 1171; Merwin et al., 2008, s. 377). I industrien er det ønskelig med et høyt innhold av de viktigste nitrogenholdige næringskildene for gjær (aminosyrer, ammoniumsalter, og thiamin). Dette vil gi en rask og fullstendig fermentering. Imidlertid oppnås oftest best sluttkvalitet med aromatiske og smaksrike sidere, dersom fermenteringen foregår sakte. I slike tilfeller er det ikke ønskelig med for høyt innhold av YAN i eplejus.

Epler inneholder generelt lave mengder aminosyrer. Nitrogeninnholdet i epler varierer fra 27-574 mg/L, der aminosyrer omfatter rundt 20% (Dos santos et al., 2015, s. 1171).

Aminosyrene som vanligvis forekommer i størst konsentrasjon i epler er asparagin, asparaginsyre og glutaminsyre (Buglas, 2011, s. 237; Ma et al., 2018, s.468). Tilsammen med serin og prolin utgjør de mellom 86-95% av den totale mengden aminosyrer i epler (Dos santos et al., 2015, s. 1171). Aminosyrer er viktige forløpere og mellomprodukter i syntese av flyktige komponenter (Dos santos et al., 2015, s. 1171; Buglas, 2011, s. 237; Ma et al., 2018,

s.468). Når aminosyrer brytes ned er hovedproduktene høyere alkoholer, som videre er viktige forløpere og mellomprodukter i produksjonen av estere (Dos santos et al., 2015, s. 1171).

2.3.2 Karbohydrater

De mest forekommende karbohydratene i epler er monosakkarider og disakkarider, der mesteparten er fermenterbart for gjær. De vanligste karbohydratene utgjør fruktose (7-11%), sukrose (2-4,5%) og glukose (1,5-3%) (Merwin et al., 2008, s. 382; Jolicoeur, 2013, s.154). Innholdet av løselige sukker er direkte knyttet til den totale alkoholemengden (etanol) som gjær produserer under en komplett fermentering. I tillegg inneholder epler ikke fermenterbare suktermolekyler, deriblant sorbitol (søtningmiddel), som tilfører sødme til sluttproduktet (Jolicoeur, 2013, s.155). Epler inneholder både stivelse og pektin.

2.4.0 Honning

Honning består hovedsakelig av en sammensetning av plantenektar som er samlet av honningbier. Nektaren bli tilsatt ulike enzymer som spalter komplekse suktermolekyler til glukose og fruktose (McHugh, 2017). Videre tørkes nektaren ned til en vannprosent under 20. Resultatet er honning med forskjellige sensoriske karakteristikker og ulik sammensetning avhengig av nektarkildene biene benytter. Bier kan også produsere honning av silørsaft som siver ut når bladlus punkterer planter (Norges birøkterlag, 2019). Denne prosesseres og tørkes ned på samme måte som honning av plantenektarkilder. Resultatet er lusehonning med en annen sammensetning (Kirkevold, 2016, s. 302-303).

2.4.1 Honningens sammensetning

Honning inneholder hovedsakelig ulike mengder glukose, fruktose og vann. I tillegg inkluderer det blant annet små mengder proteiner, mineraler, organiske syrer, antioksidanter og vitaminer (Subramanian et al., 2007, s.127). Det er hovedsakelig denne gruppen som utgjør den største rollen i å skille de ulike honningtypene fra hverandre med henhold til smak, farge, konsistens og lukt (Kirkevold, 2016, s.300). De mest dominerende suktermolekylene som finnes i honning er presentert i tabell 2.2

Tabell 2.2. Fordeling av sukkerarter i prosent (%) i honning.

Suktermolekyl	%
Glukose	28-35 ¹²

Fruktose	34-45 ¹²
Maltose	7,1 ¹
Sukrose	1-2 ¹
Andre sukkerarter	1,5 ¹

¹(Honning, 2019; ²McHugh, 2017)

Honning inneholder polyfenolforbindelser, hovedsakelig fenolsyrer og flavonoider. Disse er viktige termotabile komponenter som innehar antioksidant egenskaper, deriblant bakteriedrepende, betennelsesdempende, allergivennlig, antikoagulerende, og kreftdempende effekt. Polyfenolinnholdet i honing er ofte korrelert med fargen, der mørkere farge assosieres med høyere innhold av polyfenoler. (Dzukan et al., 2018, s.1-2).

Honningens kjemiske sammensetning (flyktige komponenter, karbohydrater, fytokjemikalier , fysiske egenskaper (farge, tekstur, pH), aroma og smak påvirkes i stor grad av nektarkildene biene benytter, geografiske områder, klima, prosessering og honningbiearter (honning, 2019; Dzukan et al., 2018).

2.5.0 Sideprosessen

Produksjonsprosessen og valg av epler samt gjær har stor betydning for sider. Underveis i prosessen er det mange faktorer som påvirker dannelsen av flyktige- smaksrike- og aromatiske komponenter, som er med på å definere sluttproduktet. Det finnes ulike-, ofte geografiske preferanser for hvordan sideren skal være med henhold til blant annet smak og utseende. Ofte er det ønskelig med en smakfull og aromatisk sider der en oppnår ønsket balanse mellom syrlighet, bitterhet og sødme.

2.5.1 Høsting og modning

Epler som brukes til produksjon av sider høstes som regel når de er modne. Ofte kan det være ønskelig å lagre eplene i et kjølig rom før kverning og pressing. Ved modning av epler blir mer stivelse omgjort til fermenterbart sukker, samtidig som smakskomponenter dannes (Lea, 2008, s. 42). Pektin blir brutt ned, og de assimilerbare nitrogenfraksjonene (YAN) blir redusert som følge av proteinsyntese (Jolicoeur, 2013, s.193), samt at fordamping gjennom skallet oppkonsentrerer fraksjonene i eplene. I tillegg blir fruktkjøttet mykere, som gjør de lettere å presse.

2.5.2 Sortering, knusing og pressing

Epler bør kvalitetsjekkes og vaskes før kverning og pressing. Da utsorteres råttent frukt samt urenheter og smuss. Droppes dette trinnet kan det påvirke den mikrobielle- og sluttkvaliteten i sideren (Lea & Piggot, 2003, s.66). Normalt gjøres dette i et vannbad, der vil friske epler flyte mens urenheter og råttent frukt synke til bunn (Jolicoeur, 2013, s.17).

En kvern er flittig brukt for å ødelegge strukturen i fruktkjøttet og dermed tilrettelegge før pressing. Det finnes forskjellig utstyr for å kverne eplene, som påvirker graden av hvor finmalt/grovmalt eplemassen blir. Graden av maling påvirker det potensielle jusutbytte som oppnås under pressing. Ofte er det ønskelig med en mellomting, ikke for fint slik at det tetter filteret i pressa, men heller ikke for grov som resulterer i lavere jusutbytte (Jolicoeur, 2013).

Avhengig av siderprosess, kan den kvernete eplemassen hvile noen timer før pressing, gjennom en prosess som kalles maserering. Da vil de naturligforekommende enzymene i eplemassen degradere pektinet og gjøre det mer løselig. Spesielt er Pektin metyl esterase relevant enzym i dette trinnet, som reagerer med pektin ved å fjerne metylgrupper (Lea & Piggot, 2003, s. 66). Det gjør pressingen lettere. I tillegg interagerer polyfenol oksidase (PPO) med taninene (polyfenol) ved tilstedeværelse av luft, som fører til produksjon av løselig farge (Lea & Piggot, 2003, s.66). Vedvarende oksidering av polyfenoler vil gi redusert innhold av løselige polyfenoler samt farge i eplemassen, som resulterer i mildere taniner og bedrer fargen (Lea & Piggot, 2003, s.66).

Ofte blir kvernet eplemasse presset direkte uten maseringstrinnet. Under pressing skilles eplejus fra resten av eplemassen. Det kan brukes forskjellige typer presser, som baserer seg på ulike prinsipper, men resulterer med jus adskilt fra resten av massen. Det prosentvise utbytte avhenger av flere faktorer deriblant siderprosessen, epleråstoffet og eventuell tilsats av andre komponenter som kan bedre utbyttet.

Sukkerinnholdet i eplejus kan måles med et refraktometer eller hydrometer. Det gir en god indikasjon på den potensielle alkoholprosenten sluttproduktet ender opp med. Ved et hydrometer blir specific gravity (SG) målt og tallet kan sammenlignes med tilgjengelig tabell for tilsvarende produkt. Brix (oppløst tørrstoff) måles med et refraktometer. Sukkerinnholdet i eplene påvirkes i stor grad av været (solintensitet og temperatur) (Lea, 2008, s.57).

pH er en annen faktor som kan påvirke sluttproduktet og er vesentlig å kontrollere tidlig i prosessen. Ønsket pH ved siderproduksjon er mellom 3,3-3,8 (Lea, 2008, s.59). Ved høyere pH kan det føre til mikrobiell infeksjon som resulterer i uønsket smak, mens lavere pH vil gi en skarp smak (Lea, 2008, s.59).

Keeving er en annet trinn i siderprosessen som kan være aktuelt i enkelte produksjonsprosesser. Når ferdigpresset eplejus lagres ved rundt 5°C, vil PME aktiviteten fortsette, samtidig som at mange av de naturligforekommende gjærcellene holdes i en deaktivert tilstand (Lea & piggot, 2003, s. 67). I løpet av noen dager, vil de-metylert pektin anino interagere med kationer fra eplejusen og danne en gel som stiger til toppen, samtidig som at noe vil bunnfelle (Lea & piggot, 2003, s. 67). Forekommer denne prosessen riktig, så vil den resterende eplejusen bli klar.

2.5.3 Mulige tilsetninger før fermentering

Det kan være aktuelt å tilsette ulike komponenter til eplejusen før fermentering for å bedre sluttproduktet. Eplejus har generelt et lavt innhold av gjærnæring. Derfor kan det være nødvendig å tilsette en rekke komponenter for å tilfredsstille gjærcellenes krav, deriblant vitaminer og nitrogenholdige kilder som er avgjørende for funksjon og vekst. For å hindre uklar sider, kan det være aktuelt å tilsette pektolytiske enzymer som bryter ned pektin (Lea, 2008, s.60). Svoveldioksid (SO₂) kan tilsettes for å hemme samt drepe den uønskede floraen med mikroorganismer som finnes naturlig i eplejus. Det vil fremme vekst av de ønskede gjærtypene under fermenteringen, deriblant *Saccharomyces cerevisiae* (Lea & Piggot, 2003, s.69).

2.5.4 Gjærtype

Valg av gjærtype og eventuell gjæringsmetode har en stor innvirkning på produksjon av smaksrike og aromatiske sider. Vanligvis skilles det mellom bruk av villgjær og kulturgjær. Bruk av villgjær fører til en spontan fermentering, der de naturligforekommende gjærtypene fra omgivelsene og eplene påvirker prosessen. I starten domineres den av mange forskjellige mikroorganismer. Etterhvert som alkoholprosenten øker, så tar de alkoholtolerante organismene over. Spontangjæret sider kan resultere i smaksrike- og aromatiske sider. Imidlertid oppleves denne metoden som uforutsigbar og krevende, ettersom variasjonen av mikroorganismer som påvirker sluttproduktet er stor (Lea, 2008, s.64). Det kan ofte resultere i

produksjon av uønskede smakkomponenter som gjør sideren lite tiltrekkende. Ved bruk av kulturgjær er stammer av *Saccharomyces* vanligst (Lea, 2008, s.64). Det resulterer ofte i kontrollert fermentering med forutsigbart sluttprodukt.

2.5.5 Fermentering

Fermenteringen foregår normalt etter et kjent mønster som kan deles inn i fire faser; lagfase, logfase, stasjonærfase og dødsfase. Lagfase er første del av fermenteringsprosessen, der gjær aktiveres og tilvenner seg det nye mediet. Denne fasen bør foregå aerobt og under kontrollerte betingelser ettersom gjær er avhengig av oksygen til syntetisering av viktige komponenter, hovedsakelig steroler og umettede fettsyrer. Disse komponentene er viktige vekstfaktorer for den økte biomasseproduksjon i neste fase, samtidig som det gjør cellemembranen mer gjennomtrengelig for produkter i fermenteringsprosessen. Glykogenlageret forbrukes av gjærcellene i denne fasen før cellemembranen er ferdigtilpasset fermenteringsprosessen.

Logfasen omfatter eksponentiell vekst av gjærceller, og celledetallet øker kraftig. I denne prosessen forbrukes suktermolekyler som omdannes til etanol og karbondioksid. Energi frigis som varme. Næringsstoffer som nitrogen og aminosyrer forbrukes også i reproduksjonstrinnet. I denne fasen dannes det mange smaks- og aroma komponenter som biprodukt fra cellevekst.

Under stasjonær fase vil celledetallet ha nådd sitt maksimum og veksten avtar som følge av mangel på essensielle næringsstoffer, som aminosyrer, vitamin og mineraler (Merwin et al., 2008, s. 370). Mengden gjærceller som produseres er lik mengden som dør. Gjærcellene begynner å aggregere (flokkulere)

Når dødsfasen oppstår så er næringen og oksygen oppbrukt samtidig som at avfallsstoffer opphopes. Dette fører til at gjærcellene fortsetter å aggregere (flokkulere) og sedimenterer i bunn sammen med blant annet uønskede komponenter.

(Lea & Piggot, 2003, s.30-33)

2.5.6 Malolactic fermentering

Siderprosessen gjennomgår ofte malolactic fermentering. Hovedgruppen organismer som er relevant for malolactic fermentering er heterofermentative *Leuconostoc oenos* og noen grupper av *Lactobacillus* samt *Pedicoccus* (Lea & Piggot, 2003, s. 72). Malolactic

fermentering fremskyndes av mangel på sulfitt under fermentering og lagring, samt frigjørelse av næringsstoffer gjennom autolyse av sedimenterte gjærceller. Hovedsakelig blir malic acid (eplesyre) de-karboksyliert til melkesyre og karbondioksid dannes under denne prosessen (Lea & Piggot, 2003, s. 72). Resultatet er en runder- og mindre syrlig smak (Lea, 2008, s.73). Imidlertid vil lav pH inhibere malolactic fermentering, som resulterer i at de sidervariantene med lavest pH, sjelden gjennomgår denne prosessen. Samtidig vil malolactic fermentering ofte forekomme i sider som allerede har en litt høy pH, som kan resultere i ytterligere økning i pH og dermed fremme uønsket vekst av mikroorganismer.

2.5.7 Omstikking, flasking og lagring

Når fermenteringen er ferdig, blir sideren overført til en ren beholder for å fjerne døde gjærceller som har sedimentert på bunnen av karet. Denne prosessen kalles omstikking.

Videre kan det være aktuelt å tappe sider over i tilpasset emballasje. Noen ganger kan det være nødvedig å tilsette sukker, honning eller andre søtningsmidler. Denne prosessen kalles kapitalisering og resulterer i sekundær fermentering, som gir økt alkoholprosent samt karbondioksid (Lea, 2008,s.83). Andre tilsetninger kan også være aktuelt avhengig av siderprosess.

Ferdig tappet sider kan gjøres lagringsstabil blant annet med varmebehandling, tilsetning av enkelte kjemiske stoffer, emballering i vakuum eller senke pH (Lea & Piggot, 2008, s. 79-80).

2.6.0 Mikroorganismer og metabolisme

2.6.1 Gjær

Gjær er en encellet sopp som består av over 700 arter. Kun et fåtall benyttes i alkoholproduksjon. *Saccharomyces cerevisiae* er en av de mest benyttede gjærtypene i matindustrien. De mangler klorofyll og kan dermed ikke generer energi via fotosyntesen. Derfor livnærer de seg på komplekse næringsstoffer, som kan metaboliseres med eller uten oksygen (Aerob: med oksygen. Anaerob: uten oksygen). Hver gjær-celle har en membran innkapslet rundt kromosomet. Formeringen foregår hovedsakelig med aseksuell knopp-skyting, der morcellen utvikler en identisk datter-celle. Under næringsmangel kan seksuell reproduksjon (meiose) trigges med produksjon av askosporer. Dette fører til produksjon av fire haploide kjerner som er innkapslet i hver sin stressresistente askospore.

Gjærcellene inneholder cellevegg og cellemembran og omslutter cytoplasma som inneholder organeller med viktige funksjoner. Cellemembranen har en viktig funksjon som selektiv barriere der kun kontrollert transport av spesifikke stoffer kan foregå inn og ut av cellen. Dette er en avgjørende faktor for fermenteringen, der næringsstoffer som sukker slipper inn og avfallsstoffene karbondioksid og etanol trenger ut. Cellemembranen består av fosfolipider som danner en hydrofil og hydrofob del med kanaler av membranproteiner, med viktig funksjon fra andre proteiner, karbohydrater og steroler. Optimal funksjon av cellemembranen er avgjørende for fermenteringsprosessen deriblant flokkulering og frigjørelsen av metabolske produkter fra cellen som tilfører viktig smak til produktet. (Buglas, 2011, s. 72-73; Lea & Piggot, 2003, s. 25-26).

Gjær er ansvarlig for produksjon av en rekke aroma- og smakskomponenter som dannes under fermentering og er en viktig bidragsyter for sluttproduktet (Lea & Piggot, 2003, s. 71).

2.6.2 Næringsbetingelser for gjær

Gjær er normalt fakulativt anaerob og trives best med tilgang på oksygen, men tolererer oksygenfrie forhold, som resulterer i fermentering og alkoholproduksjon. De er kjemoorganotrofe organismer med relativt enkle næringsbehov. Det skyldes den manglende evnen til å generere energi gjennom fotosyntese, som derfor krever eksterne karbonkilder i form av mindre komplekse enheter. Deriblant enkle karbohydrater som monosakkarider (glukose, fruktose, mannose, galaktose), disakkarider (maltose, sukrose, melibiose) og trisakkarider (Raffinose). Gjær innehar hydrolytiske enzymer som bryter ned di- og trisakkarider. I tillegg avhenger næringsgrunnlaget av nitrogenholdige komponenter, uorganiske stoffer (fosfat, svovel klorid, vitaminer (B-vitamin) og sporstoffer (jern, kobber, mangan, natrium, kalium, zink, magnesium) til metabolske forhold.

Nitrogen er ofte en begrensende faktor under fermentering med stammer av *Saccharomyces* (*Saccharomyces spp*). Gjær kan utnytte nitrogenholdige komponenter i form av alle aminosyrer med unntak av prolin og amoniakkforbindelser. Nitrogen er avgjørende for cellevekst og andre viktige reaksjonsveier. (Mervin et.al, 2008 s. 375-376; Buglas, 2011, s. 73-75; Lea & Piggot, 2003, s. 26-27).

2.6.3 Karbohydratmetabolisme hos gjær

Metabolismen til gjær tilfører viktig smaks- og aromakomponenter som er med på å definere sluttproduktet. Gjennom metabolisme av ulike typer karbohydrater så generer gjær energi i form av ATP. Det er en kompleks prosess som inneholder mange reaksjonstrinn med tilhørende enzym. En komplett fermentering starter med et substrat som gjennomgår glykolysen samt andre reaksjonstrinn og resulterer i forskjellige sluttprodukt.

Karbohydratene forbrukes etter et spesifikt mønster der de minst komplekse enhetene metaboliseres først. Monosakkaridene glukose, fruktose, galaktose og mannose forbrukes direkte av gjærcellene og transporteres inn via fasilitert diffusjon gjennom membranproteiner. Mens disakkarider og større molekyler avhenger av spesifikke enzymer som kan spalte til mindre enheter, ofte utenfor cellen, slik at gjærcellene kan nyttiggjøre seg av substratene. Enkelte karbohydrater (eks maltose) krever aktiv transport for å bli nyttiggjort av gjærcellene. Aktiv transport krever energi, og dermed begrenses alkohol produksjonen ofte av glukose og fruktose opptaket. (Lea & Piggot, 2003, s.27)

Den metabolsk reaksjonsveien gjær benytter for bryte ned karbohydrater avhenger av om det er aerobe- eller anaerobe forhold. Aerobt foregår det gjennom cellulær respirasjon, mens anaerobt blir alkohol generert via glykolysen, også kalt Embden Meyerhof Parnas reaksjonsvei (EMP). Reaksjonsveien som benyttes av gjærcellene påvirkes av mengden tilgjengelig substrat og vekstforhold. Begge reaksjonsveiene starter med glykolysen der et glukosemolekyl produserer to pyruvat og samtidig genererer to ATP molekyler. Dette er en katabolsk prosess med hensikt å produsere energi i form av ATP, som er avgjørende for cellefunksjon og vekst. Pyruvat vil videre ta forskjellige reaksjonsveier avhengig av oksygentilgangen. Under aerobe forhold omsettes pyruvat til karbondioksid og acetyl-CoA som videre inngår i krebs syklus. Krebs syklus generer også stoffer som er avgjørende for syntetisering av amino- og nukleinsyre. Tilslutt generes ATP under oksidativ- og substratnivå fosforylering (elektrontransportkjeden). Gjennom en rekke enzymatiske reaksjoner via glykolysen, krebs syklus og elektrontransportkjeden vil et glukosemolekyl resultere i 36 ATP molekyler, under aerobe forhold. Tilstedeværelse av oksygen spiller en viktig rolle som terminal elektron akseptor under respirasjon. Aerob metabolisme vil være mer energieffektivt og øke biomasseproduksjonen. Gjærceller vil kun velge aerob metabolisme i miljøer med lavt sukkerinnhold og tilstedeværelse av oksygen samt under lagfasen der produksjon av vekstfremmende stoffer, som steroler er viktig. I miljøer med høyt sukkerinnhold så forekommer utelukkende anaerob metabolisme. (Buglas, 2011, s. 81)

Under anaerobe forhold foregår alkoholfermentering når pyruvat fra glykolysen dekarboliseres til acetaldehyd og karbondioksid. Deretter reduseres acetaldehyd til etanol. I *Saccharomyces* vil NADH fra glykolysen fungere som et reduksjonsmiddel og dermed redusere acetaldehyd som fungerer som terminal elektron akseptor for etanol. Samtidig blir NADH oksidert til NAD^+ , som er avgjørende for at glykolysen hele tiden kan gjentas under anaerobe forhold. Denne prosessen er avgjørende for å opprettholde en akseptabel redoksbalanse i cellen, og forekommer ettersom mangelen på oksygen gjør det umulig å transformere energien som er lagret i NADH og ADP til ATP uten å redusjon av acetaldehyd. På slutten av fermenteringen vil redoksbalansen ødelegges ved at NADH og NADPH akkumuleres. Netto energiproduksjon ved anaerob glukosemetabolisme er 2 ATP molekyler. Under normal fermentering vil rundt 95% av suktermolekylene konverteres til etanol og karbondioksid, ca 1% til cellulært materiale og omtrent 4% til andre bi-produkter som glyserol, organiske syrer og aromakomponenter. Når gjærceller utfører anaerob metabolisme av karbohydrater, så vil hastigheten av glykolysen økes deretter (opptil 10 ganger vanlig glykolyse under aerobe betingelser) for å opprettholde en energiproduksjon som er tilpasset vekst, til tross for lav ATP produksjon under denne produksjonsretningen (Buglas, 2011, s. 81). Under glykolysen vil rester av karbohydratskjellet bli brukt for å syntetisere molekyler (aminosyrer, lipider,mm) som er avgjørende for cellevekst gjennom anabolisme og biomasseproduksjon. (Buglas, 2011, s. 81-83)

2.7.0 Smaks og aromakomponenter i sider

Sider er et alkoholholdig produkt som inneholder en kompleks og variert blanding av smaks og aromakomponenter dannet under de forskjellige produksjonstrinnene i siderprosessen. I en godt utført fermenteringsprosess så vil mesteparten av sukkeret omdannes til etanol.

Imidlertid forekommer det normalt en lav prosentvis produksjon av biprodukter / andre komponenter. Biproduktene bidrar til ønskede og uønskede kjemiske komponenter som påvirker smaksprofilen i sluttproduktet. Blant annet spiller estere, høyere alkoholer, aldehyder og organiske syrer en viktig rolle. Sammensetningen og konsentrasjonen av biproduktene som produseres under fermenteringsprosessen påvirkes av gjærtype, råstoff, næringstilgang og andre miljøfaktorer, blant annet temperatur (Buglas, 2011, s. 88). De viktigste smaks-og aromakomponentene som dannes under fermentering og påvirker de organoleptiske

egenskapene i sider, er høyere alkoholer, estere og karbonyl komponenter (Herrero et al., 2006, s.210).

2.7.1 Estere

Estere utgjør en viktig andel av hovedklassen smaks- og aromakomponenter i alkoholholdig drikke og produseres normalt i små mengder. Lave organoleptiske terskelverdier for estere hos mennesker gjør de til viktige bidragsyttere i smaksopplevelsen (Suomalainen, 1980, s.296). Flyktige estere bidrar ofte med et stort spekter av aromalignende smaker og lukter, slik som fruktighet, sødme og parfyme (Saerens et al., 2010, s. 165). De viktigste esterene som er relevant for denne oppgaven er presentert i tabell 2.3.

Estere syntetiseres under fermentering med gjær. De dannes gjennom en intracellulær prosess som blir katalysert av acyl transferase. Denne reaksjonen krever energi fra tioester bindingen til acyl-CoA co substrat. Den vanligste acyl- CoA er acetyl-CoA som kan dannes gjennom oksidativ dekarboksylering av pyruvat eller ved direkte aktivering av acetat med ATP. Mesteparten av acyl-CoA blir generert ved acylering av frie CoA , som er katalysert av acyl-CoA syntase gjennom fettsyre syntese. (Renger et al., 1998, s.509: Saerens et al., 2010, s. 167-168).

Esterdannelsen forekommer gjennom en kondensasjonsreaksjon mellom alkoholer som dannes under fermenteringen og fettsyrer bundet til acyl-CoA (Lea & Piggot, 2003, s. 35). De to hovedgruppene av smaks-aktive estere i alkoholholdige drikker er acetat estere og medium kjedet fettsyre (MCFA) etyl ester (Saerens et al., 2010, s. 166). Acetat estere består av acetat (syregruppe) og etanol eller høyere alkoholer (alkoholgruppe). De dannes ved kondensasjonsreaksjon mellom acetyl- CoA og etanol eller høyere alkoholer. MCFA etyl estere består av en medium kjedet fettsyre (syregruppe) og etanol (alkoholgruppe). De dannes ved en kondensasjonsreaksjon mellom acyl-CoA og etanol.

Under normale forhold så blir mesteparten av de organiske syrene brukt til membran biosyntese. Mens under anaerobe forhold kan ikke umettede fettsyrer og steroler syntetiseres som dermed gir mulighet for å utnytte de tilgjengelige organiske syrene i produksjon av estere. Derfor vil faktorer som gir vekstrestruksjoner, deriblant mangel på nitrogen og oksygen, ofte resultere i økt ester produksjon (Lea & Piggot, 2003, s. 35). Produksjonen av ester avhenger av konsentrasjonen til substratene alkohol og acyl-CoA, samt aktiviteten av

enzymene som er involvert i syntese og hydrolyse (Saerens et al., 2010, s. 165). Ester produksjonen er normalt høyest når alkoholproduksjonen er best, under logfasen og den stasjonære fasen (Lea & Piggot, 2003, s. 35).

2.7.2 Høyere alkoholer

Høyere alkoholer, også kalt fusel alkoholer kjennetegnes som kjemiske komponenter med karbonkjeder bestående av 3 eller flere karbonatomer. Produksjon av høyere alkoholer forekommer som et resultat fra to reaksjonsveier med utgangspunkt i karbonskjelettet til aminosyrer. Enten som sekundær metabolitt fra aminosyre katabolisme via Erlich's reaksjonsvei eller som biprodukt fra aminosyresyntese via karbohydratmetabolisme gjennom den anabolske reaksjonsvei (Pietruszka et al., 2010, s. 52). Begge reaksjonsveiene benytter alfa-ketosyre. Erlich's syntesevei foregår i tre reaksjonstrinn, som resulterer i dannelsen av høyere alkoholer. Først fjernes aminogruppen fra aminosyrer ved hjelp av transaminaser og det dannes alfa-ketosyre. Videre blir alfa-ketosyrene dekarboksylert til fuselaldehyd. Fuselaldehyd reduseres til høyere alkoholer. Alfaketo-syre kan også dannes gjennom karbohydrat metabolisme og videre resultere i høyere alkoholer.

Mengden høyere alkoholer og type som produseres avhenger blant annet av vekstforhold og gjærtype. Produksjon av høyere alkoholer stimuleres ofte av økt temperatur, stor mengde inokulert gjær, oksygenering eller ved å bytte ut maltose med glukose (Lea & Piggot, 2003, s.34). De relevante høyere alkoholene for denne oppgaven er presentert i tabell 2.3

2.7.3 Terskelverdier for relevante flyktige komponenter

Smakskomponenter har terskelverdier som definerer muligheten for å kunne lukte eller smake i ulike løsninger. Hver komponent har sin unike terskelverdi som må til for å kunne detektere det. I enkelte tilfeller oppstår det en synergieffekt mellom ulike komponenter som gjør at de kan smakes eller luktes til tross for at de ikke når sin terskelverdig (Buglas, 2011).

Terskelverdier og oversikt over tilhørende sensorisk karakteristikk for relevante flyktige komponenter er presentert i tabell 2.3.

Tabell 2.3. Oversikt over flyktige komponenter med tilhørende sensorisk karakteristikk og terskelverdier oppgitt i mg/L.

Flyktig komponent	Sensorisk karakteristikk	Terskelverdi (mg/l)
Estere		
Etyl acetat	Fruktig, søtt, løsemiddel/neglfjerner ¹	7,5 ^{1a}
Isobutyl acetat	Banan, fruktig, søtt, eterisk ^{2,5}	0,008 ^{2a}
Butyl acetat	Banan, søtt, løsemiddel, aceton ²	0,016 ^{2a}
Isoamyl acetat	Bannan og pære ¹	0,03 ^{1a}
Etyl hexanoat	Eple, fruktig, anisfrø ¹	0,0014 ^{1a}
Etyl heptanoat	Fruktig, parfyme ²	0,22 ^{2a}
Etyl octanoat	Eple, søtt, fruktig, urter, tre ^{1,5}	0,005 ^{1a}
Høyere alkoholer		
1-propanol	Alcohol, skarp, moden frukt ¹	830 ^{1a}
2-metyl-1propanol	Vin, løsemiddel ¹	40 ^{1a}
3-metyl-1-butanol	Alcohol, fruktig, brent, neglelakk ¹	30 ^{1a}
2-mety-1-butanol	Whisky, malt, brent ¹	30 ^{1a}
2-hexanol	Blomster, søt, rose ²	-
1-hexanol	Grønt, nøtteaktig og søt ⁶	0,11 ^{6a}
Karbynyler og svovelforbindelser		
Acetaldehyd	Vannbasert maling, grønne epler, fruktig ³	5 ^{3b}
2-metyl-propanal	Malt ⁴	0,006 ^{4a}
3-metyl-butanal	Malt ⁴	0,0046 ^{4a}
2-metyl-butanal	Kakao ²	0,01 ^{2a}
Hexanal	Grønt, gress ⁴	0,02 ^{4a}
Aceton	Eterisk, kvalmende, eddik, fruktig ⁵	42 ^{2a}
Dimetylsulfid	Søt mais, tomatsaus ³	0,03-0,05 ^{3b}

Diacetyl	Smør ³	0,043 ^{3b}
-----------------	-------------------	---------------------

¹(Carru et al., 2007, s.1199) ²(Miller, 2019, s. 421-467) ³(Aroxa, u.å.) ⁴(Mayr et al.,2015) ⁵(Williams, 1974), ⁶(Bingman et al., 2020). De benyttede terskelverdiene baserer seg på ^alukt og ^ben blanding av smak og lukt (flavour).

2.7.4 Organiske syrer

Organiske syrer er viktige bidragsyttere for de organoleptiske egenskapene hos sider (Ye et al., 2013, s. 2951). Hovedvekten av de organiske syrene stammer fra epleråstoffet og kan detekteres i ulik grad i sluttproduktet. Underveis i fermenteringsprosessen dannes det enkelte organiske syrer, som sekundære metabolitter fra biokjemiske reaksjoner (Zhang et al., 2008, s. 1187). Organiske syrer tilfører en syrlighet, bitterhet samt astringens til sider og har en viktig påvirkning på den kjemiske stabiliteten, pH, næringsegenskaper og lagringsholdbarhet (Ye et al., 2013, s. 2951; Zhang et al., 2008, s. 1183). I tillegg assosieres organiske syrer ofte med kvalitet i sider og er en kvalitetsparameter under fermenteringsprosessen. Organiske syrer i sider omfatter en rekke varianter der L- og D- epletsyre er de mest dominerende. I tillegg finnes pyrodruesyre, eddiksyre, ravsyre, sitronsyre, melkesyre, kininsyre, fumarsyre og andre organiske syrer i varierende mengde (Bandic et al.,2018, s. 599; Jolicoeur, 2013, s. 177). Type- og den prosentvise mengden av de ulike organiske syrene endres fra eplejus til ferdig sider gjennom fermenteringsprosessen (Ye et al., 2013, s. 2951). Da blir konsentrasjonen av enkelte organiske syrer økt, noen avtar og andre tilføres som sekundære metabolitter fra fermenteringsprosessen. Epleråstoff, gjærtype og fermenteringsbetingelser er faktorer som vil påvirke innholdet av organiske syrer i sider med hensyn til variasjon av ulike varianter samt konsentrasjoner (Bandic et al.,2018, s. 602-603; Zhang et al., 2008, s. 1188-1189). Spekteret av organiske syrer som er tilstede i sider har ulik innvirkning på sluttproduktet. Enkelte forekommer i små mengder og bidrar i liten/ingen grad til aroma og smak (Buglas, 2011, s. 242). De flyktige syrene bidrar med aroma og flavor og inkluderer blant annet butansyre og oktansyre, mens de ikke flyktige syrene tilfører smak og omfatter blant annet melkesyre, epletsyre, shikiminsyre, ravsyre og fumarsyre (Buglas, 2011, s. 242).

Sammensetningen og konsentrasjonen av organiske syrer har en stor innvirkning på balansen og den kjemiske stabiliteten i sluttproduktet. Blant annet vil i hovedsak melkesyrebakterier omdanne epletsyre til melkesyre gjennom sekundærfermentering (malolactic fermentering), som resulterer i en rundere smak.

2.7.5 Fenoler

Epler inneholder en mengde sekundære plantemetabolitter, kjent som fenoler. Fenoler er organiske forbindelser bestående av en benzenring (aromatisk ring C₆) tilknyttet en eller flere hydroksylgrupper (Merwin et al., 2008, s. 382). De utgjør en viktig komponent i sider og bidrar med farge, bitterhet og astringens, som alle er viktige kvalitetsparametere i sluttproduktet. Fenolforbindelser innehar viktige forsvarsmekanismer mot insekter, bakterier og sopp i planter. Dette skyldes evnen til å danne kompleks med proteiner, som ødelegger fordøyelsen i insekter, de har en bitter- og lite tiltalende smak, samt at de akkumuleres i skadede vev, for å reparere og hindre ytterligere pest inngrep (Merwin et al., 2008, s. 382). Innholdet av fenolforbindelser i epler, varierer og påvirkes blant annet av sort, modenhet, høstetid, terroir (geografiske betingelser), lagring, prosessering samt miljøforhold (vær, temperatur, og andre stressfaktorer som kan påvirke) (Merwin et al., 2008 s. 382-383; Kalinowska et al., 2014, s.171; Pandey & Rizvi, 2009 s. 271-272). Dessuten kan forskjellene i sammensetningen av de ulike fenolkomponentene defineres basert deres synteseveien. Fenoler kjennetegnes for å inneha viktige bioaktive egenskaper som blant annet motvirker kreft (anticarcinogen), inflammasjon (antiinflammatorisk) , samt besitter antioksidant egenskaper (Merwin et al., 2008, s. 383; Kalinowska et al., 2014, s. 170-171).

Fenoler oppstår vanligvis fra et mellomprodukt av fenylalanin eller shikiminsyre, som sekundære metabolitter i shikiminsyre- og fenylpropanoid syntesevei (Kalinowska et al., 2014, s. 171). Fenoler opptrer sjeldent i fri tilstand, men ofte i konjugerte former som glykosider eller estere (Pandey & Rizvi, 2009 s. 270). De kan også bindes til fettsyrer, karboksyl- og organiske syrer, aminer, steroler samt på celleveggen. Det skilles mellom enkle fenoler som omfatter fenolske syrer og polyfenoler som består av flere fenolstrukturenheter, deriblant flavonoider og taniner (Kalinowska et al., 2014, s.171). Fenoler som finnes i epler kan deles inn i flere grupper og undergrupper basert på kjemisk struktur. Inndelingen av fenoler i epler er presentert i tabell 2.4.

Tabell 2.4. Oversikt over klassifisering av eplefenoler i hovedgruppe og undergruppe (Kalinowska et al., 2014, s. 169)

Fenoler	
Hovedgruppe	Undergruppe

Hydroksybenzoesyrer (fenol syre)	p-hydroksybenzoesyre, protocatechuicsyre, gallinsyre, sprøytinsyre, gentisic syre
Hydroksykanelsyre og derivater (fenol syre)	p-kumarsyre, koffeinsyre, ferulinsyre, klorogensyre,
Flavonoler	Quercetin i glykosylerte former
Dihydrokalkoner	Phloridzin og dets derivater
Antocyanider	Cyanidin og dets glykosider
Monomere flavanoler/flavan-3-ols	Epicatechin, catechin
Oligomere flavanoler	Procyanidiner

Generelt inneholder matepler og dessertepler et lavere innhold av fenolforbindelser, enn siderepler (Buglas, 2011, s. 235). I tillegg vil variantene av fenolforbindelser være vesentlig ulike, deriblant er klorogensyre og procyanidiner ofte er høyere i siderepler (Merwin et al., 2008 s.384). Fenolforbindelsene opptrer i både skallet, fruktkjøttet og frøene. Det har blitt rapportert at fenolinnholdet kan variere fra 1000-10000 (mg/kg fersk vekt) (Merwin et al., 2008 s.385). Frie hydroksykanelsyre er ofte tilstede i sider som følge av hydrolysering som forekommer under fermenteringsprosessen. Produksjonsprosessen fra eple til ferdig sider kan også påvirke fenolforbindelser i sluttproduktet.

2.7.6 Polyfenoler

Polyfenoler er en viktig gruppe kjemiske forbindelser som finnes i epler. De utgjør en vesentlig andel av den totale sluttkvaliteten i sider. Der bidrar polyfenolene med blant annet bitterhet, astringens, fargestabilitet og totalmunnfølelse, som hindrer at sider oppleves smakløs (Bandic et al., 2018, s. 599-600; Lea & Piggot, 2003, s. 64). Polyfenolene kan klassifiseres i forskjellige grupper basert på antall fenol-ringer de inneholder og hvilke kjemiske elementer som avgjør bindingene innad mellom ringene (Pandey & Rizvi, 2009 s. 270). Hovedklassen polyfenoler i epler er flavonoler (quercetin), monomere flavanoler/flavan-3-ol (catechin og epicatechin), dihydroalkoner (phloridzin), antocyanider (cyanidin 3-glykosid), hydroksykanelsyre (klorogensyre) og oligomere flavanoler (procyanidiner/taniner, er polymer av catechin og epi-catechin) (Merwin et al., 2008 s.383; Nogueira et al., 2008, s.1025-1026). Det er kun procyanidiner som er ekte taniner og produserer astringens og bitter smak. Taniner er en gruppe polyfenoler som danner sterke interaksjoner med proteiner (Merwin et al., 2008 s.383). Astringens er den tørrhetsfølelsen som oppstår på tungen når blant annet taniner interagerer med spyttproteiner, mens bitterhet

kan gjenkjennes som en skarp/sviende følelse på baksiden eller siden av tungen (Merwin et al., 2008 s.383). Disse fenomenene blir ofte brukt om hverandre, ettersom mange har manglende evne til å skille de fra hverandre, i sider.

I tillegg til de tidligere nevnte faktorene som har innvirkning på innholdet av fenolforbindelser, så vil siderprosessen også utgjør en avgjørende faktor.

Polyfenolforbindelser blir nedbrutt ved oksidering som hovedsakelig forekommer under kverning og pressing ved fremstilling av eplejus til sider. Da vil eplemassen både eksponeres for oksygen samt enzymer (polyfenoloksidase (PPO)), og det resulterer i produksjon av melanin som gir en brun farge (enzymatisk bruningsprosess) (Merwin et al., 2008 s.383; Burda et al., 1990 s. 945). Ved å inaktivere disse enzymene eller fjerne oksygeneksponeringen, så kan bruningsprosessen fjernes. En stor andel av procyanidiner bli værende i eplerestene (pomace) etter pressing, som følge av absorpsjon til celleveggen (Nogueira et al., 2008, s.1026). Dette vil følge til et lavere innhold av polyfenoler i eplejusen før fermentering. Enkelte gjærceller evner å absorbere polyfenolforbindelser, som følge av celleveggen sammensetning og overflateareal. Forskjell i polaritet samt den hydrofobe og hydrofile strukturen bestemmer gjærcellenes evne til å absorbere ulike kjemiske komponenter, stort overflateareal gir økt absorpsjon (Nogueira et al., 2008, s.1026). Lagring kan føre til reduksjon av polyfenolinnholdet som følge av oksidering og resulterer i dannelsen av andre polymeriserte stoffer. Det kan påvirke farge og de organoleptiske egenskapene (Pandey & Rizvi, 2009 s. 272).

Antioksidanter er komponenter med viktige funksjoner i en rekke næringsmidler.

Autooksidasjon er oksidasjonsprosesser som initieres av frie radikaler (molekyler med et uparet elektron, som gjør de veldig reaktive). Frie radikaler kan føre til oksidativ stress og følgende skade en rekke funksjonsrike og viktige molekyler i menneskekroppen. Blant annet er lipider, proteiner, nukleinsyrer eksempler på molekyler som kan påvirkes negativt av frie radikaler. Negativ påvirkning av slike molekyler kan blant annet føre til økt risiko for hjerte og karsykdommer, diabetes og kreft. Polyfenolforbindelser har egenskaper som nøytraliserer de reaktive frie radikalene, ved å donere et av sine elektroner og selv bli radikal, gjennom en rekke mekanismer (Kalinowska et al., 2014, s.169). Fenolforbindelser som blir frie radikaler er mindre reaktive forbindelser, ettersom de er ressonansstabiliserte (Sobiesak, 2017). Det gir sideren en økt holdbarhet, samtidig som at polyfenolforbindelser virker positivt for helsa til de som konsumerer sider.

Fenolforbindelser inngår i dannelsen av sedimenter under lagring av sider, grunnet deres kolloidale interaksjon med proteiner. Under fermenteringsprosessen kan de inhibere vekst av uønskede mikroorganismer, hindre eventuelle feil som typisk kan utvikles av melkesyrebakterier i sider, deriblant mannitol smak, samt at de bidrar til den helhetlige sluttkvaliteten (Nogueira et al., 2008, s.1025).

2.8.0 Kjemiske analyser

En oversikt over de kjemiske analysene som er brukt i forsøket.

2.8.1 Bestemmelse av frie aminosyrer, organiske syrer, karbohydrater og polyfenoler med HPLC

Høytrykksvæskekromatografi (HPLC) er en analysemetode som ofte benyttes til skille en miks av ulike komponenter i et prøvemateriale som kan løses i en væske, samt separer og kvantifisere disse (Vidushi & Meensakshi, 2017, s.166). Metoden baserer seg på at prøvematerialet injeseres under høyt trykk i en kolonne bestående av et porøst materiale (stasjonær fase) og en væske (mobil fase). HPLC er omvendt fasekromatografi hvor den stasjonære fasen er upolar, mens den mobile fasen er polar. Prøvematerialet separeres basert på molekylenes størrelse og kjemiske egenskaper, som påvirker affiniteten til stasjonærfasen, løseligheten til mobilfasen, og de intermolekylære interaksjonene mellom prøvekomponentene (Lausund, 2018). Det resulterer i at ulike komponenter får forskjellig vandrings hastighet og dermed elueringstid. Komponentene med høy affinitet til stasjonær fasen vil bruke lenger tid og komme kortere i kolonnen, enn de som har lavere affinitet til stasjonærfasen. De ulike stoffene identifiseres ved å sammenligne med elueringstider av kjente standarder (Lausund, 2018).

2.8.2 Bestemmelse av flyktige komponenter med HCGC

Gasskromatografi (GC) er en analysemetode som separerer og detekterer ulike komponenter i en løsning ved hjelp av en stasjonær- (kjemisk- stoff eller væske) og mobilfase (bæregass) (Zuo et al., 2013, s.2-3). Når løsningen injiseres i kolonnen vil den strømme gjennom sammen med mobilfasen i ulik fart avhengig av de kjemiske- og fysiske egenskapene til komponentene (NTNU, 2018). Farten påvirkes blant annet av kokepunkt og vekt. Separasjonen av de ulike komponentene resulterer i tydelig topper i et kromatogram, som gjør

de identifiserbar med sammenlignbare data fra allerede kjente komponenter, der hvert stoff har sin unike topp og spesifikk elureingstid (NTNU, 2018).

2.8.3 Bestemmelse av L-Malic acid innhold ved hjelp av UV-metoden

Eplesyre (Malic acid) er den mest dominerende blant syrene som finnes i epler og sider. Mengden eplesyre kan kvantifiseres ved hjelp av UV-metoden gjennom et eplesyre kit. Det tar utgangspunkt i at L-eplesyre oksideres til oksaleddiksyre ved hjelp av nikotinamid adenindinukleotid (NAD) ved tilstedeværelse av L-eplesyre dehydrogenase (L-MDH). Oksaleddiksyre blir samtidig degradert til pyruvat og karbondioksid.

Reaksjonen følger formelen: $L\text{-eplesyre} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{D-MDH}} \text{pyruvat} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$

Mengden NADH som dannes er støkiometrisk til mengden L-eplesyre, og kan måles ved absorbans ved 334, 340 eller 365nm. (R-Biopharm, s. 1-3).

3.0 Materialer og metoder

3.1 Råvarer

Det ble benyttet to ulike eplesorter til produksjon av sider. Sortene Aroma (A) og Mutsu (M) ble høstet fra frukthagen tilhørende Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) i september 2020. Eplene ble videre lagret for modning på kjølerom til siste halvdel av oktober. Det ble ikke utført kontroll av modningsgrad på eplene før pressing. Pressingen av sortene foregikk på ulike dager i to separate forsøk med en ukes mellomrom. Det ferdig pressede råstoffet ble fryst for begge eplesortene før videre prosessering/tilsetning av gjær.

3.1.2 Gjær

Det ble brukt tre forskjellige typer kulturgjær i siderforsøket. De tre sortene omfattet sidergjær, champagnegjær og ølgjær. Gjærtype med kodenavn er presentert i tabell 3.1

Tabell 3.1. Oversikt over gjærtyper og kodenavn brukt i forsøket.

Gjærtype	Kodenavn
Fermentis Safcider (<i>Saccharomyces</i> <i>Bayanus</i>)	S

EC1118 (<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i>)	C
Fermentis Safale (<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>)	Ø

Tillaging og mengden benyttet gjær tok utgangspunkt i det som var anbefalt fra de ulike produsentene (5g/30l for sidergjær, 11,5g/30l for ølgjær og 5g/30l for champagnegjær). Gjærmengden ble veid ut og løst i ca 1dl lunket vann.

3.1.3 Honning

Honningen stammet fra egen bigård, med hovedvekt av lynghonning samlet i slutten av juli til og med august i Østfold sesongen 2020.

3.2 Beskrivelse av sider produksjon

Siderprosessen ble utført i mikrobryggeriet og piloten i meieribygningen på NMBU. Utgangspunktet var to forskjellige eple sorter, tre ulike gjærtyper og tre gjentak, som tilsammen utgjorde 18 varianter. Etter fermentering, ble det tilsatt sukker eller honning, slik at antallet varianter ble doblet til 36. Dette ble tilsatt for å tilføre sødme og fremme karbonering gjennom sekundærfermentering med gjær, for å bedre sluttproduktet. Dessuten var det ønskelig å se på eventuelle forskjeller i innhold av flyktige komponenter og polyfenoler mellom varianter som var tilsatt sukker sammenlignet med tilsvarende varianter tilsatt honning. I tillegg de 36 sidervariantene kommer to eplejustyper som består av hver sin eple sort (mutsu eller aroma) med et gjentak. Forsøkene ble utført under samme betingelser med hensyn på temperatur, fermenteringstid og benyttet utstyr. Fermenteringen ble kontrollert daglig med brixmålinger, helt til brix nådde 4-4.5, eller ikke endret seg nevneverdig. Deretter ble prøvene satt på kjølelager i underkant av 2 uker, før de ble stukket om (fjernet døde gjær celler) ved å tilføre prøvene i nye kar, tilsatt sukker eller honning, flasket samt korket og satt til etterfermentering/karbonering i 2 uker i romtemperatur før de ble satt til modning på kjølerom (ca 2-4°C). Alle varianter er fremstilt i tabell 3.2

Tabell 3.2. Oversikt over kodenavn for eplejusvariantene og sidervariantene basert på eple sort, gjærtype, sukker/honning og gjentak

Kodenavn	Eple sort	Gjærtype	Sukker/honning	Gjentak
A (eplejus)	Aroma	-	-	1

M (eplejus)	Mutsu	-	-	1
AØ1S	Aroma	Ølgjær	Sukker	1
AØ2S	Aroma	Ølgjær	Sukker	2
AØ3S	Aroma	Ølgjær	Sukker	3
AØ1H	Aroma	Ølgjær	Honning	1
AØ2H	Aroma	Ølgjær	Honning	2
AØ3H	Aroma	Ølgjær	Honning	3
AC1S	Aroma	Champagne gjær	Sukker	1
AC2S	Aroma	Champagne gjær	Sukker	2
AC3S	Aroma	Champagne gjær	Sukker	3
AC1H	Aroma	Champagne gjær	Honning	1
AC2H	Aroma	Champagne gjær	Honning	2
AC3H	Aroma	Champagne gjær	Honning	3
AS1S	Aroma	Sidergjær	Sukker	1
AS2S	Aroma	Sidergjær	Sukker	2
AS3S	Aroma	Sidergjær	Sukker	3
AS1H	Aroma	Sidergjær	Honning	1
AS2H	Aroma	Sidergjær	Honning	2
AS3H	Aroma	Sidergjær	Honning	3
MØ1S	Mutsu	Ølgjær	Sukker	1
MØ2S	Mutsu	Ølgjær	Sukker	2
MØ3S	Mutsu	Ølgjær	Sukker	3
MØ1H	Mutsu	Ølgjær	Honning	1
MØ2H	Mutsu	Ølgjær	Honning	2
MØ3H	Mutsu	Ølgjær	Honning	3
MC1S	Mutsu	Champagne gjær	Sukker	1
MC2S	Mutsu	Champagne gjær	Sukker	2
MC3S	Mutsu	Champagne gjær	Sukker	3
MC1H	Mutsu	Champagne gjær	Honning	1
MC2H	Mutsu	Champagne gjær	Honning	2
MC3H	Mutsu	Champagne gjær	Honning	3
MS1S	Mutsu	Sidergjær	Sukker	1
MS2S	Mutsu	Sidergjær	Sukker	2

MS3S	Mutsu	Sidergjær	Sukker	3
MS1H	Mutsu	Sidergjær	Honning	1
MS2H	Mutsu	Sidergjær	Honning	2
MS3H	Mutsu	Sidergjær	Honning	3

Eplesortene ble presset på to separate dager. Først ble de vasket fri for urenheter og råtne epler sortert ut. Videre ble eplene kvernet til en fin masse i en Speidel sentrifugal fruktmølle for å effektivisere den kommende pressingen og øke jusutbyttet. Deretter ble den kverned eplemassen presset i en 20l Speidel hydropresse. Brix ble målt for begge sortene rett etter pressing. Ferskpresset eplejus ble fryst i store, tilpassede beholdere for begge eplesortene før tilsetning av gjær ved et senere tidspunkt. Utstyret ble rengjort mellom hver eplesort.

De fryste sortene med eplejus ble tint i romtemperatur før tilsetning av gjær. Tillaging og dosering tok utgangspunkt i det som var anbefalt fra de ulike produsentene med henholdsvis 5g/30l for sidergjær, 11,5g/30l for ølgjær og 5g/30l for champagnegjær). Gjærmengden ble veid ut og løst i ca 1dl lunket vann, hver for seg før de ble tilsatt gjæringskar. Eplejus fra begge sortene ble fordelt i hver sine 5l plastflasker (gjæringskar) med gjærlås før tilsetning av riktig mengde gjær. Flaskene ble merket med utgangspunkt i eplesort, gjærtype og gjentak, til totalt 18 kar og plassert til fermentering ved romtemperatur, skjermet for direkte sollys. Brix ble målt daglig i de 18 karene under fermenteringen, med unntak av helgen. Dette ble gjort for å følge nedgangen i brix, som resultat av fermenteringsprosessen. Fermenteringen ble ansett som ferdig når brix verdiene ikke endret seg nevneverdig lenger, med brix rundt 4-4.5 (litt variasjon mellom variantene). Dette ble oppnådd etter 9 dager. Prosessen ble avsluttet ved å plassere karene på kjølerom (2-4°C) i underkant av 2 uker, for å inaktivere gjæren og dermed klare sideren. I løpet av denne perioden sank døde gjærceller til bunnen, som videre ble fjernet under omstikking. Da ble prøvene ført over i nye beholdere og tilsatt sukkerlake (80% sukker, 20% vann) eller honning, tilsvarende 27g/l for å oppjustere brix verdiene til rundt 6,5 (noen variasjoner forekom). Videre ble prøvene tappet i egnede glassflasker og korket, før de ble oppbevart ved romtemperatur i 2 uker for karbonering og etterfermentering. Deretter ble alkoholinnholdet målt før flaskene ble satt på kjølerom (2-4°C) for videre modning til en tiltenkt sensorisk bedømming. Dette ble ikke gjennomført som følge av koronasituasjonen i Norge på det aktuelle tidspunktet.

3.3 Kjemiske analyser

Underveis i prosessen ble det tatt ut prøvemateriale som ble fryst til bruk ved et senere tidspunkt for de kjemiske analysene. Prøveuttak ble gjort av de to ferskpressede eplejusvariantene (råvareprøver) og av ferdig sider etter at det hadde blitt tilsatt sukker eller honning og lagret 2 uker i romtemperatur, rett før flaskene ble satt på kjølerom. Det ble tatt ut prøver i 3x50ml blåtopp glassflasker (Duran) for hver variant, tilsammen 2 råvareprøver og 36 prøver med ferdig sider.

3.3.1 Analyse av alkoholinnhold med Anton Paar

Det ble utført analyse av alkoholinnholdet i alle de ferdige sidervariantene i et Anton Paar instrument, som ble stilt inn på sideranalyse (Anton Paar GmbH, Graz Østerrike). Alle prøvene var romtemperert før analysen. Flaskene ble plassert i beholderen og videre påført trykk slik at korken ble perforert av en nål. Deler av flaskeinnholdet (ca. 0,125l) ble sugd opp via nålen og analysert for alkoholinnhold. Instrumentet ble jevnlig rengjort med destillert vann, for å rense bort grums fra siderprøvene som hopet seg opp i slangen underveis. Samtlige prøver sprutet over når nålen perforerte korken i flaska.

De gjennomsnittlige verdiene med tilhørende standardavvik for innhold av alkohol ble beregnet for ASS, AØS, ACS, ASH, AØH, ACH, MSS, MØS, MCS, MSH, MØH og MCH og presentert i figur (4.3).

3.3.2 Brix

Tørrstoff (brix) ble bestemt underveis i siderprosessen ved hjelp av et refraktometer. Avlesningen foregikk ved å tilføre en dråpe av prøvematerialet med pipette til prismeoverflate. Refraktometeret ble kalibrert og rengjort med destillert vann mellom hver måling. Overskytende væske ble fjernet med et mykt papir. Alle brix-målingene ble utført i romtemperatur. Brix-verdiene ble brukt til å følge fermenteringsprosessen og tilføre riktig mengde sukker eller honning før karbonering/etterfermentering.

De gjennomsnittlige brix-verdiene med tilhørende standardavvik for AS, AØ, AC, MS, MØ og MC ble beregnet og presentert i figur (4.1).

3.3.3 Analyse av flyktige komponenter med Headspace Gas Chromatography (HSGC)

Flyktige aromakomponenter ble bestemt i eplejusvariantene og av ferdig sider som hadde vært oppbevart i romtemperatur i 2 uker etter tilsetning av sukker eller honning. Totalt ble 38 prøver analysert for flyktige komponenter. Prøvene hadde vært nedfrosset og tint på kjølerom over natten før analysering. Disse ble videre analysert ved hjelp av Head Space Gas Chromatography (HSGC) etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011), med noen modifikasjoner.

Prøvene ble blandet godt før innveiging av 30,00g i et 50ml sterilt Nunc-rør. Rørene ble sentrifugert ved 3000rpm (1960xg) i 20min ved 20°C, for å sedimentere grums og døde gjærceller. Deretter ble supernatanten filtrert gjennom foldefilter for å fjerne CO₂ og andre urenheter. Under dette trinnet ble løsningene satt på kjølerom for å hindre fordamping av de flyktige komponentene. Denne operasjonen ble utført i motsatt rekkefølge av det som var beskrevet, ettersom det oppstod problemer med tett filter hvis ikke sentrifugeringen ble utført først.

10,00g av ferdigfiltrert prøvematerialet ble veid inn i headspace-flasker (Machery Nagel, Duren, Tyskland). Flaskene ble forseglet med teflonbelagt septa med aluminiumsring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), med en spesialtang. Prøvene 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).

Det ble benyttet en bæregass av helium grad 6.0 (Aga, Norge) med en konstant flow på 5.0 ml/min. Headspace badtemperatur var 50°C, manifoldtemperatur var 60°C.

Ekvilibreringstiden var 45minutter, og prøvene ble mikset under oppvarming med 70 omristing/ min. Headspaceflaskene var trykksatt til 10 PSI før injeksjon og injeksjonstiden var 0.5minutt

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 0,53mm og filmtykkelse på 5,0µm. Det ble benyttet følgende temperaturprogram under analysen: 35°C, 5min; 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-metyl-butanal, 2-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-propanal, 3-metyl-butanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-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).

De gjennomsnittlige konsentrasjonene (mg/l) med tilhørende standardavvik for innhold av de detekterte flyktige komponentene (acetaldehyd, aceton, dimetylsulfid, diacetyl, 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanol, hexanal, etyl acetat, isobutyl acetat, butyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, etyl heptanoat, etyl octanoat, 1-propanol, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-hexanol og 1-hexanol) ble beregnet for ASS, AØS, ACS, ASH, AØH, ACH, MSS, MØS, MCS, MSH, MØH og MCH samt for et gjentak fra eplejusvariantene M og A. Disse er presentert i tabell (4.3-4.5)

3.3.4 Analyse av organiske syrer og karbohydrater (HPLC)

Innholdet av organiske syrer og karbohydrater ble analysert i eplejusvariantene og av ferdig sider som hadde vært oppbevart i romtemperatur i 2 uker etter tilsetning av sukker. Totalt ble 20 prøver analysert for innhold av organiske syrer og karbohydrater. Prøvene hadde vært nedfrosset og tint på kjølerom over natten før analysering. Analysen ble gjennomført ved bruk av High Performance Liquid Chromatography (HPLC) etter en metode beskrevet av Grønnevik et al. (2011), med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før innveining av 1,00g i et 10ml rør, med tilsats av 2,5ml ionebyttet vann, 200µl 0,5 M H₂SO₄ (Merck, Tyskland) og 8,0 ml acetonitril (Merck). Deretter ble prøvene ristet for hånd og kontrollert for eventuell lekkasje, før de ble plassert i en MultiRS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello Diagnostics A/S, Oslo, Norge) i 30 min. Prøvene ble

sentrifugert i romtemperatur, 15 minutter ved 1470 x g (3400 rpm) i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Supernatanten ble sugd opp i en 10ml steril sprøyte (Becton Dickinson S.A. , Madrid, Spania) med en engangskanyle på 0,8x40mm (Becton Dickinson S.A., Madrid, Spania) og filtrert med 0,2 µm PTFE Membran (Acrodisc CR 13 mm Syringe Filter, PALL, Storbritannia) over i et HPLC-rør (Agilent Technologies, USA). Røret ble forseglet med Chromacol 8-SV plastkork med Chromacol 8-ST101 septa. Sprøyten ble rensset med acetonitril mellom hver prøve.

Etter prøveopparbeidelse ble analysen gjennomført ved bruk av et HPLC-instrument Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Singapore), bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosampler (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren som ble benyttet var OpenLab CDS (Agilent Technologies). 25 µl av prøven ble injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For beskyttelse av kolonnen ble prøvene først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories). Kolonnetemperatur var satt til 32 °C. 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 prøvene som ble analysert. Komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck). For organiske syrer ble sitronsyre, orotinsyre, pyrodruesyre, ravsyre, melkesyre, maursyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre, alfa-ketoglutarsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

De gjennomsnittlige konsentrasjonene (mg/l) med tilhørende standardavvik for innhold av de detekterte organiske syrene (sitronsyre, pyrodruesyre, ravsyre, alfa-ketoglutarsyre og eddiksyre) ble beregnet for ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS samt for et gjentak av eplejusvariantene M og A. Disse resultatene er presentert i tabell (4.2)

De gjennomsnittlige konsentrasjonene (g/l) med tilhørende standardavvik for innhold av de detekterte karbohydratene (glukose, fruktose og maltose) ble beregnet for ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS samt for et gjentak av eplejusvariantene M og A. Disse resultatene er presentert i figur (4.2)

3.3.5 Analyse av frie aminosyrer (HPLC)

Identifisering og kvantifisering av frie aminosyrer ble analysert i eplejusvariantene og av ferdig sider som hadde vært oppbevart i romtemperatur i 2 uker etter tilsetning av sukker. Totalt ble 20 prøver analysert for innhold av frie aminosyrer. Prøvene hadde vært nedfrosset og tint på kjølerom over natten før analysering. Analysen ble gjennomført ved bruk av High Performance Liquid Chromatography (HPLC) etter en metode beskrevet av Bütikofer og Ardö (1999) og Moe et al. (2013), med noen modifikasjoner.

Prøvene ble godt blandet før innveiling av 5,00g i et 15ml sterilt Nunc-rør, og tilsatt 5,00mL indre standardløsning (0,4 µmol/ml L-norvalin (Sigma-Aldrich, Kina) i 0,1 M HCl (Merck, Tyskland)). Videre ble prøvene mikset i rundt 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. Deretter ble prøvene 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 0,8 ml 4 % trikloreddiksyre (Merck) og 0,8 ml av supernatanten i et 2 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. Videre ble prøvene sugd 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 filtrert gjennom et 0,2 µm cellulose acetat-filter (VWR, USA) over i et HPLC-rør. Sprøyten ble skylt i ionebyttet vann-, og filteret ble byttet mellom hver prøve. 50 µl av den ferdig filtrerte prøven 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 mmol/l natrium-acetat-trihydrat (Merck) og 0,53 mmol/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 prøvene som ble analysert, og komponentene i prøvene 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-isoleucin, L-fenylalanin, L-tryptofan, L-leucin, L-ornitin og L-lysin løst i 0,1 M HCl (Merck).

konsentrasjonen (mg/kg) av alle de detekterte frie aminosyrene (L-asparaginsyre, L-glutaminsyre, L-asparagin, L-glutamin, glycin, L-theronin, L-alanin, GABA, L-valin, L-metionin, L-isoleucin, L-ornitin, L-lysin) samt sum FAA (totalt innhold av frie aminosyrer) for gjennomsnittet av sidervariantene (ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS) samlet og for hver av de eplejusvariantene M og A, og er presentert i tabell (4.1). Det prosentvise innholdet av hver aminosyre er inkludert for eplejusvariantene.

3.3.6 Analyse av polyfenoler (HPLC)

Innholdet av polyfenoler ble analysert i eplejusvariantene og av ferdig sider som hadde vært oppbevart i romtemperatur i 2 uker etter tilsetning av sukker eller honning. Totalt ble 38 prøver analysert for innhold av polyfenoler. Prøvene hadde vært nedfrosset og tint på kjølerom over natten før analysering. Noen av prøvene ble satt i vannbad for tining rundt 1.5-2 timer før analysering. Analysen ble gjennomført ved bruk av high pressure liquid chromatography (HPLC) etter en metode beskrevet av Sylvain Gyot et.al (1998) med noen modifikasjoner.

Prøvene ble blandet godt før 0,7ml ble pipettert ut i et 1,5ml eppendorfrør. Videre ble det tilsatt 0,7ml 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). Sprøyten ble rensert i surgjort metanol, og nytt filter ble byttet mellom hver prøve. For noen av prøvene ble filteret tett før all væsken var filtrert over i HPLC-rør (VWR) som resulterte i at filteret måtte byttes før. Noen prøver ble opparbeidet etter samme fremgangsmåte men ved å tilsette 3ml av prøvematerialet og 3ml surgjort metanol, 1% eddiksyre (Merck, Tyskland) i metanol (Merck) i et 10ml rør. Etter 20 minutter i ultralydvannbad (Branson 2510, Soest, Nederland), ble de fordelt i tre forskjellige 1,5 ml eppendorfrør og sentrifugert. Videre ble løsningene filtrert over i 3 HPLC-rør (VWR), et rør av samme prøvemateriale til hver av bølgelengdene (280nm, 320nm og 350nm). Dette ble gjort for å redusere antall dager med opparbeidelse De ferdig opparbeidede prøvene ble lagret på kjølerom (ca 4°C) før analysekjøring.

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 autosamler (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, 320nm og 350nm. 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, 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, klorogensyre, rutin hydrate, koffeinsyre og quercetin (Sigma).

De gjennomsnittlige konsentrasjonene (mg/l) med tilhørende standardavvik for innhold av de detekterte polyfenolene ((+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2, phloretin, phlorizin, klorogensyre, rutin, koffeinsyre and quercetin) ble beregnet for ASS, AØS, ACS, ASH, AØH, ACH, MSS, MØS, MCS, MSH, MØH og MCH samt for et gjentak fra eplejusvariantene M og A. Disse er presentert i tabell (4.7).

3.3.7 Analyse av epleysyreinnhold

Epleysyreinnholdet ble analysert i råvareprøvene og av ferdig sider som hadde vært oppbevart i romtemperatur i 2 uker etter tilsetning av sukker. Totalt ble 20 prøver analysert for innhold av epleysyre. Prøvene hadde vært nedfrosset og tint i romtemperatur 1-2 timer før analysering. Analysen ble gjennomført ved bruk av epleysyrekit fra Boehringer Mannheim. Fremgangsmåten ble utført basert på oppskriften som ble gitt fra produsenten (R-Biopharm, s. 1-3).

Epleysyrekitet inneholdt 5 forskjellige flasker med ulikt innhold. Flaskenes innhold er presentert i tabell 3.3

Tabell 3.3. Oversikt over flaskenes innhold i epleysyrekitet.

Flaske	Løsning
1	Glycylglycine buffer, pH approx 10.0; L-glutamic acid (ca 440mg)

2	NAD lyphilizate (ca 210mg)
3	Glutamate-oxaloacetate transaminase (ca 160 U)
4	L-malate dehydrogenase (ca 2400 U)
5	L-malic acid (kontrollprøve)

Alle flaskene med unntak av flaske 2, var ferdigblandet fra produsent. Flaske 2 ble tilsatt 6ml destillert vann og blandet godt til alt pulveret var løst opp. Alle flaskene ble godt ristet før bruk.

Råvare- og siderprøvene ble filtrert gjennom et foldefilter for å fjerne grums og urenheter. Deretter ble prøvene blandet i reagensrør og tilsatt ulik mengde løsning fra de forskjellige flaskene, basert på oppskriften som er presentert i tabell 3.3. Det ble også laget en blank prøve som ble benyttet til utregningen av epletsyreinnholdet (L-epletsyre) og brukt til å nullstille spektrofotometeret. Til blank prøven ble det brukt destillert vann.

Tabell 3.4. Oversikt over hvilke mengder av de ulike løsningene som skal blandes for å oppnå riktig forhold.

Flaske	Prøve	Blank
1	1,000ml	1,000ml
2	0,200ml	0,200ml
3	0,010ml	0,010ml
Prøvetype*	0,100ml	-
Destillert vann	0,900ml	1,000ml

*De ulike råvare- og siderprøvene

Etter blanding av de ulike løsningene, ble rørene ristet godt. Absorbansen (A_1) ble målt rundt 3 minutter etter at løsningene ble tilsatt. Deretter ble prøvene tilsatt 0,010ml av løsning 4 og ristet godt. Dette ble gjort for å starte reaksjonen fra L-epletsyre til oxaloacetate av NAD ved tilstedeværelse av L-epletsyre dehydrogenase (R-Biopharm, s. 1-3). Absorbansen (A_2) ble målt 5-10 minutter etter tilsetning av løsning 4. Alle målingen ble utført ved bruk av samme spektrofotometer ved 340nm. Det ble benyttet plastkyvetter.

Utregninger av epletsyreinnhold ble gjort ved hjelp av følgende formel:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \left(\frac{\text{g}}{\text{l}}\right)$$

V= sluttvolum (ml)

v= prøvtypevolum (ml)

MW= molekulær vekt av de analyserte stoffene (g/mol)

d= lysvei (cm)

ε = extinction koeffesient av NADH ved 340nm er 6,3 (l x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Prøve}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blank}}$

De gjennomsnittlige konsentrasjonene (g/l) med tilhørende standardavvik for innhold av L-eplesyre ble beregnet for sidervariantene (ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS) samt et gjentak fra eplejusvariantene M og A, og er presentert i tabell (4.9).

3.3.7 Databehandling og statistiske analyser

Microsoft Excel ble benyttet til å registrere, systematisere og beregne gjennomsnittsverdier med tilhørende standardavvik for rådata opparbeidet fra de ulike analysene. Figurer og tabeller ble laget i Word og Excel.

Det ble utført enveis ANOVA (variensanalyse: en-faktor) i Excel for å undersøke eventuelle signifikante forskjeller i forekomsten av ulike flyktige komponenter og polyfenoler, som et resultat av gjærtype i hver av de eplejusvariantene M og A.

I tillegg ble det utført toveis ANOVA (variensanalyse: To-faktor med tilbakelegging) i Excel for å undersøke eventuelle signifikante forskjeller i forekomsten av ulike flyktige komponenter og polyfenoler, som resultat av eplejusvariant (eplesort), gjærtype eller interaksjon mellom disse.

Ved utførelsen av begge ANOVA analysene, så ble gjennomsnittet av alle tre gjentakene for hver variant av ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS beregnet. Resultatene baserer seg på hypotesetesting, der nullhypotesen angir at det ikke er noen forskjell mellom faktorene i påvirkning av en spesifikk komponent mens den andre hypotesen angir at det er forskjell. I disse resultatene er det brukt p-verdi med 95% signifikansnivå. Det vil si sannsynligheten for at resultatet stemmer dersom nullhypotesen er sann, er lik eller lavere enn 5% (p=0,05 eller mindre), som dermed gir grunn til å forkaste nullhypotesen ved bruk av 95% signifikansnivå.

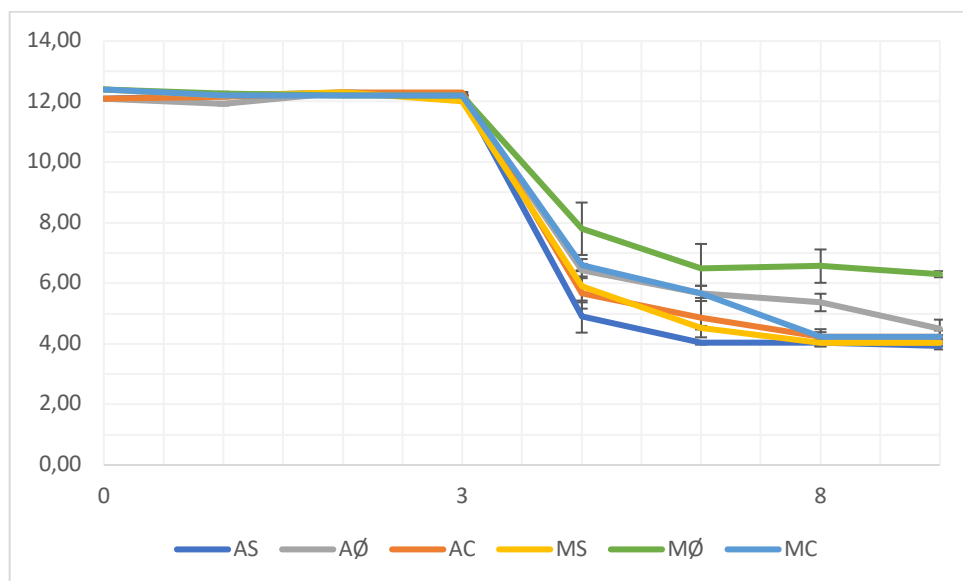
Resultatet kalles da statistisk signifikant ved dette signifikansnivået. Desto lavere p-verdi, øker sannsynligheten for at nullhypotesen ikke forkastes feilaktig.

4.0 Resultater

Resultatene som presenteres i kapittel 4 er basert på gjennomsnittsverdier og standardavvik av 3 gjentak for sidervariantene og et gjentak for eplejusvariantene. For enkelte av gjentakene er verdiene avvikende sammenliknet med tilsvarende verdier av de andre gjentakene. Disse har ikke blitt tatt med i beregningen av gjennomsnitt og standardavvik. Noen av resultatene er avvikende for alle tre gjentakene som dermed gir større utslag på standardavviket. Rådata med alle resultatene som ble detektert i analysene er presentert i spesifiserte vedlegg.

4.1 Brix utvikling før og under fermentering

Brix ble målt i sidervariantene AS, AØ, AC, MS, MØ og MC, daglig (unntatt helg) så lenge fermenteringen pågikk (dag 9). Figur 4.1 viser oversikt over gjennomsnittlig endring i brix med tilhørende standardavvik for hver av sidervariantene. Rådata er vist i vedlegg 1.



Figur 4.1. Endring av brix i sidervariantene AS, AØ, AC, MS, MØ og MC.

Brixen endret seg lite de første dagene, men ble markant redusert i alle sidervariantene i løpet av fermenteringen. De fleste sidervariantene hadde en flatende trend når brix nærmet seg 4-4,5. For variant MØ er verdien adskillig høyere og endte til slutt på 6,3.

4.2 Frie aminosyrer HPLC

Innholdet av frie aminosyrer ble analysert ved hjelp av HPLC i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS. Kun aminosyrene som ble detektert i prøvene presenteres. Resultatene fra sidervariantene (ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS) er oppgitt som gjennomsnittsverdier av alle sidervariantene samlet, med tilhørende standardavvik, mens prøvene av eplejus stammer fra et gjentak. Alle verdier er oppgitt som mg/kg og presentert i tabell 4.1 Det prosentvise innholdet av hver aminosyre er inkludert for eplejusvariantene. Mens det totale innholdet av frie aminosyrer (FFA) er beregnet for alle prøvene samlet da det ikke var store forskjeller i innhold av aminosyrer mellom variantene. Rådata er vist i vedlegg 2.

Tabell 4.1. Konsentrasjon (mg/kg) av frie aminosyrer, FFA og prosentvisinnhold av hver aminosyre i eplejus M og A, samt sidervarianter ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS.

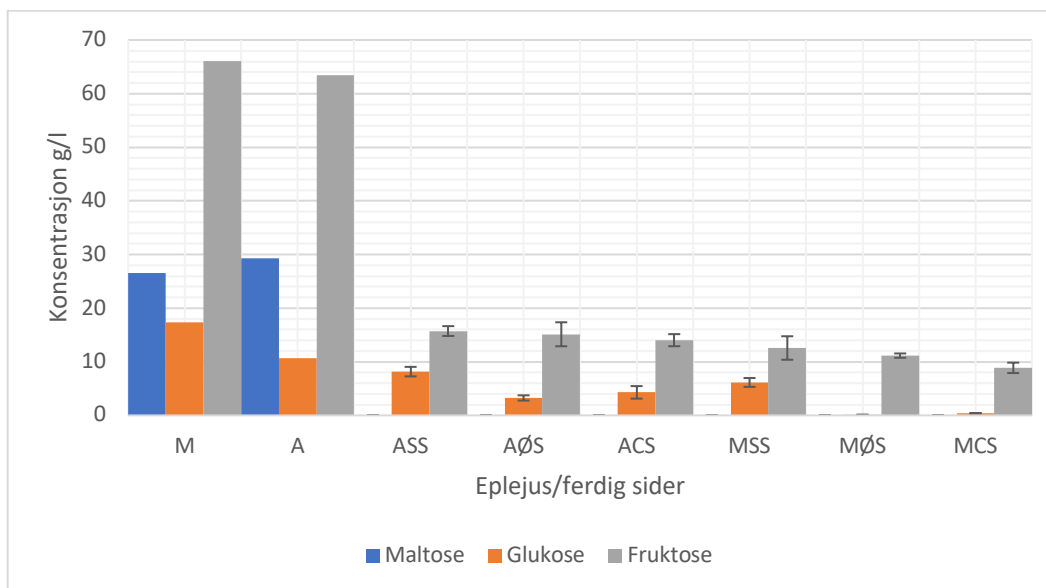
	M		A		ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
L-asparaginsyre	95,09	16,59	87,24	11,70	n.d.
L-glutaminsyre	59,28	10,34	38,90	5,22	n.d.
L-asparagin	389,95	68,06	569,28	76,39	n.d.
L-serin	9,24	1,61	11,71	1,57	n.d.
L-glutamin	2,63	0,45	9,28	1,24	n.d.
Glycin	0,90	0,15	1,20	0,16	0,56±0,09
L-threonin	4,46	0,77	3,63	0,48	n.d.
L-alanin	5,79	1,01	12,07	1,6	n.d.
GABA	3,24	0,56	3,55	0,47	n.d.

L-valin	0,29	0,05	1,93	0,25	n.d.
L-metionin	0,29	0,05	n.d.	0	n.d.
L-isoleucin	1,70	0,29	0,65	0,08	n.d.
L-ornitin	n.d.	0	4,09	0,54	n.d.
L-lysin	n.d.	0	1,60	0,21	n.d.
SUM FAA	572,92		745,20		0,56±0,09

Det ble detektert tilsammen 14 aminosyrer i eplejus- M og A, og kun én i sidervariantene (med unntak av MØS, der L-alanin ble detektert i liten mengde, se vedlegg 2). De dominerende aminosyrene i eplejusvariantene er henholdsvis L-asparaginsyre, L-glutaminsyre og L-asparagin, med et prosentvisinnhold mellom henholdsvis 11,7-16,59, 5,22-10,34 og 68,06-76,39. Det totale innholdet av FFA er noe høyere i eplejus M- enn i eplejus A. I sidervariantene er mengden FFA nærmest neglisjerbar med verdi på 0,56mg/l

4.3 Karbohydrater HPLC

Innholdet av karbohydratene maltose, glukose og fruktose ble bestemt med HPLC i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS. Resultatene er presentert i figur 4.2 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusprøvene. Konsentrasjonen er angitt som g/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 3.



Figur 4.2. Konsentrasjon (g/l) av maltose, glukose og fruktose i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS.

Innholdet av de ulike karbohydratene varierer noe mellom de to eplejusene M og A. Det er forskjellen i glukoseinnholdet som er mest fremtredende med henholdsvis 17,33g/l for M og 10,66 g/l for A. Fruktoseinnholdet er markant høyest av karbohydratene i begge eplejusvariantene med henholdsvis 63,45-66,04g/l. Det samme gjelder for sidervariantene, men der er fruktoseinnholdet mye lavere og varierer mellom 8,87-15,73 g/l, hvor ASS, AØS og ACS har høyest konsentrasjon og relativt likt fruktoseinnhold. Karbohydratinnholdet har blitt markant redusert gjennom fermenteringen. Det ble ikke detektert maltose i noen av sidervariantene, men henholdsvis 26,49g/l for M og 29,3g/l for A. Innholdet av glukose er lavest i MØS og MCS med 0,12g/l og 0,39g/l og mest i ASS og MSS, henholdsvis 8,16g/l og 6,15g/l.

4.4 Organiske syrer HPLC

Innholdet av de organiske syrene sitronsyre, alfa-ketoglutarsyre, pyrodruesyre, ravsyre og eddiksyre ble ved hjelp av HPLC bestemt i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS. Resultatene er presentert i tabell 4.2 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusprøvene. Konsentrasjonen er angitt som mg/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 4.

Tabell 4.2. Konsentrasjon (mg/l) av sitronsyre, alfa-ketoglutarsyre, pyrodruesyre, ravsyre og eddiksyre i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS.

prøvetype	Sitronsyre	Alfa-ketoglutarsyre	Pyrodruesyre	Ravsyre	Eddiksyre
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
M	41,4	n.d.	n.d.	1627,4	n.d.
A	44,8	n.d.	n.d.	1598,4	172,3
ASS	89,6±1,7	409,6±1,8	148,5±3,2	856,7±90,1	112,2±10,0
AØS	85,3±3,3	31,2±3,5	197,3±9,6	3026,8±81,3	28,7±10,6
ACS	43,1±8,1	48,0±7,6	107,2±15,5	1464,2±319,6	96,4±10,6
MSS	87,4±0,9	218,6±12,4	101,5±10,2	1615,8±33,9	74,0±22,6
MØS	89,7±0,9	25,0±2,6	178,1±14,4	2014,8±216,7	42,1±3,2
MCS	97,1±2,7	36,3±3,0	65,5±5,4	2113,8±67,7	156,9±9,3

Begge eplejusene inneholder relativt lik mengde sitronsyre og ravsyre. Eplejus A inneholder i tillegg eddiksyre. Hverken alfa-ketoglutarsyre eller pyrodruesyre ble detektert i eplejusvariantene. Ravsyre er den mest dominerende syren i eplejusvariantene med henholdsvis 1627,4mg/l i eplejus M og 1598,4mg/l i eplejus A. Det samme gjelder for sidervariantene, men der er det stor variasjon i ravsyreinnhold, med verdier fra 856,7-3026,8mg/l, hvor det har økt i AØS, MØS og MCS, blitt redusert i ASS og holdt seg relativt stabilt i ACS og MSS. Innholdet av sitronsyre har økt markant i alle sidervariantene med unntak av ACS, der den ikke har endret seg nevneverdig. Både alfaketoglutarsyre og pyrodruesyre har blitt produsert i alle sidervariantene i løpet av fermenteringen. Sidervariantene ASS og MSS har adskillig høyere innhold av alfa-ketoglutarsyre, enn de andre. Pyrodruesyreinnholdet varierer fra 65,5-197,3mg/l i sidervariantene. Det ble detektert eddiksyre i alle sidervariantene, med varierende innhold fra 28,7-156,9mg/l.

4.5 Flyktige komponenter HCGC

Det ble analysert for et utvalg av flyktige komponenter ved hjelp av HCGC i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH. De flyktige komponentene som ble analysert var acetaldehyd, acetone,

dimetylsulfid, diacetyl, 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal, hexanal, etyl acetat, isobutyl acetat, butyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, etyl heptanoat, etyl octanoat, 1-propanol, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-hexanol og 1-hexanol. De oppnådde verdiene for dimetylsulfid, etyl heptanoat og 1-propanol er under terskelverdien som er definert i tabell 2.3, og er derfor ikke presentert.

4.5.1 Karbonyler og svovelforbindelser

Innholdet av acetaldehyd, aceton, diacetyl, 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal og hexanal ble bestemt i eplejus og ferdig sider. Resultatene er presentert i tabell 4.3 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusene. Konsentrasjonen er angitt som mg/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 5

Tabell 4.3. Konsentrasjonen (mg/l) av acetaldehyd, aceton, diacetyl, 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal og hexanal i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH.

Prøve	Acetaldehyd	Aceton	Diacetyl	2-metyl-propanal	3-metyl-butanal	2-metyl-butanal	hexanal
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
M	1,32	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	0,335	0,959
A	7,74	0,18	n.d.	n.d.	n.d.	2,246	0,651
ASS	22,92±0,44	0,44±0,01	n.d.	0,045±0,007	0,045±0,004	1,697±0,024	n.d.
AØS	15,52±0,28	0,28±0,12	1,143±0,207	0,050±0,011	0,035±0,003	1,734±0,037	n.d.
ACS	16,63±0,67	0,21±0,01	n.d.	n.d.	0,020±0,000	1,500±0,218	n.d.
ASH	18,91±1,04	0,41±0,01	0,148±0,024	0,036±0,003	0,042±0,002	1,763±0,009	0,014±0,003
AØH	20,68±2,19	0,30±0,01	1,654±0,402	0,110±0,005	0,054±0,004	1,864±0,048	0,004±0,001
ACH	16,24±3,27	0,44±0,06	0,170±0,018	0,020±0,001	0,020±0,004	1,771±0,122	0,003±0
MSS	14,18±1,09	0,13±0,04	n.d.	n.d.	0,027±0,002	0,221±0,024	n.d.
MØS	11,19±2,92	n.d.	0,237±0,013	n.d.	0,017±0,002	0,200±0,019	n.d.
MCS	12,83±1,51	0,17±0,02	n.d.	n.d.	0,011±0,001	0,245±0,007	n.d.
MSH	19,17±2,19	0,43±0,01	n.d.	n.d.	0,041±0,006	0,263±0,006	0,019±0,001
MØH	12,99±1,85	0,21±0,04	0,284±0,005	0,022±0,004	0,020±0,003	0,286±0,010	0,004±0,002

MCH	11,01±1,43	0,24±0,01	n.d.	0,016±0,004	0,013±0,002	0,254±0,002	0,008±0,002
------------	------------	-----------	------	-------------	-------------	-------------	-------------

Konsentrasjonen av acetaldehyd og 2-metyl-butanal er mye høyere i eplejus A, sammenliknet med eplejus M. Det samme gjelder for sidervariantene som er fermentert med eplejus A. Mens innholdet av acetaldehyd har økt markant for alle sidervariantene i løpet av fermenteringen, har innholdet av 2-metyl-butanal blitt noe redusert for alle sidervariantene i løpet av fermenteringen. Konsentrasjonen av aceton er relativt likt i begge eplejusvariantene, men har litt varierende innhold i sidervariantene etter fermentering, med verdier fra 0,13-0,44mg/l. Det er variantene som inneholder honning (ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH), hvor konsentrasjonen jevnt over er høyest. Det ble ikke detektert diacetyl, 2-metyl-propanal eller 3-metyl-butanal i noen av eplejusvariantene. Innholdet av diacetyl varierer en del i sidervariantene, hvor det i prøvene ASS, ACS, MCS, MSH og MCH ikke ble detektert. Det ble funnet diacetyl i alle sidervariantene som er fermentert med ølgjær (Ø), og de høyeste verdiene er funnet i AØS og AØH. Konsentrasjonen av 2-metyl-propanal har økt i sidervariantene ASS, AØS, ASH, AØH, ACH, MØH og MCH, med varierende verdier fra 0,016-0,110mg/l. I ACS, MSS, MØS, MCS og MSH ble det ikke detektert 2-metyl-propanal. Innholdet av 3-metyl-butanal har økt i alle sidervarianter etter fermentering. Konsentrasjonen av hexanal er redusert i alle sidervariantene etter fermentering, og kun detektert i prøvene som ble tilsatt honning (ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH).

4.5.2 Ester

Innholdet av etyl acetat, isobutyl acetat, butyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat og etyl octanoat ble bestemt i eplejus og ferdig sider. Resultatene er presentert i tabell 4.4 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusene. Konsentrasjonen er angitt som mg/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 5

Tabell 4.4. Konsentrasjonen (mg/l) av etyl acetat, isobutyl acetat, butyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat og etyl octanoat i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH.

Prøve	Etyl acetat	Isobutyl acetat	Butyl acetat	Isoamyl acetat	Etyl hexanoat	Etyl octanoat
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
M	0,03	0,023	0,75	0,553	0,002	n.d.
A	1,37	0,019	5,09	0,212	0,037	0,015
ASS	7,25±1,38	0,030±0,007	1,329±0,185	2,514±0,435	0,130±0,023	0,101±0,011
AØS	11,03±0,59	0,058±0,009	1,412±0,066	1,174±0,132	0,197±0,017	0,174±0,055
ACS	11,86±1,67	0,036±0,004	1,698±0,028	1,245±0,094	0,212±0,017	0,139±0,002
ASH	13,07±0,71	0,013±0,001	0,011±0,001	0,113±0,006	0,122±0,003	0,149±0,008
AØH	15,84±0,82	0,025±0,001	0,014±0	0,062±0,003	0,210±0,010	0,345±0,002
ACH	20,01±3,01	0,012±0,002	0,015±0,001	0,085±0,014	0,249±0,002	0,292±0,026
MSS	16,71±2,25	0,053±0,009	0,236±0,018	3,859±0,653	0,180±0,018	0,145±0,007
MØS	10,14±0,72	0,040±0,004	0,260±0,001	1,401±0,021	0,214±0,023	0,256±0,005
MCS	18,00±1,77	0,053±0,001	0,261±0,011	3,027±0,010	0,275±0,009	0,34±0,026
MSH	19,79±3,46	0,012±0,002	n.d.	0,130±0,002	0,208±0,021	0,224±0,010
MØH	12,98±1,23	0,031±0,007	0,016±0,004	0,259±0,060	0,218±0,024	0,334±0,014
MCH	21,51±2,63	0,009±0,001	n.d.	0,090±0,008	0,309±0,027	0,525±0,020

For eplejus A var konsentrasjonen av etyl acetat, butyl acetat, etyl hexanoat og etyl octanoat markant høyere enn i eplejus M. Mens innholdet av isobutyl acetat var relativt likt i begge eplejusene og konsentrasjonen av isoamyl acetat tilnærmet dobbelt så høyt i eplejus M, sammenliknet med A. Det har vært en markant økning i konsentrasjonen av etyl acetat, etyl hexanoat og etyl octanoat i alle sidervariantene etter fermentering. Innholdet av etyl acetat varierer fra 7,25-21,51 mg/l i sidervariantene og er jevnt over noe høyere i variantene som er tilsatt honning. For etyl hexanoat er konsentrasjonen høyest i sidervariantene som er fermentert med champagnegjær (C) etterfulgt av ølgjær (Ø) og tilslutt sidergjær (S) når varianter av samme eplejus og tilsetning (sukker eller honning) sammenliknes. Innholdet av etyl octanoat i sidervariantene varierer fra 0,101-0,525 mg/l og er høyere i variantene som er tilsatt honning for varianter av samme eplejus og gjærtype. For esterne isobutyl acetat, butyl acetat og isoamyl acetat er konsentrasjonen jevnt over mye lavere for alle sidervariantene som ble tilsatt honning, sammenliknet med de som ble tilsatt sukker. Konsentrasjonen av isobutyl acetat og isoamyl acetat har derfor økt etter fermentering i variantene som er tilsatt sukker,

mens de har blitt redusert i prøvene med honning. For butyl acetat har alle sidervariantene fått redusert innhold etter fermentering.

4.5.3 Høyere alkoholer

Innholdet av 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-hexanol og 1-hexanol ble bestemt i eplejus og ferdig sider. Resultatene er presentert i tabell 4.5 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusene. Konsentrasjonen er angitt som mg/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 5.

Tabell 4.5. Konsentrasjonen (mg/l) av 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-hexanol og 1-hexanol i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH

Prøve	2-metyl-1-propanol	3-metyl-1-butanol	2-metyl-1-butanol	2-hexanol	1-hexanol
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
M	0,25	0,08	1,015	n.d.	2,33
A	0,30	0,35	0,647	4,36	9,04
ASS	39,9±3,0	186,7±3,2	34,3±1,6	1,45±0,18	7,10±0,22
AØS	59,6±2,6	106,0±4,5	18,3±0,8	2,23±0,22	7,12±0,19
ACS	20,3±3,20	90,8±14,0	19,3±2,8	1,93±0,21	5,22±1,10
ASH	39,5±2,4	185,9±0,6	33,9±1,0	1,84±0,13	8,15±0,04
AØH	60,1±5,2	106,2±9,8	18,3±1,4	2,94±0,08	8,12±0,21
ACH	21,4±3,2	102,9±7,4	21,7±1,7	2,75±0,30	7,48±0,66
MSS	25,9±2,4	160,5±6,1	26,9±2,1	0,62±0,00	2,91±0,10
MØS	30,3±1,5	96,3±9,3	13,5±1,8	0,91±0,04	3,63±0,31
MCS	18,9±0,2	101,5±1,5	20,8±0,5	1,16±0,02	3,44±0,63

MSH	28,7±1,2	190,8±6,1	29,8±1,1	0,83±0,07	3,74±0,14
MØH	37,1±3,8	104,5±10,4	16,1±0,2	1,09±0,03	4,58±0,04
MCH	19,1±0,8	103,3±1,3	20,9±0,1	1,42±0,19	3,87±0,60

Konsentrasjonen av 3-metyl-1-butanol, 2-hexanol og 1-hexanol er klart høyest i eplejus A, for 2-metyl-1-butanol er konsentrasjonen høyere for eplejus M, mens for 2-metyl-1-propanol er den relativt lik for begge varianter. Innholdet av 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol har økt i alle sidervariantene etter fermentering. For 2-metyl-1-propanol er konsentrasjonen høyest i sidervariantene som er fermentert med ølgjær (Ø) etterfulgt av sidergjær (S) og tilslutt champagnegjær (C), når varianter av samme eplejus sammenliknes. Det samme gjelder for innholdet av 2-metyl-1-butanol, men der er det variantene som er fermentert med sidergjær (S), etterfulgt av champagnegjær (C) og til slutt ølgjær (Ø), som gir høyest konsentrasjon. Konsentrasjonen av 3-metyl-1-butanol er markant høyere for sidervariantene som er fermentert med sidergjær (S), men har relativt likt innhold i de andre variantene. Innholdet av 2-hexanol og 1-hexanol har det blitt redusert i sidervarianter som er fermentert med eplejus A, og økt i varianter av eplejus M. Konsentrasjonen av 2-hexanol og 1-hexanol er noe høyere i sidervarianter som er fermentert med samme eplejus og tilsatt honning, samt høyest i prøvene som er fermentert med eplejus A.

4.5.4 Enveis- og toveis ANOVA for flyktige komponenter

Det ble utført enveis- og toveis ANOVA på alle de flyktige komponentene som er inkludert i tabell 4.3-4.5, med unntak av hexanal (ble ikke detektert i noen av siderprøvene). Enveis ANOVA ble testet for å undersøke om variasjonen i resultatene fra hver enkelt flyktige komponent fermentert fra samme eplejus, var stor nok til påvise signifikante forskjeller som følge av gjærtype. Toveis ANOVA ble brukt for å finne ut om variasjonene i de detekterte resultatene fra hver enkelt flyktig komponent skyldtes signifikante forskjeller som følge av eplejusvariant, gjærtype og/eller en interaksjon mellom disse. Resultatene fra enveis og toveis ANOVA for de flyktige komponentene er presentert i tabell 4.6 og oppgitt som P-verdi basert på 95% signifikansnivå. ANOVA ble kun testet for sidervariantene som var tilsatt sukker (ASS, ACS, AØS, MSS, MØS og MCS) og inkluderte alle tre gjentak for hver variant. Resultatene som viste signifikante forskjeller er markert med gult.

Tabell. 4.6. Oppgitte P-verdier som ble detektert gjennom enveis- og toveis ANOVA for hver enkelt flyktig komponent fra sidervariantene ASS, ACS, AØS, MSS, MØS og MCS.

Flyktig komponent	Toveis-ANOVA			En-veis ANOVA	
	Eplejusvariant (eplesort)	Gjærtype	Interaksjonseffekt	Forskjeller mellom gjærtypene S, Ø og C fermentert med eplejus M	Forskjeller mellom gjærtypene S, Ø og C fermentert med eplejus A
	P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
Karbonyler og andre					
Acetaldehyd	0,0023	0,0066	0,0781	0,2628	0,0263
Aceton	0,0001	0,0407	0,0029	0,0137	0,0318
Diacetyl	0,0903	0,0004	0,0679	0,4218	0,0616
2-metylpropanal	0,0062	0,0222	0,078	0,0034	0,0159
3-metylbutanal	0,001	0,001	0,0819	0,0119	0,0217
2-metylbutanal	1×10^{-10}	0,0539	0,0307	0,5016	0,0693
Ester					
Etyl acetat	0,0045	0,0057	0,0065	0,0095	0,1616
Isobutyl acetat	0,6532	0,2784	0,0594	0,2865	0,0263
Butyl acetat	$1,2 \times 10^{-8}$	0,9889	0,8596	0,6035	0,9679
Isoamyl acetat	0,0453	0,0058	0,1089	0,0451	0,0474

Etyl hexanoat	0,0003	1,4x10 ⁻⁵	0,0812	0,0021	0,0045
Etyl octanoat	0,007	0,0012	0,0216	0,0004	0,1044
Høyere alkoholer					
2-metyl-1-propanol	2,2x10 ⁻⁷	7,2x10 ⁻⁹	3,6x10 ⁻⁶	0,0004	2,6x10 ⁻⁵
3-metyl-1-butanol	0,5328	1,8x10 ⁻⁷	0,0473	0,0009	0,0001
2-metyl-1butanol	0,031	3,8x10 ⁻⁷	0,0033	0,0001	0,0005
2-hexanol	2,4x10 ⁻⁷	0,0084	0,057	0,001	0,1349
1-hexanol	4,2x10 ⁻⁸	0,02	0,0071	0,1641	0,0191

Enveis ANOVA viste at det var signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for de detekterte verdiene av enkelte flyktige komponenter. I sidervariantene som var fermentert med eplejus M ble det påvist signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for forekomsten av aceton, 2-metyl propanal, 3-metyl-butanal, etyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, etyl octanoat, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1butanol og 2-hexanol. Mens for sidervariantene som var fermentert med eplejus A ble det funnet signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for forekomsten av acetaldehyd, aceton, 2-metyl propanal, 3-metyl-butanal, isobutyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1butanol og 1-hexanol.

Gjennom toveis ANOVA ble det detektert signifikante forskjeller i forekomsten av acetaldehyd, aceton, diacetyl, 2-metyl propanal, 3-metyl-butanal, 2-metyl-butanal, etyl acetat, butyl acetat, isoamyl acetat, etyl hexanoat, etyl octanoat, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1butanol, 2-hexanol og 1-hexanol som følge av en eller flere av diss; eplejusvariant og/eller gjærtype og/eller interaksjon mellom disse.

4.6 Polyfenoler HPLC

4.6.1 Polyfenoler

Konsentrasjonen av polyfenolene B1(procyanidin), (+)-catechin, B2 (procyanidin), (-)-epicatechin, phloridzin, phloretin, klorogensyre, koffein-syre, rutin og quercetin ble analysert ved HPLC. Disse ble bestemt i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH. Resultatene er presentert i tabell 4.7 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusprøvene. Konsentrasjonen er angitt som mg/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 6.

Tabell 4.7. Konsentrasjon (mg/l) av B1(procyanidin), (+)-catechin, B2 (procyanidin), (-)-epicatechin, phloridzin, phloretin, klorogensyre, koffein-syre, rutin og quercetin i eplejus M og A samt gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH.

Prøve	B1, procyanidin	(+)-catechin	B2, procyanidin	(-)-epicatechin	Phloridzin	Phloretin	Klorogensyre	Koffein-syre	Rutin	Quercetin
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
M	8,87	2,26	3,81	18,83	6,55	0,17	56,9	0,14	1,25	0,18
A	16,26	3,69	4,45	11,72	2,51	n.d.	42,1	0,12	n.d.	n.d.
ASS	12,06±0,65	18,49±0,65	3,05±0,14	8,21±0,51	2,40±0,08	0,21±0,02	28,7±0,1	0,58±0,02	n.d.	0,19±0,04
AØS	13,8±0,38	6,62±0,84	2,99±0,33	8,87±0,28	1,83±0,08	0,19±0,01	27,3±1,2	0,83±0,03	n.d.	0,17±0,02
ACS	7,99±0,3	8,18±0,37	2,14±0,05	4,63±0,11	1,62±0,04	0,19±0,35	19,5±0,5	0,40±0,05	n.d.	0,23±0,01
ASH	8,87±0,68	18,56±1	2,77±0,16	7,91±0,64	0,53±0,02	1,01±0,04	29,7±0,3	0,75±0,02	n.d.	0,44±0,03
AØH	11,38±0,14	6,63±0,85	2,72±0,12	7,84±0,55	0,54±0,02	0,48±0,03	26,8±0,3	0,94±0,03	n.d.	n.d.
ACH	9,97±0,53	12,50±0,28	2,89±0,09	8,12±0,76	0,52±0,02	1,01±0,07	28,4±1,1	0,73±0,05	n.d.	0,24±0,01
MSS	6,82±0,39	17,18±0,09	2,49±0,04	13,24±0,68	5,16±0,06	0,48±0,35	49,9±0,9	0,20±0,01	n.d.	0,34±0,07

MØS	5,95±0,77	6,39±0,22	2,36±0,22	12,39±0,75	5,35±0,12	0,30±0,03	49,1±1,8	0,17±0,03	0,84±0,32	0,27±0,04
MCS	6,63±0,82	13,25±0,4	2,72±0,50	13,41±0,51	5,55±0,30	0,21±0,01	49,8±0,8	0,19±0,03	n.d.	0,30±0,01
MSH	4,15±0,07	16,47±1,37	1,82±0,26	10,70±1,28	0,67±0,09	2,02±0,06	45,2±3,6	0,19±0,02	n.d.	1,04±0,08
MØH	6,11±1,08	6,50±0,05	2,58±0,26	13,95±1,16	0,38±0,03	2,15±0,06	49,4±1,3	0,30±0,02	n.d.	0,70±0,04
MCH	6,41±0,37	13,03±0,33	2,61±0,20	13,22±0,19	0,47±0,01	2,21±0,03	49,7±1,7	0,21±0,04	n.d.	1,02±0,01

Innholdet av B1, procyanidin er høyest i eplejus A sammenlignet med eplejus M. Dette gjenspeiler seg i sidervariantene også, der innholdet av B1, procyanidin er høyest i variantene som er fermentert med eplejus A. Innholdet av B1, procyanidin er redusert i alle sidervariantene etter fermentering. Konsentrasjonen av (+)-catechin er lave i begge eplejusvariantene, men har økt markant i sidervariantene etter fermentering. Det er store variasjoner mellom innhold av (+)-catechin i sidervariantene med verdier fra 6,39-18,56mg/l. Innholdet av B2, procyanidin er litt høyere i eplejus A sammenliknet med eplejus M og er redusert i alle sidervariantene etter fermentering. Det er relativt jevnt innhold av B2, procyanidin i sidervariantene, med verdier fra 1,82-3,05mg/l. Konsentrasjonen av epicatechin er markant høyere i eplejus M sammenliknet med eplejus A. Det samme gjelder for sidervariantene også, der innholdet av epicatechin er høyere i variantene som er fermentert med eplejus M. Innholdet av epicatechin er redusert i alle sidervariantene etter fermentering. Mengden phloridzin er adskillig høyere i eplejus M, enn A. Innholdet av phloridzin er noe redusert i sidervariantene som er fermentert med samme eplejus og tilsatt sukker (ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS). For sidervariantene som er tilsatt honning (ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MCH) er konsentrasjonen av phloridzin markant redusert, spesielt i variantene som er fermentert med eplejus M. I tillegg er verdiene relativt like mellom disse sidervariantene. Phloretin ble ikke detektert i eplejus A, men 0,17mg/l ble funnet i eplejus M. Det har blitt detektert økt innhold av phloretin i alle sidervariantene, men konsentrasjonene varierer. I alle sidervariantene med tilsatt honning er det påvist høyest konsentrasjon av phloretin, sammenliknet med de som er tilsatt sukker. Klorogensyre er den polyfenolen som har det har blitt påvist i høyest konsentrasjon i begge eplejusene og alle sidervariantene. Innholdet av klorogensyre er en del høyere for eplejus M, sammenliknet med eplejus A. Det samme gjenspeiler seg i sidervariantene også, der innholdet av klorogensyre er høyere i variantene som er fermentert med eplejus M. I både eplejus- M og A, er innholdet av

koffeinsyre lavt. Det har økt noe i løpet av fermenteringen for alle sidervariantene. Sidervariantene som er fermentert med eplejus A, har de høyeste konsentrasjonene av koffeinsyre. Det ble kun detektert rutin i eplejus M, og i sidervariant MØS. Quercetin ble kun detektert i eplejus M. Konsentrasjonen av quercetin økte i alle sidervarianter etter fermentering med unntak av AØH, der den ikke ble detektert. I alle sidervariantene med tilsatt honning (unntatt AØH) er det påvist høyere konsentrasjon av quercetin, sammenliknet med de som er tilsatt sukker.

4.6.2 Enveis- og toveis ANOVA for polyfenoler

Det ble utført enveis- og toveis ANOVA på polyfenolene som er inkludert i tabell 4.7. Enveis ANOVA ble testet for å undersøke om variasjonen i resultatene fra hver enkelt av polyfenolene fermentert fra samme eplejus, var stor nok til påvise signifikante forskjeller som følge av gjærtype. Toveis ANOVA ble brukt for å finne ut om variasjonene i de detekterte resultatene fra hver enkelt polyfenol skyldtes signifikante forskjeller som følge av eplejusvariant, gjærtype og/eller en interaksjon mellom disse. Resultatene fra enveis og toveis ANOVA for polyfenolene er presentert i tabell 4.8 og oppgitt som P-verdi basert på 95% signifikansnivå. ANOVA ble kun testet for sidervariantene som var tilsatt sukker (ASS, ACS, AØS, MSS, MØS og MCS) og inkluderte alle tre gjentak for hver variant. Resultatene som viste signifikante forskjeller er markert med gult.

Tabell. 4.8. Oppgitte P-verdier som ble detektert gjennom enveis- og toveis ANOVA for hver av polyfenolene fra sidervariantene ASS, ACS, AØS, MSS, MØS og MCS.

Polyfenoler	Toveis-ANOVA			En-veis ANOVA	
	Eplejusvariant (eplesort)	Gjærtype	Interaksjonseffekt	Forskjeller mellom gjærtypene S, Ø og C fermentert med eplejus M	Forskjeller mellom gjærtypene S, Ø og C fermentert med eplejus A
	P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
B1, procyanidin (+)-catechin	3,57x10 ⁻⁸	0,0002	0,0001	0,1802	1,45x10 ⁻⁵
	0,8308	1,25x10 ⁻⁵	0,0083	0,0309	9,8x10 ⁻⁷
B2, procyanidin (-)-epicatechin	0,0846	0,3619	0,0067	0,2401	0,0030
	1,89x10 ⁻⁵	0,2138	0,0143	0,2232	0,0028

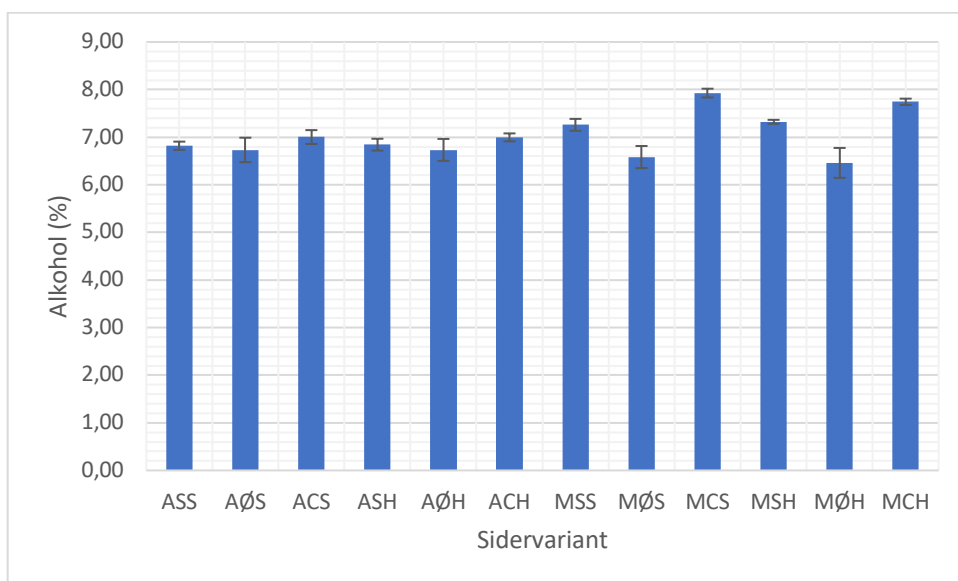
Phloridzin	0,0030	0,6730	0,7999	0,8302	1,77x10 ⁻⁵
Phloretin	0,2368	0,5160	0,5038	0,5277	0,1640
Klorogensyre	5,83x10 ⁻⁶	0,4490	0,0585	0,3698	9,47x10 ⁻⁶
Koffein-syre	7,59x10 ⁻¹¹	1,16x10 ⁻⁶	1,44x10 ⁻⁵	0,2383	1,78x10 ⁻⁵
Quercetin	0,0305	0,2900	0,5536	0,4316	0,2422

Enveis ANOVA viste at det var signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for de detekterte verdiene av enkelte polyfenoler. I sidervariantene som var fermentert med eplejus M ble det kun påvist signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for forekomsten av (+)-catechin. Mens for sidervariantene som var fermentert med eplejus A ble det funnet signifikante forskjeller mellom gjærtyperne for forekomsten av B1, procyanidin, (+)-catechin, B2, procyanidin, (-)-epicatechin, phloridzin, klorogensyre og koffein-syre.

Gjennom toveis ANOVA ble det detektert signifikante forskjeller i forekomsten av B1, procyanidin, (+)-catechin, B2, procyanidin, (-)-epicatechin, phloridzin, klorogensyre, koffein-syre og quercetin som følge av en eller flere av disse; eplejusvariant og/eller gjærtype og/eller en interaksjon mellom disse.

4.7 Anton Paar analyse

Alkoholinnhold ble bestemt i siderprøvene ASS, AØS, ACS, ASH, AØH, ACH, MSS, MØS, MCS, MSH, MØH og MCH, ved hjelp av Anton Paar analyse. Resultatene er presentert i figur 4.3 som gjennomsnittsverdier med tilhørende standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene. Alkoholinnholdet er angitt som %. Rådata er vist i vedlegg 7.



Figur 4.3 Alkoholinnhold (%) som gjennomsnittsverdier med standardavvik for sidervariantene ASS, AØS, ACS, ASH, AØH, ACH, MSS, MØS, MCS, MSH, MØH og MCH for tre

Alkoholinnholdet varierer mellom 6,46-7,84% i sidervariantene, og er noe høyere i variantene som er fermentert med champagnegjær (C) for varianter av samme eplejus.

4.8 Innhold av L-Malic acid ved UV-metoden

Konsentrasjonen av L-eplesyre ble bestemt ved hjelp av UV-metoden i eplejus M og A, samt for ferdig sider av prøvene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS. Resultatene er presentert i tabell 4.9 og oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre gjentak for hver av sidervariantene samt et gjentak i eplejusprøvene. Konsentrasjonen er angitt som g/l for alle prøvene. Rådata er vist i vedlegg 8.

Tabell 4.9. Konsentrasjon (g/l) av L-eplesyre i eplejus M og A, samt sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS.

Prøve	L-eplesyre
	g/l
M	1,452
A	1,452
ASS	1,452±0,015
AØS	1,449±0,024
ACS	1,472±0,052
MSS	1,427±0,012
MØS	1,440±0,012

Det beregnede innholdet av L-epletsyre har ikke endret seg nevneverdig fra eplejus til ferdig sider. Det er generelt små forskjeller i konsentrasjonen av L-epletsyre i de forskjellige sidervariantene.

5.0 Diskusjon

5.1 Brix

Brix-verdien gir en indikasjon på modningsgrad og den potensielle alkoholprosenten som sideren kan få ved fermentering. Normalt vil 2 enheter brix resultere i 1% alkohol, produsert av gjær (Merwin & Zakour, 2006). Etterhvert som epler modnes, så blir stivelsen omdanna til sukker, som er lett omsettelig for gjær under alkoholfermentering. Ferskpresset jus fra Aromaeplene hadde en brix på 12,1, mens for eplejus av Mutsu ga en brix på 12,4. Det var små forskjeller i brix mellom de to eplejusvariantene, samtidig som at verdiene antydte at eplene var modne. Merwin & Zakour (2006) beskrev store variasjoner i brix mellom ulike siderepler, der verdier varierte fra 8,5-18,9. Det er normalt store forskjeller i brix mellom eplesorter og som resultat av modningsgrad. I enkelte land er det strenge restriksjoner for hvor høyt alkoholinnholdet kan være før sider kategoriseres som eplevin (Merwin & Zakour, 2006). Ofte blir sider laget med en blanding av ulike eplesorter, for å oppnå en ønsket balanse mellom syrlighet, sødme og bitterhet (polyfenoler) i sluttproduktet (Jolicoeur, 2013; Lea, 2010; Buglass, 2011) j.f tabell 2.1. Aroma og Mutsu er klassifisert som dessertepler, og disse er kjent for å ha et høyt innhold av løselig tørrstoff (derav høyere brix), lavt innhold av syre og bitterhet (polyfenoler) (Merwin et al. 2008). Jolicoeur (2013) beskrev at en brix på 12,5 gir et potensielt alkoholinnhold på 6,2, som bør være et minimum for å oppnå en aromatisk sider. Eventuell tilsats av sukker er mulig, men ikke anbefalt, da bør heller eplesorter med høyere brix inngå i blandingen for å fremme et godt sluttresultat.

Det tok noen dager før brix ble merkbart redusert i eplejusvariantene etter tilsetning av gjær. Dette er å forvente ettersom gjær trenger tid til å tilvenne seg mediet samtidig som at viktige komponenter, deriblant steroler og umettede fettsyrer syntetiseres. Når brix reduseres så impliserer det at logfasen er i gang. Da øker celletallet kraftig samtidig som at sukkermolekyler forbrukes og omdannes til etanol, karbondioksid og energi generes. Dette kan ses fra dag 3-7. Under denne prosessen foregår det produksjon av viktige smaks- og aroma komponenter som biprodukt fra cellevekst. Disse vil være avgjørende og påvirke

sideren. Etterhvert vil reduksjonen i brix avta, som kan ses for samtlige sidervarianter etter rundt 7 dager. Dette skyldes blant annet at den tilgjengelige mengden med næringsstoffer avtar for gjæren og veksten stopper opp. Fermenteringsforløpet er noe forskjellig for sidervariantene, og dette blir tydeligst under den logfasen. De fleste sidervariantene ender på en gjennomsnittlig brix rundt 4-4.5. MØ er varianten som skiller seg ut, og ender til slutt med en gjennomsnittlig brix på 6.

5.2 Aminosyrer

Eplejus og sidervariantene ble analysert for innhold av frie aminosyrer (FAA), som er nitrogenkilder gjær kan nyttiggjøre seg av under metabolisme. Generelt er innholdet av nitrogenholdige kilder (frie aminosyrer utgjør en vesentlig andel) ofte en begrensende faktor for vekst av gjær (Dos Santos et al. 2015). Det har derfor en stor innvirkning på fermenteringsprosessen og derav blant annet produksjonen av ønskede aromastoffer i sluttprodukt av sider (Ma et al. 2018).

Det ble totalt identifisert 14 aminosyrer tilsammen i de to eplejusene M og A, der 13 ble funnet i eplejus A og 11 i eplejus M. Total konsentrasjonen av FAA i de to eplejusene varierte fra 572,95-745,20 mg/kg og var høyest i eplejus A. Det har blitt funnet vekslende innhold av totalt FAA i tilsvarende forsøk på eplejus fra andre eplesorter, der verdier varierer stort (Ma et al. 2018; Dos Santos et al. 2015), og generelt var lavere enn innholdet av totalt FAA som ble funnet for begge eplejusvariantene M og A. Det er noe variasjon av totalt FAA mellom eplejusvariantene og den prosentvise fordelingen av de ulike aminosyrene. Variasjoner mellom innhold av aminosyrer skyldes hovedsakelig eplesort, men blir ofte omtalt som et resultat av mange faktorer der blant annet bruk av gjødsel/ikke gjødsel, miljøbetingelser, terroir, prosessering, lagring og modning er vesentlige bidragsyttere (Ma et al. 2018; Jolicoeur, 2013; Merwin et al. 2008; Dos Santos et al. 2015).

I begge eplejusvariantene var asparagin, asparaginsyre og glutaminsyre de mest dominerende aminosyrene, og utgjorde henholdsvis 93,31%-94,99% av den totale FAA i eplejusvariantene. Ma et al (2018) og Dos Santos et al (2015) fant liknende resultater for eplejus av andre eplesorter, men der var det prosentvise innholdet noe lavere. Det prosentvise innholdet av de andre detekterte aminosyrene var relativt små i begge eplejusvariantene.

Aminosyresammensetningen i eplejus er av interesse for fermenteringsprosessen ettersom

ulike gjærtyper benytter disse i forskjellig grad, som følge av at de spiller en viktig rolle som metabolitt i produksjon av flyktige komponenter (Ma et al. 2018).

Innholdet av FAA hadde blitt markant redusert fra eplejus til ferdig sider for alle sidervarianter. Dette er et resultat av fermentering der gjærcellene blant annet nyttiggjør seg av tilgjengelig aminosyrer for vekst og biomasseproduksjon. Underveis i denne prosessen så dannes det metabolitter som inngår i produksjonen av flyktige komponenter, deriblant høyere alkoholer, estere, karbonyler og svovelforbindelser (Fairbairn et al. 2017). Produksjonen av disse komponentene er delvis eller helt påvirket av den tilgjengelige konsentrasjonen og sammensetningen av aminosyrer under fermenteringen (Dos Santos, 2015; Buglass, 2011). Høyere alkoholer er hovedgruppen av flyktige komponenter i sider og blir dannet gjennom katabolisme av aminosyrer via Erhlich syntesevei. Disse kan videre være mellomprodukter i produksjonen av estere i løpet av fermenteringsprosessen. Dos Santos et al (2015) oppdaget at gjærens forbruk av asparagin, asparaginsyre og glutaminsyre under fermentering gir vesentlig bidrag i produksjonen av høyere alkoholer (2-fenyletanol og 3-metyl-1-butanol) og estere (etyl ethanoat) som fremmer fruktig aroma i sluttproduktet. Mens gjærens utnyttelse av theronin, lysin og cystein ikke påvirker den samlede smak og aroma i sluttproduktet.

Vekst kinetikk i fermenteringsprosessen er en annen faktor som påvirkes av innhold og sammensetning av aminosyrer (Fairbairn et al. 2017). Dette baserer seg på forløpet av fermenteringsprosessen der innholdet av frie aminosyrer i eplejusen er omtalt som en hastighetsbestemmende faktor for fermenteringen. For lavt innhold kan gi sakte og ufullstendig fermentering, med høy produksjon av uønskede svovelholdig aroma (eks dimetylsulfid og diacetyl) (Ma et al., 2018). Ifølge Dos Santos et al (2015) så kan et innhold på >75mg/l hindre at fermenteringen stopper eller blir ufullstendig. Lavt innhold av FAA i sidervariantene tyder på at gjærveksten ikke har blitt begrenset av mangel på aminosyrer under fermenteringen, som ofte kan være et problem under produksjon av sider (Dos Santos et al. 2015). Det var hovedsakelig glysin som ble detektert av FAA i sidervariantene. Innholdet av glysin utgjorde en ubetydelig mengde i alle sidervariantene og tilsvarte stort sett samme konsentrasjon som eplejusen før fermentering. Det betyr at gjæren i liten eller ingen grad har benyttet tilgjengelig glysin under vekst og biomasseproduksjon.

5.3 Karbohydrater

Gjærceller har ulik evne til å utnytte og metabolisere forskjellige karbohydrater (Buglass, 2011). Gjæren innehar viktige enzymer som er vesentlig for å spalte komplekse karbohydrater og dermed gjør de i stand til å benytte seg av disse. Karbohydrater sammen med gjær og de rette betingelsene danner grunnlaget for fermentering og dermed produksjon av etanol, karbondioksid og andre metabolske biprodukter, i tillegg til energi (Daccache et al.2020). Det er ønskelig med en rask og fullstendig fermentering av de tilgjengelige sukkermolekylene som gir en smaksrik og aromatisk sider uten produksjon av usmak, med tilstrekkelig alkoholprosent og et lavere innhold av restsukker, som dermed reduserer den potensielle mikrobielle trusselen under videre lagring (Wang et al. 2004). For å kunne forutse og kontrollere fermenteringsprosessen, så er det viktig å vite hvilke karbohydrater som er tilstede og omsettes i løpet av fermenteringen.

Det var små forskjeller mellom innhold av maltose og fruktose i eplejus A og M, men noe varierende innhold av glukose på henholdsvis 17,33g/l (eplejus M) og 10,66g/L (eplejus A). Daccache et al (2020) forklarte at forskjeller i karbohydratinnhold hovedsakelig skyldes eplesort, miljøbetingelser, terroir og lagring. Høyeste konsentrasjonen ble funnet å være fruktose i begge eplejusvariantene, som stemmer godt overens med tilsvarende observasjoner om at fruktose dominerer blant de fermenterbare sukkermolekylene (Merwin et al. 2008; Daccache et al. 2020; Jolicoeur, 2013; Buglass, 2011; Magalhaes et al. 2017). Maltose er den eneste av de detekterte karbohydratene som har blitt fullstendig fermentert i alle siderprøvene. Det tyder på at gjæren har foretrukket denne karbohydratkilden, som er avhengig av enzymatisk spalting for å tilgjengeliggjøre glukosen som er lett omsettelig i den videre energimetabolismen. Normalt er det forventet at gjærcellene benytter seg av sukkermolekyler via et spesifikt mønster, der monosakkaridene glukose (førstevalg) og fruktose blir omsatt før disakkarider, som maltose (Wang et al, 2004). Dette ble ikke observert her og kan skyldes ulike grunner. Wang et al (2004) beskrev hvordan vekstkinetikken til ulike gjærtyper påvirkes av om de er glukofil (foretrekker glukose) eller fruktofil (foretrekker fruktose) og likeledes av miljøbetingelser, slik som temperatur, substrat, og alkoholinnhold. Dette kan føre til at ulike gener uttrykkes ved forskjellige tidspunkt i fermenteringsprosessen og dermed påvirker hvordan opptaket av de ulike sukkermolekylene blir.

Konsentrasjonen av fruktose har blitt markant redusert i alle sidervariantene i løpet av fermenteringen. Det er noen forskjeller mellom sidervariantene når det kommer til fruktoseinnholdet. Alle sidervarianter som er fermentert med eplejus M, som i utgangspunktet hadde et lavere fruktoseinnhold før fermentering sammenliknet med eplejus A, har generelt et litt lavere innhold etter fermentering. Dessuten kan det virke som at gjærtypene har påvirket omsetningen av fruktose, hvor det største restinnholdet av fruktose er detektert i sidervariantene som er fermentert med sidergjær (S), etterfulgt av ølgjær (Ø) og tilslutt champagnegjær (C), for sidervariantene av samme eplejus. Forskjellene i fruktoseinnhold mellom de ulike sidervariantene som er fermentert med forskjellige gjærtyper er imidlertid lave.

Innholdet av glukose i MØS og MCS var henholdsvis 0,11 g/l og 0,39 g/l som tyder på tilnærmet fullstendig fermentering av glukose i disse variantene. Noe høyere verdier ble detektert i de andre sidervariantene, og konsentrasjonen av glukose var størst i ASS og MSS, med henholdsvis 8,16 g/l og 6,14 g/l. Det tyder på at gjæren ikke hadde omsatt store mengder av den tilgjengelige glukosen fra eplejusen. Dette kan skyldes forskjeller mellom gjærtypene og hvilke gener som uttrykkes i gitte medier. Magalhaes et al (2017) og Daccache et al (2020) beskriver hvordan opptakt av glukose og fruktose påvirkes av konsentrasjonen de opptrer med i eplejus, der høyt eller lavt innhold av de respektive sukkermolekylene kan indusere eller inhibere omsetningen av disse. Innholdet av glukose og fruktose kan sammen med temperaturen ha en stor innvirkning på vekstraten til gjær, dermed fermenteringsforløpet. Dette vil igjen påvirke aroma og smaksprofil i sluttproduktet (Magalhaes et al. 2017).

MØ (MØS) var den varianten som hadde høyest brix med 6.3, etter primærfermentering (alkoholfermentering). Dette ser ikke ut til å ha påvirket restinnholdet av glukose, fruktose og maltose, sammenlignet med de andre variantene. MØS er derimot sammen med MCS den varianten som har lavest restinnhold av de analyserte karbohydratene. Dette tyder på at gjær har metabolisert mesteparten av de tilgjengelige sukkermolekylene i løpet av primær- og sekundærfermenteringen, som impliserer en tilnærmet fullstendig fermentering for disse variantene.

5.4 Organiske syrer

Organiske syrer er ansett for å være en viktig bidragsyter for siderens kompleksitet samt sluttkvalitet og opptrer i synergi med polyfenoler i utvikling av bitterhet og astringens (Bandic et al. 2018; Zhang et al. 2008; Daccache et al. 2020). I tillegg bidrar organiske syrer med syrlig smak, pH og dermed mikrobiell stabilitet. Hver organiske syre tilfører sin unike karakteristikk til sluttproduktet (Zhang et al. 2008).

5.4.1 L-eplesyreinnhold gjennom UV-metoden

Eplesyre er dominerende blant syrene i eplejus og sider og er den største bidragsyteren i sluttproduktet. Høyt innhold av eplesyre kan føre til skarp- og uønsket smak i sluttprodukt av sider (Zhang et al. 2008). I slike tilfeller kan eplesyrefermentering være aktuelt for å redusere innholdet av eplesyre med økt innhold av melkesyre (Zhao et al. 2014).

Eplesyre inngår i en rekke biokjemiske prosesser, og kan både omsettes og produseres av gjæren under fermentering (Zhang et al. 2008). Ye et al (2014) beskrev at etanol, isobutanol, amyl alkohol, ravsyre og melkesyre kan være et resultat av nedbrytning av eplesyre. Det har blitt funnet store variasjoner knyttet til eplesyre konsentrasjon i eplejus og ferdig sider fra tidligere studier. Bandic et al (2018) observerte verdier fra 3,56- 3,82 g/l i eplejus og 3,33- 3,79 g/l i ferdig sider. Zhang et al (2008) observerte eplesyre konsentrasjoner på 7,17g/l i eplejus og 5,78g/l etter 18 dagers fermentering. Rosend et al (2019) detekterte verdier fra 2,93-6,15 g/l i eplejus og 1,88-5,05g/l i ferdig sider. Forskjeller i eplesyre innhold kan skyldes ulike faktorer, der eple-sort er den viktigste (Daccache et al. 2020). De detekterte konsentrasjonene av L-eplesyre i eplejus og sidervariantene viste små forskjeller fra 1,427- 1,472g/l. Dessuten ble det påvist et mye lavere innhold enn det som er funnet i tilsvarende studier (Bandic et al. 2018; Zhang et al. 2008; Rosend et al. 2019). Alle eplesyreverdiene er lavere enn det som ble funnet av ravsyre i eplejus og av ferdig sider for de fleste variantene med unntak av ASS. Dette er lite sannsynlig da de fleste andre studier har funn som indikerer at eplesyre er den dominerende syren før og etter fermentering av eplejus (Bandic et al. 2018; Zhang et al. 2008; Rosend et al. 2019; Buglass, 2011). Det kan dermed tyde på at resultatene som ble detektert gjennom denne analysemetoden ikke ga de resultatene som var ønskelig eller at utførelsen ikke ble gjort riktig. Imidlertid ble analysemetoden testet opp mot en tilhørende kontroll løsning som fulgte med eplesyre-kitet. Kontroll løsningen inneholdt en kjent konsentrasjon av L-eplesyre på 0,196g/l. Analysen ble utført i forhold til beskrivelsene i den medfulgte instruksjonen. Absorbans ble målt som videre ble benyttet i samme formel som ble brukt til å beregne konsentrasjonen av L-eplesyre i de analyserte prøvene av eplejus og

sider. Resultatet ga en konsentrasjon av L-eplesyre 0,196g/l som samsvarte med konsentrasjonen i kontrollprøven (0,196g/l). Dette resultatet styrker antakelsen om at analysen ble utført riktig i forhold til den medfulgte instruksjonen, som gjør det vanskelig å forklare hvorfor de detekterte eplesyrekonsentrasjonen var så lav for alle de analyserte prøvene.

5.4.2 Organiske syrer detektert med HPLC

Sitronsyre utgjør et viktig mellomprodukt i krebssyklus og kan bli produsert under fermentering og senere inngå som et produkt i katabolismen eller metaboliseres til eddiksyre (Buglass, 2011). Det var små forskjeller mellom eplejus A og M i henhold til konsentrasjon av sitronsyre. Innholdet av sitronsyre ble mer enn doblet i samtlige av sidervariantene i løpet av fermenteringen. ACS var den eneste prøven der sitronsyrekonsentrasjonen ikke hadde endret seg fra eplejus til ferdig sider. En økning i konsentrasjon av sitronsyre har blitt funnet i flere lignende studier. Både Bandic et al (2018) og Zhang et al (2008) har påvist en markant økning i sitronsyreinnhold fra eplejus til ferdig sider. I begge disse studiene ble det detektert mye høyere konsentrasjoner i både eplejus og ferdig sider, med verdier på henholdsvis 110-130mg/l i eplejus og 250-290mg/l i ferdig sider (Bandic et al. 2019) samt 116,52mg/l i eplejus og 512,89 etter 18 dagers fermentering i (Zhang et al. 2008). Innholdet av sitronsyre var relativt jevnt mellom sidervariantene (unntatt ACS) med den høyest detekterte verdien på 97,1 mg/l i MCS og den lavest på 43,1mg/l i ACS. For ACS var standardavviket veldig høyt, noe som impliserer at det var store variasjoner mellom de tre gjentakene. Sitronsyre blir ofte tilsatt under fermentering av sider for å justere syrligheten og stabiliteten i sluttproduktet (Zhang et al. 2008).

Alfa-ketoglutarsyre er en viktig metabolitt som inngår i krebssyklus. Den er fundamental for gjærcellenes biomasseproduksjon og et mellomprodukt i mange anabolske og katabolske prosesser, deriblant produksjonen av enkelte aminosyrer som glutaminsyre (Zhang et al. 2020). Det ble ikke funnet alfa-ketoglutarsyre i noen av eplejusvariantene. I løpet av fermenteringen så har det blitt produsert alfa-ketoglutarsyre i alle sidervariantene. Innholdet varierer fra 25- 409,6mg/l. De største konsentrasjonene er funnet i variantene som er fermentert med sidergjær (S). Det tyder på at sidergjær har hatt en stor påvirkning på produksjonen av alfa-ketoglutarsyre i løpet av fermenteringen. Imidlertid ble det påvist et markant høyere innhold i ASS med henholdsvis 409,6mg/l, sammenlignet med MSS hvor konsentrasjonen var 218,6mg/l. Det er noe forskjell mellom produksjon av alfa-ketoglutarsyre i ølgjær og

champagnegjær. De minste konsentrasjonene av alfa-ketoglutarsyre ble påvist i AØS og MØS. Eplesort virker også å ha en effekt på produksjonen av alfa-ketoglutarsyre, og ble påvist i høyest konsentrasjon i sidervarianter fermentert med eplejus A, avhengig av gjærtype.

Pyrodruesyre er en annen viktig komponent som inngår i flere metabolske prosesser under fermentering og er blant annet et mellomprodukt i glykolysen (Bandic et al. 2018). Under fermentering utskilles det normalt ulike konsentrasjoner av pyrodruesyre med verdier fra 80-640mg/l (Zhang et al. 2008). Zhang et al (2008) påviste at den største produksjonen av pyrodruesyre var når rundt halvparten av suktermolekylene var omsatt. Deretter ble deler av mengden metabolisert på nytt, hvor sluttkonsentrasjonen ble påvirket av gjærtype og tilgjengelig substrat samt næring i mediet (Zhang et al.2008). Det ble ikke påvist pyrodruesyre i eplejusvariantene. Tidligere studier viser liten eller ingen innhold av pyrodruesyre i eplejus (Caulgar et al. 2021; Zhang et al.2008). Det ble påvist varierende innhold av pyrodruesyre i alle sidervariantene med verdier fra 65,5-197,3mg/l. Det betyr at alle gjærtypene har produsert pyrodruesyre i løpet av fermenteringen. Sidervariantene som var fermentert med ølgjær (Ø) har høyest konsentrasjon av pyrodruesyre med verdier fra 197,3mg/l for AØS og 178,1mg/l for MØS. Den laveste produksjonen av pyrodruesyre ble påvist i sidervariantene fermentert med champagnegjær, for hver av eplejusvariantene. Det tyder på at gjærtype har hatt en påvirkning på produksjon av pyrodruesyre, noe som også ble påvist av Zhang et al (2008). Konsentrasjonen av pyrodruesyre er noe høyere for sidervariantene som er fermentert med eplejus A. Dette henger sammen med observasjoner som Zhang et al (2008) gjorde i sine funn, der mediet/epleråstoffet har innvirkning på produksjonen av pyrodruesyre.

Ravsyre inngår som et viktig metbolitt i alkoholfermentering, der sluttkonsentrasjonen påvirkes av gjærtype (Bandic et al. 2018). Den tilfører syrlighet til sider og dannes fra epletsyre under anaerobe forhold samt induseres av lav pH (Zhang et al. 2008). Ravsyre er den mest dominerende blant de detekterte organiske syrene fra HPLC-analysen. Både eplejusen og ferdig sider inneholder store mengder ravsyre. Det ble påvist henholdsvis 1627,4mg/l ravsyre i eplejus M og 1598,4mg/l ravsyre i eplejus A. Det er derfor små forskjeller mellom de to eplejusvariantene. Etter fermentering er det detektert varierende konsentrasjoner av ravsyre med verdier fra 856,7- 3026,8mg/l. Disse konsentrasjonene er mye høyere enn det Bandic et al (2018), Ye et al (2014) og Zhang et al (2008) påviste i sine studier av ferdig sider, som varierte fra 19,1-350mg/l. Zhang et al (2008) beskrev at variasjoner mellom 0-

1600mg/l kan forekomme i eplejus og av ferdig sider. For samtlige av sidervariantene er det påvist over 1600mg/l. Det ble påvist størst variasjon i innhold mellom sidervariantene som var fermentert med eplejus A. For begge eplejusvariantene var det ølgjær (Ø) etterfulgt av champagnegjær (C), som ga høyest konsentrasjon av ravsyre, mens sidergjær (S) genererte lavest konsentrasjon. Det er imidlertid betydelige standardavvik for enkelte av sidervariantene (ACS og MØS), som tyder på store variasjoner mellom de detekterte konsentrasjonene av ravsyre for de tre parallellene. Ravsyre er en viktig bidragsyter gjennom interaksjon med andre molekyler som fremmer esterproduksjon (Ye et al. 2014).

Eddiksyre er blant den viktigste av organiske syrer i sider og er forløperen til ethyl acetat (Zhang et al. 2008). Høy konsentrasjon av eddiksyre kan forårsake syrlig og uønsket smak i sider, som i verste fall kan omdannes til eple-sideddik (Whithing, 1973). Ukontrollert melkesyrefermentering kan fremme oksidering av etanol til eddiksyre (Buglass, 2011). I eplejus M ble det ikke detektert eddiksyre. Det ble påvist en konsentrasjon på 172,2mg/l eddiksyre i eplejus A. Alle sidervariantene som var fermentert med eplejus A, hadde en reduksjon i innhold av eddiksyre. Zhang et al (2008) påviste økt innhold av eddiksyre som resultat av fermentering og foreslo at gjærtype, substrat og næring i mediet samt betingelser under fermentering kan påvirke eddiksyre metabolisme. Konsentrasjonen av eddiksyre økte i alle sidervarianter som var fermentert med eplejus M, noe som samsvarer med tilsvarende observasjoner gjort av Zhang et al (2008), der konsentrasjonen økte fra 25,07mg/l i eplejus til 82,18mg/l i sider. De detekterte konsentrasjonene av eddiksyre varierte fra 28,7- 156,9 mg/l i sidervariantene. Innholdet av eddiksyre virket å variere mellom gjærtyper og for sidervariantene som var fermentert med ølgjær (Ø) ble det detektert lavest konsentrasjon av eddiksyre, med henholdsvis 28,7 mg/l i AØS og 42,1 mg/l i MØS. For de andre sidervariantene var det forskjell mellom gjærtype og eplesort i produksjonen av høyest eddiksyrekonsentrasjon. Det ble detektert et stort standardavvik for MSS, grunnet store variasjoner mellom påviste resultater i de tre parallellene.

5.5 Flyktige komponenter

Flyktige komponenter blir ansett som viktige bidragsytere i den totale sluttkvaliteten i sider, der de i små mengder tilfører kompleksitet og fruktighet (Dos Santos et al. 2015). Mange smaks- og aromakomponenter stammer fra råstoffet, mens andre dannes, reduseres eller økes under fermentering og er ansett for å forbedre sluttkvaliteten i sider (Guine et al.

2021). Williams (1974) beskrev at flyktige komponenters bidrag i sider er avgjørende for forståelsen av smak og aroma. Flyktige komponenter er et resultat fra mange biokjemiske prosesser som skjer under fermentering, der hovedfokuset for gjærcellene er vekst og energiproduksjon. Et mangfold av ulike metabolitter dannes gjennom disse prosessene og gir videre grunnlag for produksjon av en rekke smaks- og aromakomponenter, som kan detekteres i sluttproduktet. Medina et al (2020) og Bingman et al (2020) beskrev innholdet av flyktige komponenter som et resultat av eplesort, modning, lagring, prosessering, terroir og gjærtype.

5.5.1 Høyere alkoholer

Høyere alkoholer omfatter den mest dominerende gruppen blant de flyktige komponentene og er ansett for å tilføre mye smak og aroma i sider (Xu et al. 2007). Forekomsten av høyere alkoholer er tilknyttet aminosyre metabolisme (Herrero et al. 2006). Derfor har innholdet- og sammensetningen av aminosyrer en effekt på forekomsten- og sammensetningen av høyere alkoholer, der blant annet 1-propanol assosieres med theronin, 2-metyl-1-propanol produseres av valin og 2-metyl-1-butanol og 3-metyl-1-butanol stammer fra isoleucin og leucin (Medina et al 2020, Bingman et al. 2020; Herrero et al. 2006; Rosend et al. 2019). Terskelverdiene er ofte høyere for disse enn for ester, karbonyler og andre flyktige komponenter. Det ble totalt påvist 6 høyere alkoholer i eplejus og sidervariantene, der 1-propanol ble detektert i mye lavere konsentrasjon enn terskelverdien som ble definert i Carru et al (2007), på 830mg/l. Den anses derfor for å ha mindre betydning for smak- og aroma i sideren . Williams (1974) beskrev terskelverdiene som gode kilder som indikerer hvor store konsentrasjoner som må til for å detektere en gitt komponent. Imidlertid kan det oppstå interaksjoner med andre komponenter, som er viktig for den organoleptiske opplevelsen, til tross for at terskelverdien ikke er nådd for denne komponenten. Noe som antyder at komponenter som detekteres under terskelverdi, ikke nødvendigvis har fraværende påvirkning på produktet.

Det ble påvist i ganske lik mengde av 2-metyl-1-propanol i eplejusvariantene på henholdsvis 0,25mg/l i eplejus M og 0,30mg/l i eplejus A. I løpet av fermenteringen har det vært en markant økning i konsentrasjonen av 2-metyl-1-propanol. Det impliserer at denne har blitt produsert av gjær i løpet av fermentering. Innholdet varierer fra 18,9-60,1mg/l, og ble påvist i størst konsentrasjon i AØH og AØS. De fleste sidervariantene har en konsentrasjon under 40mg/l, som ble definert som terskelverdi av Carru et al (2007). Resultatene viser tilnærmet

ingen forskjell mellom prøver tilsatt honning sammenlignet de som ble tilsatt sukker i sidervariantene som er fermentert med eplejus A, men noe for sidervarianter av eplejus M. Det ble detektert høyere konsentrasjoner i sidervarianter fermentert med eplejus A, avhengig av gjærtype. Sidervarianter fermentert med ølgjær ga høyest innhold av 2-metyl-1-propanol, mens sider fermentert med champagnegjær hadde lavest innhold. 2-metyl-1-propanol anses for å bidra med en vinaktig, løsemiddel smak, og denne er trolig mest fremtredende i AØS og AØH. Konsentrasjonen av 2-metyl-1-propanol viste signifikante forskjeller som følge av eplejusvariant, gjærtype og interaksjonen mellom disse.

Konsentrasjonen av 3-metyl-1-butanol har økt markant i alle sidervarianter i løpet av fermenteringen, der innholdet varierer fra 90,8-190,8 mg/l. Mens konsentrasjonen i eplejus M var 0,08mg/l og i eplejus A 0,35mg/l. Det tyder på at 3-metyl-1-butanol er en komponent som i stor grad dannes av gjær under fermenteringsprosessen. dos Santos et al (2015) detekterte verdier fra 93,7-2581mg/l i sider fra ulike eplesorter fermentert med forskjellige gjærtyper. Mens Medina et al (2020) fant konsentrasjoner fra 0-14,3 mg/l i ferdig sider. Det tyder på store variasjoner mellom innhold av 3-metyl-1-butanol i ferdig sider. Calugar et al (2021) beskrev at forskjeller i flyktige komponenter skyldes mange faktorer, deriblant eplesort, gjærtype og prosessering. Alle sidervariantene har høyere konsentrasjon av 3-metyl-1-butanol enn terskelverdiene som er beskrevet av Carru et al (2007), på 30mg/l. Den er ansett for å være en av de viktigste flyktige komponentene i sider og tilfører fruktig-, brent-, alkohol- og svak negl lakk aroma i sluttproduktet (dos Santos et al. 2015; Carru et al. 2007; Bingman et al, 2020; Medina et al. 2020). Bingman et al (2020) beskrev at for konsentrasjoner over 300mg/l kan 3-metyl-1-butanol bli for skarp. De høyeste konsentrasjonene er detektert i sidervariantene som var fermentert med sidergjær (S), ASS, ASH, MSS og MSH. For disse var det små forskjeller mellom eplejusvariant og/eller hvorvidt de var tilsatt honning/sukker. Blant sidervariantene fermentert med eplejus M eller A og ølgjær/champagnegjær, tilsatt honning/sukker, ikke hadde store forskjeller i konsentrasjon av 3-metyl-1-butanol med verdier fra 90,8-106,2 mg/l. Det ble påvist signifikante forskjeller i konsentrasjonen av 3-metyl-1-butanol som følge av gjærtype og interaksjon mellom gjærtype og eplejus. Eplejus som uavhengig faktor, ga ikke utslag for signifikans i forekomsten av 3-metyl-1-butanol.

2-metyl-1-butanol er en annen komponent der konsentrasjonen har økt mye i alle sidervariantene, som følge av fermenteringen, med innhold som varierer fra 13,5-34,3mg/l. I eplejusvariantene ble det detektert lave konsentrasjoner på henholdsvis, 1 mg/l i eplejus M og

0,64mg/l i eplejus A. Rosend et al (2019) detekterte verdier fra 0,31-3,54mg/l i sider, der de fant signifikante forskjeller som følge av modningsgrad og eple-sort, men ikke som resultat av gjærtype. Resultatene oppnådd i dette forsøket samsvarer ikke med de verdiene som ble funnet for Rosend et al (2019). Det var kun ASS og ASH som ble detektert over terskelverdien som er beskrevet av Carru et al (2007), på 30mg/l. 2-metyl-1-butanol er kjent for å tilføre whisky-, malt- og brent aroma i sluttproduktet. Det var eplejusvariantene som ble fermentert med sidergjær (S), som ga høyest produksjon av 2-metyl-1-butanol. I tillegg ble det generelt funnet noe høyere konsentrasjon i de variantene som var fermentert med eplejus A, avhengig av gjærtype. Tilsats av sukker/ honning ser ikke ut til å gi nevneverdige forskjeller i konsentrasjon av 2-metyl-1-butanol i ferdig sider. Både eplejusvariant, gjærtype og interaksjonen mellom disse har gitt signifikante utslag på forekomsten av 2-metyl-1-butanol i ferdig sidervariantene (tabell 4.6).

Konsentrasjonen av 2-hexanol var 4,36mg/l i eplejus A, men ble ikke detektert i eplejus M. For alle sidervarianter som er fermentert med eplejus A, så har innholdet blitt redusert, der verdier fra 1,45-2,97 mg/l har blitt detektert. I alle sidervariantene som har blitt fermentert med eplejus M, har det blitt detektert økte verdier, fra 0,62-1,42mg/l, som følge av fermenteringsprosessen. De høyeste konsentrasjonene har blitt påvist i eplejusvariantene som er fermentert med ølgjær (Ø) i eplejus A og champagnegjær (C) i eplejus M. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomst av 2-hexanol som følge av eplejusvariant og gjærtype, men ikke som interaksjon mellom disse. For alle sidervarianter der honning ble tilsatt, så tyder det på å gi noe høyere restverdi av 2-hexanol, sammenlignet med de variantene som ble tilsatt sukker, avhengig av gjærtype og eplejusvariant. Miller (2019) beskrev at 2-hexanol tilfører blomster- og søtlig aroma til sluttproduktet. Det er aroma som trolig kan gi ønskede effekter på sluttprodukt av sider, men ettersom det ikke ble funnet noen terskelverdi for innhold av 2-hexanol i annen litteratur, så er det vanskelig å definere betydningen av denne i sidervariantene fra dette forsøket. Dos Santos et al (2015) fant konsentrasjoner av 2-hexanol fra 0-213mg/l i sidervarianter fermentert med ulike gjærtyper og eple-sorter og beskrev innholdet som viktig del av den fruktige aromaen i sider.

Innholdet av 1-hexanol er ansett for å gi en grønn-, nøtteaktig- og søt aroma i sluttproduktet (Bingman et al. 2020). Konsentrasjonen var på henholdsvis 9,04mg/l for eplejus A og 2,33mg/l for eplejus M. For alle sidervarianter som er fermentert med eplejus A, så har innholdet blitt redusert, der verdier fra 5,22-8,15 mg/l har blitt detektert. I alle sidervariantene

som har blitt fermentert med eplejus M, har det blitt detektert økte verdier, fra 2,91-4,58 mg/l, som følge av fermenteringsprosessen. For alle sidervarianter der honning ble tilsatt, er det detektert noe høyere innhold av 1-hexanol sammenlignet med de variantene som ble tilsatt sukker, avhengig av gjærtype og eplejusvariant. Alle sidervariantene hadde høyere konsentrasjon av 1-hexanol enn terskelverdi som ble beskrevet av Bingman et al (2020) på 0,11mg/l. 1-hexanol er derfor ansett for å tilføre ønsket smak og aroma i alle sidervariantene. Det ble funnet signifikante forskjeller i forekomsten av 1-hexanol som følge av eplejusvariant, gjærtype og interaksjon mellom disse. Fra andre utførte studier på sider, har det blitt funnet varierende innhold av 1-hexanol. Dos Santos et al (2015) beskrev verdier fra 0-117mg/l, Rosend et al (2019) fant verdier fra 0,28-46,59mg/l og Medina et al (2020) detekterte verdier fra 0,17-0,41mg/l. Alle studiene beskriver lignende forhold som ble observert i dette forsøket, om at konsentrasjonen av 1-hexanol ble redusert eller økt i løpet av fermenteringen, avhengig av gjærtype og eplejusvariant (Dos Santos et al. 2015; Rosend et al. 2019; Medina et al. 2020).

5.5.2 Ester

Estere er kjent for å tilføre fruktig-, blomsteraktig- samt søt smak i sider, og har ofte lave terskelverdier som gjør de relevant for smak- og aroma selv i små konsentrasjoner (Herrero et al. 2006). Estere finnes naturlig i epleråstoffet, men mange blir produsert i løpet av fermenteringsprosessen av gjær som følge av at de inngår i viktige biokjemiske prosesser, der esterifisering av alkoholer og fettsyrer forekommer, eller som resultat av fettsyresyntetisering (Dos Santos et al. 2015; Bingman et al. 2020). Ofte vil økt produksjon av estere føre til redusert innhold av høyere alkoholer, ettersom disse er viktige mellomprodukt i dannelsen av ester (Medina et al. 2020, Dos Santos et al. 2015). Det ble totalt påvist 7 estere i eplejus- og sidervariantene, der etyl heptanoat ble detektert i mye lavere konsentrasjon enn terskelverdien som er definert av Miller (2019). Dessuten finnes det lite informasjon om betydningen av denne i andre studier av sider (Dos Santos et al. 2015; Bingman et al. 2020; Medina et al. 2020; Wilson et al. 2021; Rosend et al. 2019). Den anses derfor for å ha mindre betydning for smak og aroma i sidervariantene.

Etyl acetat ble detektert i lave konsentrasjon for begge eplejusvariantene, med henholdsvis 0,03mg/l i eplejus M og 1,37mg/l i eplejus A. Det hadde vært en markant økning av etyl acetat for alle sidervariantene i løpet av fermenteringen, med variasjoner fra 7,25-21,51mg/l. Det tyder på at etylacetat er et resultat av biokjemiske prosesser i gjærmetabolismen som

forekommer under fermentering. Herrero et al (2006) beskrev etyl acetat som den dominerende esteren i sider og at den produseres av gjær fra acetyl-CoA og etanol. Alle sidervariantene med unntak av ASS, ga konsentrasjoner av etyl acetat over terskelverdien som ble beskrevet av Carru et al (2007), på 7,5mg/l. De er ansett for å tilføre fruktig-, søtlig-, neglelakk aroma i sluttproduktet (Carru et al. 2007), som dermed er med på å påvirke ønskede effekter i sluttproduktet av sidervariantene. Bingman et al (2020) beskrev at ved høye konsentrasjoner av etyl acetat, så kan det fremme uønsket løsemiddelaroma. Rosend et al (2019) påviste konsentrasjoner fra 0,01-0,7 i sidervarianter, mens Medina et al (2020) detekterte verdier fra 0,07-0,33mg/l i forskjellige sidervarianter. Disse verdiene er mye lavere og samsvarer dårlig med de detekterte verdiene som ble funnet for sidervariantene i dette forsøket. Det ble påvist høyere konsentrasjoner i alle sidervariantene som var tilsatt honning sammenlignet med tilsvarende varianter tilsatt sukker. Sidervarianter fermentert med eplejus M, ga jevnt over høyere verdier enn tilsvarende som ble fermentert med eplejus A. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av etyl acetat, som følge av eplejusvariant, gjærtype og interaksjoner mellom disse.

Konsentrasjonen av isobutyl acetat er relativt likt i eplejus M og A, med henholdsvis 0,023mg/l i eplejus M og 0,019mg/l i eplejus A. For samtlige av sidervariantene har innholdet av isobutyl acetat økt i løpet av fermenteringen. Konsentrasjonen i sidervariantene varierer fra 0,009-0,058mg/l. Medina et al (2020) påviste konsentrasjoner fra 0-0,0019mg/l i ulike sidervarianter. Disse verdiene er mye lavere enn det som ble påvist for sidervariantene i dette forsøket. For alle sidervariantene ble det påvist verdier over terskelverdien beskrevet av Miller (2019) på 0,008 mg/l. Det er imidlertid store forskjeller mellom de detekterte konsentrasjonene, der innholdet av isobutyl acetat jevnt er over høyere i variantene som er tilsatt sukker sammenlignet med tilsvarende varianter som er tilsatt honning. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomst av isobutyl acetat som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus A, men ikke for eplejus M. Dessuten ble det ikke påvist signifikante forskjeller i forekomst av isobutyl acetat i sidervariantene som følge av eplejusvariant. Miller (2019) angir at isobutyl acetat tilfører fruktig-, søtlig-, eterisk- og bananaroma i sluttproduktet. Isobutyl acetat er derfor ansett for å kunne tilføre sidervariantene ønsket aroma, som totalt kan påvirke fruktighet sluttproduktet.

Innholdet av butyl acetat var klart høyest i eplejus A med 5,09mg/l, mens den var 0,75mg/l i eplejus M. Konsentrasjonen er markant redusert i alle sidervariantene etter fermentering, med

varierende innhold fra 0-1,69 mg/l. Det ble påvist lavest innhold i sidervariantene som var tilsatt honning, sammenlignet med tilvarende varianter med sukker. Rosend et al (2019) detekterte verdier 0,00017-0,012mg/l i sider, noe som er adskillig lavere enn det som ble detektert i samtlige sidervarianter i dette forsøket. For de fleste sidervarianter ble det påvist konsentrasjoner over terskelverdien beskrevet av Miller (2019) på 0,016mg/l. Butyl acetat er ansett for å tilføre en eple-, banan-, søtlig- løsemiddel/acetone aroma i sluttproduktet (Miller, 2019; Rosend et al. 2019). Medina et al (2020) beskrev butyl acetat som en av de viktigste komponentene for å fremme karakteristisk eplearoma i sider. Det ble påvist signifikante forskjeller mellom eplejusvariantene i forekomsten av butyl acetat i sidervariantene, men ikke signifikante forskjeller som følge av gjærtype.

Isoamyl acetat ble påvist i små konsentrasjoner i begge eplejusvariantene, på henholdsvis 0,55mg/l i eplejus M og 0,21mg/l i eplejus A. I sidervariantene var innholdet varierende med verdier fra 0,062-3,85mg/l, der det jevnt over ble påvist størst konsentrasjon i MSS, MØS og MCS, sammenlignet med ASS, AØS og ACS. Det ble funnet et mye lavere innhold i sidervariantene som var tilsatt honning sammenlignet med tilsvarende varianter med sukker. For variantene med honning, hadde konsentrasjonen av isoamyl blitt redusert fra eplejus til ferdig sider (unntatt for AØH og MØH). Det kan tyde på at honning har hatt en negativ effekt på produksjon av isoamyl for sidergjær (S) og champagnegjær (C), i disse variantene. Det finnes imidlertid ikke litteratur som beskriver tilsvarende funn, som gjør det vanskelig å vite hvilke faktorer eller mekanismer som forårsaker dette. For alle sidervarianter som ble tilsatt sukker hadde konsentrasjonen av isoamyl acetat økt fra eplejus til ferdig sider. Rosend et al (2019) beskrev at 3-metyl-1-butanol kan inngå i esterifisering i produksjonen av isoamyl acetat under fermentering. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av isoamyl acetat som følge av eplejusvariant og gjærtype. Isoamyl acetat er ansett for å gi en banan- og pærearoma i sluttproduktet, som bidrar med fruktighet i sider (Carru et al. 2007; Rosend et al. 2019). Rosend et al (2019) påviste konsentrasjoner av isoamyl acetat i sidervarianter mellom 0,0039-0,252mg/l, som tidels samsvarer med innholdet i sidervariantene fra dette forsøket. Alle sidervariantene ga konsentrasjoner av isoamyl acetat over terskelverdien som ble beskrevet av Carru et al (2007), på 0,03mg/l, og er derfor ansett for å bidra til fruktig aroma i sidervariantene.

Konsentrasjonen av etyl hexanoat var høyest i eplejus A, men generelt lav i begge varianter, med henholdsvis 0,002 mg/l i eplejus M og 0,037mg/l i eplejus A. Innholdet av etyl hexanoat

hadde økt i alle sidervarianter i løpet av fermentering, og det ble påvist varierende mengder fra 0,13-0,3mg/l. Wilson et al (2021) beskrev at etyl hexanoat er et resultat av esterifisering av fettsyrer og etanol, som forekommer under fermenteringsprosessen. I tilsvarende studier har det blitt påvist varierende konsentrasjoner. Rosend et al (2019) påviste verdier fra 0,01-0,25mg/l i sider, Medina et al (2020) beskrev konsentrasjoner fra 0,18-0,97mg/l i sider, Wilson et al (2021) detekterte innhold fra 0,1-21 mg/l i sider og Bingman et al (2020) fant 0,014mg/l i sider. Samtlige av studiene påviste en økning av etyl hexanoat fra eplejus til ferdig sider, som samsvarer godt med det som ble påvist for sidervariantene i dette forsøket (Wilson et al. 2021; Rosend et al. 2019; Bingman et al. 2020). For alle sidervarianter ble det påvist konsentrasjoner over terskelverdien beskrevet av Carru et al (2007) på 0,0014mg/l. Etyl hexanoat er assosiert med eple-, fruktig-, og anis aroma i sluttproduktet (Carru et al. 2007) og blir derfor ansett som et viktig bidrag for smak- og aroma i sidervariantene. Det ble påvist signifikante forskjeller som følge av eplejusvariant og gjærtype i forekomsten av etyl hexanoat.

Etyl octanoat er beskrevet som en dominerende ester i sider og tilfører viktig fruktig-, søtlig-, eple-, urte-, og trearoma i sluttproduktet (Wilson et al., 2021; Bingman et al., 2020; Medina et al., 2020). Det ble påvist 0,015mg/l etyl octanoat i eplejus A, men ingenting i eplejus M. Innholdet av etyl octanoat hadde økt markant i alle sidervariantene i løpet av fermenteringen, med varierende konsentrasjoner fra 0,101-0,525mg/l. Wilson et al (2021) beskrev at etyl octanoat, på lik linje med etyl hexanoat, er et resultat av esterifisering av fettsyrer og etanol, som forekommer under fermentering. Sidervariantene som inneholdt honning hadde noe høyere konsentrasjon av etyl octanoat enn tilsvarende varianter tilsatt sukker. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomst av etyl octanoat som følge av eplejusvariant, gjærtype og interaksjon mellom disse. I tilsvarende studier på innhold av etyl octanoat, så hardt blitt påvist varierende verdier. Bingman et al (2020) påviste 0,58mg/l i sider, Wilson et al (2021) detekterte 0-4mg/l i sider, Dos Santos et al (2015) fant 0,0179-0,066mg/l i sider og Medina et al (2020) påviste verdier fra 0,24-8,03 mg/l i sider. Alle studiene beskrev en økning i konsentrasjon av etyl octanoat fra eplejus til sider. Resultatene fra disse studiene samsvarer godt med det som ble påvist i dette forsøket, men enkelt opplevde markant høyere konsentrasjon av etyl octanoat enn det som ble detektert i sidervariantene. Alle sidervariantene fikk påvist høyere konsentrasjon av etyl octanoat enn terskelverdien som ble beskrevet av Carru et al (2007) på 0,005mg/l, som tyder på at det er en viktig smaks- og aromakomponent i sidervariantene.

5.5.3 Karbonyler og svovelforbindelser

Det ble totalt påvist 8 karbonyler og andre komponenter i eplejus og sidervariantene. Hexanal ble detektert i mye lavere konsentrasjon i sidervariantene enn terskelverdien som er definert av Mayr et al (2015). Den er ansett for å gi en ønsket grønn, gressaktig aroma i sider, dersom den forekommer i tilstrekkelig konsentrasjon. Medina et al (2020) detekterte små mengder av hexanal i eplejus, men ikke i ferdig sider, noe som samsvarer godt med det som ble erfart i dette forsøket. Hexanal anses derfor for å ha mindre betydning for smak og aroma i sidervariantene.

Acetaldehyd er en komponent som vanligvis dannes under fermentering av suktermolekyler, men kan også være et resultat av aminosyre metabolisme (Lui & Pilone, 1998). De er kjent for å interagere med andre stoffer, spesielt aminosyrer, som gjør de stand til å danne ulike smaks- og aromastoffer (Lui & Pilone, 1998). Acetaldehyd er ansett for å gi en ønsket aroma av grønne epler, fruktighet og vannbasert maling, ved lave konsentrasjoner, men en uønsket skarp lukt og smak i store mengder (Aroxa, u.å.). Det ble påvist høyest konsentrasjon av acetaldehyd i eplejus A med 7,74mg/l, mens 1,32 mg/l i eplejus M. Konsentrasjonen hadde økt markant i alle sidervarianter i løpet av fermenteringen og varierte mellom 11,01-22,92 mg/l. Medina et al (2020) påviste verdier fra 0,0087-0,0145mg/l i sidervarianter fra forskjellige epler og gjærtyper. Det var adskillig lavere enn det som ble detektert i sidervariantene i dette forsøket. Alle sidervariantene har en konsentrasjon som er markant høyere en terskelverdien som ble beskrevet av Aroxa (u.å.) på 5mg/l, noe som kan tyde på at acetaldehyd i verste tilfellet kan påvirke sluttproduktet i sidervariantene negativt. De høyeste konsentrasjonene av acetaldehyd ble generelt påvist sidervarianter fermentert med eplejus A. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomst av acetaldehyd som følge av eplejusvariant og gjærtype.

Det ble påvist varierende innhold av diacetyl i ASS, AØS, ASH, AØH, ACS, MØH og MCH, med verdier fra 0,148-1,654 mg/l. I disse sidervariantene har diacetyl blitt produsert som resultat av fermentering, ettersom det ikke ble detektert i eplejusvariantene. Diacetyl assosieres med smøraroma, og i alle sidervarianter det ble påvist, var over terskelverdien på 0,043mg/l beskrevet av (Aroxa, u.å.). Cousin et al (2017) beskrev diacetyl som en ønsket aromakomponent i enkelte sidervarianter, mens den er uønsket i andre. Den er et resultat av

fermentering med gjær og høye konsentrasjoner settes ofte i sammenheng med forekomsten av epleesyrefermentering av melkesyrebakterier (Aroxa, u.å.). Det ble påvist markant høyere konsentrasjon av diacetyl i AØS på 1,143mg/l og AØH på 1,654mg/l. Både honning, ølgjær og eplejusvariant ser ut til å ha noe innvirkning på forekomsten av diacetyl i sidervariantene. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomst av diacetyl som følge av gjærtype, men ikke som et resultat av eplejusvariant. Det finnes lite informasjon fra andre liknende studier for betydningen av diacetyl på de organoleptiske egenskapene i sider. Hvilket gjør det vanskelig å definere graden av diacetyls påvirkning i sideravariantene der dette forekom.

Aldehyder og ketoner er kjent for tilføre urteaktig eller løsemiddelaktig aroma og er ansett for å utgjøre en liten andel for sluttprodukt av sider (Wilson et al. 2020; Medina et al. 2020). Det ble generelt påvist små mengder av 2-metyl-propanal, 3-metyl-propanal, 2-metyl-butanal, hexanal og aceton i eplejus/eller sidervariantene. Forekomsten av disse varierte noe mellom eplejustype og sidervariant. Sensoriske karakteristikk og terskelverdier som er definert i tabell 2.3 fremmer muligheten for at enkelte av sidervariantene kan påvirkes positivt og/eller negativt for forekomsten av disse. Etersom det finnes lite informasjon om betydningen av disse for sluttprodukt av sider, så blir det vanskelig å avgjøre hvorvidt det spiller en viktig rolle for de organoleptiske egenskapene i sider.

5.6 Polyfenoler

Polyfenoler tilhører en klasse sekundære plantemetabolitter som blant annet finnes i epler og innehar antioksidantegenskaper. Disse gir viktig bidrag for den organoleptiske kvaliteten av sider, der den antas for å påvirke farge, bitterhet og astringens, samt interagere med andre flyktige komponenter som dermed kan fremme ønskede egenskaper (Zhang et al. 2020; Ye et al. 2014). Høye molekylære procyanidiner er ansett for å gi astringens, mens de mindre komponentene bidrar med bitter smak, samtidig som de samlet påvirker syrligheten og sødmen i sider (Laaksonen et al. 2016). Zhang et al (2020) beskrev at innholdet av polyfenoler i sider varierer og påvirkes av blant annet av eplesort, modning og gjærtype. Mange av polyfenolene stammer opprinnelig fra epleråstoffet, noen dannes, andre reduseres eller øker som følge av fermenteringsprosessen (Laaksonen et al. 2016). Det ble totalt påvist 10 ulike polyfenoler i eplejusvariantene og/eller sidervariantene.

B1 procyanidin er en viktig komponent i gruppen av tanniner, som tilfører astringens og bitterhet i sider. Det var ulikt innhold av B1 procyanidin i eplejusvariantene med henholdsvis 8,87mg/l i eplejus M og 16,26mg/l i eplejus A. I løpet av fermenteringen hadde konsentrasjonen av B1 procyanidin blitt redusert i alle sidervariantene, og sluttkonsentrasjonene varierte fra 4,15-13,8mg/l. Det ble detektert høyere innhold i sidervariantene som var fermentert med eplejus A, og total reduksjonen hadde jevnt over vært høyest i disse som følge av fermenteringen. Bandic et al påviste litt varierende innhold av B1 procyanidin i ulike typer eplejus og ferdig sider, men totalt en reduksjon som følge av fermentering. Det ble ikke påvist noen tydelige forskjeller mellom sidervariantene som ble tilsatt sukker sammenlignet med honning, men for noen sidervarianter var konsentrasjonen noe høyere i de variantene som var tilsatt sukker sammenlignet med tilsvarende sidervarianter med honning. Deriblant ASS (12,06mg/l) sammenlignet med ASH (8,87mg/l) og MSS (6,82mg/l) sammenlignet med MSH (4,15mg/l). Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av B1 procyanidin som følge av eplesort, gjærtype og interaksjon mellom disse.

B2 procyanidin er en annen komponent som inngår i gruppen av tanniner og er derfor viktig for den organoleptiske egenskapen i sider. Det ble påvist relativt likt innhold av disse i begge eplejusvariantene, med henholdsvis 3,81mg/l i eplejus M og 4,45mg/l i eplejus A. Konsentrasjonen av B2 procyanidin hadde blitt redusert i alle sidervariantene som følge av fermenteringen, der innholdet varierte fra 1,82-3,05mg/l. Innholdet er jevnt over noe høyere i sidervariantene som er fermentert med eplejus A, men dette skyldes trolig at denne varianten inneholdt mer B2 procyanidin i utgangspunktet. Bandic et al (2018) påviste lignende opplevelser med en reduksjon i innholdet av B2 procyanidin fra eplejus til ferdig sider for majoriteten av sidervariantene, mens Laaksonen et al (2017) beskrev at innholdet av procyanidiner generelt er høyere i eplejus, sammenlignet med sider. Dette er noe som stemmer godt med de resultatene som ble funnet for sidervariantene i dette forsøket. Reduksjonen av B2 procyanidin kan skyldes oksidering og polymeriseringsreaksjoner (Ye et al. 2014). Forekomsten av B2 procyanidin viste signifikante forskjeller som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus A, men også for interaksjon mellom eplejusvariant og gjærtype. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom forekomst av B2 procyanidin som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus M.

Innholdet av (+)-catechin ble påvist i små mengder i begge eplejusvariantene. Mengden hadde økt markant i alle sidervarianter som følge av fermentering, med varierende verdier fra 6,39-

18,49mg/l .Innholdet er høyest i variantene som er fermentert med sidergjær (S) og lavest for varianter fermentert med ølgjær (Ø). Det ble ikke påvist noen tydelige forskjeller mellom innhold av honning i forhold til sukker. Bandic et al (2018) påviste også en økning av (+)-catechin fra eplejus til ferdig sider, som samsvarer godt med det som ble observert for sidervariantene i dette forsøket. Dolge et al (2014) detekterte store forskjeller i konsentrasjon av (+)-catechin i sider fra forskjellige eplesorter, med verdier fra 2,81-11,92mg/l. En økning av (+)-catechin fra eplejus til sider kan skyldes det produseres gjennom gjærmetabolisme (Ye et al. 2014). Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av (+)-catechin i sidervariantene som følge av gjærtype og interaksjon mellom eplejusvariant og gjærtype.

Konsentrasjonen av (-)-epicatechin varierer mellom eplejusvariantene med verdier fra 18,83mg/l i eplejus M og 11,72mg/l i eplejus A. Det er en reduksjon av innholdet av (-)-epicatechin i alle sidervariantene, som følge av fermenteringen, med konsentrasjoner fra 4,63-13,95mg/l. En reduksjon i innhold av (-)-epicatechin kan skyldes oksidering og polymeriseringsreaksjoner (Ye et al. 2014). Bandic et al (2017) opplevde en reduksjon fra eplejus til sider for noen av variantene (forskjellige eplesorter og gjærtyper) og motsatt for andre. Mens Ye et al (2014) observerte en svak reduksjon i konsentrasjonen av (-)-epicatechin fra eplejus til sider. Det ble ikke påvist noen tydelig forskjell mellom innhold av honning sammenlignet med sukker for sidervariantene. Konsentrasjonen er høyere i variantene som er fermentert med eplejus M, men dette henger trolig sammen med et høyere innhold før fermentering. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av (-)-epicatechin i sidervariantene som følge av eplejusvariant og interaksjon mellom eplejusvariant og gjærtype. Dessuten ble det også funnet signifikante forskjeller i forekomsten av (-)-epicatechin som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus A, men det ble ikke påvist for eplejus M.

Polyfenolet phloridzin har store forskjeller i forekomst mellom eplejusvariantene, med henholdsvis 6,55mg/l i eplejus M og 2,51mg/l i eplejus A. Det ble påvist reduksjon i konsentrasjonen av phloridzin for alle sidervariantene, som følge av fermentering, med verdier fra 0,38-5,55mg/l. Reduksjonen var imidlertid markant størst for sidervariantene som var tilsatt honning, der det nesten ikke ble påvist noe restinnhold uavhengig av eplejusvariant. En generell reduksjon av phloridzin kan skyldes oksidering og polymeriseringsreaksjoner (Ye et al. 2014). Den spesifikke årsaken til at enkelte sidervarianter ser ut til å bli redusert som følge av honning, er uklar ettersom det ikke finnes lignende studier som adresserer dette. Det

ble detektert markant høyere konsentrasjon i sidervariantene som var fermentert med eplejusvariant M og ikke tilsatt honning, sammenlignet med varianter fermentert med eplejus A og ikke tilsatt honning. Ye et al (2014) påviste en liten reduksjon i konsentrasjonen av phloridzin fra eplejus til ferdig sider, men opplevde en oppgang underveis i fermenteringsprosessen, før den ble redusert. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av phloridzin i sidervariantene som følge av eplejusvariant, men også som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus A, men det ble ikke påvist for eplejus M.

Phloretin ble ikke påvist i eplejus A, men 0,17mg/l i eplejus M. Innholdet hadde økt i alle sidervarianter som følge av fermenteringen og varierte fra 0,19-2,21mg/l. Konsentrasjonen var klart høyest i sidervariantene som var tilsatt honning, noe som kan skyldes at honningen inneholdt phloretin. Innholdet av phloretin er generelt høyets i sidervariantene som var fermentert med eplejus M, sammenlignet med tilsvarende varianter. Det finnes lite informasjon om detekterte innhold av phloretin fra andre studier, som gjør det vanskelig å fastslå om innholdet samsvarer med andre studier. Det ble ikke påvist noen signifikante forskjeller i forekomsten av phloretin som følge av eplesort, gjærtype eller interaksjon mellom disse.

Klorogensyre er den polyfenolen som ble påvist i høyest konsentrasjon både i eplejusvariantene og sidervariantene, lignende har blitt funnet i andre studier (Ye et al. 2014; Bandic et al. 2018; Dolge et al. 2018; Calugar et al. 2021). For eplejus M var innholdet 56,9mg/l og for eplejus A 42,1mg/l. Klorogensyre hadde blitt redusert i alle sidervariantene i løpet av fermenteringen, og innholdet varierte fra 19,5-49,9mg/l. Ye et al (2014) beskrev at reduksjon i klorogensyre som resultat av fermentering, kan skyldes nedbrytning av syre ved tilstedeværelse av polyfenoloksidase (PPO). Konsentrasjonen var klart høyest i sidervariantene som var fermentert med eplejus M. Det ble ikke påvist tydelige forskjeller mellom sidervarianter som var tilsatt honning, sammenlignet med tilsvarende varianter med sukker. Bandic et al påviste fra 38,53-140,66mg/l i forskjellige eplejusvarianter og 33,82-86,79mg/l i ulike sidervarianter, og opplevde en reduksjon i innhold av klorogensyre fra eplejus til sider, for de fleste av variantene. Ye et al (2014) opplevde en reduksjon fra 13,29mg/l (eplejus) til 8,27mg/l (ferdig sider). Mens Dolge et al (2014) påviste store variasjoner i innhold av klorogensyre i sider fra 170,28-435,69mg/l. Det tyder på mye varierende forekomst av klorogensyre i både eplejus og sider. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av klorogensyre i sidervariantene som følge av eplejusvariant, men

også som følge av gjærtype i sidervarianter fermentert med eplejus A, men det ble ikke påvist for eplejus M. Oksidering av klorogensyre resulterer i enzymatisk bruningsprosess som oppstår i eplejus og sider, og dermed påvirker fargen (Daccache et al. 2020).

Koffeinsyre er en fri kaneltsyre som kan bedre stabiliteten og kvalitet i blant annet sider (Ye et al., 2014). Det ble påvist i små konsentrasjoner hos eplejusvariantene, med henholdsvis 0,14mg/l i eplejus M og 0,12mg/l i eplejus A. Innholdet hadde økt i alle sidervarianter som følge av fermenteringen og konsentrasjonen varierte fra 0,17-0,94mg/l. En økning av koffeinsyre kan skyldes metabolisme hos gjær gjennom hydrolyse av kaftarsyre, som frigjør koffeinsyre og tartarsyre (Bandic et al.2018). Det ble detektert noe høyere innhold av koffeinsyre i sidervariantene som var tilsatt honning, sammenlignet med tilsvarende varianter med sukker. Olas (2020) beskrev koffeinsyre som vanlig bestand i honning, noe som kan forklare hvorfor det ble påvist noe høyere innhold av koffeinsyre i sidervarianter tilsatt honning. Det ble jevnt over påvist noe høyere konsentrasjon av koffeinsyre i variantene som var fermentert med ølgjær (Ø). Bandic et al (2018) påviste 0,78-0,90mg/l i eplejus og 2,86-4,93mg/l i sider. Mens Ye et al (2014) fikk en reduksjon fra 5,72-4,2mg/l fra eplejus til sider. Det ble påvist signifikante forskjeller i forekomsten av koffeinsyre i sidervariantene som følge av eplejusvariant, gjærtype og interaksjonen mellom disse.

Rutin er en glykosid av disakkaridet rutinose og flavonolen quercetin (Ye at al., 2014). Det ble kun påvist i eplejus M og sidervariant MØS. I MØS var standardavviket relativt stort, som impliserer at resultatene fra de tre parallellene er varierende. Det lave innholdet av rutin kan skyldes dårlig ekstrahering under pressing, eller oksidering ved tilstedeværelse av polyfenoloksidase (PPO).

Quercetin ble ikke påvist i eplejus A, men 0,18mg/l i eplejus M. Innholdet av quercetin har økt i sidervariantene som følge av fermenteringen, med unntak av AØH, der det ikke ble påvist. Innholdet varierer fra 0-1,04mg/l. Bandic et al (2018) påviste en økning i konsentrasjonen av quercetin fra eplejus til ferdig sider med innhold fra 0-1,02mg/l i eplejus og 1,32-1,44mg/l i sider. Dette samsvarer god med resultater påvist for sidervariantene i dette forsøket. Konsentrasjonen er høyere i sidervariantene som er tilsatt honning sammenlignet med tilsvarende varianter med sukker (unntatt AØH). Olas (2020) beskrev quercetin som en bestand i honning, med påvist innhold på 0,31mg/100g avhengig av honningsort, noe som kan forklare hvorfor det ble påvist noe høyere innhold av quercetin i sidervarianter tilsatt honning

(unntatt AØH). Det ble påvist signifikant forskjell i forekomsten av quercetin som følge av eplejusvariant, men ikke gjærtype.

5.7 Anton Paar (alkoholinnhold)

Alkoholinnholdet ble målt i alle sidervariantene, 2 uker etter at honning/sukker ble tilsatt og de ble satt til etterfermentering i romtemperatur. Til etterfermentering var det ønskelig å justere brix opp til rundt 6,5, med tilsats av honning eller sukker. Dette ble gjort for å gi sideren en sødme samtidig som at deler av det tilsatte søtstoffet fører til etterfermentering med hensikt å karbonere innholdet. Normalt bedrer dette den totale smaksopplevelsen.

Alkoholinnholdet varierer noe, men er jevnt over 6,5-7% i de fleste sidervariantene. For noen av prøvene ble det tilsatt litt for mye sukker/honning, som kan ha resultert i noe høyere alkoholinnhold i disse. Dette skyldtes vanskeligheter med dosering av honning og sukkerløsningen som ble lagd, slik at brix ble noe høyere enn 6,5, og gjaldt spesielt variantene som var fermentert med ølgjær (Ø). Disse hadde noe høyere brix etter primærfermenteringen, som gjorde at den forhåndsberegnede doseringen (tilpasset brix 4-4,5), ga en litt høyere brix for disse. Alkoholinnholdet ble påvist høyest i de variantene som var fermentert med champagnegjær (C). Dette kan skyldes at champagnegjær har en bedre utgjæring, sammenliknet med de andre gjærtypene. Det er påvist noe høyere alkoholinnhold for de gjærtypene som ble fermentert med eplejusvariant M, med unntak for MØS og MØH. Her var standardavvikene større, som tyder på litt variasjoner mellom de tre gjentakene. For eplejusvariant M, var brix noe høyere før fermentering, som kan ha gitt det lille utslaget på sluttinnholdet av alkohol i disse variantene, sammenliknet med tilsvarende varianter som var fermentert med eplejus A. Det er jevnt over påvist litt lavere alkoholinnhold i sidervariantene som er fermentert med ølgjær (Ø). Dette kan skyldes at ølgjær har en dårligere utgjæring, sammenliknet med de andre gjærtypene. Dessuten var som nevnt tidligere, brix innholdet noe høyere etter tilsetning av honning/sukker. Tarko et al, 2020 beskrev et varierende alkoholinnhold på 5,7-7,7% i sidervarianter fermentert med ulike gjærtyper. Dette samsvarer godt med det som ble påvist i dette forsøket, hvor det virker som at gjærtypene har hatt en liten innvirkning på sluttinnholdet av alkohol. MØH som allerede hadde en høy brix-verdi etter primærfermenteringen, har ikke gitt noe markert utslag på alkoholinnhold, som kan henge sammen med dårligere utgjæring. Tilsats av honning eller sukker ser ikke ut til å ha gitt noen tydelige utslag på sluttinnholdet av alkohol i sidervariantene.

6.0 Konklusjon

Gjennom en rekke analyser, så har problemstillingen tilknyttet forskjeller og likheter i produksjon av smaks og aromakomponenter i de ulike sidervariantene blitt belyst. Det har blitt påvist forskjeller mellom eplejusvariantene og sider i forekomst av ulike komponenter som følge eple-sort og gjærtype. De tre benyttede gjærtypene (S, Ø og C) har vist noen forskjeller seg imellom for forekomst av ulike analyserte komponenter, som er med på å bidra til den organoleptiske kvaliteten i sidervariantene.

Enkelte komponenter dominerer i eplejus og blir redusert som følge av fermenteringen. Dette gjaldt spesielt innholdet av de flyktige komponentene 2-hexanol, 1-hexanol, hexanal og butylacetat. Imidlertid er innholdet av de flyktige komponentene jevnt over høyere i sidervariantene sammenlignet med eplejus. Dette skyldes at mange av de flyktige komponentene er et resultat av fermentering der de ofte produseres som biprodukt fra ulike metabolske reaksjonsveier hos gjær. Blant annet er innholdet og sammensetningen av aminosyrer i eplejus viktig for dannelsen av flyktige komponenter. Det ble påvist en markant reduksjon i aminosyreinnholdet fra eplejus til sider. Dette skyldes at gjær metaboliserer dette under vekst. Underveis i denne prosessen så dannes det metabolitter som inngår i produksjonen av flyktige komponenter, deriblant høyere alkoholer, estere, karbonyler og svovelforbindelser. Derfor er innholdet av de fleste detekterte flyktige komponenter høyere i sidervariantene enn i eplejus. Viktige flyktige komponenter som hadde økt i løpet av fermenteringen var etylacetat, isobutylacetat, isoamylacetat, etylhexanoat, etyloctanoat og 3-metyl-1-butanol. Alle disse var påvist over terskelveridene som er definert i tabell 2.3, og forbindes med fruktig-, blomsteraktig, alkohol- og søtligaroma. Disse anses for å tilføre sidervariantene ønskede aroma og smaks-komponenter som dermed er med på å bedre slutt-kvaliteten i sidervariantene. Enkelte andre deriblant 2-metyl-1-propanol og 2-metyl-1-butanol hadde økt i løpet av fermenteringen, men ble detektert under terskelverdi for de fleste sidervarianter. Derfor har disse trolig mindre påvirkning på aroma og smak i sluttproduktet.

Polyfenolene B1-, og B2 procyanidin, (-)-epicatechin, phloridzin og klorogensyre var høyere i eplejus enn i sider, og utgjør hovedbestanddelen av de påviste polyfenolene. Dette er å forvente ettersom polyfenoler er utsatt for oksidering og polymeriseringsreaksjoner som dermed kan føre til redusert innhold av enkelte polyfenoler. Klorogensyre er påvist i høyest konsentrasjon i både eplejus og sidervariantene. Innholdet av (+)-catechin, phloretin,

koffeinsyre og quercetin, økte fra eplejus til ferdig sider. Dette skyldes trolig at disse produseres som bidprodukter fra gjærmetabolisme.

Det har gjennom enveis og toveis ANOVA blitt påvist signifikante forskjeller i forekomsten av enkelte flyktige komponenter og polyfenoler i sidervariantene som følge av epejusvariant (eplesort), og/eller gjærtype og/eller som resultat av interaksjon mellom disse. Disse funnene styrker resultatene som ble påvist i dette forsøket. Der eplesort og gjærtype er faktorer som kan påvirke forekomsten av smaks og aromakomponenter i sider.

Innholdet av sitronsyre, alfa-ketoglutarsyre, pyrodruesyre og ravsyre har for samtlige varianter økt markant som følge av fermenteringen fra eplejus til ferdig sider. Mens eddiksyre økte for noen og ble redusert for andre. Sammen er de organiske syrene ansett for å tilføre viktig bidrag for de organoleptiske egenskapene i sider.

Sidervariantene som ble tilsatt honning fikk påvist noe høyere konsentrasjon av etyl acetat, etyl octanoat, phloretin, koffeinsyre og quercetin, og noe lavere innhold av isobutyl acetat, isoamyl acetat og phloredzin, sammenlignet med tilsvarende sidervarianter tilsatt sukker.

I videre arbeid kan det være aktuelt ta ut prøver underveis i fermenteringe for å følge utvikling og reduksjon av de enkelte biokjemiske komponentene. Det kan også være interessant å studere effekt av temperatur, tilsats av enkelte næringsstoffer for utvikling av aroma og smakskomponenter i sluttproduktet.

7.0 Kilder

Aroxa. (u.å.). *Certified cider flavour standards*. <https://www.aroxa.com/cider/cider-flavour-standard>

Bandic, L. M., Zulj, M. M., Fruk, G., Babojelic, M. S, Jemric, T & Jeromel, A. (2018). The profile of organic acids and polyphenols in apple wines fermented with different yeasts strains. *Journal of food science and technology* 2019, 56(2):599-606

Bingman, M. T., Stellick, C. E., Pelkey, J. P., Scott, J. M & Cole, C. A. (2020). Monitoring Cider Aroma Development throughout the Fermentation Process by Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis. *Beverages* 2020, 6(40): doi:10.3390/beverages6020040 www.mdpi.com/journal/beverages

Buglass, A. J. (2011). *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects* (Volume 1). John Wiley & sons, Ltd, Publication

Burda, S., Oleszek, W & Lee, C. Y. (1990). Phenolic Compounds and Their Changes in Apples during Maturation and Cold Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990, (38): 945-948

Bütikofer, U. & Ardö, Y. (1999). Quantitative determination of free amino acids in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 337: 24-32.

Carru, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A & Dellacassa, E. (2007). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *Federation of European Microbiological Societies* 8 (2008): 1196-1207

Caulgar, P.C., Pasqualone, A., Coldea, T. E., Salant, L. C., Pop, C. R., Udrea, C. B., Zhao, H & Mudura, E. (2021). An Overview of the Factors Influencing Apple Cider Sensory and Microbial Quality from Raw Materials to Emerging Processing Technology. *Process* 2021, 9(502). Doi: <https://doi.org/10.3390/pr9030502>

Cousin, F. J., Gueljec, R. L., Schlüsselhuber, M., Dalmaso, M., Laplace, J. M & Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* 2017, 5(3), 39: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039>

- Daccache, M. A., Koubaa, M., Maroun, R. G., Salameh, D., Louka, N & Vorobiev, E. (2020). Impact of the Physicochemical Composition and Microbial Diversity in Apple Juice Fermentation Process: A Review. *Molecules* 2020, 25(16), 3698: <https://doi.org/10.3390/molecules25163698>
- Dolge, R. R., Kruma, Z., Dimins, F., Straumite, E & Karklina, D. (2014). Phenolic Composition and Sensory Properties of Ciders Produced from Latvian Apples. *Proc. Latv. Univ. Agr.*, 2014, 31(326). DOI: 10.2478/plua-2014-0005
- Dos santos, C. M. E., Pietrowski, G. A. M., Braga, C. M., Rossi, M. J., Ninow, J., Dos santos, T. P. M., Wosiacki, G., Jorge, R. M. M & Nogueira, A. (2015). Apple Amino acid Profile and Yeast Strains in the Formation of Fusel Alcohols and Esters in Cider Production. *Journal of Food Science* 80(6): 1750-3841
- DuPont, S, M., Bennet, R. N., Mellon, F.A & Williamson, G. (2002). Polyphenols from Alcoholic Apple Cider Are Absorbed, Metabolized and Excreted by Humans. *Journal of Nutrition* 2002 (132): 172-175.
- Dzugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P & Leiko, D. G. (2018). Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules (mdpi)* 2018, 23(8): 2069. doi:10.3390/molecules23082069
- Fairbairn, S., Mckinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferriera, A. C & Bauer, F. F. (2017). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8:2554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J.A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, Volume 21, Issue 9, September 2011, Pages 601-606
- Guine, R. P. F., Barroca, M. J., Coldea, T. E., Bartkiene, E & Anjos, O. (2021). Apple <fermented Products: An Overview of Technology, Properties and Health Effects. *Processes* 2021, 9(223): <https://doi.org/10.3390/pr9020223>
- Herrero, M., Garcia, L. A & Diaz, M. (2006). Volatile compounds in cider: Inoculation Time and Fermentation Temperature Effects. *Journal of the institute of brewing*, 112 (3): 210-214.

Honning. (2019). *Et naturprodukt*. Lastet ned 13.05.2021, fra:

<https://www.honning.no/et-naturprodukt>

Jolicoeur, C. (2013). *The new cider makers handbook: A Comprehensive Guide for Craft Producers* (1.utg.). Chelsea Green Publishing.

Kalinowska, M., Bielawska, A., Siwekiewicz, H. L., Priebe, W & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 84 (2014): 169-188

Kirkevold, R. R. (2016). *Ingarsis birøkt (2.utgave)*. Valleåsen: www.bk.no

Lausund, s. (20.09.2018). *HPLC*. NTNU.no.

<https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/HPLC>

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

Lui, S. Q & Pilone, G. J. (1998). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology* 2000, 35, 49-6.

Ma, S., Neilson, A. P., Lahne, J. Peck, G. M., O'keefe, S. F & Stewart, A. C. (2018). Free amino acid composition of apple juices with potential for cider making as determined by UPLC-PDA. *Journal of the Institute of Brewing* 2018 (124): 467-476.

Magalhaes, F., Krogerus, K., Vidgren, V., Sandell, M., Sandell, M & Gibson, B (2017). Improved cider fermentation performance and quality with newly generated *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanuhybrids*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2017; 44(8): 1203-1214. doi: [10.1007/s10295-017-1947-7](https://doi.org/10.1007/s10295-017-1947-7)

Mayr, C.M., Capone, D. L., Pardon, K.H., Black, C.A., Pomeroy, D & Francis, I. L. (2015). Quantitative Analysis by GC-MS/MS of 18 Aroma Compounds Related to Oxidative Off-Flavor in Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf505803u

McHugh, T. (1.6.2017). How Honey Is Processed. *Food Technology Magazine* 71(6).

<https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2017/june/columns/processing-how-honey-is-processed>

Medina, S., Perestrelo, R., Pereira, R & Câmara, J. S. (2020). Evaluation of Volatilomic Fingerprint from Apple fruits to Ciders: A Useful Tool to Find Putative Biomarkers for Each Apple Variety. *Foods* 2020, 9 (1839): doi:10.3390/foods9121830

Merwin, I., Valois, S., & Padilla-Zakour, O. (2008). Cider Apples and Cider-Making Techniques in Europe and North America. *Horticultural reviews Vol. 34*, 365-415.

Miller, G. H. (2019). *Whiskey Science: A Condensed Distillation* (e-bok). Springer Nature Switzerland AG. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-030-13732-8.pdf>

Moe, K. M., 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.

Nogueira, A., Gyt, S., Marnet, N., Lequère, 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

Norges birøkterlag. (2019). *Honning*. Lastet ned 13.05.2021, fra:

<http://www.norbi.no/bienesprodukter.cfm?pArticleId=13701>

NTNU. (19.09.2018). *Gasskromatografi*. Confluence.

<https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Gasskromatografi>

Olas, B. (2020). Honey and its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutrients* 2020, 12(2): 283. doi: [10.3390/nu12020283](https://doi.org/10.3390/nu12020283)

Pandey, K. B & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5): 270-278

Pietruszka, M., Przybylska, K.P. & Szopa, J. S. (2010). Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes. *Scientific bulletin of the technical university of Lodz* 2010 (1081), 74.

R-Biopharm.(Cat. No. 10139068035). *L-Malic acid, UV Method* [Oppskrift]. https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/2012/06/roche_ifu_malic-acid-1_en_10139068035_2017-08.pdf

Renger, R. S., Hateren, H. V & Luyben, K. Ch. A. M. (1992). The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure. *Journal of the institute of brewing* 1992 (vol. 98): 509-513

Rosend, J., Kuldj r v, R., Arju, G & Nisamedtinov, I. (2019). Yeast performance characterization in different cider fermentation matrices. *Agronomy Research* 17(5): 2040-2053. doi: <https://doi.org/10.15159/AR.19.178>

Rosend, J., Kuldj r v, R., Rosenvald, S & Paalme, T. (2018). The effects of apple variety, ripening stage, and yeast strain on the volatile composition of apple cider. *Heliyon* 2019, 5(6), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01953>

Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J & Thevelein, J.M (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing LTD* (2010), 3(2): 165-177

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

Sobiesiak, M. (2017). *Phenolic Compounds- Natural Sources, Importance and Application: Chemical Structure of Phenols and Its Consequence for Sorption Process*. Intech. DOI:[10.5772/66537](https://doi.org/10.5772/66537)

Subramanian, R., Hebbar, H. U & Rastogi, N. K. (2007). Processing of honey: A Review. *International journal of Food Properties* 10(1): 127-143. DOI: 10.1080/10942910600981708

Suomalainen, H. (1980). Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *Journal of the institute of brewing 1981* (Vol.87): 296-300

Tarko, T., Januszek, M., Pater, A., Sroka, P & Duda-Chodak, A. (2020). The Quality of Ciders Depends on Must Supplementation with Mineral Salts. *Molecules* 2020, 25 (3640): doi:10.3390/molecules25163640

Vidushi, Y & Meensakshi, B. (2017). A Review On HPLC Method Development And Validation. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* 2(6): 166-178. DOI - 10.26479/2017.0206.12

Wang, D., Xu, Y., Hu, J & Zhao, G. (2004). Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing* 110(4): 340-346.

Whithing, G. C. (1973). Acetification in Cider and Perries. *Journal of the Institute of Brewing* 1973 (79).

Williams, A. A. (1974). Flavor Research And The Cider Industry. *Journal of the Institute of Brewing* 1974(Vol. 80): 455-470

Wilson, A., Johnson, J. B., Batley, R., Lal, P., Wakeling, L & Naiker, M. (2021). Authentication Using Volatile Composition: A Proof-of-Concept Study on the Volatile Profiles of Fourteen Queensland Ciders. *Beverages* 2021, 7(28), <https://doi.org/10.3390/beverages7020028>

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* 2007, 55(8); 3051-3057. DOI: 10.1021/jf0631732

Ye, M., Yue, T & Yuan, Y. (2013). Evolution of polyphenols and organic acids during fermentation of apple cider. *Journal of the science of food and agriculture* (2014), 94:2951-2957

Ye, M., Yue, T & Yuan, Y. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014 (94): 2951-2957. Doi: DOI 10.1002/jsfa.6639

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

Zhang, C. H., Guo, Y., Wang, X & Meng, Y. (2020). Polyphenols in fermented apple juice: Beneficial effects on human health. *Journal of Functional Foods* 76(2021)
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104294>

Zhang, J., Herik, B. M. V. D & Wahl, S.A. (2020). Alpha-ketoglutarate utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: transport, compartmentation and catabolism. *Scientific reports* 2020 10:12838 doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69178-6>

Zhao, H., Zhou, F, Dziugan, P., Yao, Y., Zhang, J., Lv, Z & Zhang, B. (2014). Development of Organic Acids and Volatile Compounds in Cider during Malolactic Fermentation. *Czech Journal of Food Science* 32(1): 69-76.

Zuo, H. L., Huang, W. H. H & Xia, Z. N. (2013). Preparative Gas Chromatography and Its Applications. *Journal of Chromatographic Science Advance Access* 2013(1): 1-12.
doi:10.1093/chromsci/bmt040

8.0 Vedlegg

Vedlegg 1

Tabell 8.1 viser oversikt over rådata fra alle brix malingene, 3 paralleller for hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS.

Prøvetype	Dag							
	0	1	2	3	6	7	8	9
AØ1	12,1	11,9	12,3	12,2	6,5	5,4	5,2	4,5
AØ2	12,1	11,9	12,3	12,2	6,2	5,7	5,2	4,2
AØ3	12,1	12	12,3	12,2	6,6	5,9	5,7	4,8
AC1	12,1	12,2	12,3	12,3	6,2	5,5	4,4	4,3
AC2	12,1	12,2	12,3	12,3	5,2	4,2	4,1	4,2
AC3	12,1	12,1	12,3	12,3	5,6	4,9	4,2	4,2
AS1	12,1	12,2	12,3	12,2	4,7	4,1	4,2	4,1
AS2	12,1	12,2	12,3	12,2	4,9	4	3,9	4
AS3	12,1	12,2	12,3	12,2	5,1	4	4	3,7
MØ1	12,4	12,3	12,2	12,2	8,8	7,3	7,2	6,4
MØ2	12,4	12,2	12,2	12,2	7,3	6,5	6,3	6,3
MØ3	12,4	12,3	12,2	12,2	7,3	5,7	6,2	6,2
MC1	12,4	12,2	12,2	12,2	6,6	5,7	5	4,4
MC2	12,4	12,2	12,2	12,2	6,8	5,9	5,2	4,3
MC3	12,4	12,2	12,2	12,2	6,4	5,4	4,7	4
MS1	12,4	12,2	12,3	12	5,5	4,5	3,9	3,9
MS2	12,4	12,2	12,3	12	5,7	4,5	4,1	4,1
MS3	12,4	12,2	12,3	12	6,5	4,6	4,1	4,1

Vedlegg 2

Tabell 8.2 Viser oversikt over de analyserte aminosyrene inkludert oversikt over alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS og en parallell for eplejusvariantene M og A. Tabellen inkluderer omregning fra $\mu\text{mol/g}$ til mg/kg for alle aminosyrene. Gult felt er fjernet fra gjennomsnittsberegningen av dette gjentaket.

Prøvetype	L-asparaginsyre		L-asparaginsyre		L-asparaginsyre		L-glutaminsyre		L-glutaminsyre		L-asparagin		L-serin		L-serin		L-serin		L-glutamin		L-glutamin		L-glutamin		L-histidine		Glycin		Glycin		Glycin		L-threonin		L-threonin		L-threonin		L-citrullin		L-arginin	
	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg	$\mu\text{mol/g}$	mg/kg		
M	0,7145	133,1	95,1000	0,4030	147,1	59,2813	2,9520	132,1	389,9592	0,0880	105,1	9,2488	0,0180	146,2	2,6316	n.d.	0,0120	75,1	0,9012	0,0375	119,1	4,4663	n.d.	n.d.																		
A	0,6550	133,1	87,1805	0,2640	147,1	38,8344	4,3095	132,1	569,2850	0,1115	105,1	11,7187	0,0635	146,2	9,2837	n.d.	0,0160	75,1	1,2016	0,0305	119,1	3,6326	n.d.	n.d.																		
AS1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0060	75,1	0,4506	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AS2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0040	75,1	0,3004	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AS3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0020	75,1	0,1502	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AØ1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0040	75,1	0,3004	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AØ2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0110	75,1	0,8261	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AØ3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0110	75,1	0,8261	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MS1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0030	75,1	0,2253	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MS2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0020	75,1	0,1502	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MS3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0020	75,1	0,1502	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AC1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0040	75,1	0,3004	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AC2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0030	75,1	0,2253	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
AC3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0050	75,1	0,3755	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MØ1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0160	75,1	1,2016	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MØ2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0110	75,1	0,8261	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MØ3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0150	75,1	1,1265	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MC1S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0140	75,1	1,0514	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MC2S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0100	75,1	0,7510	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		
MC3S	n.d.	133,1	n.d.	n.d.	147,1	n.d.	n.d.	132,1	n.d.	n.d.	105,1	n.d.	n.d.	146,2	n.d.	n.d.	0,0120	75,1	0,9012	n.d.	119,1	n.d.	n.d.	n.d.																		

Prøvetype	L-alanin	L-alanin	L-alanin	GABA	GABA	GABA	L-tyrosin	L-tyrosin	L-tyrosin	L-tyrosin	L-melatonin	L-melatonin	L-melatonin	L-isooleucin	L-isooleucin	L-isooleucin	L-phenylalanin	L-tryptofan	L-leucin	L-ornitin	L-ornitin	L-ornitin	L-lysin	L-lysin	L-lysin
	µmol/g	mg/kg	mg/kg	µmol/g	µmol/g	mg/kg	µmol/g	µmol/g	µmol/g	mg/kg	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g	µmol/g
M2	0,0650	89,1	5,7915	0,0315	103,1	3,2477	n.d.	0,0025	117,1	0,2928	0,0020	149,2	0,2984	0,0130	131,2	1,7056	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
A2	0,1355	89,1	12,0731	0,0345	103,1	3,5570	n.d.	0,0165	117,1	1,9322	n.d.	149,2	n.d.	0,0050	131,2	0,6560	n.d.	n.d.	n.d.	0,0310	132,2	4,0982	0,0110	146,2	1,6082
AS1S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AS2S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AS3S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AØ1S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AØ2S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AØ3S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MS1S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MS2S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MS3S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AC1S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AC2S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
AC3S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MØ1S	0,0170	89,1	1,5147	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MØ2S	0,0020	89,1	0,1782	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MØ3S	0,0060	89,1	0,5346	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MC1S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MC2S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.
MC3S	n.d.	89,1	n.d.	n.d.	103,1	n.d.	n.d.	n.d.	117,1	n.d.	n.d.	149,2	n.d.	n.d.	131,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	132,2	n.d.	n.d.	146,2	n.d.

Vedlegg 3

Tabell 8.3 Oversikt over de analyserte karbohydratene inkludert alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS og en parallell for eplejusvariantene M og A. Tabellen inkluderer omregning fra ppm til g/l for alle karbohydratene. Gule felt er fjernet fra gjennomsnittsberegningen av dette gjentak.

Prøvetype	Maltose	Maltose	Maltose	Glukose	Glukose	Glukose	Fruktose	Fruktose	Fruktose
	ppm		g/L	ppm		g/L	ppm		g/L
AS1S	n.d.	0,001	n.d.	8418,87	0,001	8,42	16200,44	0,001	16,20
AS2S	n.d.	0,001	n.d.	8896,05	0,001	8,90	16314,73	0,001	16,31
AS3S	n.d.	0,001	n.d.	7177,44	0,001	7,18	14672,63	0,001	14,67
AØ1S	n.d.	0,001	n.d.	5052,48	0,001	5,05	12909,25	0,001	12,91
AØ2S	n.d.	0,001	n.d.	2912,53	0,001	2,91	15111,20	0,001	15,11
AØ3S	n.d.	0,001	n.d.	3604,83	0,001	3,60	17380,30	0,001	17,38
AC1S	n.d.	0,001	n.d.	905,76	0,001	0,91	7061,40	0,001	7,06
AC2S	n.d.	0,001	n.d.	3473,70	0,001	3,47	14821,20	0,001	14,82
AC3S	n.d.	0,001	n.d.	5123,98	0,001	5,12	13229,95	0,001	13,23
MS1S	n.d.	0,001	n.d.	6728,75	0,001	6,73	11884,05	0,001	11,88
MS2S	n.d.	0,001	n.d.	5561,52	0,001	5,56	10802,83	0,001	10,80
MS3S	n.d.	0,001	n.d.	9112,42	0,001	9,11	15016,95	0,001	15,02
MØ1S	n.d.	0,001	n.d.	128,93	0,001	0,13	10869,91	0,001	10,87
MØ2S	n.d.	0,001	n.d.	103,21	0,001	0,10	11439,82	0,001	11,44
MØ3S	n.d.	0,001	n.d.	3198,98	0,001	3,20	23394,55	0,001	23,39
MC1S	n.d.	0,001	n.d.	416,27	0,001	0,42	9805,94	0,001	9,81
MC2S	1952,28	0,001	1,95	371,02	0,001	0,37	8671,04	0,001	8,67
MC3S	n.d.	0,001	n.d.	147,45	0,001	0,15	7871,65	0,001	7,87
M	26492,03	0,001	26,49	17332,02	0,001	17,33	66038,57	0,001	66,04
A	29298,94	0,001	29,30	10660,97	0,001	10,66	63449,52	0,001	63,45

Vedlegg 4

Tabell 8.4 Oversikt over de analyserte organiske syrene inkludert oversikt over alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS og MCS og en parallell for eplejusvariantene M og A. Gule felt er fjernet fra gjennomsnittsberegningen av dette gjentaket.

	Sitronsyre	Alfa-ketoglutarsyre	Pyrodruesyre	Ravsyre	Eddiksyre
Prøvetype	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
AS1S	91,44	410,99	152,22	793,00	123,78
AS2S	89,44	408,36	146,12	920,50	106,22
AS3S	87,93	386,14	147,35	2055,38	106,61
AØ1S	51,87	20,65	111,28	1877,58	n.d.
AØ2S	87,67	33,72	204,17	3084,36	36,3
AØ3S	83,01	28,70	190,51	2969,31	21,18
AC1S	37,37	42,62	69,86	1238,16	80,45
AC2S	67,41	69,02	118,27	2327,63	153,49
AC3S	48,94	53,40	96,23	1690,26	112,48
MS1S	88,10	209,87	102,49	1591,87	71,99
MS2S	86,71	194,40	90,86	1639,91	76,1
MS3S	109,41	227,47	111,33	1912,43	90,76
MØ1S	81,63	22,99	167,96	1861,57	40,36
MØ2S	89,58	24,19	188,38	2168,07	40,28
MØ3S	97,97	28,02	216,63	2558,33	45,94
MC1S	95,14	35,82	71,28	2055,95	149,76
MC2S	208,55	33,67	60,40	2188,40	153,59
MC3S	99,06	39,60	64,97	2097,16	167,57
M	41,47	n.d.	n.d.	1627,41	n.d.
A	44,89	n.d.	n.d.	1598,44	172,34

Vedlegg 5

Tabell 8.5 Oversikt over de analyserte flyktige komponentene inkludert alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MØC, samt en parallell for eplejusvariantene M og A. Gule felt er fjernet fra gjennomsnittsberegningen av dette gjentaket.

Prøvetype	Acetaldehyd	Aceton	Dimetylsulfid	Diacetyl	2-methylpropanal	3-methylbutanal	2-methylbutanal	Hexanal
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
M	1,321	0,162	0,162	n.d.	n.d.	n.d.	0,335	0,959
A	7,748	0,183	0,183	n.d.	n.d.	n.d.	2,246	0,651
AC1S	8,691	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,009	0,983	n.d.
AC2S	17,116	0,227	0,227	n.d.	n.d.	0,020	1,654	n.d.
AC3S	16,158	0,203	0,203	n.d.	n.d.	0,020	1,346	n.d.
MS1S	15,424	0,164	0,164	n.d.	n.d.	0,028	0,222	n.d.
MS2S	13,358	0,108	0,108	n.d.	n.d.	0,027	0,197	n.d.
MS3S	13,779	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,025	0,244	n.d.
MC1S	11,309	0,157	0,157	n.d.	n.d.	0,012	0,243	n.d.
MC2S	12,850	0,204	0,204	n.d.	n.d.	0,010	0,252	n.d.
MC3S	14,332	0,174	0,174	n.d.	n.d.	0,017	0,239	n.d.
MØ1S	8,993	n.d.	n.d.	0,466	n.d.	0,015	0,213	n.d.
MØ2S	14,510	n.d.	n.d.	0,246	n.d.	0,025	0,264	n.d.
MØ3S	10,074	n.d.	n.d.	0,228	0,033	0,018	0,186	n.d.
AØ1H	19,607	0,284	0,284	0,436	0,106	0,056	1,863	n.d.
AØ2H	23,207	0,305	0,305	1,938	0,113	0,051	1,912	0,003
AØ3H	19,239	0,320	0,320	1,370	0,049	0,041	1,817	0,005
AS1H	19,885	0,434	0,434	0,172	0,019	0,042	1,766	0,017
AS2H	19,039	0,419	0,419	0,146	0,034	0,044	1,770	0,014
AS3H	17,817	0,400	0,400	0,125	0,038	0,041	1,753	0,011
AC1H	13,339	0,379	0,379	0,087	0,019	0,017	1,438	n.d.
AC2H	19,800	0,503	0,503	0,183	0,020	0,032	1,857	0,003
AC3H	15,598	0,450	0,450	0,157	0,035	0,023	1,685	0,003
MS1H	16,753	0,440	0,440	n.d.	n.d.	0,036	0,259	0,002
MS2H	19,730	0,440	0,440	n.d.	0,014	0,041	0,270	0,020
MS3H	21,043	0,419	0,419	n.d.	n.d.	0,047	0,261	0,018
MC1H	11,693	0,249	0,249	n.d.	0,015	0,015	0,252	0,006
MC2H	11,982	0,233	0,233	n.d.	0,021	0,011	0,255	n.d.
MC3H	9,366	0,265	0,265	n.d.	0,013	0,012	0,254	0,009
MØ1H	13,049	0,173	0,173	0,287	0,020	0,019	0,279	0,002
MØ2H	11,124	0,209	0,209	0,280	0,026	0,018	0,281	n.d.
MØ3H	14,824	0,270	0,270	0,177	0,019	0,024	0,298	0,005
AØ1S	17,615	0,43	0,43	0,311	0,149	0,062	1,76	n.d.
AØ2S	12,959	0,211	0,211	1,289	0,058	0,037	1,708	n.d.
AØ3S	15,986	0,211	0,211	0,996	0,042	0,033	1,850	n.d.
AS1S	24,454	0,431	0,431	n.d.	0,043	0,049	1,708	n.d.
AS2S	22,769	0,457	0,457	n.d.	0,053	0,041	1,714	n.d.
AS3S	21,541	0,447	0,447	n.d.	0,039	0,044	1,669	n.d.

Prøvetype	Ethylacetate	Isobutyl acetate	Butyl acetat	Isoamyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	Ethyl heptanoate
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	ppm
M	0,035	0,023	0,759	0,553	0,002	n.d.	n.d.
A	1,371	0,019	5,097	0,212	0,037	0,015	n.d.
AC1S	9,932	0,031	1,286	1,178	0,197	0,137	n.d.
AC2S	12,993	0,039	1,717	1,459	0,231	0,167	n.d.
AC3S	12,656	0,038	1,678	1,311	0,207	0,141	n.d.
MS1S	12,178	0,046	0,239	3,397	0,162	0,109	n.d.
MS2S	15,124	0,059	0,217	4,320	0,181	0,140	n.d.
MS3S	18,307	0,080	0,252	6,646	0,198	0,150	n.d.
MC1S	16,115	0,052	0,253	3,034	0,309	0,321	n.d.
MC2S	19,629	0,007	n.d.	0,068	0,268	0,359	n.d.
MC3S	18,257	0,054	0,269	3,020	0,281	0,292	n.d.
MØ1S	10,661	0,044	0,259	1,386	0,192	0,260	0,003
MØ2S	9,637	0,040	0,261	1,416	0,238	0,252	0,004
MØ3S	6,339	0,036	0,211	0,795	0,211	0,209	0,006
AØ1H	15,625	0,026	0,014	0,059	0,205	0,347	0,001
AØ2H	15,145	0,024	0,014	0,065	0,203	0,343	0,004
AØ3H	16,753	0,024	0,014	0,061	0,222	0,275	0,001
AS1H	12,641	0,013	0,012	0,110	0,120	0,149	n.d.
AS2H	13,899	0,014	0,012	0,120	0,126	0,157	n.d.
AS3H	12,686	0,012	0,010	0,110	0,121	0,141	n.d.
AC1H	17,179	0,011	0,014	0,071	0,247	0,273	n.d.
AC2H	23,171	0,014	0,016	0,099	0,296	0,311	n.d.
AC3H	19,680	0,012	0,014	0,086	0,250	0,212	n.d.
MS1H	18,226	0,012	n.d.	0,131	0,194	0,217	n.d.
MS2H	17,397	0,011	n.d.	0,128	0,199	0,232	n.d.
MS3H	23,771	0,014	n.d.	0,172	0,232	0,283	n.d.
MC1H	23,472	0,010	n.d.	0,096	0,328	0,540	n.d.
MC2H	22,565	0,068	0,318	3,872	0,365	0,511	n.d.
MC3H	18,515	0,008	n.d.	0,084	0,290	0,421	n.d.
MØ1H	6,227	0,026	0,018	0,216	0,191	0,236	0,007
MØ2H	13,860	0,036	0,013	0,301	0,226	0,324	0,004
MØ3H	12,117	0,013	n.d.	0,052	0,238	0,344	0,005
AØ1S	11,232	0,066	1,686	1,487	0,212	0,341	0,001
AØ2S	10,363	0,049	1,365	1,081	0,179	0,135	0,002
AØ3S	11,504	0,060	1,458	1,267	0,200	0,213	n.d.
AS1S	11,439	0,047	1,941	2,821	0,155	0,106	n.d.
AS2S	6,278	0,025	1,198	1,56	0,109	0,089	n.d.
AS3S	8,24	0,035	1,46	2,206	0,126	0,11	n.d.

Prøvetype	2-methyl-1-propanol	3-methyl-1-butanol	2-methyl-1-butanol	2-hexanol	1-hexanol	Ethyl heptanoate
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
M	0,255	0,083	1,015	n.d.	2,335	n.d.
A	0,309	0,35	0,647	4,369	9,04	n.d.
AC1S	12,812	56,853	11,982	1,685	4,044	n.d.
AC2S	22,584	100,727	21,367	2,052	6,234	n.d.
AC3S	18,059	80,891	17,315	2,059	5,392	n.d.
MS1S	25,084	164,876	26,360	0,551	2,795	n.d.
MS2S	24,073	156,143	25,090	0,629	2,979	n.d.
MS3S	28,737	191,646	29,331	0,627	2,955	n.d.
MC1S	19,156	101,198	21,013	1,154	3,033	n.d.
MC2S	18,932	100,228	20,311	1,286	4,180	n.d.
MC3S	18,644	103,273	21,325	1,184	3,135	n.d.
MØ1S	29,002	89,729	13,380	0,889	3,611	0,003
MØ2S	32,045	103,008	15,450	0,945	3,961	0,004
MØ3S	30,010	67,211	11,816	0,645	3,328	0,006
AØ1H	63,148	109,719	19,178	3,000	8,239	0,001
AØ2H	63,254	113,973	19,253	2,855	8,259	0,004
AØ3H	54,191	95,105	16,765	2,986	7,874	0,001
AS1H	40,018	186,061	34,082	1,752	8,201	n.d.
AS2H	41,806	186,627	34,959	1,996	8,126	n.d.
AS3H	36,973	185,238	32,911	1,798	8,124	n.d.
AC1H	17,959	79,089	16,727	2,440	6,775	n.d.
AC2H	24,445	108,228	23,014	3,055	8,094	n.d.
AC3H	22,013	97,634	20,581	2,754	7,599	n.d.
MS1H	28,114	185,115	29,692	0,799	3,720	n.d.
MS2H	30,138	197,391	31,108	0,775	3,907	n.d.
MS3H	27,955	190,020	28,825	0,921	3,621	n.d.
MC1H	19,274	104,097	21,189	1,547	4,258	n.d.
MC2H	19,935	101,740	20,901	1,530	3,182	n.d.
MC3H	18,211	104,076	20,829	1,206	4,191	n.d.
MØ1H	41,424	92,513	16,166	0,618	4,535	0,007
MØ2H	35,990	110,798	16,363	1,068	4,618	0,004
MØ3H	34,067	110,430	15,939	1,118	4,607	0,005
AØ1S	62,274	108,484	19,265	2,481	7,245	0,001
AØ2S	59,681	108,827	18,134	2,059	6,900	0,002
AØ3S	56,963	100,707	17,556	2,161	7,221	n.d.
AS1S	40,885	186,736	34,842	2,102	7,081	n.d.
AS2S	42,422	189,401	35,68	1,316	7,341	n.d.
AS3S	36,457	182,997	32,547	1,583	6,9	n.d.

Vedlegg 6

Tabell 8.6 Oversikt over de analyserte polyfenolene inkludert alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MØC, samt en parallell for eplejusvariantene M og A. Gule felt er fjernet fra gjennomsnittsberegningen av dette gjentakket.

Prøvetype	280	280	280	280	280	280	320	320	350	350
	B1, procyanidin (+)-catechin ug/ml	B2, procyanidin (-)-epicatechin ug/ml	Phloridzin ug/ml	Phloretin ug/ml	Chlorogenic acid ug/ml	Caffeic acid ug/ml	Rutin ug/ml	Quercetin ug/ml		
M	8,866	2,264	3,813	18,834	6,547	0,165	56,94	0,142	1,253	0,176
A	16,261	3,69	4,45	11,724	2,511	n.d.	42,097	0,12	n.d.	n.d.
AS1S	11,314	17,767	3,026	8,751	2,463	0,228	28,639	0,578	n.d.	0,172
AS2S	12,535	19,026	2,916	8,137	2,315	0,197	29,24	0,563	n.d.	0,233
AS3S	12,326	18,669	3,201	7,74	2,43	0,196	28,725	0,611	n.d.	0,163
AØ1S	13,479	6,786	3,129	6,575	1,898	0,183	28,209	0,846	n.d.	0,173
AØ2S	13,695	7,352	2,611	9,064	1,835	0,186	27,737	0,854	n.d.	0,185
AØ3S	14,227	5,707	3,22	8,675	1,747	0,187	26,015	0,793	n.d.	0,14
AC1S	8,296	7,775	2,097	4,556	1,602	0,184	18,921	0,448	n.d.	0,193
AC2S	7,687	8,282	2,138	4,751	1,605	0,189	19,657	0,358	n.d.	0,201
AC3S	7,997	8,484	2,191	4,569	1,666	0,204	19,776	0,401	n.d.	0,286
MØ1S	6,54	6,289	2,521	14,014	4,251	0,727	50,373	0,207	n.d.	0,416
MØ2S	6,642	6,238	2,5	12,725	5,118	0,234	50,457	0,192	n.d.	0,319
MØ3S	7,268	6,637	2,436	12,991	5,197	n.d.	48,837	0,315	0,841	0,27
MS1S	5,41	17,123	2,514	12,917	5,436	0,169	50,307	0,185	n.d.	0,262
MS2S	2,998	8,507	1,295	6,027	2,486	0,327	23,984	0,135	0,614	0,234
MS3S	6,495	17,246	2,207	11,855	5,266	0,278	47,795	0,182	1,065	0,313
MC1S	7,508	13,709	3,301	13,383	5,761	0,205	50,461	0,174	n.d.	0,289
MC2S	5,877	12,949	2,474	13,937	0,494	2,203	48,96	0,228	n.d.	0,91
MC3S	6,506	13,099	2,391	12,916	5,333	0,221	49,916	0,169	n.d.	0,305
AC1H	10,138	12,54	2,983	8,629	0,541	1,082	29,541	0,782	n.d.	0,236
AC2H	9,379	12,758	2,881	7,245	0,5	0,945	27,269	0,68	n.d.	0,248
AC3H	10,399	12,204	2,797	8,475	0,529	1,014	28,433	0,73	n.d.	0,428
AØ1H	11,262	7,061	2,852	8,018	0,52	0,604	27,072	0,903	n.d.	n.d.
AØ2H	11,531	7,182	2,623	8,283	0,549	0,499	26,877	0,936	n.d.	n.d.
AØ3H	11,348	5,653	2,674	7,218	0,542	0,455	26,468	0,967	n.d.	0,326
AS1H	8,566	18,202	2,669	8,471	0,534	1,015	29,568	0,727	n.d.	0,445
AS2H	9,642	19,691	2,961	8,054	0,553	1,053	30,01	0,739	n.d.	0,463
AS3H	8,389	17,78	2,687	7,213	0,516	0,972	29,426	0,77	n.d.	0,399
MØ1H	6,013	6,492	2,874	14,737	0,398	2,175	49,737	0,281	n.d.	0,668
MØ2H	7,235	6,556	2,514	14,492	0,359	2,193	50,529	0,308	n.d.	0,729
MØ3H	5,087	6,462	2,363	12,616	0,48	2,09	48,037	0,313	n.d.	0,286
MS1H	4,186	16,378	1,859	9,57	0,738	2,056	44,453	0,2	n.d.	1,071
MS2H	4,196	15,146	1,546	10,445	0,606	1,974	42,005	0,163	n.d.	1,11
MS3H	4,066	17,873	2,065	12,096	0,482	2,232	49,01	0,197	n.d.	0,951
MC1H	4,072	13,312	2,394	13,035	0,475	2,226	51,14	0,298	n.d.	1,008
MC2H	6,668	13,116	2,79	13,207	5,435	0,228	50,162	0,178	n.d.	0,346
MC3H	6,149	12,662	2,636	13,406	0,461	2,184	47,799	0,237	n.d.	1,029

Vedlegg 7

Tabell 8.7 Oversikt over alkoholinnholdet (%) i de analyserte sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, ASH, AØH, ACH, MSH, MØH og MØC. Rådata inkluderer alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene.

Prøvetype	Alkohol %
AS1S	6,78
AS2S	6,7
AS3S	6,76
AS1H	6,91
AS2H	6,92
AS3H	6,92
AØ1S	6,45
AØ2S	6,95
AØ3S	6,95
AØ1H	6,51
AØ2H	6,8
AØ3H	6,85
AC1S	7,12
AC2S	7,09
AC3S	6,84
AC1H	6,97
AC2H	7,05
AC3H	6,93
MS1S	7,16
MS2S	7,31
MS3S	7,22
MS1H	7,37
MS2H	7,4
MS3H	7,29
MØ1S	6,37
MØ2S	6,55
MØ3S	6,83
MØ1H	6,11
MØ2H	6,55
MØ3H	6,72
MC1S	7,82
MC2S	7,71
MC3S	7,98
MC1H	7,82
MC3S	7,98
MC3H	7,7

Vedlegg 8

Tabell 8.8 Oversikt over beregning av L-eplesyre (g/l) i de analyserte sidervariantene ASS, AØS, ACS, MSS, MØS, MCS, samt eplejus A og M. Rådata inkluderer alle resultater for 3 paralleller fra hver av sidervariantene og en parallell for eplejusene. I tillegg er målte verdier for blank prøven tatt med, som er viktig i beregningen av L-eplesyre konsentrasjonen. Det ble også beregnet konsentrasjon av L-eplesyre opp mot en medfølgende kontrollprøve med kjent innhold av L-eplesyre på 0,196g/l. De beregnede verdiene for kontrollprøvene heter Kit Standard 1 og Kit Standard 2, og verdiene samsvarte med tilhørende kontroll flaske med kjent konsentrasjon.

Prøve	A1	A1 gjennomsnitt	A2	A2 gjennomsnitt	Δprøve gjennomsnitt	Δ Blank	ΔA	$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000}$	$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \left(\frac{g}{l}\right)$
MØ1S		0,512		3,568					
MØ2S		0,49		3,565					
MØ3S		0,52	0,514333333	3,571	3,568	3,053666667	0,006	3,047666667	0,472507619
M51S		0,541		3,582					
M52S		0,553		3,576					
M53S		0,568	0,554	3,586	3,581333333	3,027333333	0,006	3,021333333	0,472507619
MC1S		0,514		3,578					
MC2S		0,509		3,574					
MC3S		0,473	0,498666667	3,559	3,570333333	3,071666667	0,006	3,065666667	0,472507619
AØ1S		0,519		3,565					
AØ2S		0,46		3,555					
AØ3S		0,479	0,486	3,556	3,558666667	3,072666667	0,006	3,066666667	0,472507619
AS1S		0,485		3,564					
AS2S		0,488		3,555					
AS3S		0,448	0,473666667	3,545	3,554666667	3,081	0,006	3,075	0,472507619
AC1S		0,438		3,549					
AC2S		0,385		3,565					
AC3S		0,478	0,433666667	3,555	3,556333333	3,122666667	0,006	3,116666667	0,472507619
A		0,490		3,570	3,570	3,081	0,006	3,075	0,472507619
M		0,506	0,506	3,587	3,587	3,081	0,006	3,075	0,472507619
Blank		0,274		0,28					
Kir Standard 1		0,287	0,71	0,423		0,423	0,006	0,417	0,472507619
Kir Standard 2		0,281	0,704	0,423		0,423	0,006	0,417	0,472507619



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway