



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016

30 stp

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Vekst, metabolisme og ølbrygging med ulike stammer av gjær**

Growth, Metabolism and Brewing by Different Yeast  
Strains

Ludvig Nikolai Tanderø

Master i Matvitenskap: Produksjon og utvikling av næringsmidler

## **Forord**

Denne oppgaven ble utført innen matvitenskap ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet (NMBU). Oppgaven utgjør 30 studiepoeng, og ble gjennomført i løpet av perioden februar-juni 2016.

Jeg valgte en oppgave der jeg kunne bruke etablert kunnskap gjennom mange år som student. Fermenteringsmikrobiologi har alltid interessert meg fordi denne prosessen er viktig for smak og aroma i næringsmidler. Jeg kom i kontakt med ett lite bryggeri på Nesodden som heter Ode bryggerier, som peilet meg inn på denne oppgaven. Å få jobbe med gjær i sammenheng med øl har vært tidkrevende, morsomt og interessant fordi jeg har fått lov til å undersøke øl med ulike kjemiske teknikker. Jeg vil takke min hovedveileder Trude Wicklund og medveileder Hilde Østlie for tålmodighet og god oppfølging når jeg trengte det i et fagfelt som er komplisert. Jeg vil også takke Kari, Ahmed og May på laboratoriet for god hjelp til det praktiske arbeidet og for hyggelige samtaler i en stressende hverdag og ikke minst god kaffe. Til slutt vil jeg takke Ode bryggerier for økonomisk støtte og min samboer for moralsk støtte.

Ludvig Nikolai Tanderø

Ås, juni 2016



## Sammendrag

Aromastoffer i øl er viktig for å gi ølet en særegenhet. Gjær er en stor bidragsyter.

Metabolitter fra gjær bidrar til en rekke smaker og aromastoffer som er ønskelig i øl. Flyktige stoffer som estere, høyere alkoholer, vicinale diketoner, aldehyder (VDK) og sulfatgrupper er alle med på å definere aromaprofilen til øl. Mengden aromastoffer som produseres påvirkes av vekstbetingelsene til gjærcellene. Faktorer som temperatur, pH, næringstilgang, oksygen og tilføring av trykk er eksempler på måter man kan påvirke gjær.

Aromakomponentene som forekommer i større konsentrasjoner i øl er høyere alkoholer som n-propanol, 3-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, fenyletyl alkohol og 2-metyl-1-propanol, hvorav alle er viktige bidragsyttere når det gjelder smakkomponenter i øl. Det samme gjelder for estere i form av etyl acetat, isobutyl acetat, fenyletyl acetat, etyl hexanoat og etyl oktanoat, men disse produseres i små konsentrasjoner. De to kjemiske gruppene har en synergistisk effekt på smak og aroma i ølet da majoriteten av disse stoffene ligger under terskelverdien for smak i øl.

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke fire forskjellige gjærstammer og se på hvordan effekten av tid og temperatur påvirker vekst og metabolisme hos gjær.

Temperaturens bidrag til aroma og smak undersøkes. Det ble utført ett vekstforsøk der det ble sett på veksten av gjærceller og deres utvikling over tid ved 18, 22 og 25,5 °C. Gjær ble podet til vørter med en standardisert sukkerkonsentrasjon (16,2 °Plato) og det ble gjort målinger ved tid 0, 24, 96 og 168 timer. Det ble også brygget ett øl basert på hver gjærstamme med den samme vørterresepten, og brygget ble sammenliknet med to kommersielle belgiske øl.

Det kunne observeres raskere reduksjon av pH og sukkerkonsentrasjon i vørter ved økt temperatur. Dannelsen av aromatiske stoffer som estere og høyere alkoholer målte en generelt høyere konsentrasjon av hver komponent ved høyere temperatur. Temperatur hadde en klar effekt på vekst, etanol- og CO<sub>2</sub>-produksjonen til hver gjærstamme.

Konklusjonen med oppgaven er at temperatur har noe å si for graden av aroma og smak i øl.



## Abstract

Aromatic compounds in beer are of great importance to give the beer its own character. Yeast is a huge contributor when it comes to flavor and aromas in beer. Volatile compounds as higher alcohols, esters, aldehydes, vicinal diketones (VDK) and sulfides are all contributors to the characteristics of beer. The growth rate of yeast and the factors contributing to growth influence the concentration of aromatic compounds that is produced. Temperature, pH, accessibility to nutrients, oxygen-concentration and pressure are all factors that influence yeast growth. The major groups of volatile compounds found in beer are higher alcohols and esters especially n-propanol, 3-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, phenylethyl alcohol, 2-methyl-1-propanol and ethyl acetate, isobutyl acetate, phenylethyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl oktanoate. The majority of these compounds are below the threshold for taste, but still these volatile compounds contribute in a huge way due to the synergistic effect on flavour and aroma.

The purpose of this Masters thesis is to study growth and metabolism in four different yeast strains. How temperature and time influences the growth and metabolism will be investigated through a series of experiments. Growth studies of the yeast was monitored over 168 hours, fermenting at three different temperatures; 18, 22 and 25,5 °C. The yeast-culture was transferred to a standard wort-solution with a concentration of sugars of 16,2 °Plato. Measurements were done after 0, 24, 96 and 168 hours. The four yeast strains were also used in the fermentation process of making beer. These beers were compared with two commercial Belgian Ales.

There was observed a greater decline in pH and sugar content at higher temperatures. The development of volatile compounds like esters and higher alcohols did also on a general basis increase at higher temperatures. Temperature had a clear correlation on the production of ethanol and CO<sub>2</sub>, as well as for the growth rate.

The conclusion of this thesis is that temperature is important for the development of yeast and the effect on metabolism.

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon</b>	<b>7</b>
1.1	Flokkulering	8
1.2	Transport av karbohydrater inn i cellen	8
1.3	Gjenbruk av gjærkulturer	9
1.4	Ølbrygging	11
1.5	Malt	11
1.6	Maillardreaksjoner—dannelsen av aroma og farge	13
1.7	Mesking	14
1.8	Foringelse av vørteren	15
1.9	Vørterkoking	16
1.10	Humle	17
1.11	Metabolisme	17
1.12	Glykolyse	19
1.13	Utvikling av pH	19
1.14	Smak og aroma ved refermentering	20
1.15	Aroma og smak i øl	23
1.15.1	Estere	25
1.15.2	Høyere alkoholer	26
1.15.3	Organiske syrer	28
1.15.4	Vicinal diketoner (VDK)	28
1.15.5	Terskelverdier og beskrivelse av smaks karakteristikk for viktige aromakomponenter som kan forekomme i øl	29
1.16	Modning av ølet	30
1.17	Referanseølet som brukes i oppgaven	30
<b>2</b>	<b>Metode og materialer</b>	<b>32</b>
2.1	Gjærstammer	32
2.1.1	Isolering av gjærceller fra kommersielt øl	32
2.2	Dyrking av gjær	33
2.3	Celletallsbestemmelse ved telling	33
2.4	Forberedelser vekstforsøk	34
2.4.1	Vørterproduksjon til vekstforsøket (forberedende vekstforsøk)	34
2.5	Vekstforsøk (hoveddel)	36
2.5.1	Fermentering av vørter	36
2.5.2	Vekst av gjær i vørter	37
2.6	Kjemiske analyser	38
2.6.1	pH og Plato	38
2.6.2	CO <sub>2</sub> analyse	38
2.6.3	Analyse av flyktige stoffer (HSGC-FID)	39
2.7	Ølbrygging	39
2.8	Vannkvaliteten Oppegård/Ås	42
2.9	Anton Paar	42
2.10	HSGC-FID	42
2.11	Isolering av DNA	44
2.12	Polymerase Chain Reaction (PCR)	44
2.12.1	Sekvensering av DNA og identifikasjon	46
2.13	Statistikk	46

<b>3</b>	<b>Resultater</b>	<b>47</b>
3.1	Identifisering av gjær ved Sanger sekvensering	47
3.2	Del 1 - vekstforsøk	48
3.2.1	Cellevekst	48
3.2.2	Sukkeromsetning	49
3.2.3	pH-målinger	52
3.2.4	Etanolproduksjon	55
3.2.5	CO <sub>2</sub> -produksjon	59
3.3	HSGC-FID: vekstforsøk	63
3.3.1	Aromaprofil 168 timer 18 °C	63
3.3.2	Aromaprofil 168 timer 22 °C	65
3.3.3	Aromaprofil 168 timer 25,5 °C	66
3.3.4	Principal Component Analyse (PCA)	74
3.3.5	Vekstforsøk 96 timer	74
3.3.6	Vekstforsøk 168 timer	75
3.3.7	One-Way Anova	77
3.4	Del 2 - Produktsammenlikning (P1, P2, P3, P4 mot Orval og St. Bernadus)	78
3.4.1	Hovedeffekt plot	78
3.4.2	Konsentrasjon av flyktige komponenter etter 48 dagers modning i pilotbrygget øl	80
3.4.3	Principal Component Analysis av kjemiske komponenter og produkter i pilot og kommersielt øl	82
3.4.4	One-Way Anova for 48 dagers modnet øl	82
3.4.5	Målinger gjort av øl i Anton Paar	83
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>84</b>
4.1	Vekstforsøk	84
4.1.1	Cellevekst	84
4.1.2	Omsetning av sukker	86
4.1.3	pH	86
4.1.4	CO <sub>2</sub> -produksjon	87
4.1.5	Etanolproduksjon	88
4.1.6	Produksjon av flyktige komponenter	89
4.2	Principal Component analyse (PCA)	91
4.2.1	Sammenlikning av flyktige komponenter etter 96 timer	91
4.2.2	Sammenlikning av flyktige komponenter etter 168 timer	92
4.2.3	PCA-analyse for ferdigbrygget øl	94
4.3	Flyktige komponenter generelt	96
4.3.1	Isobutyl acetat	98
4.3.2	Etyl hexanoat	98
4.3.3	Etyl oktanoat	99
4.3.4	2-metyl-1-propanol	99
4.3.5	1-propanol	100
4.3.6	Fenyletyl alkohol	100
4.4	Terskelverdier	101
<b>5</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>102</b>
5.1	Videre arbeid	104
	Litteraturliste	105
	Vedlegg 1: HSGC-FID vekstforsøk P1 (18 °C)	108
	Vedlegg 2: HSGC-FID vekstforsøk P1 (22 °C)	109
	Vedlegg 3: HSGC-FID vekstforsøk P1 (25,5 °C)	110

<b>Vedlegg 4: HSGC-FID vekstforsøk P2 (18 °C)</b> .....	<b>111</b>
<b>Vedlegg 5: HSGC-FID vekstforsøk P2 (22 °C)</b> .....	<b>112</b>
<b>Vedlegg 6: HSGC-FID vekstforsøk P2 (25,5 °C)</b> .....	<b>113</b>
<b>Vedlegg 7: HSGC-FID vekstforsøk P3 (18 °C)</b> .....	<b>114</b>
<b>Vedlegg 8: HSGC-FID vekstforsøk P3 (22 °C)</b> .....	<b>115</b>
<b>Vedlegg 9: HSGC-FID vekstforsøk P3 (25,5 °C)</b> .....	<b>116</b>
<b>Vedlegg 10: HSGC-FID vekstforsøk P4 (18 °C)</b> .....	<b>117</b>
<b>Vedlegg 11: HSGC-FID vekstforsøk P4 (22 °C)</b> .....	<b>118</b>
<b>Vedlegg 12: HSGC-FID vekstforsøk P4 (25,5 °C)</b> .....	<b>119</b>
<b>Vedlegg 13: Flyktige stoffer i øl</b> .....	<b>120</b>
<b>Vedlegg 14: Celletall</b> .....	<b>121</b>
<b>Vedlegg 15: Sukkeromsetningen i løpet av 168 timer</b> .....	<b>122</b>
<b>Vedlegg 16: Reduksjon i pH i løpet av 168 timer</b> .....	<b>123</b>
<b>Vedlegg 17: Etanolproduksjon i løpet av 168 timer</b> .....	<b>124</b>
<b>Vedlegg 18: CO<sub>2</sub> -produksjon i løpet av 168 timer</b> .....	<b>125</b>
<b>Vedlegg 19: Høyere alkoholer i ferdig øl modnet i 48 dager</b> .....	<b>126</b>
<b>Vedlegg 20: Aldehydekonsentrasjonen etter modning i 48 dager</b> .....	<b>127</b>
<b>Vedlegg 21: Esterkonsentrasjon etter 48 dagers modning</b> .....	<b>128</b>
<b>Vedlegg 22: Ketonkonsentrasjonen etter modning i 48 dager</b> .....	<b>129</b>
<b>Vedlegg 23: Statistikk PCA, One-way Anova</b> .....	<b>130</b>
<b>Vedlegg 24: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle 27 aromakomponentene</b>	<b>131</b>
<b>Vedlegg 25: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle gjærstammene ved forskjellige tiduttak og temperaturer</b> .....	<b>133</b>
<b>Vedlegg 26: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle 27 aromakomponentene etter 48 dager modning</b> .....	<b>135</b>
<b>Vedlegg 27: Oversikt over de kjemiske gruppene</b> .....	<b>136</b>
<b>Vedlegg 28: Oppskrift på ølet som ble brygget i denne oppgaven</b> .....	<b>137</b>
<b>Vedlegg 29: Identifisering av gjær isolert fra Orval</b> .....	<b>138</b>
<b>Vedlegg 30: Identifisering av gjær isolert fra St. Bernadus</b> .....	<b>139</b>
<b>Vedlegg 31: Materialer brukt i oppgaven</b> .....	<b>140</b>

## Innledning

Øl kommer i mange varianter og det skilles hovedsakelig mellom overgjæret og undergjæret øl (Adams and Moss, 2008). Da renhetsloven ble opphevet i Norge 1. januar 1994 kunne det observeres en økning av importert øl (Øystå, 2009b, Statens forvaltningstjeneste, 1996). Renhetsloven gikk ut på at øl kun skulle brygges på malt av bygg, humle, gjær og vann (Øystå, 2009b). Importen av belgisk øl til Norge, har økt de siste syv årene (Perre, 2014). Belgia isolert sett står for 1% av den totale produksjonen av øl i verden og produserer 1500 forskjellige øltyper. Fra årsrapporten til Vinmonopolet kan det se ut som salget av sterkøl, over 4,75 % (v/v), har hatt en jevn vekst de siste 10 årene (Henriksen, 2015). Sammenliknes dette med data hentet fra Statistisk sentralbyrå kan det se ut som det totale ølsalget i Norge har holdt seg relativt stabilt de siste årene i samme tidsperiode (Statistisk sentralbyrå, 2016). Tallene gir en viss indikasjon på at det er blitt en større interesse for øl med en mer kompleks smaksprofil, da sterkøl normalt sett smaker mer.

Belgisk øl er kjent for å inneholde aromakomponenter som bidrar til mye smak. I mange av øltypene som brygges spesielt i Belgia brukes det en blandingskultur for å skape en rik aroma i ølet. Lambisk øl, fruktøl, trappistøl og Abbey-type øl er eksempler på øl med mye smak og aroma (Bokulich et al., 2012, Vanderhaegen et al., 2003).

I denne oppgaven ble det tatt utgangspunkt i gjær som brukes til å brygge belgisk ale type dobbel og trippel. Vekst og metabolisme hos fire forskjellige gjærstammer ble undersøkt ved tre forskjellige temperaturer (18, 22 og 25,5 °C). To av gjærstammene ble isolert fra to forskjellige kjente belgiske øl, Orval Trappiste og St. Bernadus Abt 12 Magnum Edition 2015 og to gjærstammer ble kjøpt på Bryggeland, og er gjærtyper som brukes til brygging av tilsvarende belgisk type øl. Gjærstammene ble også brukt til å brygge øl i pilotskala etter en standard oppskrift på denne type øl. Målet med denne oppgaven var å se på forskjeller vekst og metabolisme for de fire gjærstammene ved ulike fermenteringstemperaturer.

# 1 Introduksjon

I flere tusen år har man benyttet mikroorganismer til å lage produkter med spesielle smaker. Dette har blitt utført både ubevisst og bevisst gjennom tidene (Vanderhaegen et al., 2003). Bryggekunsten hadde trolig sitt opphav i Mesopotamia for mer enn 6000 år siden, der visstnok 40% av den totale kornproduksjonen ble brukt til brygging (Adams and Moss, 2008), men det er først de siste 200 årene at det har blitt forsket på den kjemiske sammensetningen i øl og på smak (Fushiki, 2002).

Mikroorganismer produserer mange forskjellige, både ønskede og uønskede, sekundære metabolitter. Disse komponentene påvirker smak og aroma i øl både positivt og negativt. En enkelt stamme med mikroorganismer i øl, kan bidra med komplekse smaker, og en mye brukt gjær, er *Saccharomyces cerevisiae* (Vanderhaegen et al., 2003). For 99% av ølet som brygges i verden er *Saccharomyces* den gjærslakten som brukes mest (Bokulich and Bamforth, 2013). Øl består av fire hovedingredienser: Malt, vann, humle og gjær (Lea and Piggott, 1995). Gjær er eukaryote, enkeltcellete, heterotrofe og fakulativ anaerobe organismer. Under fermentering vokser og deler gjærceller seg asexuelt ved knoppskyting (Pires and Brányik, 2015).

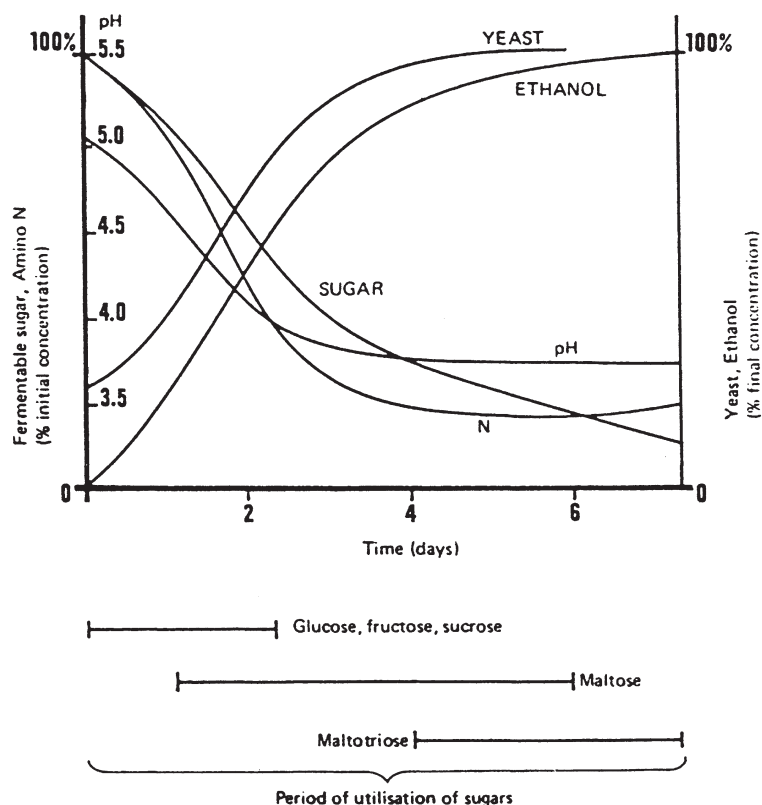
Typiske gjærstammer som brukes til å brygge henholdsvis ale og lager, stammer fra *S. Cerevisiae* var. *cerevisiae* og *S. cerevisiae* var. *carlsbergiensis* (synonymt med *S. pastorianus*). En måte å skille de to på, er at gjær som brukes til å brygge ale, legger seg på overflaten av ølet etter endt gjæring og kalles derfor toppfermenterende gjær, mens gjær til lager legger seg på bunnen og kalles derfor bunnfermenterende gjær (Adams and Moss, 2008). Skillet mellom ale- og lagergjær har blitt visket ut da lagergjær også brukes til å brygge ale (Adams and Moss, 2008). De to gruppene gjær som brukes til brygging har særegne genom, samt fysiologiske og fermenterende egenskaper. De skiller seg fra hverandre på egenskaper som flokkulering, fermenteringstid, toleranse for stress for å nevne noen faktorer (Pires and Brányik, 2015).

## 1.1 Flokkulering

Flokkulering er en viktig prosess når det gjelder gjærceller i øl. Flokkulering skjer når cellene danner aggregater ved å binde seg til hverandre. Flokkulering skjer mot slutten av primærfermenteringen når fermenterbart sukker er brukt opp (Briggs et al., 2004). Ved sterk fysisk påvirkning av en cellekultur, for eksempel i form av omrøring eller risting, er det en sterk positiv korrelasjon med flokkulering av gjærceller. Cellene må komme i kontakt med hverandre for at flokkulering skal forekomme (Briggs et al., 2004). I det cellene flokkulerer danner dette relativt stabile strukturer. Aggregatene kan reverseres dersom cellekulturen på nytt får tilgang til fermenterbart sukker. Flokkulering er viktig fordi det gir muligheten å fjerne flokkulert gjær fra umodnet øl, enten fra toppfermenterende stammer eller bunnfermenterende stammer. Henholdsvis kan cellene tas ut fra overflaten til det fermenterte ølet eller fra bunnen av fermenteringsbeholderen. Dersom flokkulering ikke forekommer med nok celler, kan det gå utover ”repitching”-prosessen, fordi det er for få celler (Briggs et al., 2004).

## 1.2 Transport av karbohydrater inn i cellen

*Saccharomyces cerevisiae* og *S. pasteurianus* kan bare absorbere og bryte ned små sukkerarter som sukrose, glukose, fruktose, maltose og maltotriose. Invertaser på utsiden av cellemembranen hydrolyserer sukrose til glukose og fruktose, slik at cellen kan transportere monosakkaridene inn i cellen. Maltose og maltotriose hydrolyseres av  $\alpha$ -glukosidaser inne i cellen (Pires and Brányik, 2015). Figur 1 viser hvordan sukrene transporteres inn i cellen i en bestemt rekkefølge da sukrene konkurrerer om samme permease i cellemembranen. Rekkefølgen er: Glukose, sukrose, maltose og tilslutt maltotriose (Pires and Brányik, 2015). Ett generelt bilde over hvordan effekten av celleveksten påvirker sukkerkonsentrasjonen, pH, aminogrupeer og etanolproduksjonen ved fermentering er også vist i Figur 1.



Figur 1: Endringer i celletall, etanol, pH, sukker og nitrogen ved fermentering ale (Adams and Moss, 2008).

### 1.3 Gjenbruk av gjærkulturer

Oppdyrking av gjærceller som er isolert fra en tidligere fermentering, kan by på noen problemer. Genetisk seleksjon av ulike varianter, gjør at de fleste bryggere inokulerer ølet med en hovedkultur som bevares under optimale forhold. Flokkulering er også en viktig faktor når det gjelder isolering av en tidligere brukt gjærkultur. Det er i tillegg faktorer i maltet som kan bidra til at gjærcellene flokkulerer for tidlig under fermenteringen og derved gir ett dårlig produkt (Bokulich and Bamforth, 2013).

Plantepatogene faktorer kan bidra til å påvirke gjærcellenes evne til å flokkulere tidligere under fermenteringen. Flokkulering skjer når mannoproteiner på celleveggen til gjærcellene binder til lektin-aktige glykoproteiner på andre cellemembraner, som resulterer i aggregering og bunnfelling (Bokulich and Bamforth, 2013). Flokkulering skjer som regel mot slutten av fermenteringen fordi sukkeret i tidlig fermenteringsfase assosierer med lektinoverflaten og sperrer for tidlig binding og flokkulering. Dersom gjærcellene flokkulerer for tidlig gir det et brygg som ikke er gjæret ferdig, noe som skaper usmaker og gir et dårlig øl (Bokulich and Bamforth, 2013). Noe som også kan påvirke kvaliteten på ølet er at cellene autolyserer (Vanderhaegen et al., 2003).

Dersom flaskene for eksempel lagres over tid kan dette være et problem, da autolyse



av gjærcellen gjør at intracellulære komponenter (aminosyrer, peptider, nukleotider, fettsyrer og enzymer) kommer ut av cellen og kan bidra negativt på smaksprofilen til ølet. Neven et al. (1997) viste at når esterasene kommer ut i ølet, vil dette påvirke esterprofilen i øl fordi viktige estere som isoamyl acetat, etyl hexanoat og etyl oktanoat hydrolyseres (Vanderhaegen et al., 2003). Det vil dannes etyl isovalerat, etyl isobutyrat og etyl fenylacetat i stedet. Esteraseaktiviteten i refermentert øl er høyere for toppfermentert øl enn for bunn fermentert øl. Esteraser har optimums pH mellom 4 og 5 (Vanderhaegen et al., 2003).

Å holde en gjærstamme ved like kan være vanskelig da forurensninger, mutasjoner eller metabolske endringer ved ”repitching” kan forekomme (Pires and Brányik, 2015). Optimalt sett burde stammene som brukes fryses ned, slik at ny, frisk gjær kan tas opp til poding og tilsettes brygget hver gang. Gjennomsnittlig levetid for de fleste gjærstammer ligger mellom 10-30 replikasjoner (Powell et al., 2000). En gjærkultur vil til tross for dette så å si leve evig fordi det produseres datterceller, som produserer nye datterceller, gitt at betingelsene er lagt til rette for det. Powell et al. (2000) konkluderte med at cellealdring i cellekulturer som brukes til brygging kan påvirke fermenteringen (Powell et al., 2000). Celledød kan skje på to måter. Den ene er gjennom nekrose der skader på intracellulære komponenter ødelegger cellen, som leder til død og autolyse. Dette kan skje på grunn av stress av forskjellige årsaker. Nekrose kan også skje ved at essensielle gener muterer eller ved akkumulering av ødelagt DNA. Den andre dødsårsaken for gjærcellene er aldersendring der cellene rett og slett blir gamle og dør (Powell et al., 2000).

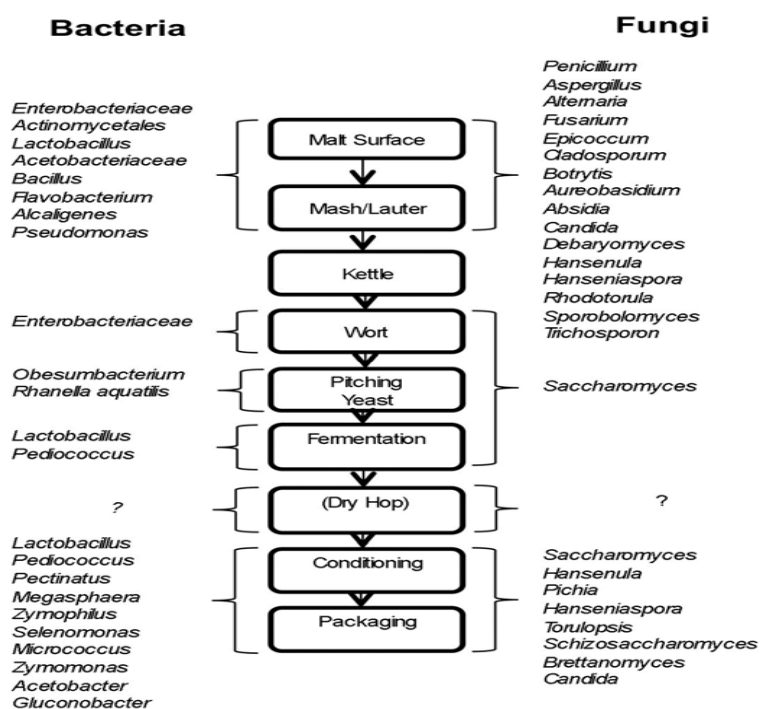
Alle gjærstammer som brukes til brygging av øl danner glyserol, vicinale diketoner (VDK), alkoholer, estere, kortkjedete fettsyrer, organiske syrer og svovelkomponenter (Bokulich and Bamforth, 2013). Mengden som produseres av hver enkelt gjærstamme avhenger av stammen.

## 1.4 Ølbrygging

Brygging av øl er et spennende felt som omhandler hvordan mikroorganismer og råmateriale sammen kan lage en alkoholholdig drikk med mye smak og aroma. Det er som nevnt tidligere, mange faktorer som spiller inn på hvordan sluttresultatet blir.

Figur 2 viser en oversikt over selve bryggeprosessen og i hvilke steg i

bryggeprosessen ulike mikroorganismer forekommer eller kan forekomme.



Figur 2: Oversikt over de forskjellige mikroorganismene som kan forekomme gjennom hele bryggeprosessen (Bokulich et al., 2012).

## 1.5 Malt

Malt inneholder stivelse, som under bryggeprosessen blir spaltet ned til mindre komponenter gjennom endogen enzymaktivitet i kornet. Dette er en viktig prosess for å få et ønskelig resultat ved brygging av øl. Bygg er den kornsorten som brukes mest til brygging, men andre kornsorter som ris, mais og hvete er eksempler på korn som kan brukes som stivelseskilder (Lea and Piggott, 1995). Majoriteten av karbohydratene i kornet er polysakkaridet stivelse og finnes hovedsakelig i stivelseskornene.

Bygget gjennomgår før bruk i selve bryggeprosessen en malting som består av tre steg (Lea and Piggott, 1995). Stegene er følgende: Oppbløtning, spiring og tørking. Dette

gjøres for å øke enzymaktiviteten i kornet skal aktiveres. Ved bløtlegging vil kornet mettes med vann. Under spiringen vil enzymer dannes og etter 5-8 dager når amylase sin høyeste konsentrasjon. Gjennom tørkeprosessen, behandles det spirende kornet med varme, opptil 100 °C. Temperatur påvirker sluttproduktet (Øystå, 2009a). Under denne prosessen vil også  $\beta$ -glukanaser bidra til at stivelse konverteres og at celleveggen til kornet degraderes (Lea and Piggott, 1995).

Gelatineringstemperaturen (52-59°C) for stivelsen i bygg er lavere enn for andre kornsorter (Adams and Moss, 2008). En gelatinering ved en lavere temperatur hjelper til slik at  $\alpha$ -amylasen ikke inaktiveres. Gelatineringen gjør at stivelsen blir mer løselig og mer tilgjengelig for depolymeriserende enzymer. Bygg inneholder også en større konsentrasjon  $\beta$ -amylase som bidrar til omdannelsen av stivelse og dextriner til maltose (Adams and Moss, 2008)

Stivelse i bygg består av amylose og amylopektin, som henholdsvis er en lineær polymer og en forgrenet polymer, med lineære partier. Fordelingen er ca. 20-25% amylose og 75-80% amylopektin (Adams and Moss, 2008). Enzymet  $\alpha$ -amylase hydrolyserer  $\alpha(1\rightarrow4)$ - glykosidbindinger og danner lavmolekylære dekstriner.  $\beta$ -amylase angriper dextrinene på den ikke-reduserende enden og danner maltose (Adams and Moss, 2008).

Amylosemolekylene består hovedsakelig av glukosemolekyler bundet sammen med  $\alpha(1\rightarrow4)$  bindinger, men i amylopektin-polymeren er monosakkarider bundet sammen med  $\alpha(1\rightarrow6)$ -bindinger i tillegg. Det dannes en mer forgrenet struktur enn for kun lineære  $\alpha(1\rightarrow4)$ -bindingene (Lea and Piggott, 1995). Amylose-polymeren inneholder ca.  $10^5$  glukopyranose enheter. Når det gjelder amylopektin polymeren har de en høyere molekylvekt enn amylosekjedene og rundt 95% av monomerene danner  $\alpha(1\rightarrow4)$  bindinger (Lea and Piggott, 1995). Når stivelseskornene varmes opp i vann bidrar dette til at polymerene dissosierer fra hverandre ved at hydrogenbindingene mellom polymerene brytes. Det gjør også at stivelseskornene sveller på grunn av hydrering, noe som bryter hydrogenbindingene, slik at karbohydratene lekker ut av granulen. Dette er viktig for å få karbohydrater ut av kornet (Lea and Piggott, 1995). Dette gjør også at svinnet reduseres under meskingen. Hydreringen av polymerene er viktig for depolymeriseringen, fordi enzymene får lettere tilgang til polymerene.

## 1.6 Maillardreaksjoner—dannelsen av aroma og farge

Maltet som brukes i mørkere øl tørkes ved høyere temperaturer enn vanlig pilsener malt. Dette bidrar til at aromatiske komponenter dannes i tillegg til en mørkere farge på ølet (Vanderhaegen et al., 2007). Intermediatene som dannes fra Maillard-reaksjonene er blant annet furfuryl alkohol og  $\alpha$ -dikarbonyl-komponenter som er reaktive i øl ved aldring, og som kan bidra til usmak. Smaker som kommer fra Maillard-reaksjonene er brent, karamell og Madeira-liknende smak og aroma (Vanderhaegen et al., 2007).

Maillard-reaksjoner påvirkes av temperatur og fuktighet under tørkeprosessen. Eksempelvis inneholder ale-type øl flere Maillardprodukter enn lager, fordi maltet er påført høyere temperatur under tørkeprosessen. Amber-malt er tørket ved høyere temperaturer, noe som påvirker Maillard-produktene og bidrar til aroma i ølet. De fleste Maillardproduktene transformeres ikke av gjær og påvirker derved sluttproduktet (Lea and Piggott, 1995).

Flere smaker utvikles gjennom varmebehandling av maltet. Frie aminosyrer øker under maltingen og disse degraderes til aldehyder som kan bidra til maltaroma. De frie aminosyrene reagerer med reduserende sukker under varmebehandlingen, i form av tørking og koking. Under koking av vørter vil konsentrasjonen av vinyl fenoler øke og gi en røykaktig, fenolsk eller krydret aroma (Lea and Piggott, 1995) Tiden og temperaturen som påføres maltet under tørkingen og fuktighetsnivået i maltet, påvirker smakene som dannes i ølet (Lea and Piggott, 1995). Beal et al. (1994) studerte typiske komponenter som kan forekomme i maltet bygg. Malt brukes hovedsakelig som karbohydratkilde, og spesialmalt brukes for til å gi farge til brygget (Beal and Mottram, 1994). Det har blitt funnet over 200 komponenter som er isolert fra varmebehandlet malt som inkluderer alfatiske alkoholer, aldehyder og ketoner, pyrroler, furaner og pyraziner (Beal and Mottram, 1994). De fant at 3- og 2-metylbutanal gav høyest utslag og konsentrasjonen økte i maltet ved økt temperaturpåvirkning. Det ble også registrert 2-fenyletanol som gir en roseaktig aroma. Metylbutanal-konsentrasjonen økte etter hvert som maltet ble tørket, men mot slutten ble konsentrasjonen i det krystalliserte maltet redusert betraktelig.

## 1.7 Mesking

Maltet kvernes for å optimalisere utbyttet av næringsstoffer under meskingen.

Mesking kan gjøres på to måter. Den første er ved singel temperatur infusjonsmesking der det kun brukes en temperatur. Dette er metoden som er brukt i denne oppgaven.

For malt med en lavere modifieringsgrad brukes det en stegvis oppvarming (Lea and Piggott, 1995). Temperaturen økes da gradvis og holdes på en bestemt temperatur for å stimulere enzymaktivitet. Optimumstemperaturen for proteaser er 50 °C, 62 °C for  $\beta$ -amylase aktivitet og 72 °C for  $\alpha$ -amylase aktivitet (Lea and Piggott, 1995). Dette er viktig kunnskap for at viktige næringskomponenter som inngår i fermenteringsprosessen ikke skal gå til spille på grunn av ufullstendig hydrolyse av stivelsen. Viktige komponenter som forekommer i vørteren etter mesking er presentert i Tabell 1.

Vannet som brukes til brygging har også noe å si på produktet som skal fremstilles. Kalsiuminnholdet i vannet påvirker pH i vørteren ved at kalsiumioner feller ut som kalsiumfosfat og reduserer pH fra 6,0 til 5,4. Det bringer pH i meskeprosessen til optimums-pH for en rekke enzymer i maltet, som igjen bidrar til å øke fermenterbare komponenter i vørteren (Adams and Moss, 2008).  $\alpha$ -amylasene stabiliseres under meskingen ved økt konsentrasjon av kalsium ioner i vørteren. Derfor kan mineralene som finnes i vannet være viktig for stabiliteten til enzymene (Lea and Piggott, 1995). Malt fra bygg inneholder fire enzymer som bryter ned stivelse og disse er  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\alpha$ -glukosidase og "limit dextrinase". Av de nevnte enzymene er det de to førstnevnte som gjør den største jobben (Pires and Brányik, 2015). Nedbrytning av stivelsen starter med  $\alpha$ -amylasen som har en optimumstemperatur og -pH på henholdsvis 72-75 °C og 5,6-5,8.  $\beta$ -amylasen har en noe lavere optimums-temperatur på mellom 60-65 °C og pH på mellom 5,4-5,5 (Pires and Brányik, 2015).  $\beta$ -amylasen bryter ned stivelse ved at enzymene virker på de ikke-reduserende endene i stivelsesmolekylene, samt dekstrinkjedene.  $\alpha$ -amylasen bidrar til å gjøre dextriner mer tilgjengelige for  $\beta$ -amylasen.  $\beta$ -amylasen katalyserer nedbrytning av stivelse til maltose, mens  $\alpha$ -amylase kan i teorien bryte ned hele stivelsespolymeren ned til glukose (Pires and Brányik, 2015)

Tabell 1: Sammensetning av vørter ved brygging av øl (Lea and Piggott, 1995).

Komponenter	Konsentrasjon (g/L)
Fruktose	2,1
Glukose	9,1
Sukrose	2,3
Maltose	52,4
Maltotriose	12,8
Ufermenterbare sukre	23,9
Totalt nitrogen	0,8
Totale aminosyrer (som nitrogen)	0,3
Totale aminosyrer	1,65
Totale fenole komponenter	0,25
Alfa-isosyrer	0,035
Kalsiumioner	0,065

Flere viktige komponenter som går ut i vørteren er blant annet fermenterbare og ikke-fermenterbare sukre, lineære og forgrenede dekstriner, aminosyrer, peptider, lipider, organiske syrer og fosfater. Komponentens konsentrasjon vil variere fra kornsort til kornsort og hvordan maltingen er utført (Lea and Piggott, 1995). Proteiner som dannes under fermenteringen vil bidra til skumdannelse eller ”haze”-produksjonen (Lea and Piggott, 1995).

## 1.8 Forringelse av vørteren

De vanligste mikroorganismene som ødelegger vørteren er Gramnegative Enterobacteriaceae som produserer større mengder dimetyl sulfid (DMS), organiske syrer og 2,3-butandiol (Bokulich and Bamforth, 2013). Det gir ølet en uønsket fruktig og vegetabilsk aroma. Mesken er som nevnt tidligere i teksten næringsrik og holder en pH på ca. 5,5. Det bidrar til at uønskede mikroorganismer vokser godt i løsningen. Enterobacteriaceae inhiberer gjærvekst noe som ytterligere ødelegger resultatet av bryggingen dersom en forurensing skulle forekomme. Etanolproduksjon og den lave pH som utvikles underveis i fermenteringen vil bidra til å inhibere disse uønskete

mikroorganismene (Bokulich and Bamforth, 2013). Tabell 2 viser en oversikt over typiske faktorer som ødelegger øl.

**Tabell 2: Mulige bismaker som kan forekomme ved forurensning i øl (Adams and Moss, 2008).**

Komponent	Smak	Mulig grunn til forurenset øl
Acetaldehyde	Epler, maling, gress	Bakteriell forurensning: Eddiksyre bakterier/ <i>Zymomonas</i>
Sulphur	Råtn e egg, sluk	Dannes under fermenteringen: Villgjær/ <i>Zymomonas</i>
Nellik	Urteaktig, fenolaktig	Bakteriell forurensning/villgjær
Muggen/soppaktig	Mugg, bedervet, hessain	Mugg eller bakterier: Normalt sett fra vannet
Fruktig	Ester, ananas, løsemiddel, bananer, pære drops.	Villgjær/ <i>Brettanomyces</i> : Bakterier i vørteren <i>Enterobacter agglomerans</i>
Etyl acetat	Løsemiddel	Villgjær/ <i>Hansenula anomala</i>
Diacetyl	Toffee, smøraroma honning	Dannes under fermenteringen: Forurensning fra melkesyrebakterier: <i>Lactobacillus/Pediococcus</i>
DMS <sup>a</sup>	Mais, ”jammy”	Bakteriell forurensning: <i>Hafnia/Obesumbacterium</i> . Vørter bakterier
TCP <sup>b</sup>	Medisin, antiseptisk sur, eddik	Bakteriell forurensning: Vørter bakterier Bakteriell forurensning: <i>Acetobacter/Gluconobacter</i>
Surt	Surt, kremaktig Surt og epler	Bakteriell forurensning: <i>Lactobacillus Acetobacter</i>

<sup>a</sup>DMS=dimetylsulfid

<sup>b</sup>TCP=eddiksyre

## 1.9 Vørterkoking

Varmebehandling av vørteren bidrar til å inaktivere enzymer i maltet, i tillegg til å drepe uønskete mikroorganismer som kan forringe produktet. Det er i tillegg vanlig å tilsette humle under kokingen, noe som bidrar til å danne bitterhet i det endelige ølet og som også har en inhiberende effekt på mikroorganismene som er uønsket.

Kokingen av vørteren kan vare i 1-2 timer der ca. 5-15% av vannet tilsatt fordampes (Lea and Piggott, 1995). Flyktige stoffer som stammer fra malt og humle kan registreres etter vørterkoking, men mesteparten av flyktige stoffer, kommer fra fermenteringen (Briggs et al., 2004).

## 1.10 Humle

Tilsetning av humle er viktig for å få en distinkt smak, samt bitterhet i produktet som lages. Det er konglene fra hunnplanten *Humulus lupulus* som gjerne tilsettes under kokeprosessen. Humle bidrar til bitterhet fordi harpiksen i konglen inneholder alfasyrer, som humulon og cohumulon, som er delvis løselige i vørteren (Adams and Moss, 2008). I tillegg til aroma og bitterstoffer, så har humle som nevnt antimikrobiell virkning på uønskete bakterier som kan ødelegge produktet i fermenteringsprosessen (Madigan, 2011). Tabell 3 viser en oversikt over hvilke komponenter som finnes i Fuggles-humlen. Dette er humletypen som er brukt i denne oppgaven.

**Tabell 3: Konsentrasjonen av komponenter i Fuggle-humlen. Tallene er hentet fra Briggs et al. (2004)<sup>a</sup> og British Hop Association<sup>b</sup>.**

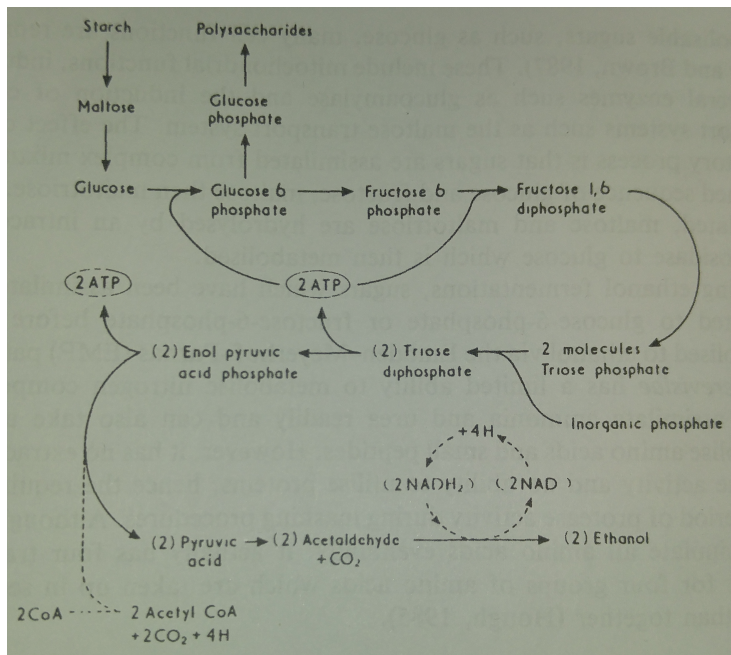
Komponent	Innhold (%)
Alfasyre	3,0-5,6 <sup>a</sup>
Betasyre	2-4 <sup>b</sup>
Co-humulon	29-30 <sup>a</sup>
Totale oljer	0,7-1,1 <sup>a,b</sup>
Humulen	30-38 <sup>b</sup>
Myrcen	25-30 <sup>b</sup>
Farnesen	6-8 <sup>b</sup>

Det er alfa- og betasyrer som er hovedkomponentene for bitterhet. Alfa-syrene er kun løselig ved 3 ppm i kaldt vann og ved varmebehandling isomerer alfasyren til iso-alfasyre som dannes under koking av vørteren. Denne isomeringen av stoffene er viktig for løselighet og bitterhet i ølet, da Iso-alfa-syre er 9 ganger så bitter som alfa-syren.

## 1.11 Metabolisme

Metabolismen til gjær er viktig å forstå når det kommer til smak og aroma utvikling i øl. Det er en komplisert prosess med mange reaksjonsveier, fra råstoff til produkt. Sukkeret dannet fra malt er en viktig energikilde for gjær. Under anaerobe forhold vil gjærcellene gjøre sukkeret om til etanol gjennom Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) – reaksjonsveien (Adams and Moss, 2008) og er vist i Figur 3.





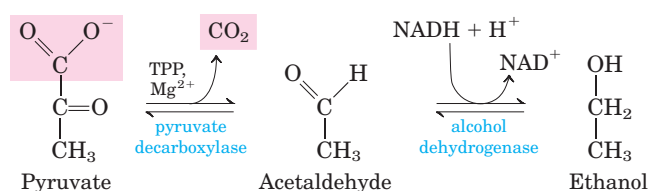
Figur 3: Emden-Meyerhof-Parnas reaksjonsveien for glukose (Lea and Piggott, 1995).

Mesteparten av sukkeret vil konverteres til etanol ved en optimal fermentering. Dannelsen av andre bi-produkter vil også forekomme. Typiske komponenter er glyserol, organiske syrer og aromakomponentene som gir ølet en spesifikk smaksprofil (Lea and Piggott, 1995). Alkoholproduksjonen og celleveksten har et raskt og tilnærmet eksponentielt forløp i initiell fase. Når celleveksten stopper opp i sekundærfasen vil etanolproduksjonen fortsette med en lineær øking, inntil sukrene er spist opp i vørteren. Det er et sammenfallende forløp mellom sukrene som tas opp og etanolproduksjon (Lea and Piggott, 1995).

Til tross for den anaerobe reaksjonsveien er det viktig å blande inn oksygen i vørteren før gjæringsprosessen starter, slik at gjærcellene kan syntetisere fettsyrer og steroler til oppbygning av celledmembranen under fermenteringsprosessen (Adams and Moss, 2008). Under den initielle fasen kan det observeres en meget aktiv cellevekst. I den sekundære fasen under fermenteringen vil etanolproduksjonen bli noe lavere fordi celleveksten reduseres (Adams and Moss, 2008). Generelt sett stiger celledtallet 6 ganger under fermenteringen.

## 1.12 Glykolysen

I glykolysen brytes ett glukosemolekyl ned via en rekke enzymatiske reaksjoner, slik at to pyruvat-molekyler dannes (Nelson et al., 2008). Glykolysen er cellens måte å konservere energi fra glukosemolekylet i form av adenosin trifosfat (ATP) og nicotin adenin dinukleotid (NADH). Mange anaerobe mikroorganismer er fullstendig avhengig av glykolysen (Nelson et al., 2008). Gjær er sopp som reproducerer aseksuelt ved knopp skyting (Brooker, 2011). Vekst aerobt er mer effektivt (36 ATP) og gir økt biomasseproduksjon. Ved anaerobe betingelser dannes energi (2 ATP) via glykolysen dersom det er glukose tilstede (Brooker, 2011). Under fermenteringen gjøres pyruvat om til CO<sub>2</sub>, acetaldehyd og etanol som vist i Figur 4.



Figur 4: Glykolysen og omgjøringen av pyruvat til etanol (Nelson et al., 2008).

Glykolysen krever NADH. Under anaerobe betingelser vil NADH konsentrasjonen øke i cellen og redusere NAD<sup>+</sup>. Opphopning av NADH forårsaker opphopning av frie radikaler som kan ødelegge DNA og cellulære proteiner i gjær cellene, fordi NADH donerer elektronene til andre molekyler (Brooker, 2011). NAD<sup>+</sup> må i tillegg regenereres for at glykolysen ikke skal stoppe helt opp. En genial måte gjær cellene løser dette på er gjennom nedbrytning av pyruvat til CO<sub>2</sub> og acetaldehyd. Deretter reduseres acetaldehyd til etanol, som gjør at NADH oksideres til NAD<sup>+</sup> (Brooker, 2011). Det bidrar til at glykolysen holdes gående i det anaerobe miljøet så lenge det er optimale næringsforhold. Gjennom denne prosessen får gjær cellen 2 ATP per glukosemolekyl.

## 1.13 Utvikling av pH

I løpet av fermenteringen vil pH i vørteren bli lavere. Reduksjonen i pH vil være raskest i starten av fermenteringen og mot slutten når sukker omsetningen er brukt opp, kan det observeres en økning i pH. Forsuringen av vørteren i løpet av fermenteringsprosessen skyldes flere faktorer. Dannelsen av karbonsyre fra karbondioksid-produksjonen er en av faktorene som bidrar til dette. Organiske syrer

som melkesyre, sitronsyre, pyruvinsyre, eplesyre, eddiksyre, maursyre, ravsyre og smørsyre blir produsert av cellen og bidrar til reduksjonen av pH (Briggs et al., 2004). Ekskresjonen av hydrogenioner bidrar også til pH-reduksjon (Coote and Kirsop, 1976). Absorpsjon av fosfater bidrar også, men i mindre grad. Dersom øl fermenteres under semi-aerobe betingelser reduseres pH mer på grunn av blant annet organiske syrer, enn det ville gjort under anaerobe betingelser (Coote and Kirsop, 1976). Dersom konsentrasjonen av frie aminosyrer i vørteren er høy vil det stimulere til cellevekst og økt produksjon av organiske syrer og  $H^+$ , noe som vil bidra til å redusere pH. Haukeli og Lie (1976) viste at en reduksjon i pH fra 5,5 til 4 under fermenteringen økte omdannelsen av  $\alpha$ -acetolaktat til diacetyl med en faktor på 4. Diacetyl konverteres spontant fra  $\alpha$ -acetolaktat, da gjær i utgangspunktet ikke produserer diacetyl. Dette er en reaksjon som avhenger spesielt av pH og temperatur.  $\alpha$ -acetolaktat kan også omdannes spontant videre til acetoin. Det har blitt vist eksperimentelt at fordelingen diacetyl og acetoin som dannes er henholdsvis 60 % og 40 % (Haukeli and Lie, 1978). En økning i pH mot slutten indikerer autolyse av gjærcellene (Bamforth, 2001).

## 1.14 Smak og aroma ved refermentering

I tillegg til de kjemiske komponentene gjærcellene produserer som bidrar til smak og aroma, er også kombinasjonen av de resterende ingrediensene i brygget viktig. En annen måte å påvirke nye og flere smaker i øl på er ved refermentering. For eksempel kan bryggeriet tilsette en ny gjærkultur direkte i flasken for å danne ytterligere en ønsket smaksprofil. Refermentering vil også gjøre at  $CO_2$  - og alkoholinnholdet i det flasketappede ølet øker. Karboneringen gir ølet en frisk smak og bidrar til dannelsen av skum (Vanderhaegen et al., 2003).

I Belgia er dette en vanlig fremgangsmåte på mange spesialøl (Vanderhaegen et al., 2003). I Belgia har det tradisjonelt blitt brukt blandingskulturer til fermentering av øl for å gi helt spesielle aromaprofiler. Belgisk trappistøl for eksempel, refermenteres i flasken med gjærstammer fra *Brettanomyces* og noen ganger med annen type gjær eller bakteriekultur. Dette bidrar til en helt spesiell smaksprofil (Bokulich and Bamforth, 2013). *Brettanomyces lambicus* og *Brettanomyces bruxellensis* dominerer gjerne etter at *Saccharomyces* har gjort sitt. I visse belgiske øltyper som trappistøl

brukes *Brettanomyces* sammen med *Saccharomyces* for å gi en helt særegen smakprofil (Vanderhaegen et al., 2003) *Brettanomyces* påvirker ølet på forskjellige måter. Membranbundede esteraser endrer esterprofilen og danner isovalerinsyre og flyktige fenoler fra hydroxycinammic-syre. Sammen med pediokokker kan til og med dextriner metaboliseres, som normalt forblir ubenyttet av *Saccharomyces*. Det gir spesielle smaker og syrlighet til produktet (Vanderhaegen et al., 2003).

*Brettanomyces* som inkluderer *B. bruxellensis*, *B. custersii* og *B. anomalus* er gjærstammer som i utgangspunktet forurenses øl og andre alkoholholdige drikker (Bokulich and Bamforth, 2013). Gjærstammene ødelegger øl ved å produsere flyktige fenol-stoffer i form av 4-etylguaiacol og 4-etylphenol, som gir en uønsket aromasammensetning i form av svette, bandasje og røyk (Bokulich and Bamforth, 2013). Til tross for denne usmaken som kan dannes, er dette gjærstammer som brukes i belgisk øl av typen lambisk øl og i fruktøl. Den enzymatiske  $\beta$ -glukosidase-aktiviteten til *Brettanomyces* fremhever fruktig aroma i brygget (Bokulich and Bamforth, 2013).

Stammer fra *S. cerevisiae* er som nevnt primærgjæren innenfor brygging (Lea and Piggott, 1995). For optimal cellevekst må visse næringskrav oppfylles. Næringskravet er karbon- og nitrogenkilder, metaller som magnesium, natrium, kalium, jern, zink, kobber og mangan, i tillegg til en rekke andre uorganiske stoffer som klorid, svovel, og fosfat. Gjærcellene trenger også vitaminer som biotin, pantotensyre, inositol, tiamin, pyridoxine og nikotinsyre. I vørter vil disse komponentene normalt sett være tilstede. Dersom det er anaerobe betingelser krever *S. cerevisiae* i tillegg steroler og umettede fettsyrer (Lea and Piggott, 1995). Det er ikke bare næringsstoffer som er viktig for optimal celledimensjon under fermenteringen. Temperatur er også en viktig faktor. For lagergjær foregår fermenteringen ved 8-12 °C, mens for ale type gjær foregår den ved 12-18 °C (Adams and Moss, 2008). *Saccharomyces cerevisiae* fungerer helt fint i temperaturer mellom 18 °C og 25 °C også, og danner øl med svært fruktig aroma (Pires and Brányik, 2015).

I et næringsrikt medium vil næringsinnholdet brukes opp over tid og alle mikroorganismer som reproducerer ved celledeling gjennomgår et tilnærmet likt vekstforløp. Følgende hovedfaser i utviklingen under en batch-fermentering er:

nølefase, eksponentiellfase og stasjonær fase (Briggs et al., 2004). Faktorer som sammensetning av næringsstoffer, temperatur, trykk og graden av agitasjon bestemmer veksthastigheten. For *Saccharomyces* gjær gjør evnen til knoppskyting dette litt annerledes, da varigheten til hver fase påvirkes av faktorene beskrevet (Briggs et al., 2004).

Temperatur har forskjellig virkning på metabolismen til gjærceller. Øker temperaturen under fermenteringen, vil det bidra til å øke diacetyl dannelse tidlig i fermenteringen på grunn av forhøyet cellevekst (Pires and Brányik, 2015). Konsentrasjonen av diacetyl mot slutten av fermenteringen vil være tilnærmet lik, som ved en lavere temperatur, da flere celler reduserer diacetylkonsentrasjonen i prøven til slutt (Pires and Brányik, 2015). Dannelsen av diacetyl i øl er et biprodukt fra valin-syntesen (Vanderhaegen et al., 2003). Kontroll av diacetylproduksjonen kan gjøres ved å øke lagringstiden eller redusere pH i vørteren (Gibson et al., 2015).

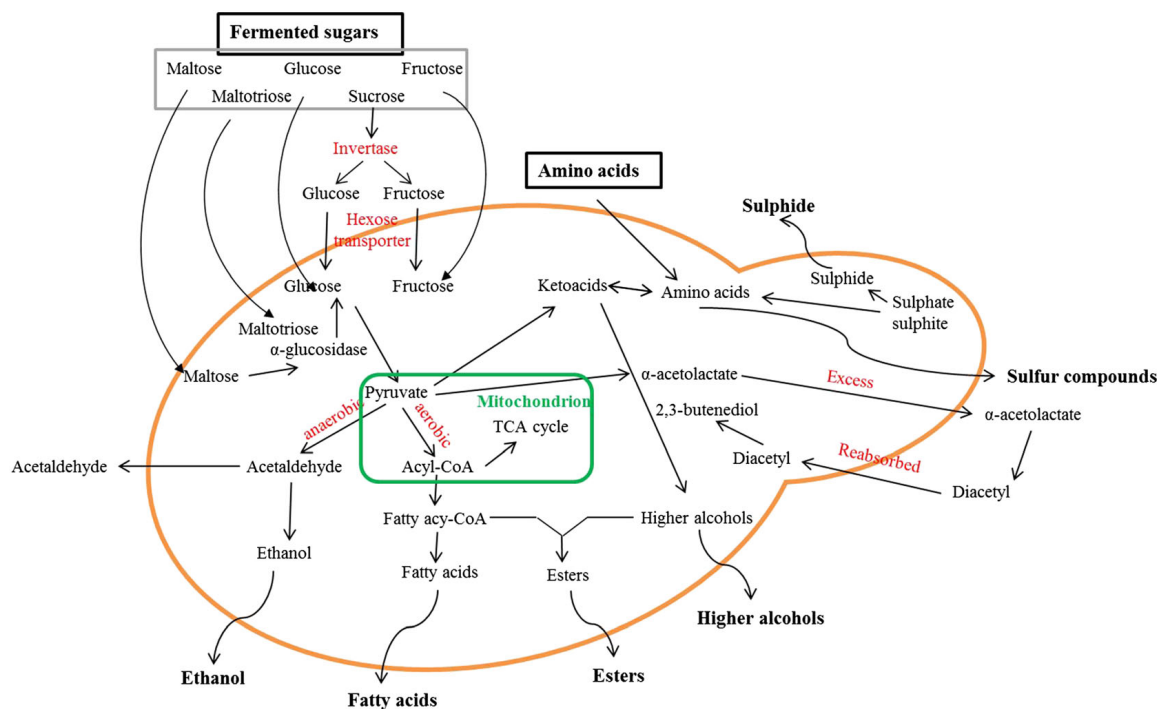
Når det gjelder ester og alkoholproduksjon er det også en rekke faktorer som påvirker mengden som produseres. Hiralal et al. (2014) viste at ved å øke fermenteringstemperaturen fra 18 °C til 22 °C bidro det til å øke acetat-ester og etyl ester-konsentrasjonen med henholdsvis 14,42 % og 62,82 % (Hiralal et al., 2014). De viste også at samme temperaturøkning påvirket etanolproduksjonen med en økning på 17,03 %. Etanol som dannes i alkoholholdige drikker, er begrenset av mengden sukker som er tilstede i vørteren (Adams and Moss, 2008). Gjærcellene har også en øvre toleransegrense for alkohol som dannes under fermenteringen. Øvre alkoholtoleransegrense for gjær er normalt rundt 14 % (v/v). Fermenteringsprosessen for *S. cerevisiae* inhiberes som regel av oksygen, men en lav tilstedeværelse av oksygen løst i vørteren, bidrar til økt etanolproduksjon, sammenliknet med fullstendig anaerobe betingelser (Aguilar Uscanga et al., 2003). *Brettanomyces* er følsom for tilstedeværelse av oksygen (Aguilar Uscanga et al., 2003).

Et totalt fravær av oksygen under fermenteringen vil virke negativt på fermenteringshastigheten. Dette kalles for negativ Pasteur-effekt. Pasteur-effekten går ut på at ved for mye oksygen tilstede vil fermenteringen inhiberes (Wikén et al., 1961). Det som gjør det komplisert er at fermenteringen kan også inhiberes ved totalt fravær av oksygen. Custer (1940) sitert i (Wikén et al., 1961) oppdaget denne

negative Pasteur effekten da de studerte *Brettanomyces claussenii*. Det ble vist at *B. claussenii* fermenterte glukose ved en høyere rate under delvis aerobe betingelser, enn ved fullstendig anaerobe betingelser. *Brettanomyces* ble ved totalt fravær av oksygen stimulert til å produsere eddiksyre fra glukose. Gjær fra slektene *Brettanomyces* og *Dekkera* viste en sterk negativ Pasteur effekt. Det ble funnet bevis for at organiske hydrogenakseptorer som acetaldehyd, aceton og 3-hydrokxy-butan-2-one reduserte denne effekten (Aguilar Uscanga et al., 2003). Eddiksyre har en inhiberende effekt på vekst hos både *S. cerevisiae* og *B. bruxellensis*. Det ble vist at gjærstammenes vekst ble inhibert når konsentrasjonen av eddiksyre nådde konsentrasjoner på 4,5-6 g/L (Aguilar Uscanga et al., 2003).

## 1.15 Aroma og smak i øl

Metabolismen til gjærcellen er som tidligere nevnt en komplisert prosess, bestående av flere reaksjonsveier som bidrar til smak og aroma. Figur 5 viser et forenklet bilde av de forskjellige veiene næringsstoffene tar frem til endeproduktet.



Figur 5: Forenklet bilde av metabolismen til en gjærcelle (He et al., 2014).

Aromastoffer som produseres i øl er en komplisert blanding av mange kjemiske komponenter som til sammen bidrar til den spesifikke smaksprofilen et øl har (Fushiki, 2002). I 2002 var det funnet over 900 kjemiske komponenter som bidrar til smak og

det er eksklusivt isomerer. Meilgaard (1982) sitert i Fushiki (2002) laget en liste over 850 forbindelser som finnes i øl noe som viser at det er en veldig komplisert smaksprofil i øl. Øl inneholder ca. 30-40 g/L ekstrakt som inneholder dekstriner, oligosakkarider, maltose, aminosyrer, glycerol, mineraler, bitterstoffer fra humle, tanniner, organiske syrer m.m. (Fushiki, 2002).

For å vurdere hvilke smakskomponenter i øl som gir smak og aroma, vil grenseverdier være til stor hjelp. Det sier noe om hvor stor konsentrasjon av hver smakskomponent det kreves for å detektere smaker i øl.

Grenseverdien er definert som ”Graden av den endringen stimuluset gir, og som må til for å frembringe en merkbar forskjell” (Fushiki, 2002).

Dette varierer veldig fra komponent til komponent. Smaksaktiviteten til aromatiske komponenter deles inn etter grad av smaksaktivitet. Smaksstoffer tilstede som har en FU (flavour unit) på >2 anses som meget smaksaktive. Tabell 4 under viser hvordan styrken av smakskomponentene påvirker smaksprofilen i øl.

**Tabell 4: Smak og aromaenheter (FU-units) og graden av smaksaktivitet de aromatiske komponentene har i en prøve med øl (Fushiki, 2002).**

FU	Graden av smaksaktivitet
<0,2	Har sannsynligvis ingen påvirkning av smaken
0,2-0,5	Sannsynligvis smaksaktive, men lite viktige
0,5-1,0	Komponenter som kun smakes av individer som er sensitive/aktive gjennom interaksjoner med andre tilsvarende smakskomponenter
1,0-2,0	Smaksaktive
>2,0	Meget smaksaktive

I normal pale lager er det tre aromatiske komponenter som er høyere enn 2.0 FU. Det er etanol, CO<sub>2</sub> og bitterstoffer fra humle (Fushiki, 2002). Når det gjelder mangfoldet av aromastoffer som gir karakteristiske smaker, er det gjerne flere komponenter sammen som bidrar til disse smakene. Disse har som ofte en FU på ca.1,0. Av alle substanser i øl, så er det bare 25 av de som har en konsentrasjon på 0,5 FU (Fushiki, 2002).

### 1.15.1 Estere

Estere er viktig for å få en ønsket smaksprofil på ølet som brygges. Esterdannelsen foregår under fermenteringen når alkoholer og acetyl-CoA reagerer med hverandre (Lea and Piggott, 1995). Esterproduksjonen er avhengig av mengden alkoholer og acyl-CoA som er tilstede i gjærcellen. Den vanligste esteren som dannes er etyl acetat. Ester-produksjonen øker når alkohol-nivået økes i ølet. Høy ”gravity” i øl, bidrar til økt ester-produksjon (Lea and Piggott, 1995).

Sammenliknes estere med andre biprodukter fra gjærcellene, er konsentrasjonen av disse ekstremt lave sett i forhold til de andre komponentene i brygget (Pires and Brányik, 2015). Til tross for den lave mengden er estere de viktigste komponentene av aromastoffer som produseres av gjærcellene (Pires and Brányik, 2015). Estere har en veldig lav organoleptisk terskelverdi i øl. Det er på den andre siden viktig at estere ikke overproduseres, da det kan gi en uønsket sterk fruktig smak (Pires and Brányik, 2015).

Det er under anaerobe forhold at organiske syrer kan brukes til å danne estere. Det innebærer at ved å redusere oksygenivået bidrar det til redusert membransyntese og økt esterproduksjon. Esterne dannes også hovedsakelig i den senere fasen i primærfermenteringen. Celleveksten i vørteren bidrar til å redusere esterdannelse (Lea and Piggott, 1995).

Av alle estere som finnes i øl, er det fem av dem som er viktigere for dannelsen av aroma i øl enn andre. Disse er etyl acetat, isobutyl acetat, fenyletyl acetat, etyl hexanoat og etyl oktanoat (Pires and Brányik, 2015). Hvilken aroma esterne har er beskrevet i Tabell 5. Esterne deles inn i to hovedgrupper: Acetat estere og medium-kjedete fettsyrer (MCFA)-ethyl estere. Acetat estere dannes fra etanol eller en høyere alkohol. Den andre gruppen produseres fra alkoholradikaler og MCFA. Acetat estere er de primære aromakomponentene blant esterne. Grunnen til det er at acetat estere finnes i høyere konsentrasjoner enn MCFA esterne (Pires and Brányik, 2015).

Estere syntetiseres i cytoplasma i gjærcellen, og transporteres enkelt ut av cellen på grunn av de hydrofobe egenskapene. Acetat esterne er såpass små at de diffunderer ut

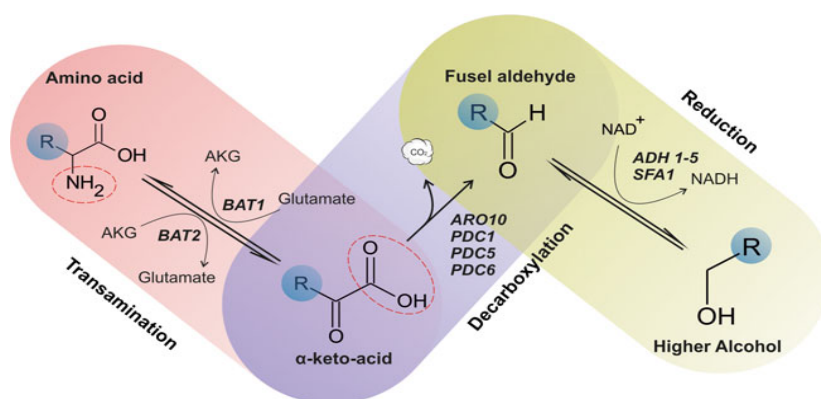


av cellen. For MCFA er dette annerledes (Pires and Brányik, 2015). Esterprofilen til øl vil endres under lagring på grunn av gjær tilstede eller spontane reaksjoner av organiske syrer med etanol.

### 1.15.2 Høyere alkoholer

Høyere alkoholer er de organoleptiske komponentene det finnes mest av i øl (Pires et al., 2014). Aminosyrer i vørteren importereres inn i gjærcellen og der fjernes aminogruppen og det dannes en alfa-keto syre. Alfa-ketosyren kan deretter inngå i en rekke nye reaksjoner, som til slutt danner biprodukter i form av høyere alkoholer. Reaksjonsveien er en irreversibel kjedereaksjon som bidrar til dannelsen av høyere alkoholer (Pires et al., 2014). Det må også nevnes at høyere alkoholer også produseres via den anabolske reaksjonsveien.

Eksempelvis blir 2-methyl-1-propanol (isobutanol) produsert i Ehrlich-reaksjonsvei som foregår i cytoplasma og/eller i mitokondriene via den anabolske synteseveien. Det inngår tre viktige enzymklasser i Ehrlich-synteseveien: Transaminaser (aminosyrer  $\rightarrow$   $\alpha$ -keto-syrer), dekarboksylaser (alfa-keto-syrer  $\rightarrow$  fusel aldehyd) og alkohol dehydroksylaser (fusel aldehyd  $\rightarrow$  høyere alkoholer). Reaksjonsveien er presentert i Figur 6 hentet fra Pires et al. (2014).

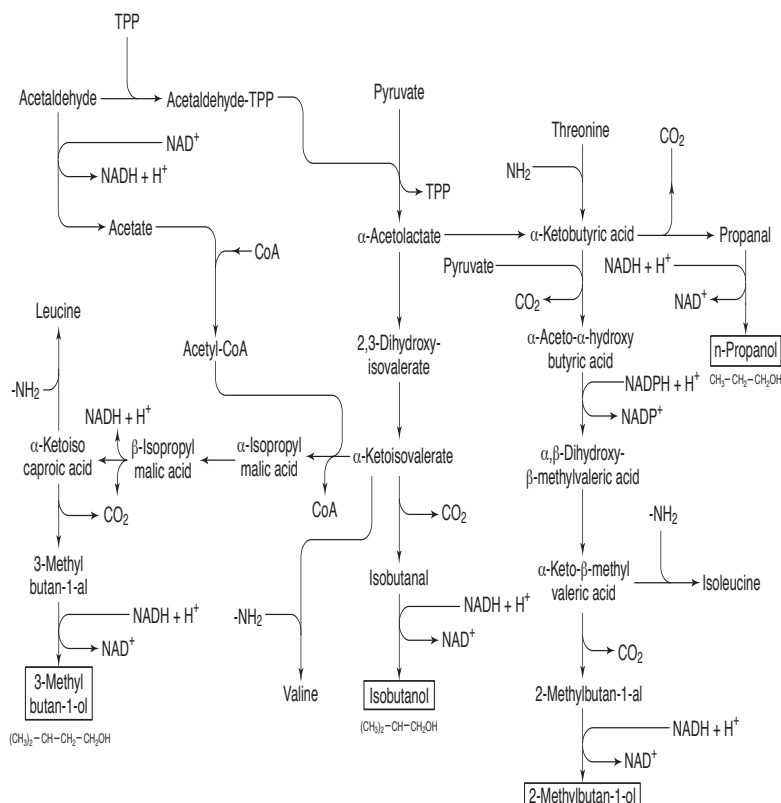


Figur 6: Forenklet figur av Ehrlich -reaksjonsveien fra aminosyre til høyere alkoholer (Pires et al., 2014).

Vørteren inneholder normalt alle aminosyrene som gjærcellene er avhengig av for normal vekst. I tillegg til Ehrlich-synteseveien som gjør om aminosyrer til  $\alpha$ -keto-syrer, kan også alfa-ketosyrer dannes gjennom karbohydrat metabolismen for

dannelsen av høyere alkoholer (Pires and Brányik, 2015). Figur 7 viser en oversikt over dette.

Vanlige høyere alkoholer som forekommer i øl og som det fokuseres på i denne oppgaven er n-propanol, 3-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-butanol, fenyletyl alkohol (Pires et al., 2014) og 2-metyl-propanol (Briggs et al., 2004). Betingelser som bidrar til høy veksthastighet, bidrar også til å stimulere produksjonen av høyere alkoholer (Lea and Piggott, 1995). Disse betingelsene kan være økt temperatur, innblanding av oksygen i prøven, økt inokuleringen av gjærcellene eller å bytte ut maltose med glukose (Lea and Piggott, 1995). Aminosyresammensetningen i vørteren vil også påvirke produksjonen. Høye verdier av for eksempel aminosyren fenylalanine stimulerer produksjonen av fenyl etanol, som gir en roseaktig aroma (Lea and Piggott, 1995). Figur 7 viser ett bilde av reaksjonsveien fra pyruvat til høyere alkoholer.



Figur 7: Reaksjonsveiene for høyere alkoholer (Briggs et al., 2004).

### **1.15.3 Organiske syrer**

Organiske syrer som går ut av cellen dannes fra intermediater i metabolismen. Acetat, epletsyre og ravsyre er eksempler på intermediater. Lengre fettsyrer kommer fra fettsyresyntesen og fettsyrer i vørteren kan tas opp og brukes til cellestruktur (Lea and Piggott, 1995). Acetat er hovedkomponenten av organiske syrer som går ut i vørteren. Acetat produseres gjennom oksidasjonen av acetaldehyd som i løpet av fermenteringen reduserer pH til rundt 3,5-4,0 (Lea and Piggott, 1995).

### **1.15.4 Vicinal diketoner (VDK)**

Av de uønskede komponentene i øl er det VDK som er mest relevant. Diketonene 2,3-butandione (diacetyl) og 2,3-pentandione er biprodukter fra aminosyreomsetningen. Dersom konsentrasjonen forekommer over terskelverdien for smak, vil det gi en uønsket søt og smøraktig aroma.

Diacetyl dannes under cellevekst og -deling under primærfermenteringen. Videre i modningen av ølet vil cellene ta opp diacetyl som reduseres til 2,3-butanediol. Denne komponenten har en høyere terskelverdi med hensyn til smak og aroma og vil ikke påvirke smaken i ølet i like stor grad som VDK (Pires and Brányik, 2015).

Tabell 5 på neste side viser en oversikt over terskelverdiene for aromakomponenter som kan forekomme i øl. Konsentrasjonen og FU-verdier er også satt inn for enkelte av komponentene. En beskrivelse av smaks karakteristikkene er også lagt inn i tabellen.

## 1.15.5 Terskelverdier og beskrivelse av smakskarakteristikk for viktige aromakomponenter som kan forekomme i øl

Tabell 5: Terskelverdier for flyktige komponenter som er vanlig å finne i øl, forventete konsentrasjoner i øl, smakskarakteristikk til hver enkelt komponent og ”flavour units” (FU). Tomme felter, ikke funnet.

Flyktige komponenter	Grenseverdier (ppm)	Typisk konsentrasjon i øl (ppm)	FU	Smakskarakteristikk
Acetaldehyd	10 <sup>2</sup>	1,2-24 <sup>2</sup>	0,1-2,4 <sup>2</sup>	Kaffe, eterisk, vinaktig <sup>1</sup> Epleskall, grønne blader, fruktig <sup>2</sup>
Acetoin	1-10 <sup>4</sup> (50 <sup>6</sup> )			Smør; Kremete <sup>1</sup>
Aceton	8-42 <sup>4</sup> (200 <sup>6</sup> )			Eple, eterisk <sup>1</sup>
Butyl acetat (eddiksyre)	0,04-0,4 <sup>4</sup>			Banan, grønt, søt <sup>1</sup>
Diacetyl	0,1-0,15 <sup>3</sup>	0,02-0,07 <sup>3</sup>		Søt, smøraktig <sup>3</sup>
Dimetylsulfid	0,033 <sup>2</sup>	0,01-0,2 <sup>2</sup>	0,6-12 <sup>2</sup>	Kokte grønnsaker, søt mais <sup>2</sup> Svovel <sup>1</sup>
Etanol	13000 <sup>2</sup>	25000-50000 <sup>2</sup>	1,8-3,6 <sup>2</sup>	Alkohol <sup>2</sup>
Etyl acetat	30 <sup>2</sup>	8-48 <sup>2</sup>	0,3-1,6 <sup>2</sup>	Løsemiddel, fruktig, søt <sup>2</sup> Stjerneanis, eterisk, ananas <sup>1</sup>
Etyl hexanoat	0,21 <sup>2</sup>	0,1-0,5 <sup>2</sup>	0,5-2,8 <sup>2</sup>	Epler, banan, ananas, vinaktig <sup>1</sup> Fruktig, nisfrø, søt <sup>2</sup>
Etyl heptanoat	0,17 <sup>5</sup> (0,4 <sup>6</sup> )			Bær, melon, fersken, ananas, plomme <sup>1</sup>
Etyl octanoat (etyl caprylat)	0,9-1,0 <sup>3</sup>	0,04-0,53 <sup>3</sup>	0,1-0,07 <sup>2</sup>	Aprikos, banan, blomster, pære, ananas, vinaktig <sup>1</sup> Eple, anisfrø <sup>3</sup> søt, fruktig <sup>2</sup>
Etyl nonanoat	1,6 <sup>6</sup>			Oilete, nøtter, fruktig <sup>1</sup>
Hexanal	0,003-0,07 <sup>4</sup> (0,35 <sup>6</sup> )			Fett, grønt <sup>1</sup>
Isoamyl acetat	1,2-2 <sup>3</sup>	0,3-3,8 <sup>3</sup>		Fruktig, løsemiddel <sup>3</sup>
Isobutyl acetat	1,6 <sup>2</sup>	0,01-0,25 <sup>2</sup>	0,01-0,15 <sup>2</sup>	Banan, søt, fruktig. <sup>2</sup> Pære, eterisk, ananas <sup>1</sup>
Fenyletyl alkohol	125 <sup>2</sup> 40 <sup>3</sup> (Lager øl)	5-102 <sup>2</sup>	0,0-0,8 <sup>2</sup>	Rose <sup>2</sup> Honning <sup>1</sup>
Trans-2-hexen-1-al	0,5 <sup>5</sup>	0,36 <sup>5</sup>		Mandel, eple, grønt, grønnsaker, plomme, søt <sup>1</sup>
1-hexanol	4,0 <sup>5</sup>	0,33 <sup>5</sup>		Grønt, urteaktig, treaktig, søt. <sup>1</sup>
1-propanol	600 <sup>3</sup>	4-17 <sup>3</sup>		Alkohol, søt <sup>3</sup> Fruktig <sup>4</sup>
2-butanone	80 <sup>5</sup>			Eterisk <sup>1</sup>
2-butanol	16 <sup>5</sup>			Søt, vinaktig (odør) <sup>4</sup>
2-metyl-butanal	1,25			Sjokolade, kaffe <sup>1</sup>
2-metyl-propanal	1,0 <sup>5</sup>			Banan <sup>1</sup>
2-metyl-1-butanol	65 <sup>2</sup>	7-34 <sup>2</sup>	0,1-0,5 <sup>2</sup>	Alkohol, vinaktig <sup>2</sup>
2-metyl-1-propanol (Isobutanol)	200 <sup>2</sup>	4-57 <sup>2</sup>	0,0-0,3 <sup>2</sup>	Fruktig, whisky, vinaktig <sup>1</sup> Alkohol <sup>2</sup>
2.3-pentadione	0,9-1,0 <sup>3</sup>	0,01-0,02 <sup>3</sup>		Mandel, smør, karamell, ost, sjokolade, kaffe, krem; Fruktig, søt <sup>1</sup>
3-metyl-butanal	0,6 <sup>5</sup>	7,0 <sup>5</sup>		Fruktig, fersken, sur <sup>1</sup>
3-metyl-1-butanol	70 <sup>2</sup>	4-57 <sup>2</sup>	0,4-1,8 <sup>2</sup>	Alkohol, vinaktig <sup>2</sup> Oljete, whiskey <sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Sigma-Aldrich, 2014). <sup>2</sup> (Fushiki, 2002). <sup>3</sup> (Pires and Brányik, 2015). <sup>4</sup> (Barnes, 2013). <sup>5</sup> (Briggs et al., 2004). <sup>6</sup> (Tan and Siebert, 2004).

## 1.16 Modning av ølet

En fullstendig primær fermentering tar mellom 5 og 7 dager avhengig av vørterkomposisjonen, temperaturen og fysiologien til gjærstammen (Pires and Brányik, 2015) Normalt sett skal vørter inneholde ca. 80% fermenterbart ekstrakt. Etter fermentering overføres det ”grønne” ølet til flasker for modning (Pires and Brányik, 2015).

Karbonering av ølet er viktig under modningsprosessen, fordi CO<sub>2</sub> hjelper til med å fjerne uønskete komponenter som kan bidra til usmak i ølet. De viktigste komponentene fokusert på i denne oppgaven er aldehyder og sulfat-komponenter. Diacetyl brukes som modningsparameter for å vurdere hvilken grad av modning brygget er i, da diacetyl som dannes i primærfermenteringen, gradvis fjernes (Pires and Brányik, 2015). I løpet av modningen vil ølet klarne, gjærcellene vil sedimentere og smaker vil utvikles (Pires and Brányik, 2015).

I øl som inneholder en høy konsentrasjon med estere viste Vanderhaegen et al. (2007) at ester konsentrasjonen reduseres over tid på grunn av hydrolysereaksjoner. Eksempelvis viser de at isoamyl acetat-konsentrasjonen er høy i ferskt øl, men reduseres over tid. I artikkelen sammenliknes to ølsorter med lik konsentrasjon av isoamyl acetat. Forskjellen mellom de to var at den ene var pasteurisert. I det upasteuriserte ølet kunne det observeres en raskere reduksjon av esteren over tid (Vanderhaegen et al., 2007). Grunnen til det er ifølge Neven et al. (1997) at esterasene ble inhibert av varmebehandlingen slik at hydrolyse av esterene ble redusert (Neven et al., 1997).

## 1.17 Referanseølet som brukes i oppgaven

Orval Trappiste (6,90%) er en trappistøl som er en overgjæret øl og stammer fra Sør-Belgia (Abbey, 2016). Bryggeriet ble etablert i 1931 og i 2015 produserte de 73 000 hektoliter med øl. Råvarene som brukes er lokalt springvann, to-rads vår-bygg, aromatisk humle og flytende kandifisert sukker. Bryggingen i dette klosteret foregår først med mesking der det kverne maltet tilsettes ett meskekar og blir filtrert. Deretter overføres mesken til et kokekar og kokes i 1 time og 30 minutter før vørteren kjøles ned. Vørteren overføres deretter til fermenteringstanker i 4-5 dager ved en

temperatur på mellom 15 og 23 °C. Etter den første fermenteringen tilsettes det en ny gjærstamme sammen med humlen. Dermed fermenteres vørteren i nye 2-3 uker for å få riktig aromadannelse i ølet. Ølet sentrifugeres og nytt sukker og ny gjærkultur gir ytterligere fermentering i flaskene. Lagring av flaskene foregår i modnings-kjellere i 3 til 5 uker ved konstant temperatur på 15 °C (Abbey, 2016). Dette er en øl med en mangfoldig og fruktig aroma av appelsin og dadler, samt hint av mørk malt og humle. St. Bernadus Abt. 12 Magnum Edition 2015 (10%) er en overgjæret belgisk Abbey Ale i quadrupel stil. Dette er en øl beskrevet som lett søtlig med kompleks lukt av appelsin, sjokolade og julekrydder. Ølet har en meget fruktig aroma.

## 2 Metode og materialer

Vørterproduksjonen til vekstforsøket og bryggeforsøket ble utført på pilotanlegget i meieribygningen til NMBU.

Materialer som er brukt i oppgaven og tillaging av næringsmedium som er brukt i forsøket er lagt til som vedlegg.

### 2.1 Gjærstammer

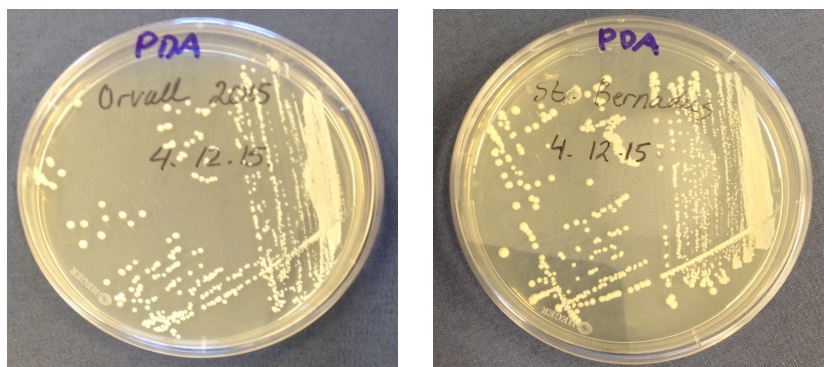
Det ble undersøkt fire gjærstammer i denne oppgaven. De er presentert i tabell 6.

**Tabell 6: Prøvenummer til hver enkelt cellekultur som i oppgaven.**

Prøve	Cellekultur
P1	Gjær isolert fra Orval Trappiste (6,90%)
P2	Gjær isolert fra St. Bernadus Abt. 12 Magnum Edition 2015 (10%)
P3	WLP500 (White Labs, San Diego, USA)
P4	WLP510 (White Labs, San Diego, USA)

#### 2.1.1 Isolering av gjærceller fra kommersielt øl

Isolering av gjærcellene ble utført ved å overføre bunnfallet i flaskene fra Orval og St. Bernadus, over i 15 mL sentrifugerør. Disse ble semtrigugert ved 1000 rpm i 10 minutter (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R Centrifuge), inntil en pellet kunne observeres i bunn. Supernatanten ble helt av og pelleten ble resuspendert i 0,5 mL sterilt Ringersvann (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Deretter ble cellene strøket ut på Potet Dextrose Agar (PDA) (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Skålene ble deretter inkubert i 3 døgn ved 22 °C. Overføring av enkeltkoloni til glukose gjærekstrakt buljong (GYP), inkubering ved romtemperatur i 2-3 døgn ved svak risting og utstryking på PDA skål og inkubering ved 22 °C i 3 døgn ble gjentatt inntil renkultur ble opparbeidet. Bildene i Figur 8 viser kolonidannelse av renkulturene ved nedfrysning.



Figur 8: Renkulturer av gjær som er isolert fra Orval og St. Bernadus på PDA skåler.

## 2.2 Dyrking av gjær

Fra nedfrosset renkultur ble det med en podenål overført celler til sterile GYP-reagensrør. Disse ble inkubert i romtemperatur (22 °C) i 2 døgn. WLP-kulturene ble innkjøpt på Bryggeland i flytende form. Det er fra WLP-kulturene podet 1% med en steril automatpipette i 5 mL steril GYP før inkubering ved romtemperatur og svak risting i to døgn. De fire cellekulturene ble deretter podet med et volum på 1% over i nye sterile GYP-rør før inkubering ved romtemperatur i 2 døgn med svak risting. Dette ble gjentatt 2 ganger før forsøksstart. Gjærcellene ble oppbevart på kjølerom (4 °C) frem til ny ompoding i forbindelse med forsøksstart eller frem til ny ompoding i forbindelse med vedlikehold av kulturen. Dette ble utført i sterilbenken gjennom hele perioden. Reagensrørene ble vortexet konsekvent i 20 sekunder hver gang for å blande opp cellene før poding.

## 2.3 Celletallsbestemmelse ved telling

For å bestemme antallet celler ble det brukt Bürker tellekammer. Antallet celler i hver rute skal være mellom  $5 < \text{og} > 50$  celler. For å få et mest mulig korrekt antall celler i B-ruten, ble celleprøven fortynnet 50x og 75x i Ringers. For å bestemme antallet celler/mL i cellekulturen, ble det summert opp celler i 12 ruter og beregnet gjennomsnitt. For gjærstammene P1, P2, P3 og P4 ble dette gjort to ganger for å få to paralleller av hver telling. Den fortynnede prøven ble vortexet i 20 sekunder før hver prøvetakning til telling.

Beregningen av antallet celler/mL ble utført på følgende måte (*likning 1*).



$$\text{Totale celler/mL} = \text{Gj.sn.celler} \times 1,6 \times 10^5 \text{ celler/mL}$$

Det ble tatt høyde for fortynningene på 50x og 75x.

Fra fortynningene ble det applisert 10 µL til rutenettet.

Gjennom alle forsøkene ble det tatt høyde for en ønsket gjærkonsentrasjon på  $10^6$  celler/mL. Det gjaldt vekstforsøket og hovedbryggingen. Beregning til ønsket gjærkonsentrasjon ble utført ved følgende formel (likning 2).

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$C_1$  = Ønsket cellekonsentrasjon ( $10^6$  celler/mL)

$V_1$  = Ønsket sluttvolum

$C_2$  = Opprinnelig celletetthet

$V_2$  = Volum som skal fortynnes

## 2.4 Forberedelser vekstforsøk

Det ble utført totalt fire vekstforsøk. Til vekstforsøket benyttet vørter tillaget etter standardoppskriften (Tabell 7) som vekstmedium.

### 2.4.1 Vørterproduksjon til vekstforsøket (forberedende vekstforsøk)

En oppskrift på American Pale Ale ble brukt som grunnlag for vørterproduksjonen.

Det ble brukt en Beer Brew 30 L bryggekjele til å lage vørteren. Dette ble gjort to ganger for å få nok til fire vekstforsøk. Ingrediensene til vørter er listet opp i Tabell 7.

Tabell 7: Oversikt over ingrediensene og mengdene som ble brukt til bryggingen.

Mengde (kg)	Råmaterialer	IBU <sup>1</sup> (%)
2	Pale Malt, Maris Otter, (5,9 EBC <sup>2</sup> )	66,7
0,8	Amber Malt (Barrett Burston) (125 EBC <sup>2</sup> )	26,7
0,2	Wheat Malt (Barrett Burston) (4 EBC <sup>2</sup> )	6,7
0,04	Fuggles humle (4,5%)- Kok 60 minutter	

<sup>1</sup>IBU= International Bittering Unit

<sup>2</sup>EBC=European Brewing Convention

Mesketemperatur skal være på 68,9 °C i 45 minutter etterfulgt av koking i 90 minutter. Det ble tilsatt 15,5 L vann fra springen. "Original gravity" skal være på 16,189 °Plato.

Til produksjonen av vørteren ble det først tilsatt 13 L vann som ble varmet opp til 75,7 °C (denne temperaturen var vanskelig å stabilisere nøyaktig, slik at temperaturen varierte med 10-15 °C). Temperaturen ble styrt manuelt.

Etter oppvarming av vannet ble det kvernede maltet tilført kjelen. I dette steget ble det målt varierende temperatur. Starttemperaturen før meskingen var 65 °C. Etter 20 minutter ble temperaturen mer stabil og holdt seg på ca. 66,9 °C.

På grunn av ustabile temperaturer ble meskingen utført i 60 minutter. Etter 45 minutter ble det foretatt en måling av sukkerinnholdet med en brix-måler. °Plato på dette tidspunktet var på 15,4°. Etter meskingen ble maltsilen plassert på toppen av bryggekarret og det ble skylt med 2,5 L vann fra springen for å øke utbyttet av næringsstoffer.

Vørteren ble deretter kokt i 90 minutter. Kjelen brukte 30 minutter på å nå kokepunktet. Humlen ble tilsatt med en gang vørteren begynte å koke. °Plato etter endt koking ble målt til 19,2°.

Den kokende vørteren ble overført til 10 stk. blåtoppflasker (1000 mL). Det ble overført 800 mL til hver flaske. Flaskene ble deretter sakte kjølt ned i ett temperert vannbad. Flaskene ble deretter plassert på kjølerom (4 °C) i 24 timer, etterfulgt av fryserom (-22°C). Flaskene ble oppbevart ved -22 °C frem til vekstforsøkene startet opp.

Før vekstforsøket skulle starte opp ble flaskene plassert på ett kjølerom (4 °C) for sakte tining over natten. Deretter ble vørteren overført til 500 mL blåtoppflasker. Vørteren ble fortynnet til et sukkerinnhold på 16,189 °Plato, med vann fra springen. Følgende formel ble brukt til å regne ut hvor mye vann som må tilsettes for å redusere sukkerinnholdet fra 19,2° til 16,189° (*likning 3*):

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$C_1$  = Opprinnelig sukkerkonsentrasjon

$V_1$  = Volumet vørter som skal tilsettes

$C_2$  = Ønskelig sukkerkonsentrasjon

$V_2$  = Ønsket volum

$V_{vann}$  = Volumet vann som skal tilsettes

For å bestemme volumet vann som måtte tilsettes hver flaske:

$$500 \text{ mL} - V_1 = V_{vann}$$

Fire flasker på 500 mL ble fortynnet til riktig fortynning til 16,189 °Plato. Det ble brukt en 250 mL målesylinder til å måle volumet på vann og vørter. Det ble også foretatt pH-målinger av vørteren. Mengdene og pH er presentert i Tabell 8.

Tabell 8: Sukkerinnholdet før og etter fortynning, volum vørter og vann tilsatt og pH i vørteren etter fortynningene.

Prøve	°Plato ufortynnet	°Plato fortynnet	Volum vørter (mL)	Volum vann (mL)	pH vørter
P1	19,2°	16,2°	421,58	78,42	5,07
P2	19,1°	16,2°	423,79	76,21	5,09
P3	19,2°	16,2°	421,58	78,42	5,12
P4	19,1°	16,2°	423,79	76,21	5,10

Flaskene ble autoklavert og oppbevart på kjøll frem til hovedvekstforsøket.

## 2.5 Vekstforsøk (hoveddel)

### 2.5.1 Fermentering av vørter

Flaskene med vørter ble satt ut i romtemperatur 24 timer før vekstforsøket startet.

Vørter (500 mL, 16,2 °Plato) ble podet med gjærceller inkubert i 2 døgn ved 22 °C i forkant, til en gjærkonsentrasjon på  $10^6$  celler/mL. Etter poding ble vørteren ristet opp og ned 10 ganger for å blande inn gjærcellene. Dette ble gjentatt for de hver gjærkultur (4 totalt). Etter poding ble det overført 40 mL til 50 mL sterile blåtoppflaske med regelmessig omrøring underveis. Det ble også pipetert ut 2 mL podet vørter til CO<sub>2</sub>-analyse i sterile headspace-flasker (Machery Nagel, Dueren, Tyskland) som ble forseglet med sterile teflonbelagte septa (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) og aluminiumkrympekapseler påsatt med en

tang. En headspace-flaske ble tillaget til hvert prøveuttak for de ulike gjærstammene. Etter poding ble 50 ml blåtoppflasker og CO<sub>2</sub>-rørene plassert ved 18, 22 og 25,5 °C for inkubering i 0-168 timer.

**Tabell 9: Oversikt over de ti prøveuttakstidspunktene (timer) og inkuberingstemperatur.**

Prøveuttak
1: nullprøve
2: 24 timer, 18 °C
3: 24 timer, 22 °C
4: 24 timer, 25,5 °C
5: 96 timer, 18 °C
6: 96 timer, 22 °C
7: 96 timer, 25,5 °C
8: 168 timer, 18 °C
9: 168 timer, 22 °C
10: 168 timer, 25,5 °C

Det ble satt av 2 timer (kun ved oppstart), prøveuttak og analyse ved de tre temperaturene per stamme. Det ble podet i rekkefølgen: P1, P2, P3 og P4.

Samme merking av prøvene ble gjort for alle de fire gjærstammene. Alle de 40 stk. 50 mL blåtoppflaskene, ble ristet opp og ned i 10 sekunder for å blande inn lik mengde med oksygen i alle prøvene. Prøver (Tabell 9) til prøveuttak **2-10** ble plassert i de respektive inkuberingskapene 18, 22 og 25,5 °C for uttak etter 24, 96 og 168 timer. Prøveuttak **1**, som er nullprøven, ble tatt ut samme dagen, tid 0.

## 2.5.2 Vekst av gjær i vørter

Til innstøpning av celler, ble 100 µL prøve pipettert med en automatpipette over i ett reagensrør med 9,9 mL Ringersvann. Dette gav en fortynning på 10<sup>-2</sup> celler/mL. Det ble laget en hovedfortynningsrekke på 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> celler/mL med 9,9 mL Ringersvann. Fortynninger som ble brukt til å vurdere celletall er presentert i Tabell 10.

**Tabell 10: Fortynninger som er brukt til hvert prøveuttak.**

Uttak	Fortynninger*
Nullprøve (0 timer)	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> og 10 <sup>-5</sup> celler/mL
24 timer	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup> og 10 <sup>-6</sup> celler/ mL
96 og 168 timer	10 <sup>-5</sup> , 10 <sup>-6</sup> og 10 <sup>-7</sup> celler/mL

\* De laveste fortynningene ble ikke tatt med i vekstforsøkparalleller 2, 3 og 4.

Fortynnet prøve med celler ble pipettert over i petriskålene merket respektive fortynninger før innstøping i PDA-agar og inkubering i 4 døgn ved 22 °C. P1 ble inkubert i en uke ved 22 °C.

## **2.6 Kjemiske analyser**

### **2.6.1 pH og Plato**

Noe av den podete vørteren ble etter uttak til utplating brukt til å undersøke utviklingen av pH og Plato i hvert prøvetidsuttak. Til å måle pH, ble flasken ristet opp og en liten mengde ble overført til medisinfager for måling av pH. pH ble målt med et pH-meter (PHM 92 LAB pH METER, Radiometer, Copenhagen). Det ble også målt sukkerinnhold ved å applisere en dråpe av prøven på refraktometeret (N1 Atago, Japan) med en Pasteur pipette. Målingen med refraktometer ble gjort to ganger for hver enkelt prøve.

Beregning av utgjæringsprosent ble gjort med følgende formel (White Labs, 2016a):

$$\text{Utgjæring \%} = \frac{(\text{OG} - \text{FG})}{(\text{OG} - 1)} * 100$$

### **2.6.2 CO<sub>2</sub> analyse**

Kvantitativ analyse av CO<sub>2</sub> ble utført ved bruk av en infarød CO<sub>2</sub> analysator (ADC 225 MK3, Analytical development, Hoddeson, Hertfordshire, UK). CO<sub>2</sub>-analysatoren ble nullstilt ved forsøksstart og deretter etter jevnlig behov. Etter nullstilling av CO<sub>2</sub> analysatoren ble 0,5 mL standardgass (nitrogen med 10% CO<sub>2</sub>) sprøytet inn i systemet for å bekrefte stabiliteten på analysesystemet. Det ble injisert to paralleller av hver standardprøve. Prøvetakningene ble foretatt med innsprøytning av volum på 0,5, 0,1 og 0,05 mL etter CO<sub>2</sub> konsentrasjon i prøvene (fortynning) og sprøytet inn i slangen koblet til analysesystemet. Prøvene ble ristet i 2 minutter for å frigjøre all CO<sub>2</sub> fra væsken til gassfasen i HSGC-flasken. To innsprøytninger ble foretatt per prøve. Samme fremgangsmåte ble gjort for alle 40 prøvene. Nullstilling av systemet ble gjort ofte da systemet hadde en tendens til å være ustabil. Kalibrering av CO<sub>2</sub>-analysatoren var gjort på forhånd mot løsninger med kjente konsentrasjoner av natriumbikarbonat og frigjøring av CO<sub>2</sub> fra disse var fra 0 til 8000 ppm.

### **2.6.3 Analyse av flyktige stoffer (HSGC-FID)**

Resten av den podete vørteren etter sterilt uttak til innstøpning ble overført til en Erlend-Meyerkolbe, for filtrering gjennom et foldefilterpapir (Filterpapir 596 ½ ø125, Schleicher & Schuell). Kolben ble satt på kjøll for filtrering av vørteren for å redusere tap av flyktige stoffer.

Etter ca. 1 time og 30 minutter ble Erlend-Meyerkolben tatt ut fra kjøll. Filtratet ble blandet godt før 10,000 g ble overført til HSGC-flasker (Machery Nagel). Headspace-flaskene ble forsegleet med teflonbelagt septa med aluminiumring (PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) ble klemt på med tang. For prøveuttakene etter 24, 96 og 168 timers inkubering, ble det også laget en 100x fortynnet prøve til analyse av etanolproduksjon. Det ble tilsatt 0,010 g filtrat og 0,990 g MilliQ-vann. Prøvene ble frosset ned ved -22 °C. Prøvene ble tatt ut fra fryser og plassert på kjølerom (4 °C) i 24 timer før analyse.

For nullprøvene ble det kun gjort ett prøveuttak per gjærstamme (P1, P2, P3 og P4). Etter 24, 96 og 168 timer ble det tatt ut prøver ved tre forskjellige temperaturer (18, 22 og 25,5 °C) slik at prøveuttakene ble gjort tre ganger per stamme og inkuberingstid.

## **2.7 Ølbrygging**

Til ølbrygging ble det brukt en CoEnCo 60 L Pro automatisk bryggekjele, bestående av to kjeler koblet sammen med ett rørsystem. Det var en til kjele til mesking og oppkok og en kjele til filtrering. Dette bryggesystemet har en automatisk temperaturregulator som bidrar til en mer kontrollert temperaturkontroll. Systemet har i tillegg automatisk omrøring under mesking og kok. Dette bryggesystemet ble vasket og desinfisert (Star San™) etterfulgt av skylning med vann på 80 °C. Desinfisering ble også gjort av gjærlåsene. Når det gjelder fermenteringsdunkene ble de kun vasket to ganger i oppvaskmaskinen opptil 85 °C (Jeros Model 9117, Odense, Danmark).

Til hovedbryggingen ble følgende standardoppskrift på American Pale Ale benyttet og er vist i Tabell 11.

**Tabell 11: Oversikt over ingrediensene og mengdene som ble brukt til bryggingen.**

Mengde (kg)	Råmaterialer	IBU <sup>1</sup> %
10	Pale Malt, Maris Otter, (5,9 EBC <sup>2</sup> )	66,7
4	Amber Malt (Barrett Burston) (125 EBC <sup>2</sup> )	26,7
1	Wheat Malt (Barrett Burston) (4 EBC <sup>2</sup> )	6,7
0,2	Fuggles humle (4,5%)- Kok 60 minutter	

<sup>1</sup>IBU= International Bittering Unit

<sup>2</sup>EBC=European Brewing Convention

Mesketemperatur skal være på 68,9 °C i 45 minutter etterfulgt av koking i 90 minutter.

Det ble brukt et automatisk meskeprogram:

Det ble tilsatt ca. 40 L vann til meskekaret som ble varmet opp til 68,9 °C. Når ønskelig temperatur ble oppnådd ble det grovkvernete maltet tilsatt. Mesken ble dermed stående i 45 minutter under omrøring. Etter 45 minutter ble mesketemperaturen økt til 78 °C i 2 minutter. Deretter ble mesken overført til filterkjelen og resirkulert flere ganger for å øke utbyttet av næringsstoffer. Gjennom denne prosessen dannet det seg en maltkake i bunn. Etter resirkulering av væsken ble ventilene åpnet og vørteren kunne sakte renne igjennom maltkaken og tilbake til kokekjelen. Det resterende volumet måtte transporteres med pumpe.

Til oppkok ble det brukt et kokeprogram (KOK90). Kjelen ble sakte men sikkert varmet opp. Følgende steg ble utført:

- 2 minutter 110 °C
- 85 minutter 110 °C
- 5 minutter 100 °C

Humlen ble tilsatt etter 30 minutter.

Vørteren ble dermed ført ut fra kjelen via pumpen og ett kjøleelement ble benyttet til å kjøle ned den oppvarmete vørteren og ett filter ble benyttet til å grovfjerne en del av maltfragmentene. Det meste av bunnfallet hadde på dette tidspunktet lagt seg i bunnen på kjelen, som lå plassert under utgangen for utpumping av vørter. Vørteren ble kjølt ned til ca. 20 °C før det ble pumpet ut i fire 30 L fermenteringsdunker.

Det ble brygget en batch på 53,3 L og en på 37,4 L. Vørteren ble fordelt på fire hvite 30 L fermenteringsbøtter. °Plato ble målt til ca. 20.

Fordelingen til de fire fermenteringsbøttene er vist i Tabell 12.

**Tabell 12: Volumet (mL) for hver av prøvene av batch 1 og 2, samt volum tilsatt cellekultur.**

Prøve	Vørter batch 1 (mL)	Volum (mL) tilsatt gjærkultur ( $10^6$ celler/ mL)
P1	13500	54,63
P2	12800	48,04
P3	13200	44,80
P4	13800	116,96
Prøve**	Vørter batch 2 (mL)	Volum (mL) tilsatt gjærkultur ( $10^6$ celler/ mL)
P1	6900	17,38
P2	10000	41,66
P3	10500	34,38
P4	10000	121,21

\* Uforholdsmessige store forskjeller på mengde gjærkultur som ble tilsatt vørteren. \*\*Grunnen til at volumet vørter er mindre i batch 2 er fordi det ble en del svinn ved overføring til fermenteringsdunkene.

Den vaskede og resuspenderte (i Ringers) gjærkulturen ble podet i 200 mL autoklavert vørter 3 dager før bryggedagen. Gjærceller ble isolert fra tidligere podet GYP-medium på 40 mL ved sentrifugering på 1000 rpm i 10 minutter. Pelleten ble resuspendert med 10 mL Ringersvann. Det ble overført 1% cellekultur til vørteren. Volumet av gjærkultur som ble tilsatt vørteren under hovedbryggingen, var beregnet ut fra standard fortynningsregel ( $C1V1=C2V2$ ) og telling i Bürker tellekammer.

Primærgjæringen ble gjort over to uker. Etter en uke ble vørteren overført til en ny 30 L fermenteringsbøtte for å fjerne gjærceller som har falt til bunnen og dermed unngå autolyse, som kan bidra til bismak. Etter 2 uker ble fermentatet overført til flasker og alle fikk tilsatt 1 sukkertablett (Coopers Cabonation drops, Regency Park, Australia). Flaskene ble stående til modning i romtemperatur (22 °C) i de påfølgende 14 dagene før det ble plassert på kjølerom (4 °C) i ytterligere 34 dager. Total tid for modning av ølet var 48 dager.



## 2.8 Vannkvaliteten Oppegård/Ås

Vannet som ble brukt i bryggingen var kommunalt vann fra springen på IKBM, NMBU, Ås. Det kommunale drikkevannet som leveres til NMBU kommer fra drikkevannskilden i Oppegård. Hardheten til vannet er ifølge nettsiden til Oppegård kommune stabil med hensyn til kvalitetsparametrene. Drikkevannet har en hardhet på 2,9° DH som er en lav verdi. Vannet i kommunen har betegnelsen ”bløtt vann” og har en lav forekomst av kalk. Drikkevannets pH for Oppegård kommune ligger på rundt 8,0 (Oppegård kommune, 2015).

## 2.9 Anton Paar

Det modne brygget ble etter 48 dager målt i en Anton Paar. Ølet ble satt ut i romtemperatur 24 timer før analysen av prøvene. Flaskene (0,5 L) ble plassert inn i flaskebeholderen, som ble lukket under trykk etterfulgt av perforering med en nål ned i flasken. Det ble tatt opp ca. ¼ av flaskevolumet. pH-meteret til Anton Paar var ute av drift, som gjorde at det ble brukt et annet pH-meter (Thermo Scientific Orion Star A211, Sveits) til å måle pH med.

For batch 1 ble det laget fire paralleller for prøvene P2, P3 og P4, til sammen 12 prøver, som ble kjørt i Anton Paar. P1 ble kastet på grunn av for mye kullsyre, slik at alt prøvemateriale rant ut.

For batch 2 ble det laget 3 paralleller for P1 og 4 paralleller for P2, P3 og P4. Til sammen 15 prøver.

Ølprøvene ble etter målinger overført til hver sin Erlenmeyer kolbe, trakt og foldefilter. Kolbene ble plassert på kjølerom. Filtratet ble blandet med roterende bevegelse ordentlig i kolben og 10,000 g ble overført til HSGC-flasker. Prøvene ble deretter frosset ned (-22 °C).

## 2.10 HSGC-FID

Det ble tatt ut nedfrossete prøver 24 timer før kjøring på HSGC-FID. HSGC-FID er analyseutstyr til kvantifisering av flyktige komponenter i en prøve. Prøvene ble

analysert ved bruk av HSGC, som er en modifisering av metode tidligere beskrevet av Narvhus et al. (1998).

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

En CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) ble benyttet for separering av komponentene. Kolonnen hadde en lengde på 25 meter, med indre diameter på 0,53 mm og filmtykkelse på 5,0 µm. Det ble benyttet følgende temperaturprogram under analysen: 35°C, 5 min; økning med 10°C min<sup>-1</sup> til 40°C, 2 min; økning med 15°C min<sup>-1</sup> til 70°C, 2 min; økning med 30°C min<sup>-1</sup> til 130°C, 4 min; økning med 30°C min<sup>-1</sup> til 160°C, 4 min; økning med 10°C min<sup>-1</sup> til 180°C, 2 min; økning med 10°C min<sup>-1</sup> 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: acetaldehyd, diacetyl, etylacetat, 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 acetat, hexanal, isoamyl acetat, etyl hexanoate, 3-carene, R-(+)-limonene, etyl heptanoat, etyl oktanoat, β-citronellol, etyl nonanoat, etyl decanoate, fenyletyl alkohol (Sigma-Aldrich), acetoin, aceton, etanol, 1-butanol, 1-propanol, 2-butanol, dimetylsulfide, og 2.3-pentadione (Merck, Tyskland).

## 2.11 Isolering av DNA

For å isolere genomisk DNA fra de to ukjente stammene isolert som ble fra henholdsvis Orval og St. Bernadus ble det brukt ett UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA Isolation Kit fra MO BIO Laboratories (MoBio, Carlsbad, USA). Fremgangsmåten er beskrevet i bruksanvisningen til DNA-isolerings settet ble benyttet. DNAet ble rensset med ett QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 29104).

## 2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Isolert, rensset DNAble amplifisert ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR). Det ble tillaget en PCR reaksjonsblanding etter protokoll fra Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA) bestående av iProof<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase, Primere ITS1 (forward) og ITS4 (reverse), MilliQ-vann, dNTPs (BioRad) og iProof buffer (Bio-Rad). Isolert DNA ble oppbevart kaldt på 4 C. Følgende mengder ble benyttet og er vist i Tabell 13.

Tabell 13: Konsentrasjonen og volumet av reagenser i PCR-reaksjonsblanding.

Produkt	Sluttkonsentrasjon per prøve (μM)	Volum (μl)
<b>iProof<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase fra BioRad</b> (Cat. No 172-5301) (2 u/uL)	0,020	0,4
<b>iProof buffer (5x)</b>	1	8
<b>iProof dNTPs (10mM)</b>	200	0,8
<b>Primer ITS1 (10 mM)</b> (forward- 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')	0,2	0,8
<b>Primer ITS4 (10 mM)</b> (reverse-5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')	0,2	0,8
<b>MilliQ –vann</b>	-	23,8

De respektive volumene fra PCR miksen overføres over til 200 uL PCR-rør og det tilsettes 1 μL isolert DNA til denne løsningen. Blandingen ble deretter sentrifugert. Det ble brukt en C1000<sup>™</sup> Thermal Cycler (BioRad) til å amplifisere DNAet til de to ukjente gjærstammene via PCR.

Syklusen ble repetert 35 ganger og innstilt for volumer på 40 μL. Syklusen er presentert i Tabell 14.

Tabell 14: Syklusen i PCR

Fase	Tid/temperatur
<b>Initiell denaturering</b>	30 sekunder ved 98 °C (repeteres ikke 35x)
<b>Denaturering</b>	10 sekunder ved 98 °C
<b>”Annealing”</b>	30 sekunder ved 55 °C
<b>Polymerisering</b>	30 sekunder ved 72 °C

Totalt tok PCR kjøringen 50 minutter.

PCR-produktene ble kjørt på en agarosegel 1,5 % (SeaKem LE agrose, Rockland, ME, USA) i ca. 2 timer til DNA-fragmentene hadde vandret langt nok i gelen. Det samme ble gjort for PCR-produktene. Gelen er presentert i Figur 10 (Kapittel 3.1) i resultatdelen. Et volum på 1,5 µL PCR-produkt ble tilsatt 1 µL Gelred Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) og 6 µL milliQ- vann. En Quick-load 100 bp DNA ladder (Biolabs, New England), ble brukt til å vurdere molekylstørrelser. Det ble tilsatt 3 og 6 µL 100 bp ladder i hver sin brønn i gelen. En spenning på 80 volt ble tilført gelen og det ble benyttet 1x TAE buffer ved kjøring.

Konsentrasjonene på PCR-produktet ble målt i et nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Wilmington, USA). Tabell 15 viser en oversikt over DNA-konsentrasjonene for rensset DNA, kultur isolert fra og molekylstørrelse (bp).

Tabell 15: Oversikt over konsentrasjon PCR-produkt, hvor den er isolert fra og størrelsen på DNA-fragmentene (bp).

Prøve	DNA-konsentrasjon (PCR-produkt)	Kultur isolert	Molekylstørrelse (bp)
<b>P1-1</b>	46,8 ng/µL	Orval*	400-500
<b>P2-1</b>	55,3 ng/µL	St. Bernadus*	900-1000
<b>P2-2</b>	46,8 ng/µL	St. Bernadus**	900-1000

\*Gjærkulturer som er podet om flere ganger

\*\* Celler hentet direkte fra frys (-80 °C), dyrket opp i GYP-medium

Til slutt ble det tilsatt 7  $\mu\text{L}$  MilliQ vann til seks 1,5 mL Eppendorf rør. Deretter ble 2  $\mu\text{L}$  rensede PCR-produkt fra hver prøve applisert i to rør hver. Prøvene ble sentrifugert i 1 minutt. Etter sentrifugering ble tre av prøvene tilsatt 1  $\mu\text{L}$  ITS1-primer og tre av prøvene fikk tilsatt ITS4-primer. Prøvene ble deretter sendt til GATC Biotech (GATC Biotech AG, Cologne, Tyskland) for sekvensering (Sanger). Det rensede PCR ble tilsatt primere med anbefalt mengde fra GATC.

### **2.12.1 Sekvensering av DNA og identifikasjon**

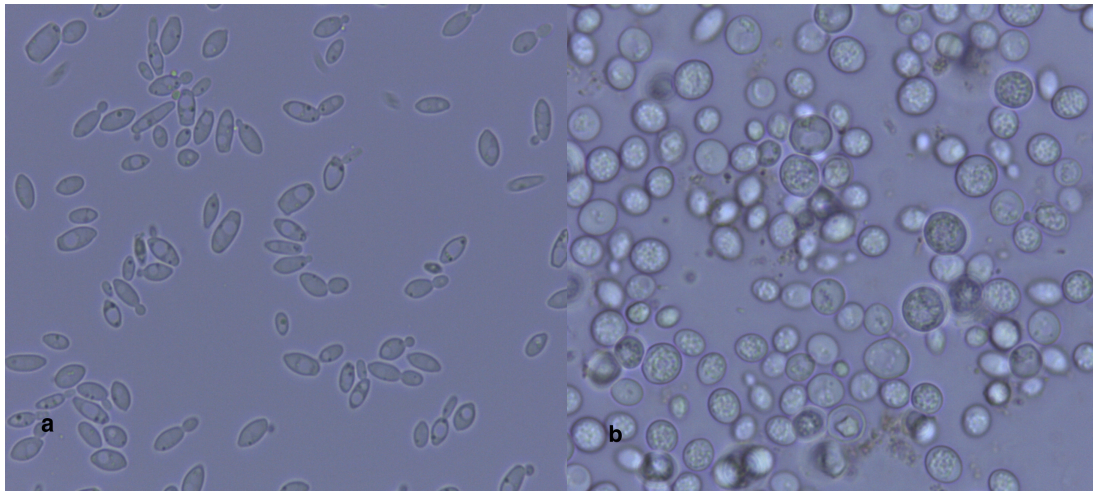
Programmet som ble brukt til å redigere og sette sammen de to fragmentene laget med hver sin primer (forward og revers) er BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit, versjon 725 (Hall, 1997)). Sekvensene ble trimmet i BioEdit for å fjerne dårlige sekvenser i 3' og 5' enden på DNA-trådene. Ved å lage en Contig-0-fil, kan denne sekvensen kopieres inn i nukleotiddatabasen i BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Medicine, 2016). I BLAST-databasen for nukleotider ble Contig-0-sekvensen sammenliknet med andre publiserte nukleotidesekvenser for å forhåpentligvis finne slekt og art i ukjent prøve.

### **2.13 Statistikk**

Til å beregne gjennomsnittet og standardavviket for hver enkelt parallell ble Microsoft Office Excel benyttet. Produksjonen av statistiske data som har blitt utført i denne oppgaven er gjennomsnitt, standardavvik, PCA (principal component analysis) og One-way Anova. PCA-plot og One-Way Anova er utført i Minitab 16 for å se sammenhengene mellom tid, gjærstamme og temperatur.

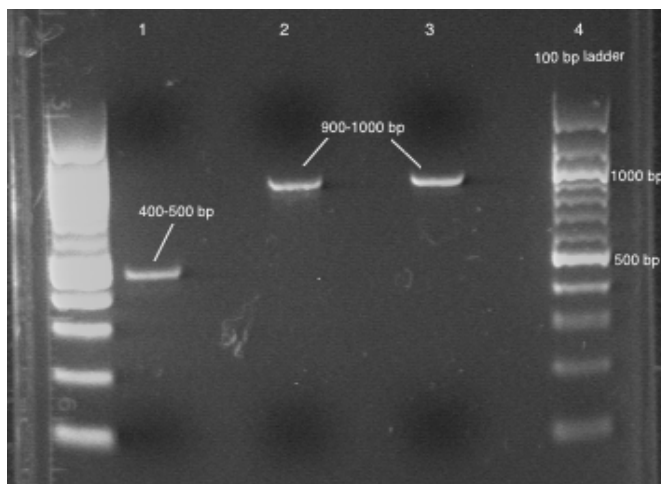
### 3 Resultater

Cellekulturene som er brukt gjennom hele oppgaven er presentert i Tabell 6 (Kapittel 2.1) i metod delen. Figur 9 viser gjærcellene som ble isolert fra Orval og St. Bernadus. En fullt voksen gjær celle har en oval form (Pires and Brányik, 2015).



Figur 9: Bilder tatt av de to forskjellige gjærstammene som ble isolert fra henholdsvis a) Orval og b) St. Bernadus ved en 1000x forstørrelse. .

#### 3.1 Identifisering av gjær ved Sanger sekvensering



Figur 10: Størrelsen på det isolerte PCR-produktet fra de to ukjente gjærstammene. Brønn 1 viser gjærstammen fra Orval. Brønn 2 og 3 viser gjærstammene fra St. Bernadus. Brønn 4 Viser 100 bp ladder.

Gjær som ble identifisert ved Sanger-sekvensering ble identifisert som *Dekkera bruxellensis* eller *Brettanomyces bruxelliensis* CBS 72 (Orval-P1) og *Saccharomyces cerevisiae* YJM1307 (St. Bernadus-P2).

I vekstforsøket ble det tatt ut prøver og gjort målinger ved nulltid, 24, 96 og 168 timer for de fire gjærstammene P1, P2, P3 og P4 ved tre forskjellige temperaturer (18, 22 og 25,5 °C). Det ble gjort målinger av celletall, sukkerkonsentrasjon (°Plato), pH, CO<sub>2</sub> og HSGC-FID for flyktige komponenter som alkohol, aldehyder, estere og ketoner og sulfater. Øl brygget med de fire gjærstammene ble sammenliknet med referanseølene og presenteres i del 2 av resultatdelen.

## 3.2 Del 1 – vekstforsøk

### 3.2.1 Cellevekst

Tabell 16 viser en oversikt over de gjennomsnittlige logaritmiske celletallene for hver gjærstamme, sammen med standardavviket. Celletallene er satt inn i grafer som viser reduksjon av pH og sukkerkonsentrasjonen (°Plato). Celletallene er også satt inn i grafer som viser CO<sub>2</sub>- og etanol produksjon for å sammenlikne cellevekst og utvikling av de forskjellige parameterne som skal presenteres videre i resultatdelen.

Sammenlikningen er først og fremst med for å vise hvordan veksten korrelerer med de ulike faktorene. Alle målinger er i utgangspunktet gjort med fire replikater der ikke annet er oppgitt.

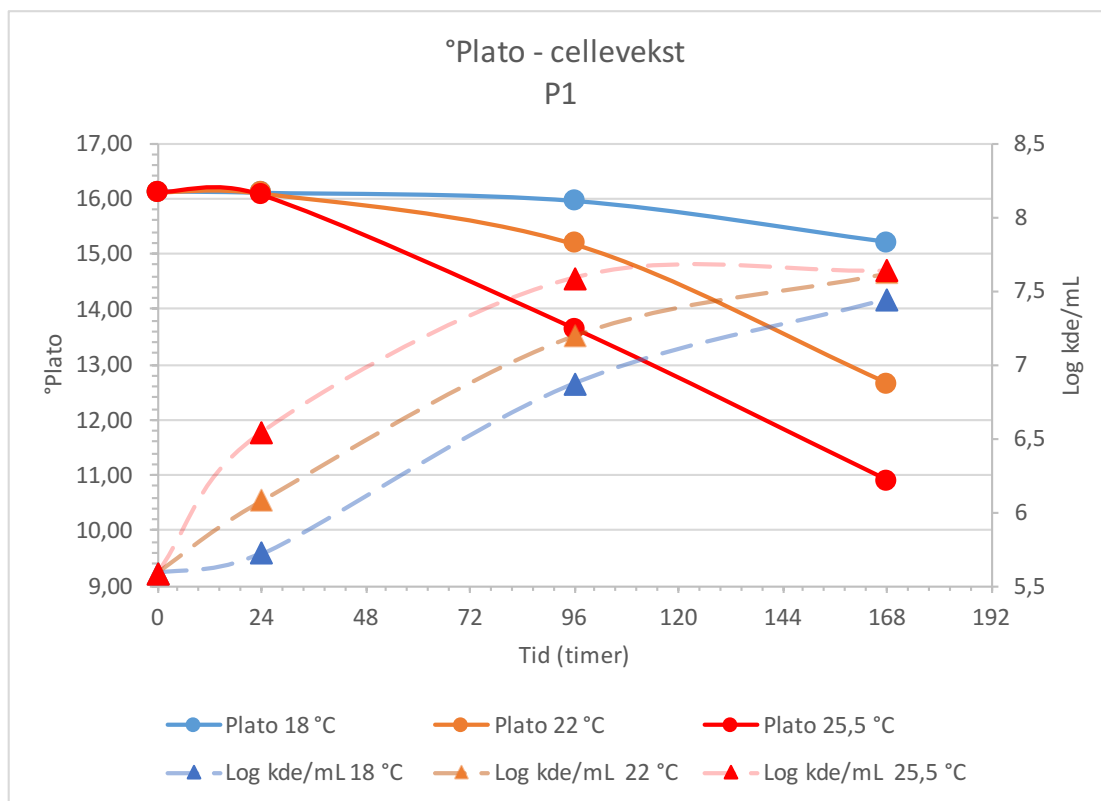
Tabell 16: Gjennomsnittlige log celletall med standardavvik.

Gjærstamme	Tid (timer)	Log kde/mL 18 °C	Log kde/mL 22°C	Log kde/mL 25,5 °C
<b>P1</b>	0	5,58 ± 0,15	5,58 ± 0,15	5,58 ± 0,15
	24	5,71 ± 0,21	6,07 ± 0,15	6,53 ± 0,161
	96	6,86 ± 0,32	7,19 ± 0,51	7,58 ± 0,46
	168	7,43 ± 0,25 <sup>a</sup>	7,61 ± 0,52 <sup>a</sup>	7,63 ± 1,45 <sup>a</sup>
<b>P2</b>	0	5,79 ± 0,084	5,79 ± 0,084	5,79 ± 0,084
	24	7,15 ± 0,078	7,68 ± 0,22	7,80 ± 0,11
	96	7,91 ± 0,13	7,86 ± 0,23	7,81 ± 0,17
	168	7,72 ± 0,15	7,96 ± 0,11	7,91 ± 0,082
<b>P3</b>	0	5,81 ± 0,11	5,81 ± 0,11	5,81 ± 0,11
	24	6,80 ± 0,032	7,47 ± 0,068	7,67 ± 0,093
	96	7,95 ± 0,29	7,84 ± 0,20	7,68 ± 0,15
	168	7,86 ± 0,31	7,86 ± 0,054	7,31 ± 0,13
<b>P4</b>	0	5,71 ± 0,081	5,71 ± 0,081	5,71 ± 0,081
	24	6,85 ± 0,044	7,48 ± 0,11	7,41 ± 0,33
	96	7,19 ± 0,061	7,43 ± 0,073	7,56 ± 0,13
	168	7,49 ± 0,12	7,62 ± 0,089	7,62 ± 0,13

<sup>a</sup>3 av 4 paralleller er benyttet ved beregning.

### 3.2.2 Sukkeromsetning

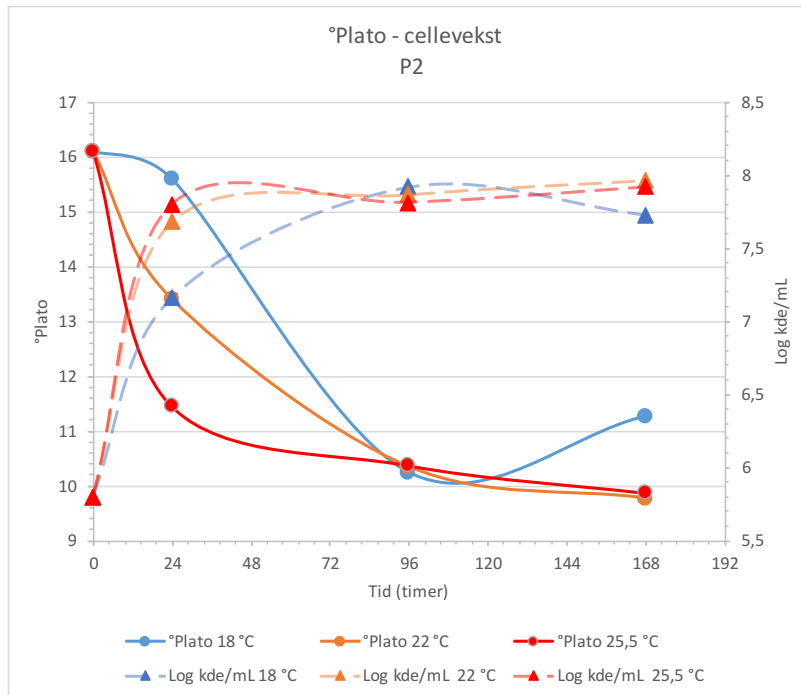
Reduksjon av sukkerkonsentrasjonen i vørteren av fire forskjellige gjærstammer er presentert i Figur 11-14 . Figur 11 viser vørter podet med gjærstamme P1 og omsetning av sukker som en funksjon av vekst. Det kan observeres en gradvis cellevekst og en forventet reduksjon av sukker. Økt temperatur gir økt cellevekst og absorpsjon av sukker.



**Figur 11:** Utvikling av sukkerkonsentrasjonen i °Plato ved forskjellige temperaturer over tid hos gjærstamme P1. Cellevekst er presentert i bakgrunnen med stiplet linje for å vise sammenhengen i utviklingen.

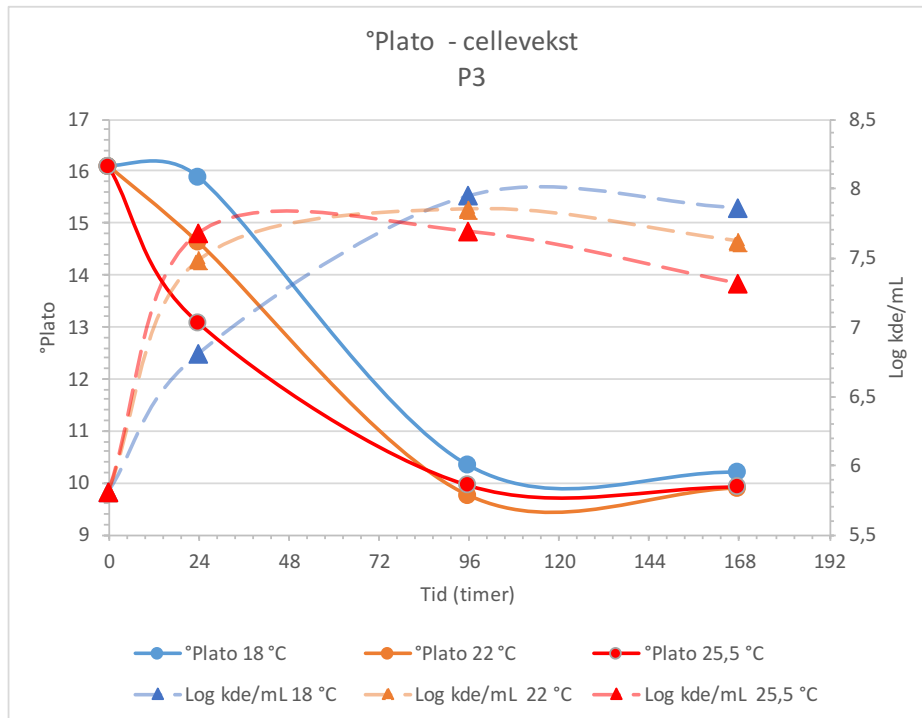
Utviklingen av sukkerkonsentrasjonen over 168 timer, samt celleveksten er presentert i Figur 12 for vørter podet med gjærstamme P2. Her kan det observeres en økning etter 96 timer ved 18 °C. Tilsvarende celletall har en svak reduksjon. Celletallet vokser raskt de første 24 timene for alle tre temperaturene og flater deretter ut fra 96 til 168 timer. Celleveksten for prøvene inkubert ved 22 og 25,5 °C har tilnærmet lik vekst.





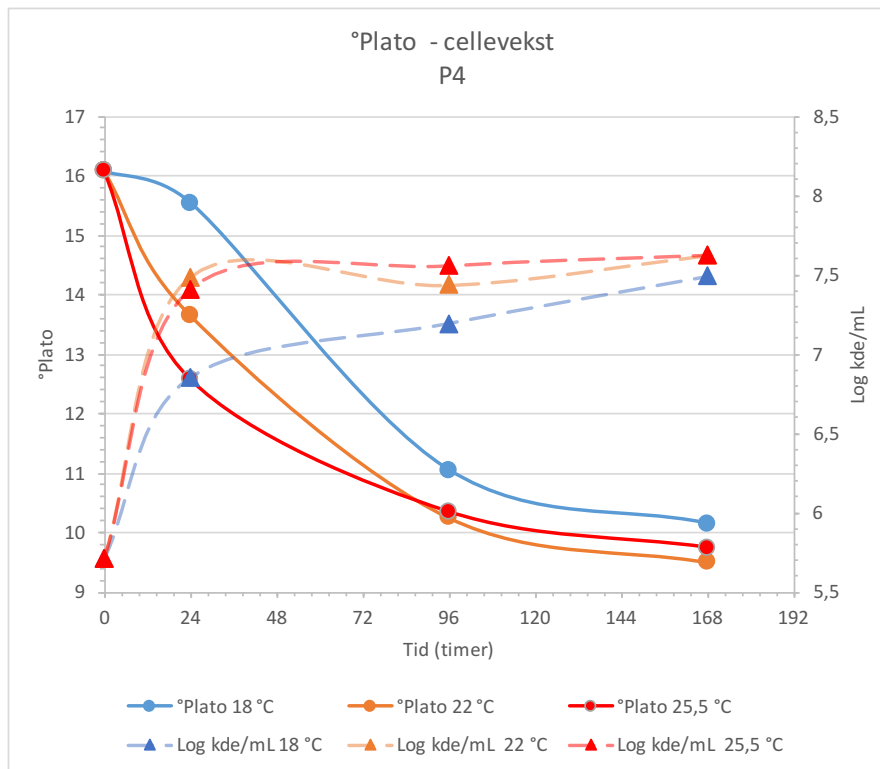
**Figur 12: Utvikling av sukkerkonsentrasjonen i °Plato inkubert ved forskjellige temperaturer over tid hos gjærstamme P2. Cellevekst er presentert i bakgrunnen med stiplet linje for å vise sammenhengen i utviklingen.**

For gjærstamme P3 er utviklingen av sukkerkonsentrasjonen som en funksjon av vekst presentert i Figur 13. Det kan observeres at prøvene inkubert ved 22 og 25,5 °C vokser rasket de første 24 timene, men avtar mest mot slutten av vekstforløpet. Celleveksten til prøven inkubert ved 18 °C gav høyest celledetall etter 168 timer. Sluttkonsentrasjonen av sukker er tilnærmet lik for prøvene inkubert ved høyest temperatur.



**Figur 13:** Utvikling av sukkerkonsentrasjonen i °Plato ved forskjellige temperaturer over tid hos gjærstamme P3. Cellevekst er presentert i bakgrunnen med stiplet linje for å vise sammenhengen i utviklingen.

Figur 14 viser en oversikt over utviklingen sukkerkonsentrasjonen og vellevekst av podet vørter med gjærstamme P4. Det kan observeres en høyere sluttkonsentrasjon av sukker etter 168 timer ved inkubering ved 22 °C. Celleveksten er størst de første 24 timene og flater ut etter 48 timer for alle tre temperaturene. Celletallet er tilnærmet likt for alle tre prøvene etter 168 timer. Mer sukker absorberes ved høyere temperatur.

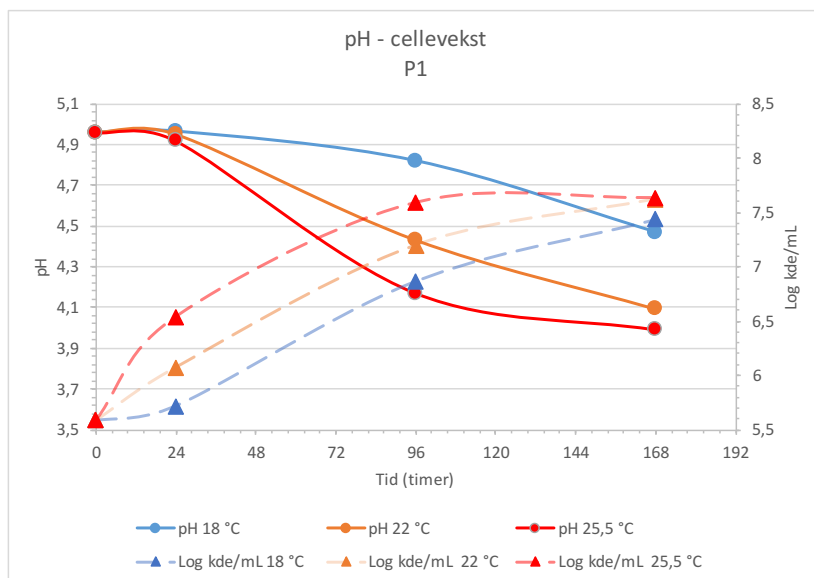


**Figur 14:** Utvikling av sukkerkonsentrasjonen i °Plato ved forskjellige temperaturer over tid hos gjærstamme P4. Cellevekst er presentert i bakgrunnen med stiplet linje for å vise sammenhengen i utviklingen.

### 3.2.3 pH-målinger

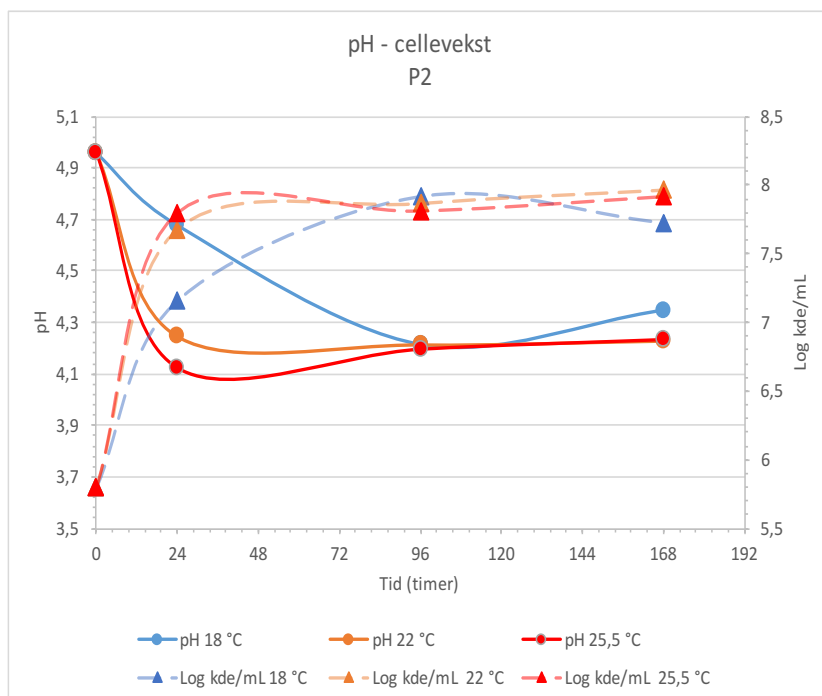
Det ble foretatt pH-målinger for å vise hvordan pH utvikles for prøvene P1, P2, P3 og P4 i løpet av 168 timer (7 dager). Resultatene er presentert i Figur 15-18.

Figur 15 viser utviklingen av pH for gjærstamme P1 i løpet av 168 timer. En forventet reduksjon i pH ved alle tre temperaturene kan observeres. Reduksjonen i pH for prøven inkubert ved 18 °C hadde en vesentlig mindre nedgang i pH enn for de to andre temperaturene. Målingene av pH ble raskere redusert etter 24 timer og det er en raskere reduksjon av pH ved høyere temperaturer.



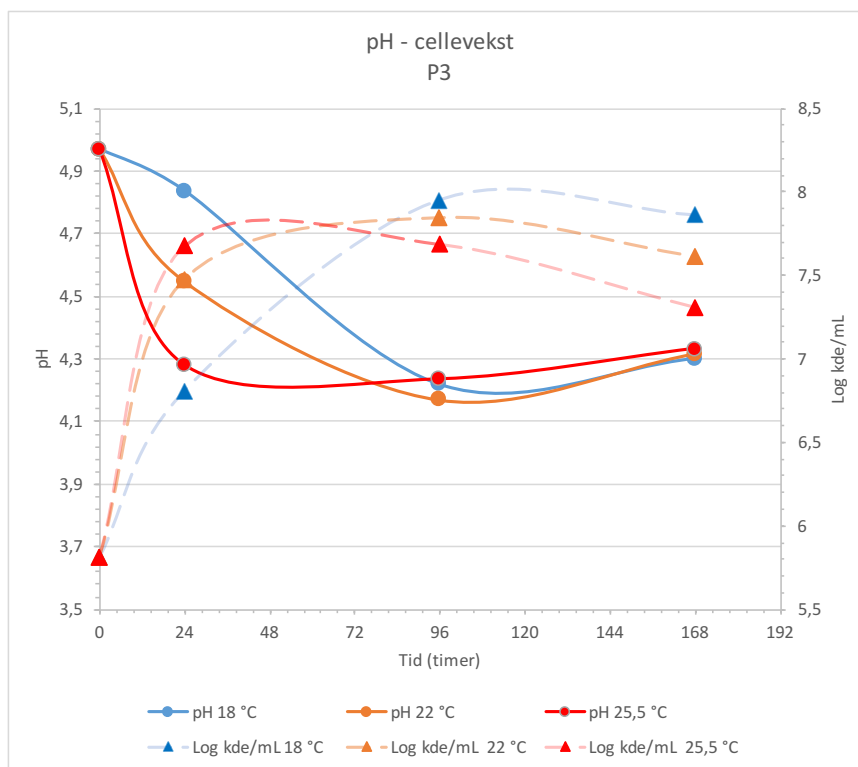
**Figur 15:** Utvikling av pH i løpet av 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P1. Celletallet er presentert med stiplet linje.

For gjærstamme P2 er pH-utviklingen presentert i Figur 16. Det kan observeres en utfłating for prøvene inkubert ved 22 og 25,5 °C etter 24 timer. Etter 96 timer øker pH ved 18 °C. En reduksjon i celletallet kan observeres ved samme temperatur.



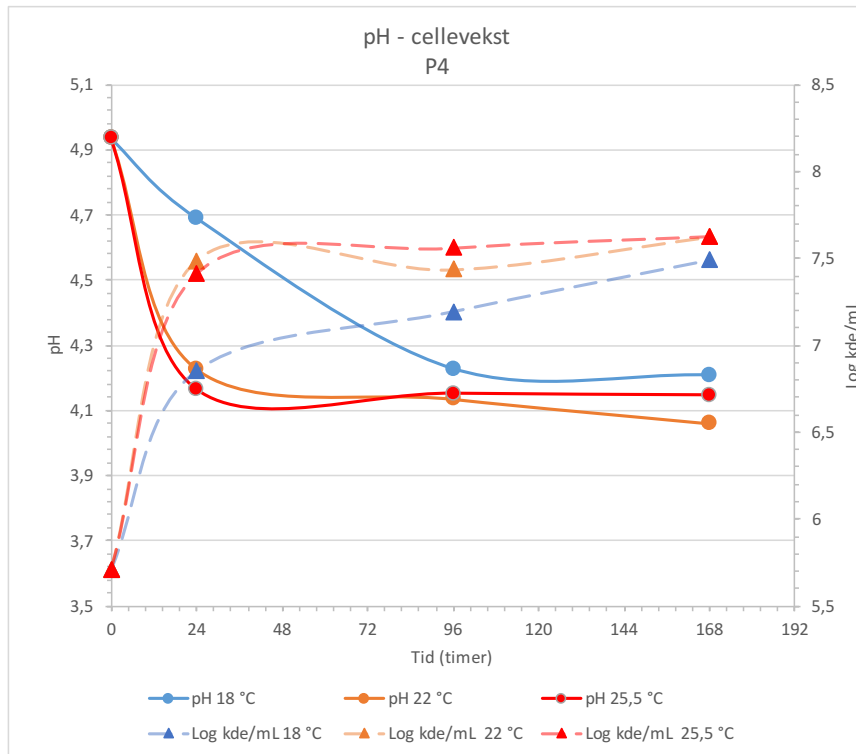
**Figur 16:** Utvikling av pH i løpet av 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P2. Celletallet er presentert med stiplet linje.

Utvikling av pH for stamme P3 er presentert i Figur 17. En økning av pH kan observeres ved alle de tre temperaturene etter 168 timer. Det kan observeres utflating etter 24 timer ved 25,5 °C. Celletallet er høyest for prøvene inkubert ved lavere temperatur.



**Figur 17: Utvikling av pH i løpet av 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P3. Celletallet er presentert med stiplet linje.**

For stamme P4 er reduksjonen av pH presentert i Figur 18. For prøvene inkubert ved 22 og 25,5 °C kan det observeres en kraftig reduksjon i pH de første 24 timene med en påfølgende utflating.

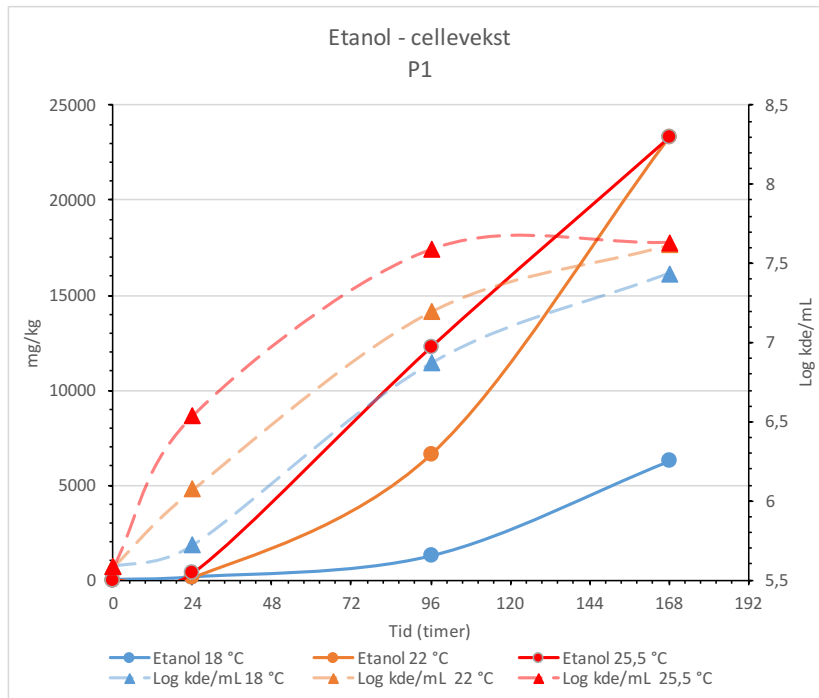


**Figur 18:** Utvikling av pH i løpet av 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P4. Celletallet er presentert med stiplet linje.

### 3.2.4 Etanolproduksjon

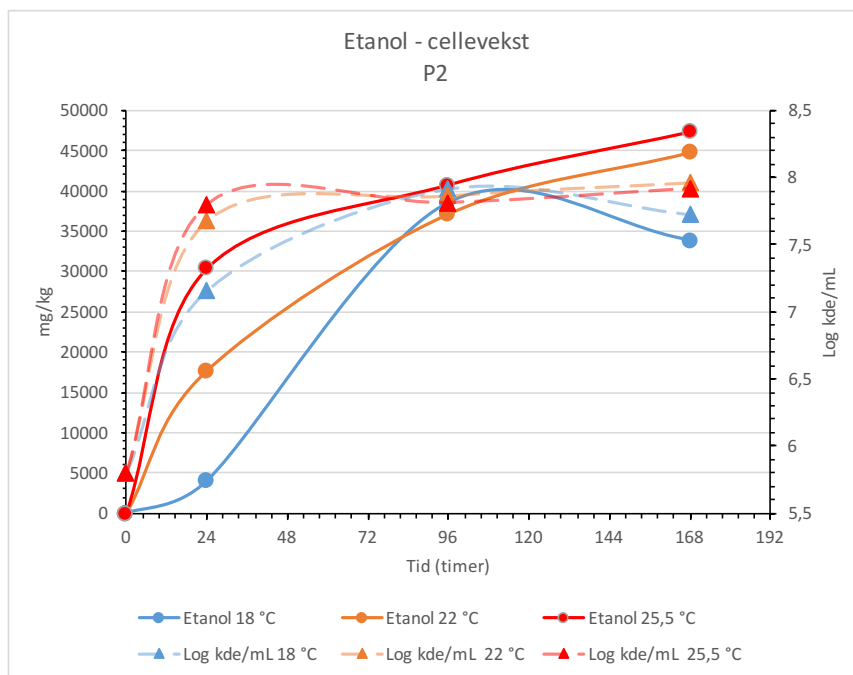
Etanolproduksjonen ble målt ved bruk av en HSGC-FID. Målingene som ble utført er presentert Figur 19-22 og viser utviklingen av etanol over 168 timer.

Etanolproduksjonen for gjærstamme P1 er presentert i Figur 19 og viser en jevn utvikling for 22 og 25,5 °C etter 24 timer. Ved 18 °C var etanolproduksjonen mye lavere gjennom hele tidsintervallet. Noe økning etter 96 timer ble observert ved 18 °C. Etter 168 timer var etanolkonsentrasjonen ved 18, 22 og 25,5 °C for de tre prøvene henholdsvis 6238, 23295 og 23294 mg/kg.



**Figur 19: Utviklingen av etanolproduksjon over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for prøve P1. Stiplede linjer viser celleveksten.**

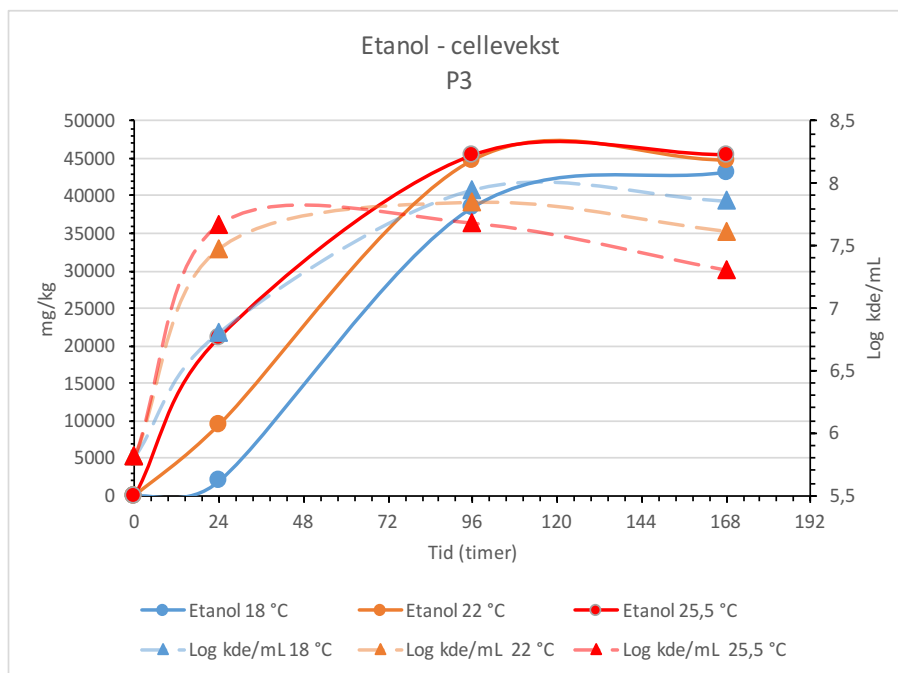
Produksjonen av etanol for gjærstamme P2 kan observeres i Figur 20. Det ble observert en reduksjon i etanolkonsentrasjonen etter 168 timer ved 18 °C. Det observeres en kraftig økning i etanolproduksjon ved 22 og 25,5 °C de første 24 timene og ved videre inkubering flater den noe ut. Ved 18 °C kan det observeres en forsinkelsesfase frem til 24 timer etterfulgt av en økning i etanolproduksjon. Etter 168 timer kunne det måles en konsentrasjon på henholdsvis 33879, 44789 og 47376 mg/kg.



**Figur 20:** Utviklingen av etanolproduksjon over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for prøve P2. Stiplede linjer viser celleveksten.

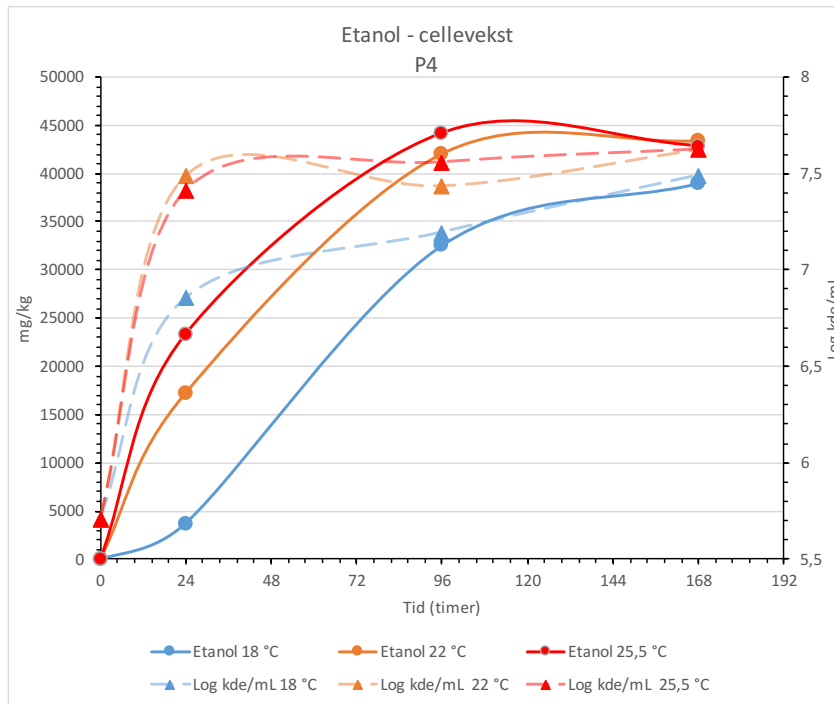
For stamme P3 kan det observeres utvikling av etanol i Figur 21 ved de tre ulike temperaturene. En kraftig økning kan observeres ved 25,5 °C i løpet av de første 24 timene. Ved 22 °C kan det observeres en jevn lineær økning i etanolkonsentrasjonen. For etanolutviklingen ved 18 °C er det en forsinkelsesfase de første 20 timene. Etter 24 timer øker produksjonen lineært ved 18 °C. Etter 168 timer ble etanolkonsentrasjonen målt til henholdsvis 43249, 44868 og 45411 mg/kg.





**Figur 21: Utviklingen av etanolproduksjon over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for prøve P3. Stiplede linjer viser celleveksten.**

For gjærstamme P4 er etanolproduksjonen presentert i Figur 22. Utviklingen av etanol viser en veldig kraftig vekst allerede fra tid 0 til 24 timer for temperatuere 22 og 25,5 °C, etterfulgt av en litt mindre økning mellom 24 og 96 timer. Ved 18 °C øker denne tilnærmet eksponentielt fra 12 til 24 timer, etterfulgt av lineær økning fra 24 timer til 96 timer. Etanolkonsentrasjonen økte med henholdsvis for de tre temperatuere med 38992, 43411 og 42825 mg/kg.

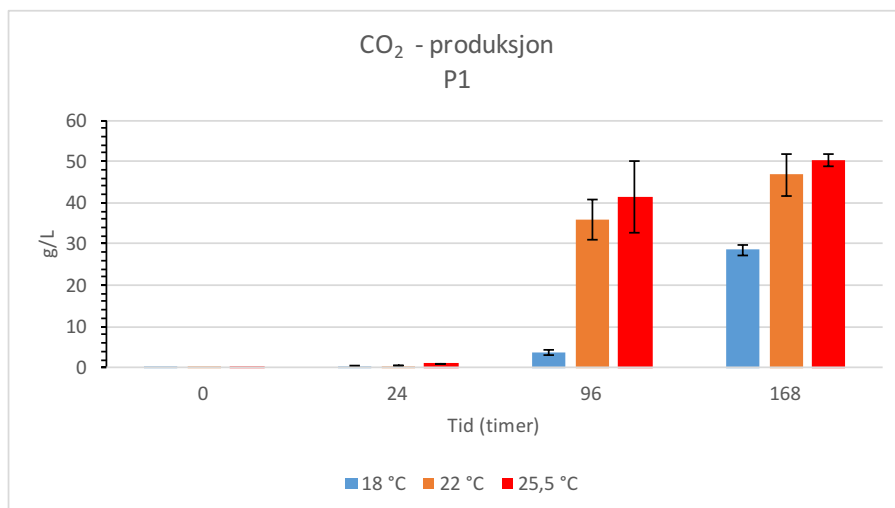


**Figur 22:** Utviklingen av etanolproduksjon over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for prøve P4. Stiplede linjer viser celleveksten.

### 3.2.5 CO<sub>2</sub>-produksjon

Målinger av CO<sub>2</sub>-produksjon er presentert i Figur 23-26 nedenfor. Figurene viser utviklingen CO<sub>2</sub>-produksjonen over 168 timer ved temperaturene 18, 22 og 25,5 °C. Verdiene presenterer ett gjennomsnitt av to paralleller.

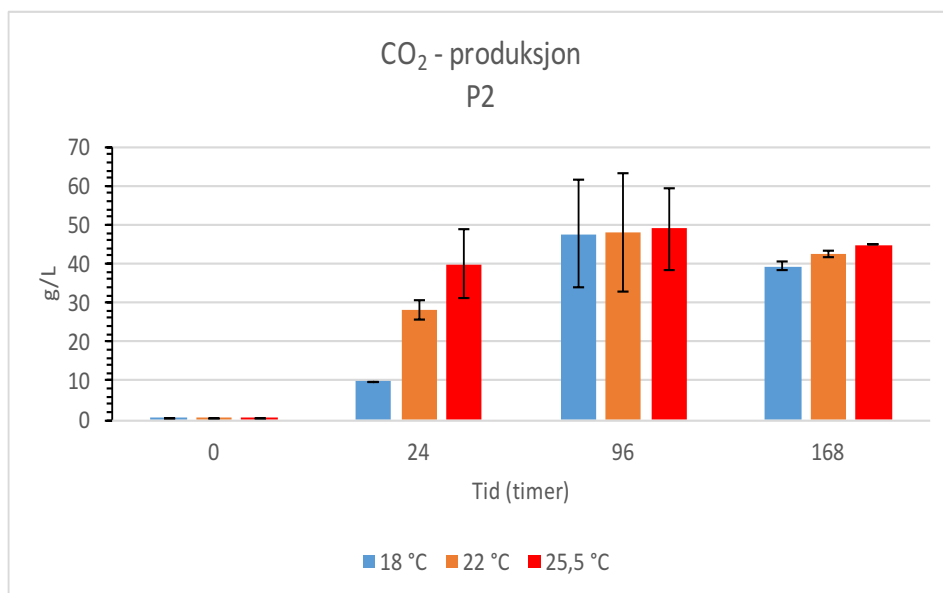
Etter 168 timer var den høyeste konsentrasjonen CO<sub>2</sub> på 50,32 g/L ved 25,5 °C for P1. Ved 18 °C var konsentrasjonen 28,56 g/L og ved 22 °C, 46,78 g/L. CO<sub>2</sub>-produksjonen for P1 er vist i Figur 23.



**Figur 23:** Utviklingen av CO<sub>2</sub> over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P1. Standardavviket er også vist i hver søyle.

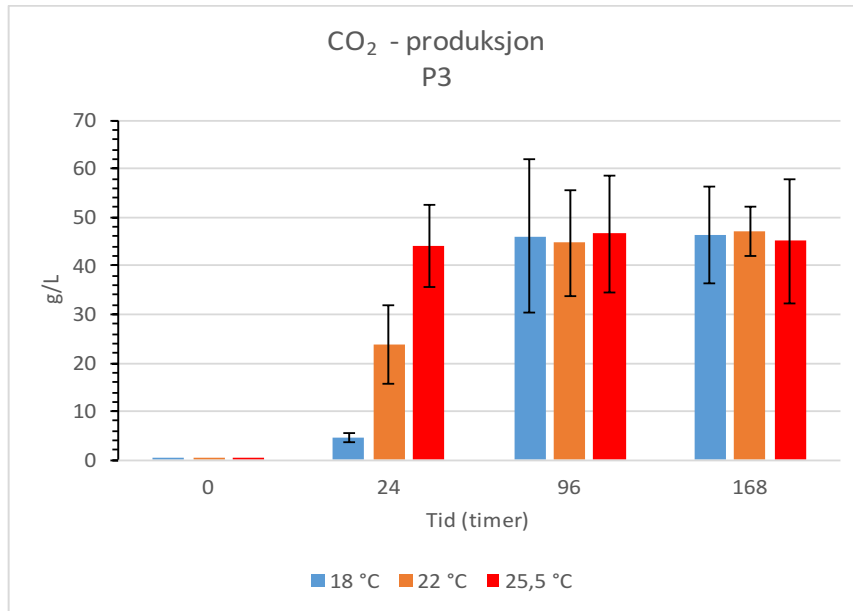
Gjærstamme P2 produserte relativt lik konsentrasjon for alle tre prøvene etter 96 timer på henholdsvis 47,5 48,0 og 49,0 g/L.

Etter 168 timer ble derimot den høyeste målingen gjort ved 25,5 °C, men noe lavere konsentrasjoner ble målt ved dette tidspunktet. Det er ikke lagt inn noe standardavvik her fordi det kun ble gjort en måling. Målingene er presentert i Figur 24.



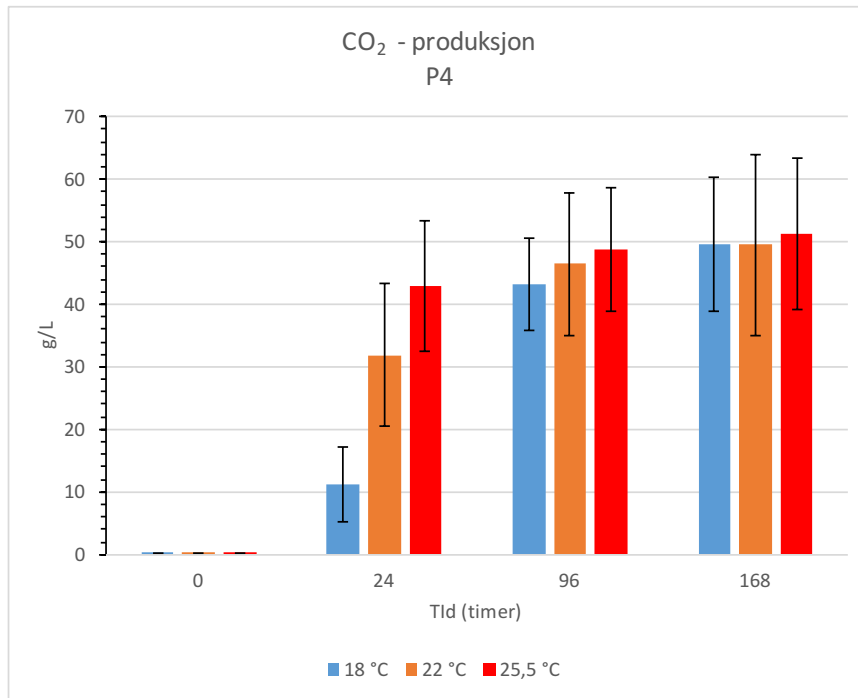
**Figur 24:** Utviklingen av CO<sub>2</sub> over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P2. Standardavviket er også vist i hver søyle.

For stamme P3 var det en relativt lik CO<sub>2</sub> -konsentrasjon etter 96 og 168 timer for alle temperaturene og resultatene er presentert i Figur 25. Etter 24 timer kan det observeres en relativt god produksjon ved 25,5 °C. Konsentrasjonene ved de tre temperaturene er henholdsvis 46,3, 47,0 og 45,0 g/L.



**Figur 25:** Utviklingen av CO<sub>2</sub> over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P3. Standardavviket er også vist i hver søyle.

For prøve P4 kunne det observeres en noe høyere konsentrasjon i prøvene målt etter 168 timer. Målingene er presentert i Figur 26. Etter 168 timer ble det målt en produksjon på 49,6, 49,5 og 51,3 g/L ved temperaturene 18, 22 og 25,5 °C.



**Figur 26: Utviklingen av CO<sub>2</sub> over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for gjærstamme P4. Standardavviket er også vist i hver søyle.**

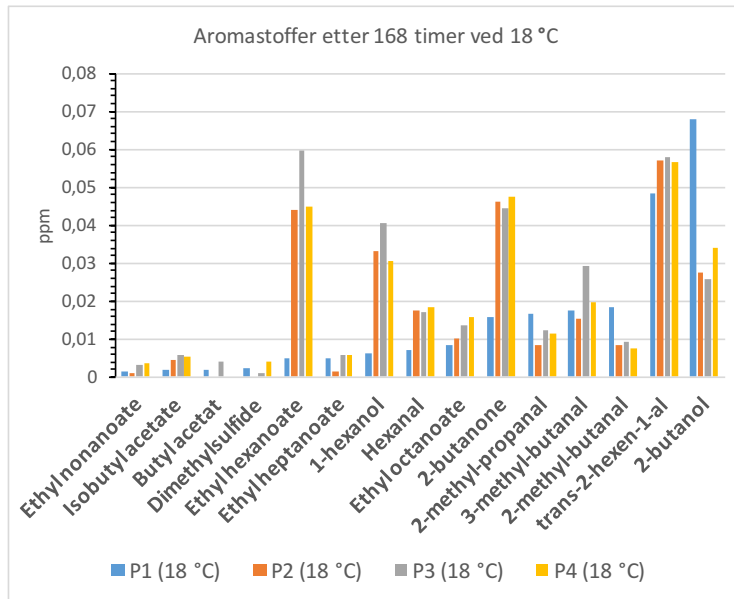
### 3.3 HSGC-FID: vekstforsøk

For å presentere resultatene fra HSGC-FID er det tatt utgangspunkt i utviklingen av aromaprofil etter 168 timer ved de tre forskjellige temperaturene. Resultatene er presentert i søylediagram da de viser forskjellene i aromaprofil på en oversiktlig måte. Data for diagrammene er lagt ved som vedlegg (Vedlegg 1-12) Det er totalt gjort målinger av 28 komponenter og av de er det 27 som presenteres i diagrammene. Det trekkes også kun ut de komponentene som anses som viktigere for smak og aroma i øl. Merk at det er ulik skala benyttet på y-aksene i noen av figurene. Figur 27-32 viser en overordnet oversikt over mengdeforholdet mellom komponentene for å gi en oversikt over produksjonen av aromastoffer fra hver gjærstamme ved tre forskjellige temperaturer. Komponentene er for denne profilen er lagt inn i to separate søylediagrammer. For de komponentene som bidrar mest til smak i øl i henhold til teorien er dette estere: Etylacetat, isobutyl acetat, etyl hexanoat og etyl oktaoat.

Høyere alkoholer som forekommer er: 1-propanol, 2-metyl-1-propanol, 3-metyl-1-propanol, 3-metyl-1 butanol og fenyletyl alkohol og for de vicinale diketonene (VDK): Diacetyl. Disse er nærmere beskrevet under kapittelet om aromastoffer (Kapittel 1.15) i introduksjonsdelen av oppgaven. På grunn av datamengdene prøver jeg å oppsummere på best mulig måte i diskusjonen (Kapittel 4.2.1 og 4.2.2) og speile de største forskjellene mellom de ulike gjærstammene.

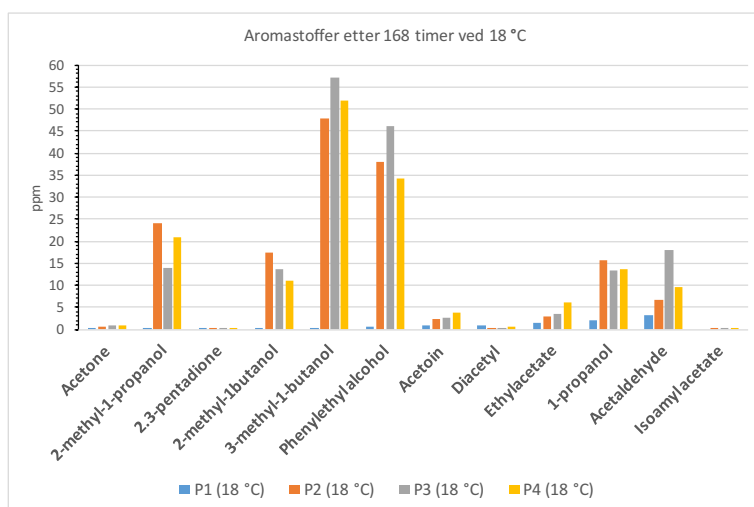
#### 3.3.1 Aromaprofil 168 timer 18 °C

Figur 27 og 28 viser en oversikt over alle de aromatiske komponentene målt etter 168 timer ved 18 °C. Av de viktige komponentene som kan nevnes her er de høyeste toppene. For komponentene i Figur 27 kan det observeres høyest konsentrasjon for etyl hexanoate for gjærstamme P3 på 0,060 ppm. For etyl okatnoat produserte P4 den høyeste konsentrasjonen på 0,016 ppm. Isobutyl acetat konsentrasjonen var tilnærmet like høy for både P3 og P4 med en konsentrasjon på henholdsvis 0,006 og 0,005 ppm. P1 produserte mest 2-metyl-butanal (0,018 ppm), 2 metyl propanal (0,017 ppm) og 2-butanol (0,068 ppm), men produserte generelt minst komponenter av alle gjærstammene ved 18 °C.



**Figur 27: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 18 °C (del 1). Tomme områder er komponenter som ikke er detekter (n.d).**

I Figur 28 kan det observeres en stor konsentrasjon for alle tre gjærstammene (P2, P3 og P4) for 2-metyl-propanol, 3-metyl-1-butanol og fenyletyl alkohol. For komponentene 3-metyl-1 butanol og fenyletyl alkohol produserte P3 de høyeste konsentrasjonene på henholdsvis 57,23 og 46,21 ppm. 1-Propanol og 2-metyl-1-propanolproduksjonen var størst for P2 med henholdsvis en målt konsentrasjon på 13,41 og 14,03 ppm. Den høyeste konsentrasjonen diacetyl ble målt for P1 på 0,823 ppm. Isoamylkonsentrasjonen var størst for P3 på 0,159 ppm. Gjennomsnitt og standardavvik er lagt til som vedlegg for Figur 27 og 28 (Vedlegg 1, 4, 7 og 10).

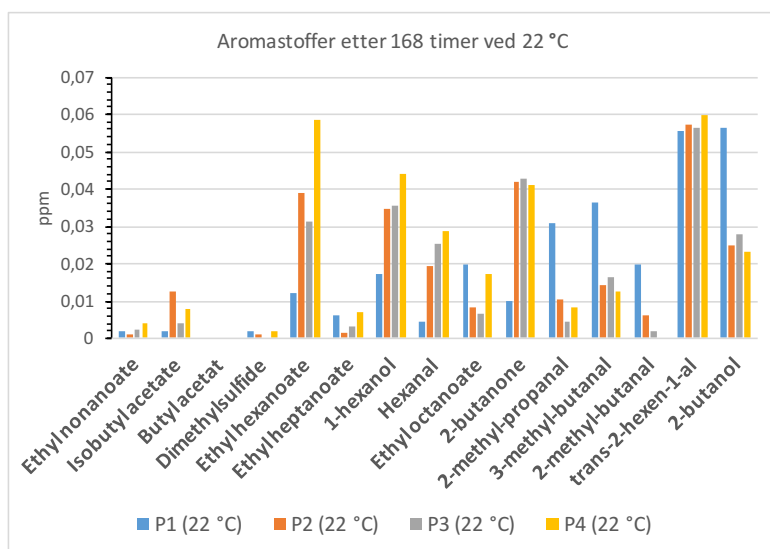


**Figur 28: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 18 °C (del 2) Tomme områder er komponenter som ikke er detekter (n.d).**

### 3.3.2 Aromaprofil 168 timer 22 °C

I Figur 29 og 30 gir en oversikt over alle de aromatiske komponentene målt etter 168 timer ved 22 °C. Her kan det observeres generelt en høyere produksjon av aromakomponenter fra alle stammene enn ved 18 °C. P1 produserer fremdeles de lavest verdiene unntatt for 2-metyl-propanal (0,031 ppm), 3-metyl-butanal (0,036 ppm), 2-metyl-butanal (0,020 ppm) og 2-butanol (0,056 ppm), men ved 22 °C produserer også P1 den høyeste sluttkonsentrasjon av etyl oktanoat på 0,020 ppm.

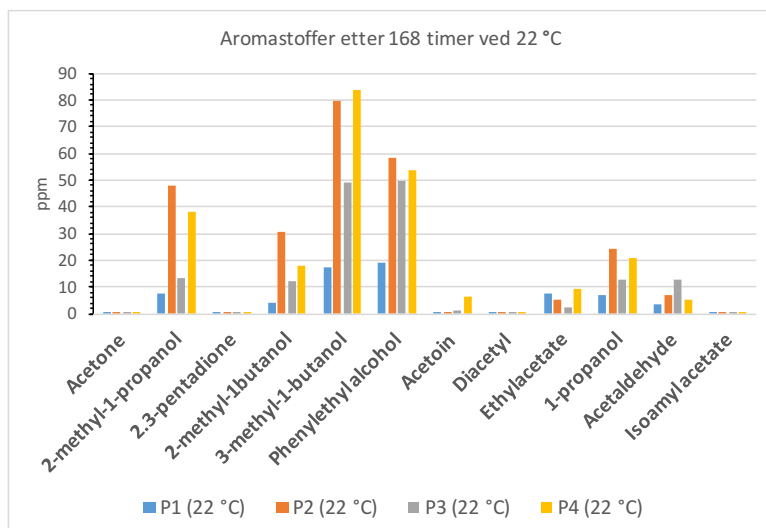
Etyl hexanoatkonsentrasjonen er høyest for P4 med en konsentrasjon på 0,059 ppm. Isobutyl acetat konsentrasjonen er høyest for prøven med gjærstamme P2 med en konsentrasjon på 0,013 ppm. Gjennomsnitt og standardavvik for Figur 29 og 30 kan observeres i vedlegg (Vedlegg 2, 5, 8 og 11).



Figur 29: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 22°C (del 1). Tomme felter er ikke detekterte komponenter n.d.

I Figur 30 kan det observeres en relativt høyproduksjon hos alle tre gjærstammene (P2, P3 og P4). P1 også økt generelt sett. Den største 2-metyl-propanol, fenyletyl og 1-Propanol alkohol var fra P2 på henholdsvis 47,87, 58,27 og 24,24 ppm. 3-metyl-1-butanol hadde høyest måling i P4 med en konsentrasjon på 83,492 ppm. Den høyeste konsentrasjonen diacetyl ble målt for P1 på 0,573 ppm. Isoiamyl acetat konsentrasjonen var størst for P2 på 0,177 ppm.

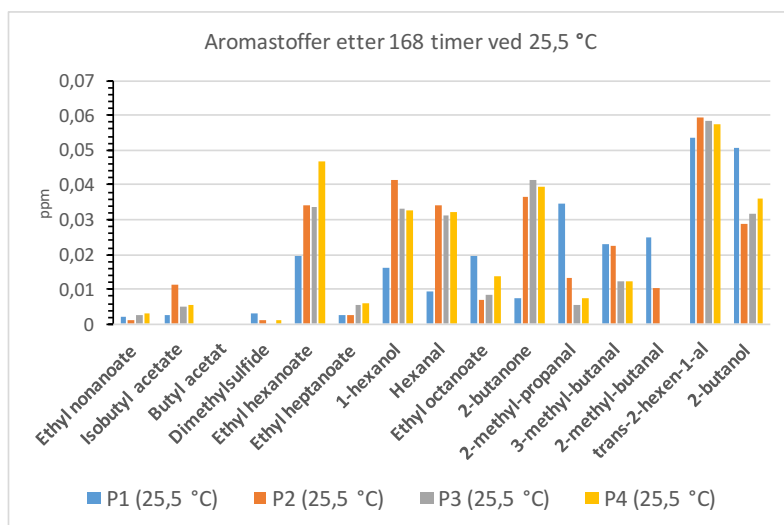




Figur 30: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 22°C (del 2). Tomme områder er komponenter som ikke er detekter (n.d).

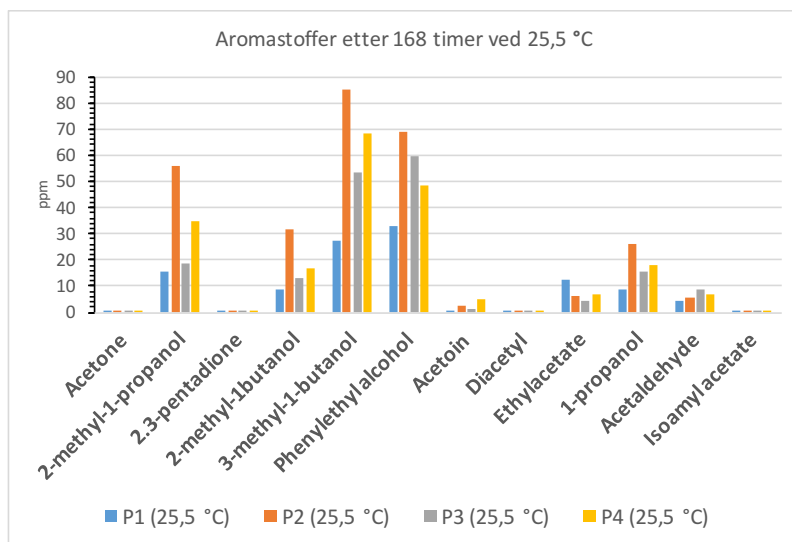
### 3.3.3 Aromaprofil 168 timer 25,5 °C

Figur 31 og 32 viser en oversikt over alle de aromatiske komponentene målt etter 168 timer ved 25,5 °C. Gjennomsnittsverdier og standardavvik er presentert i vedlegg (Vedlegg 3, 6, 9 og 12). For komponenten etyl hexanoat produserte P4 den høyeste konsentrasjonen på 0,047 ppm. P2 produserte mest isobutyl acetat (0,011 ppm). P1 produserte mest 2-metyl-butanal (0,025 ppm), 2 metyl propanal (0,035 ppm), etyl oktanoat (0,020 ppm) og 2-butanol (0,051 ppm).



Figur 31: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 25,5°C (del 1)

I Figur 32 kan det observeres høyest konsentrasjon av komponentene 2-metyl -1 propanol (18,85 ppm), 2-metyl-1-butanol (13,22 ppm), 3-metyl-1-butanol (53,71 ppm), fenyletyl alkohol (59,83 ppm), 1-propanol (15,69 ppm) og isoamyl acetat (0,109 ppm) for P2. Diacetylkonsentrasjonen er størst for P1 på 0,40 ppm.



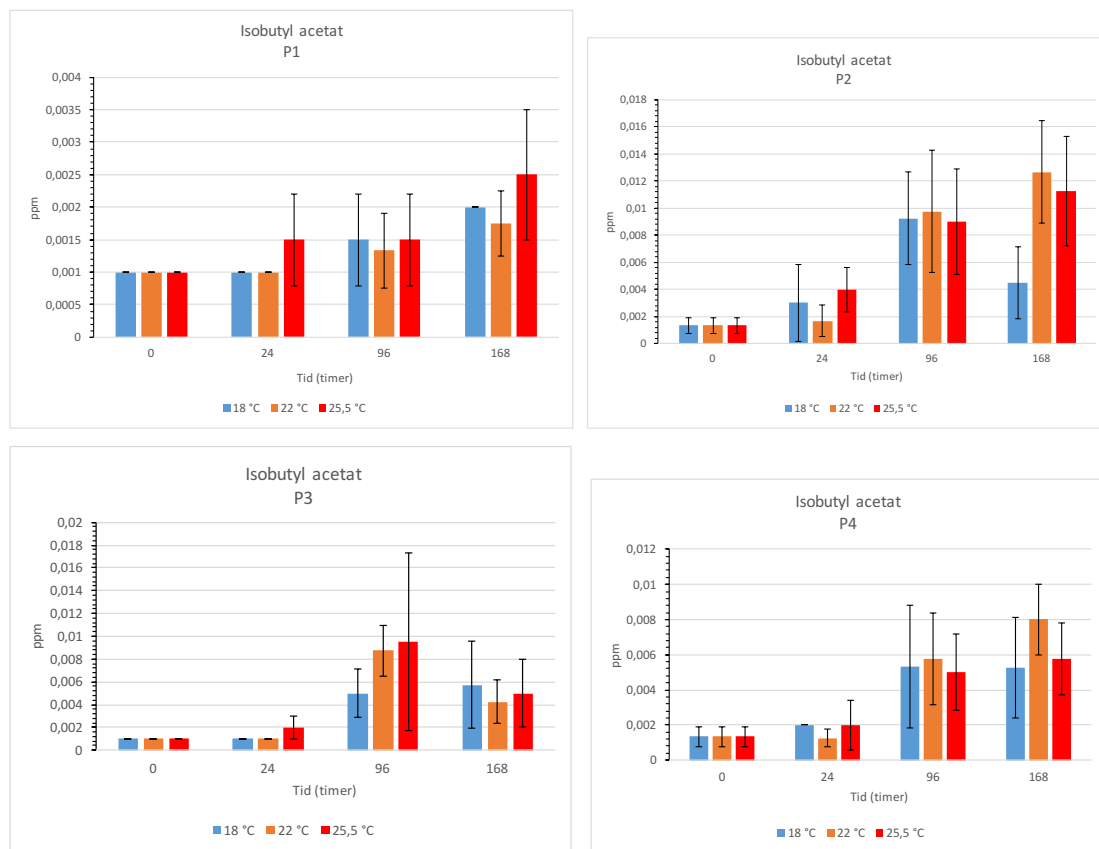
**Figur 32: Aromaprofil for de fire gjærstammene inkubert ved 22°C (del 2)**

Jeg har som nevnt allerede er det målt 28 komponenter med HCGC-FID, men her vises det kun et utvalg av to komponenter fra estergruppen, alkoholgruppen og VDK-gruppen for å vise utviklingen over 168 timer ved tre temperaturer, da disse anses som viktige for smak og aroma i øl. Disse er nærmere beskrevet i introduksjonen under kapittelet (Kapittel 1.15) om aromastoffer i øl.

På grunn av datamengden prøver jeg som tidligere nevnt å oppsummere på best mulig måte i diskusjonen og se på forskjellene mellom de ulike gjærstammene. Utviklingen av seks utvalgte komponentene som er viktig for smak er presentert i Figur 33-38. Gjennomsnittsverdier og standardavvik er lagt som vedlegg (Vedlegg 1-12).

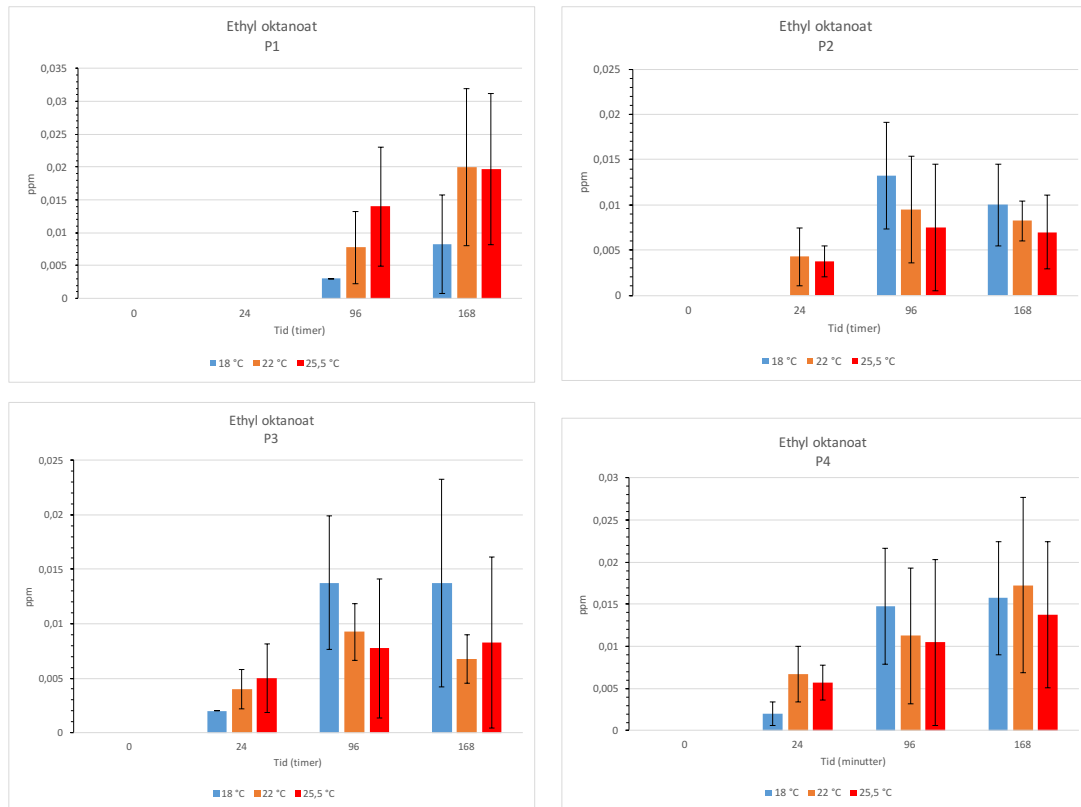
Det kan observeres en generell vekst av Isobutyl acetat konsentrasjonen over tid (Figur 33). For P1, P2 og P4 er slutt konsentrasjonen høyest ved 22 og 25,5 °C, mens for P3 er konsentrasjonen noe høyere ved 18 °C. P2 og P4 produserer høyest konsentrasjon etter 168 timer. En økning i produksjonen skjer etter 96 timer for alle prøvene. For P1 er denne utviklingen minimal. Høyeste konsentrasjon for samtlige av prøvene var

P1(0,0025 ppm), P2 (0,013 ppm), P3 (0,0057 ppm) og P4 (0,008 ppm) etter 168 timer.



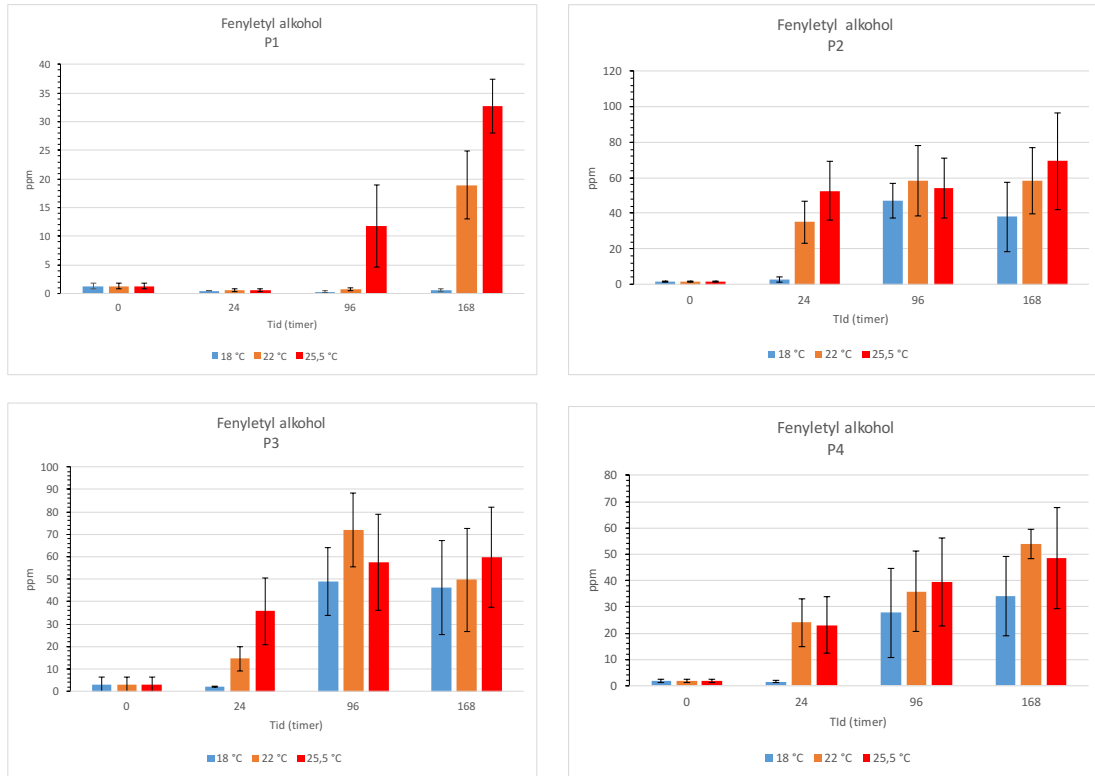
**Figur 33: Isobutylacetat-produksjonen av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d).**

I Figur 34 kan det observeres en generell vekst av etyl oktanoat acetatkonsentrasjonen over tid. For P1 er sluttkonsentrasjonen høyest ved 22 og 25,5 °C, P2 og P3 ved 18 °C. P4 har størst ved 22 °C. En økning i produksjonen skjer etter 96 timer for alle prøvene. En liten reduksjon av Isobutyl acetatkonsentrasjonen fra 96 til 168 timer observeres for P2. Høyeste konsentrasjon for samtlige av prøvene var P1(0,02 ppm), P2 (0,010 ppm), P3 (0,013 ppm) og P4 (0,017 ppm) etter 168 timer.



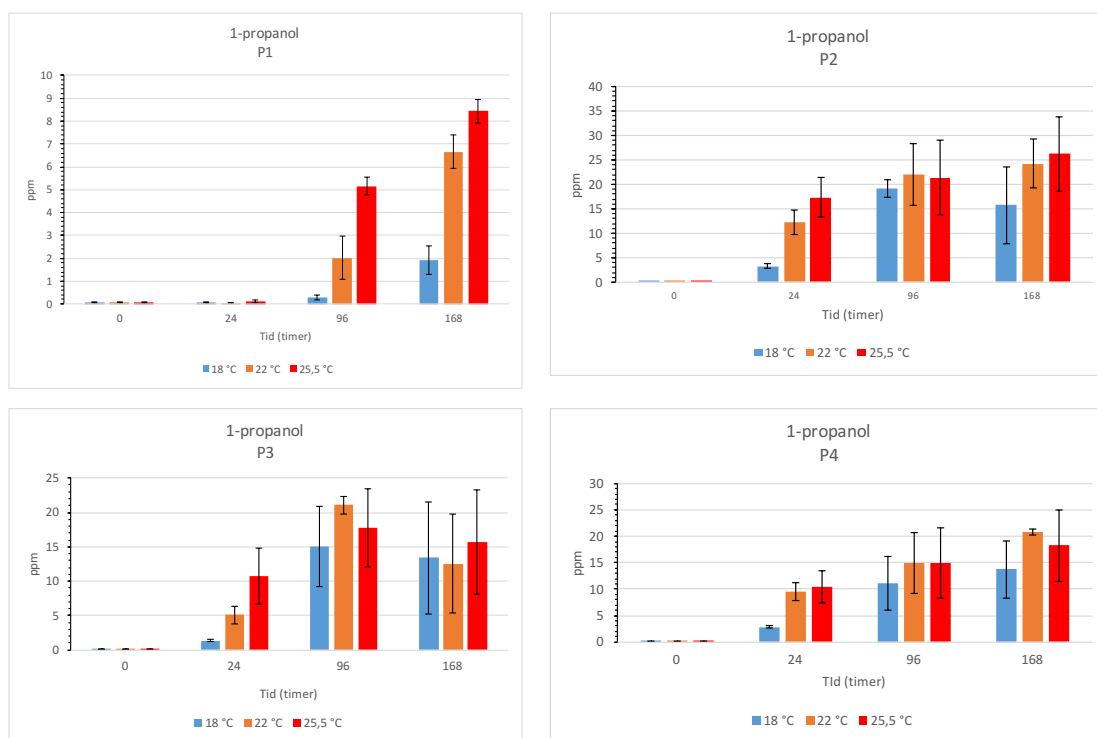
**Figur 34: Etyl oktanoat-produksjon av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek øverst på søylen, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d). Tomme felter er ikke detekterte stoffer (n.d).**

I Figur 35 kan det observeres en generell økning av fenyletyl alkohol over tid. For P1, P2 og P3 er sluttkonsentrasjonen høyest ved 25,5 °C. P4 ved 22 °C. En økning i produksjonen skjer etter 24 timer for P2, P3 og P4. For P1 skjer dette etter 96 timer ved 25,5 °C. Produksjonen er minimal for P1 ved 18 og 22 °C. Først etter 168 timer kan det observeres en økning ved 22 °C. P2. Høyeste konsentrasjon for samtlige av prøvene var P1(32,77 ppm), P2 (69,22 ppm), P3 (59,83 ppm) og P4 (53,84 ppm) etter 168 timer.



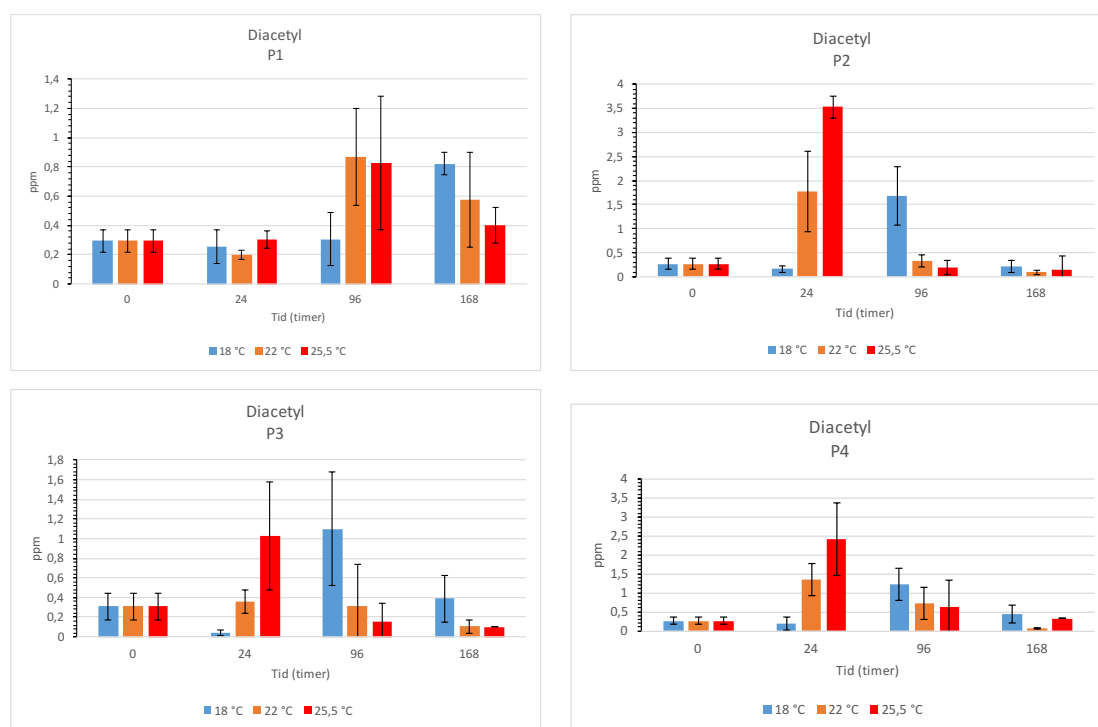
**Figur 35: Fenyletyl alkohol–produksjonen av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d).**

I Figur 36 kan det observeres en generell vekst av 1-propanol over tid. For P1, P2 og P3 er sluttkonsentrasjonen høyest ved 25,5 °C. P4 ved 22 °C. En økning i produksjonen skjer etter 24 timer for P2, P3 og P4. For P1 skjer dette etter 96 timer. Produksjonen er minimal for P1 ved 18 og 22 °C. Høyeste konsentrasjon for samtlige av prøvene var P1(8,43 ppm), P2 (26,23 ppm), P3 (15,69 ppm) og P4 (20,81 ppm) etter 168 timer. En liten reduksjon av konsentrasjonen er observert etter 96 timer for P3.



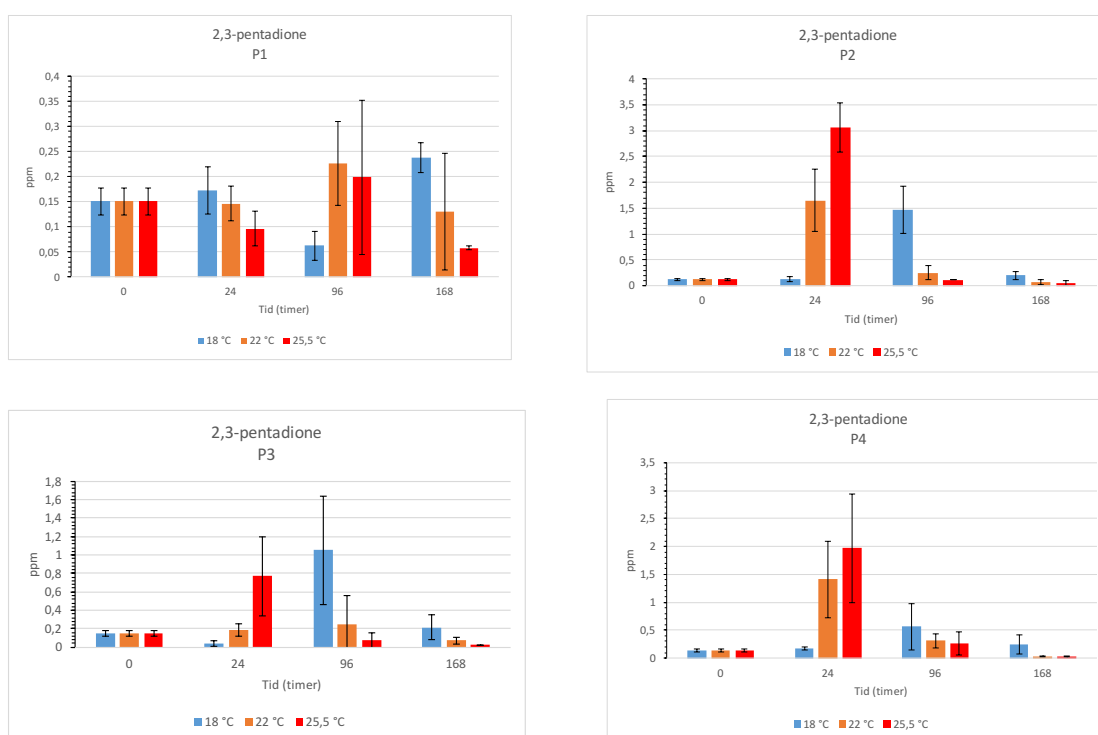
**Figur 36: 1-propanol-produksjonen av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d).**

I Figur 37 kan det observeres en generell reduksjon av diacetyl over tid. For P1 er sluttkonsentrasjonen lavest ved 25,5 °C, for P2 lavest ved 22 °C, P3 ved både 22 og 25,5 °C og P4 ved 22 °C. En økning i produksjonen skjer etter 24 timer for P2, P3 og P4 men reduseres etter 96 timer. For P1 er det en økning etter 96 timer og en liten reduksjon ved 168 timer. Laveste konsentrasjon for samtlige av prøvene var P1(0,40 ppm), P2 (0,091 ppm), P3 (0,10 ppm) og P4 (0,062 ppm) etter 168 timer.



**Figur 37: Diacetyl-konsentrasjonen av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d).**

I Figur 38 kan det observeres en generell reduksjon av 2,3-pentandione-konsentrasjonen over tid. For P1 er sluttkonsentrasjonen lavest ved 25,5 °C, for P2 lavest ved 22 og 25 °C, P3 ved både 25, 5 °C og P4 ved både 22 og 25,5 °C. En økning i produksjonen skjer etter 24 timer for P2, P3 og P4 men reduseres etter 96 timer. P3 har en relativt høy konsentrasjon etter 96 timer ved 18 °C. For P1 er det en økning etter 96 timer og en liten reduksjon ved 168 timer for de to høyeste temperaturene. Laveste konsentrasjon for samtlige av prøvene var P1(0,058 ppm), P2 (0,052 ppm), P3 (0,024 ppm) og P4 (0,028 ppm) etter 168 timer.



**Figur 38:** 2,3-pentadione-konsentrasjonen av gjærstamme P1, P2, P3 og P4 etter 168 timers inkubering ved tre forskjellige temperaturer. Vertikale linjer viser standardavviket. Standardavvik er ikke vist for de målingene med en liten svart horisontal strek, da det kun ble gjort en måling av fire paralleller (n.d).



### 3.3.4 Principal Component Analyse (PCA)

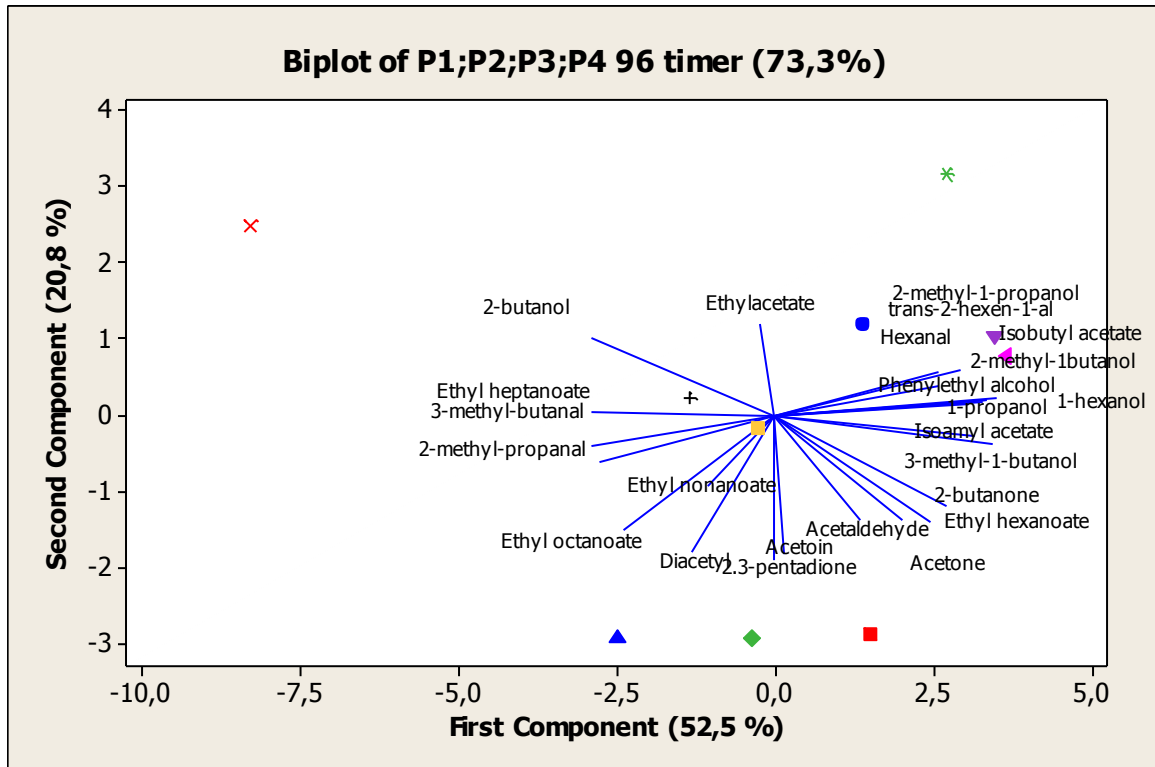
Det ble utført en multivariabel analyse med et PCA-plot som viser sammenhengen mellom de fire gjærstammene P1, P2, P3 og P4 basert på konsentrasjon av flyktige komponenter disse produserer. Det er kun gjort en sammenlikning mellom de produserte flyktige stoffene etter 96 timer og 168 timer fordi disse da inneholdt høyest konsentrasjoner. PCA-plottene fra vekstforsøket sammenlikner hvordan temperatur påvirker variasjonen i dannelsen av metabolitter. PCA er en analyse som identifiserer en rekke ikke korrelerte variabler og forklarer graden av varians. PCA-analyse er også utført på brygget øl i del 2 av resultatene.

### 3.3.5 Vekstforsøk 96 timer

Etter 96 timers vekst ble resultatene for de kjemiske komponentene sammenliknet opp mot de forskjellige gjærprøvene inokulert ved temperaturene 18, 22 og 25,5 °C og er vist i Figur 39. Fordi det manglet en komponent mangler det to punkter for gjærstamme P1 inokulert ved 18 og 22 °C etter 96 timer i Figur 39. De to prinsipale komponentene forklarer 73,3 % den totale variasjonen etter 96 timers fermentering.

I Figur 39 kan det observeres at prøvene inkubert ved forskjellige temperaturer målt etter 96 timer ligger spredt, med noen trender. P3(25,5 °C), P3 (22°C), P2 (25,5 °C) og P3 (25,5 °C) er alle prøver som har en høyforekomst av alkoholer og acetat estere med mye smak og aroma. Eksempler på disse er 2-metyl-1-butanol, fenyletyl alkohol, isobutyl acetat, 2-metyl-1-propanol, isoamyl acetat og 3-metyl-1 butanol.

P2 (18 °C), P3 (18 °C) og P4 (18 °C) er prøver med høy forekomst av smakskomponenter som diacetyl, 2,3-pentadione, aceton, acetoin og acetaldehyd. P4 (18 °C) bidrar til økt innhold av estere som bidrar til etyl hexanoat og nonanonat som er estere som bidrar til fruktighet i ølet. P1(25, 5 °C) har en høy forekomst av 2 butanol, etylacetat, etyl heptanoat og 3-metyl butanal. 2-butanol bidrar til en søt og vinaktig odør. Etylacetat bidrar med en fruktig, løsemiddel smak.



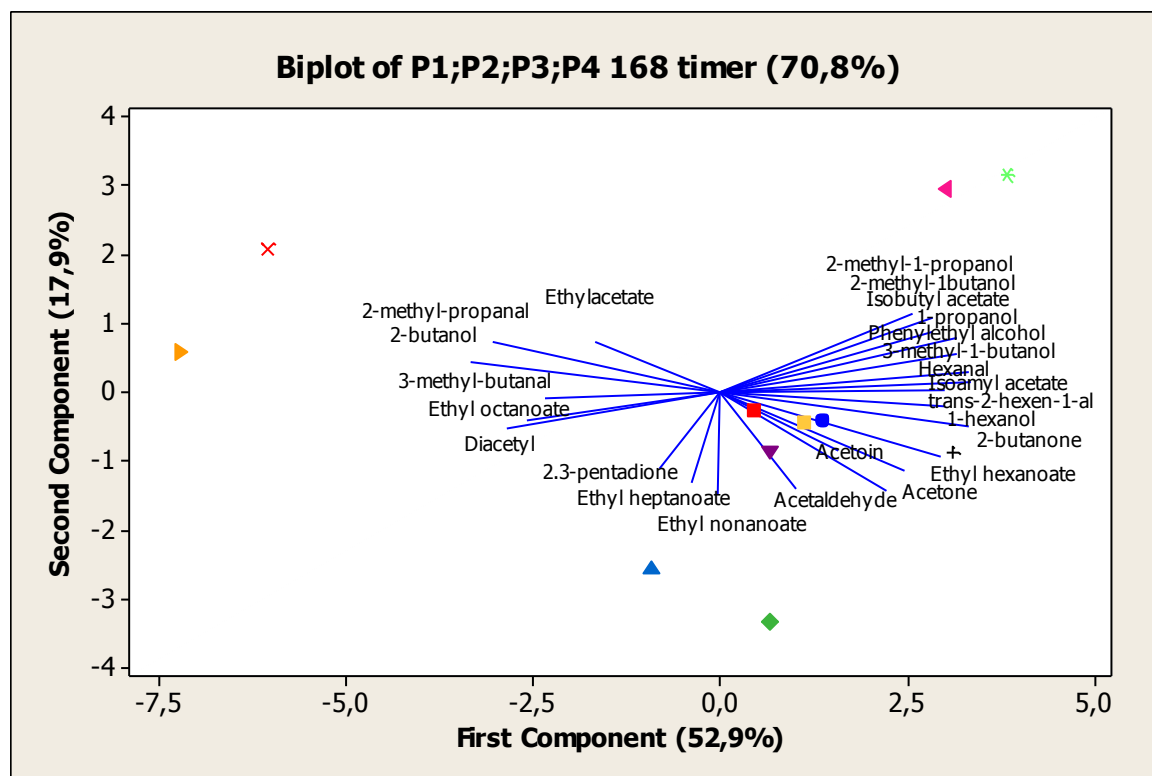
**Figur 39: Biplot som viser hvordan prøvene ligger forhold til hverandre basert på graden av komponenter produsert ved de tre forskjellige temperatuene etter 168 timer. Følgende punkter er representert i plottet:**  
 • P1 (18 °C) (mangler), ■ P2 (18 °C), ◆ P3 (18 °C), ▲ (blå trekant opp) P4 (18 °C), ▲ (gul trekant høyre) P1 (22 °C) (mangler), ▲ (rosa trekant venstre) P2 (22 °C), ▼ (lilla trekant ned) P3 (22 °C), + P4 (22 °C), × P1 (25,5 °C), \* P2 (25,5 °C), ● P3 (25,5 °C) og ■ P4 (25,5 °C).

### 3.3.6 Vekstforsøk 168 timer

Etter 168 timers vekst ble resultatene for de kjemiske komponentene sammenliknet opp mot de forskjellige prøvene inokulert ved temperatuene 18, 22 og 25,5 °C, se Figur 40. Fordi det manglet en komponent i datasettet som ble lagt inn i Minitab fjerner programmet denne prøven. Etter 168 timer mangler det kun ett punkt for gjærstamme P1 inokulert ved 18 °C. De to prinsipale komponentene (PC1 og PC2) forklarer 70,8 % av den totale variasjonen. Figur 40 viser en PCA-biplotanalyse som viser variansen mellom gjærstammene etter 168 timer inkubert ved tre forskjellige temperaturer på bakgrunn av de aromatiske stoffene gjærcellene produserer. Figur 40 viser et biplot som viser oversikten over forekomst av aromatiske komponenter etter 168 timer inkubasjon. P2 (18 °C), P3 (22 °C), P3(25,5 °C), P4 (25,5 °C) og er alle prøver som har en middels til høy forekomst av alkoholer og acetat estere med mye smak og aroma som beskrevet over. P2 (22 °C) og P2 (25,5 °C) er prøver med høy forekomst alkoholer og acetat estere som 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-1-butanol og Isobutyl acetat. P4 (22 °C) er i samme koordinater i plottet som

P2 (22 °C) og P2 (25,5 °C) på PC1-aksen men har en større konsentrasjon produsert av etyl hexanoate, aceton, acetaldehyd, 2 butanone.

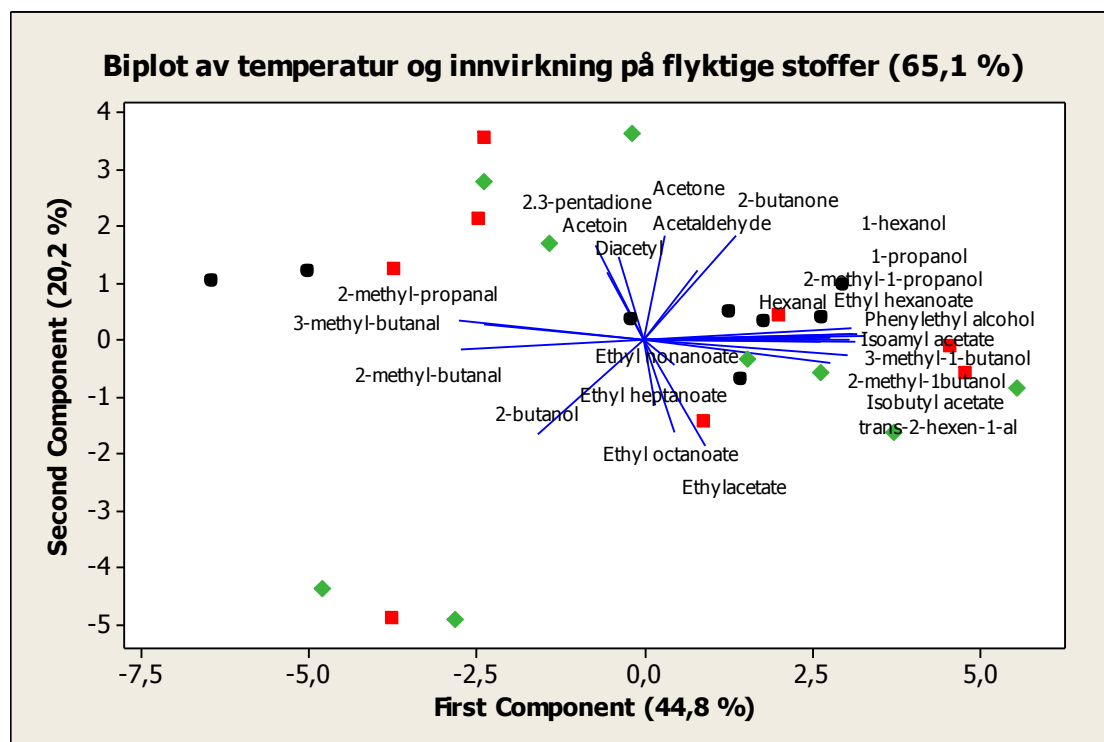
Av smakskomponenter som diacetyl, 2 butanol, eylacetat, 2 metyl-1- propanal, 3-metyl-1-butanal og etyl oktanoat er det P1 (22 °C) og P1 (25,5 °C) som bidrar mest i produksjonen av disse.



Figur 40: Biplot som viser hvordan prøvene ligger forhold til hverandre basert på graden av komponenter produsert ved de tre forskjellige temperaturene etter 168 timer. Følgende punkter er representert i plottet:

- P1 (18 °C) (mangler), ■ P2 (18 °C), ◆ P3 (18 °C), ▲ (blå trekant opp) P4 (18 °C), ▲ (gul trekant høyre) P1 (22 °C), ▲ (rosa trekant venstre) P2 (22 °C), ▲ (lilla trekant ned) P3 (22 °C), + P4 (22 °C), × P1 (25,5 °C), \* P2 (25,5 °C), ● P3 (25,5 °C) og ■ P4 (25,5 °C).

PCA-biplotanalyse for alle prøvene inkubert over 168 timer ved forskjellige temperaturer (18, 22 og 25,5 °C). Temperaturen innvirkning på dannelsen av flyktige komponenter som er produsert av gjærcellene er presentert i Figur 41. For prøvene inkubert ved 18 °C ligger de fleste prøvene nærmest nullpunktet, med unntak av to prøver. Det kan observeres en trend som viser at produksjon av aromatiske komponenter øker med temperaturen.



Figur 41: Biplot som viser prøveuttakene inkubert over forskjellige tider (24, 96 og 168 timer) ved tre forskjellige temperaturer og graden av flyktige stoffer produsert. Punktene er følgende: ● 18 °C, ■ 22°C, ◆ 25,5 °C

### 3.3.7 One-Way Anova

Det er utført en nullhypotese test med One-Way Anova der nullhypotesen er at produksjonen av flyktige komponenter er likt for de forskjellige prøvene.

Det er ikke uventet at p-verdien er lik 0 som er lavere med en signifikansverdien på 0,05. Det sier noe om at produksjonen av de forskjellige komponentene fra hver gjærceelle er ulik. Det er også utført en signikanstest for alle prøvene inkubert ved forskjellige temperaturer det bekrefter også at det er en forskjell mellom gjærprøvene med en p-verdi på 0,001. De statistiske analysene er lagt i vedlegg (Vedlegg 23-25). Det er også kjørt en Tuckey-test som viser hvilke prøver som er like eller ulike. Alle prøvene i vekstforsøket er testet for signifikans  $p \leq 0,05$ .

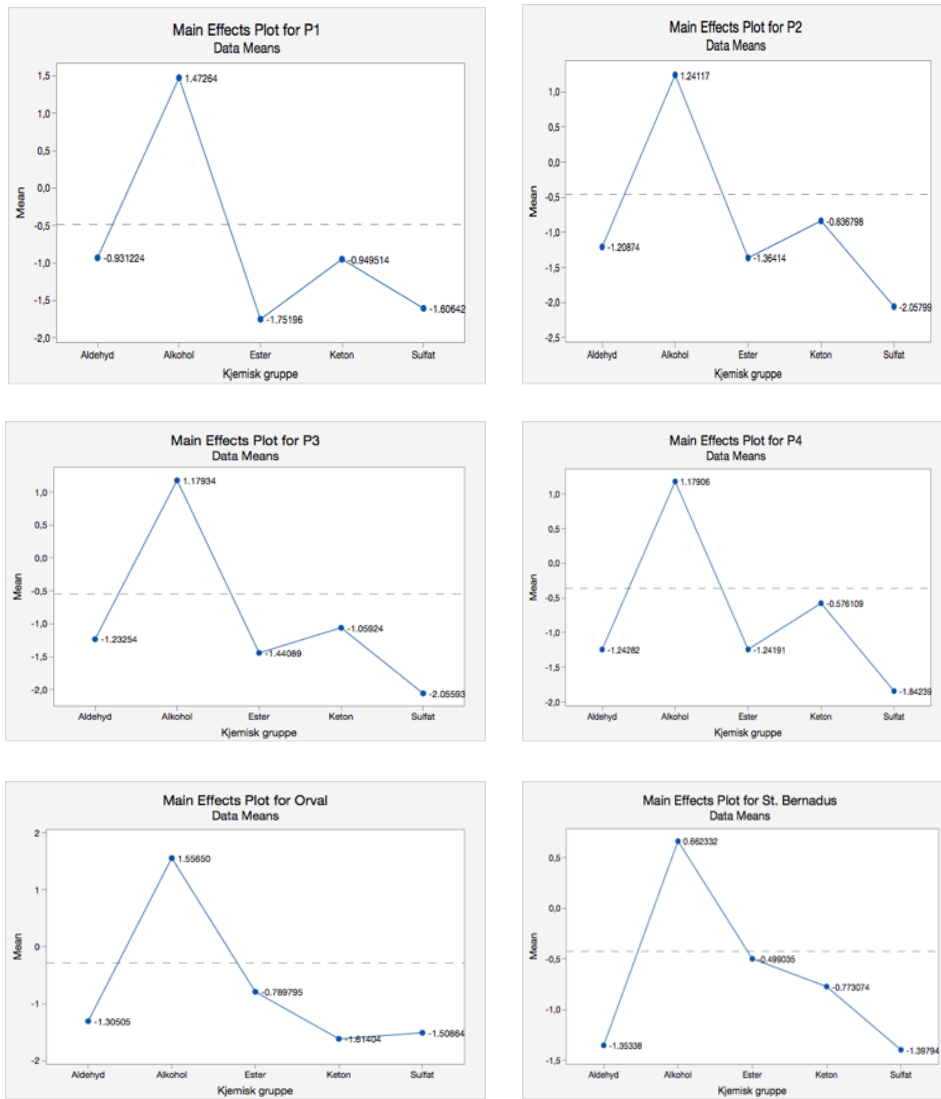
### **3.4 Del 2 – Produktsammenlikning (P1, P2, P3, P4 mot Orval og St. Bernadus)**

Ølet som er brygget med gjærstamme P1, P2, P3 og P4 er sammenliknet med hverandre og mot referanølene Orval og St. Bernadus.

#### **3.4.1 Hovedeffekt plot**

Denne delen viser en generell oversikt over gjennomsnittlige data basert på alle øltypene som sammenliknes med henholdsvis punkter for.

Figur 42 viser et Maineffekt plot for alle ølene som sammenliknes og gir en overordnet oversikt over de gjennomsnittlige logaritmiske verdiene for hver enkelt kjemisk gruppe (aldehyder, alkoholer, estere, ketoner og sulfater) som finnes i pilotbrygget øl samt de to innkjøpte referanseølene. Den eneste sulfatkomponenten som er målt i denne oppgaven er dimetylsulfid. P1 har gjennomsnittlig den høyeste forekomsten av alkoholer, men er lavest på estere. St. Bernadus inneholder høyest konsentrasjon av estere.

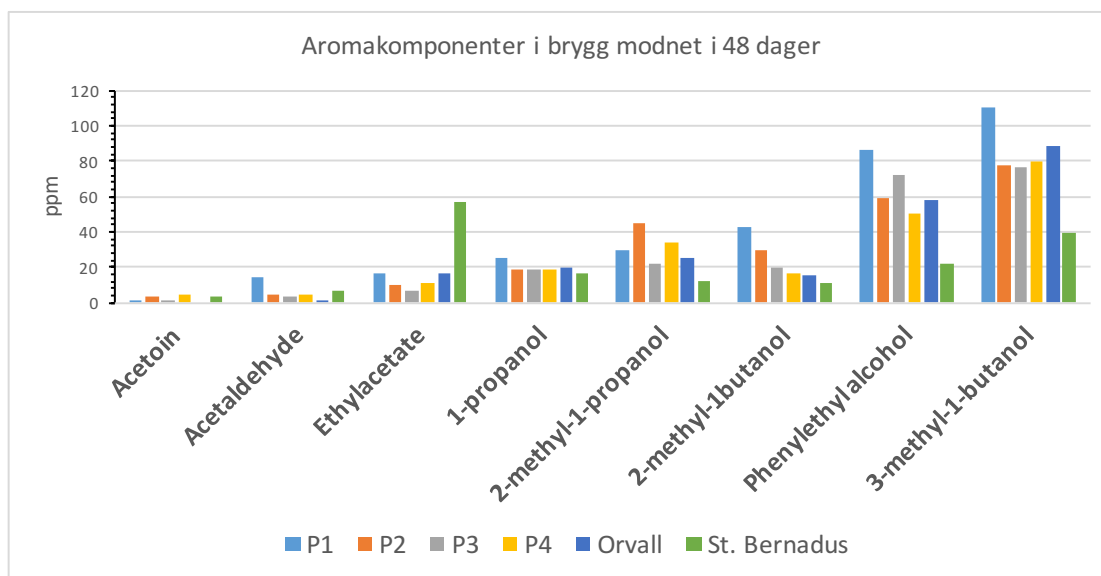


**Figur 42: Maineffektplottene viser gjennomsnittsverdier for kjemiske komponenter inndelt i aldehyder, alkoholer, estere, ketoner og dimethylsulfid i brygget øl, sammenliknet med referanseølene, Orval og St. Bernardus. Henholdsvis aldehyder, alkoholer, estere, ketoner og sulfater.**

### 3.4.2 Konsentrasjon av flyktige komponenter etter 48 dagers modning i pilotbrygget øl

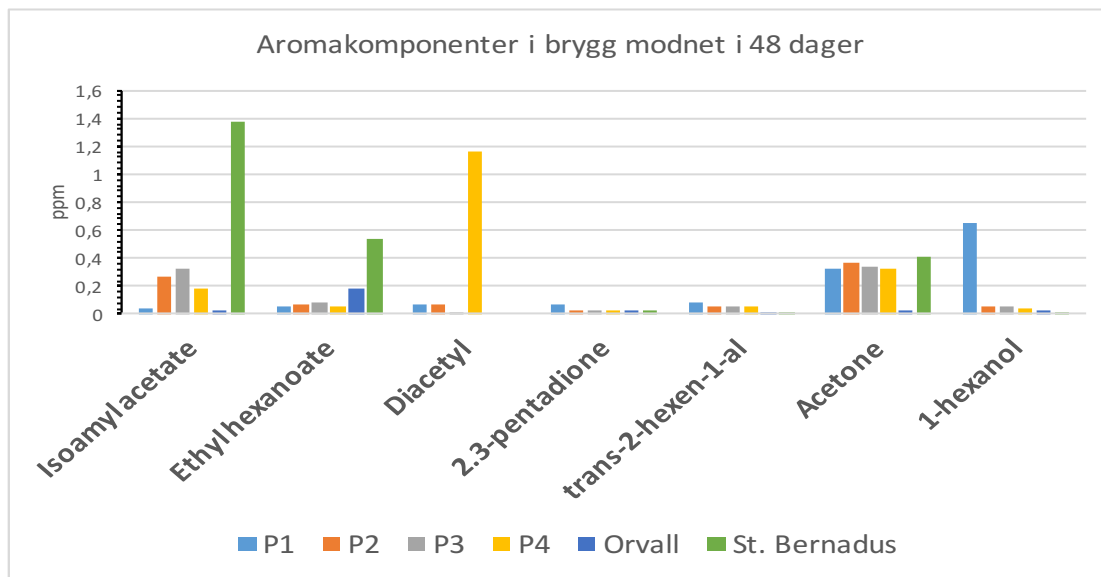
Konsentrasjonen av 27 forskjellige flyktige aromakomponenter er målt i de fire bryggene er presentert under fordelt over tre figurer: Figur 43 (del 1), 44 (del 2) og 45 (del 3). Gjennomsnittstall og prosentvis relativt standardavvik for å vise variasjonen mellom de forskjellige flaskete ølene er presentert i vedlegg (Vedlegg 19-22). For referanseølene ble disse kun målt en gang i HSGC-FID.

I Figur 43 kan det observeres at ølet brygget med gjærstamme P1 inneholder høyest konsentrasjon av acetaldehyd (14,73 ppm), 1-propanol (24,83 ppm), 2-metyl-1-butanol (42,32 ppm), fenyletyl alkohol (85,89 ppm) og 3-metyl-1-butanol (110,0 ppm). St. Bernadus inneholder høyeste etylacetat konsentrasjon på 56,57 ppm. P2 har den høyeste forekomsten av 2-metyl-1-propanol på 44,32 ppm.



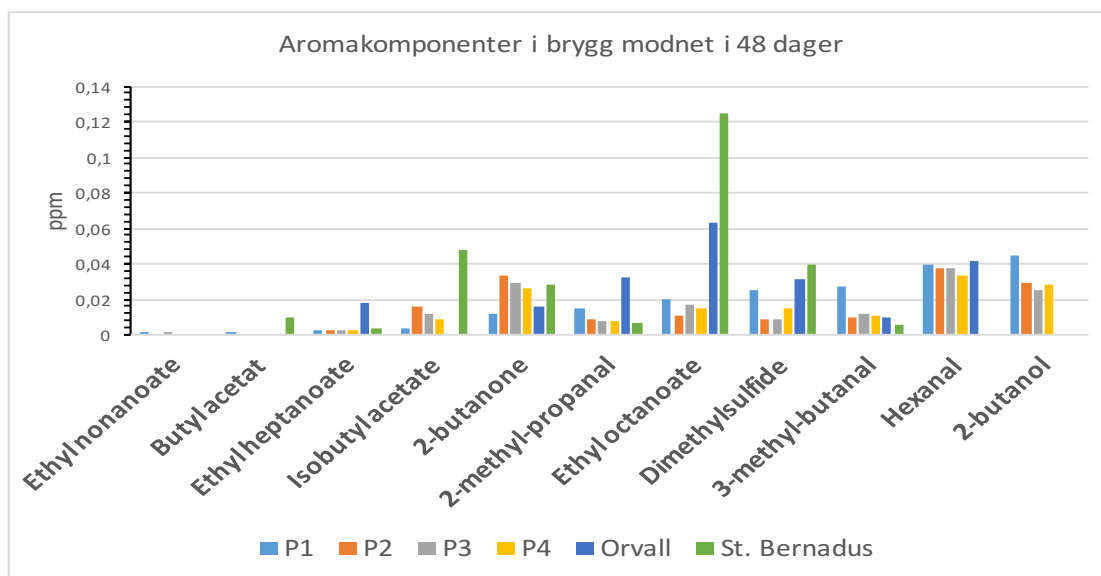
Figur 43: Aromaprofil for de seks øltypene som ble sammenliknet (del 1).

I Figur 44 kan der observere at St. Bernadus har høyest konsentrasjon av isoamyl acetate, etyl hexanoate og acetone med konsentrasjoner på henholdsvis 1,372, 0,544 og 0,40 ppm. Høyest forekomst av diacetyl finnes i P4 med en på 1,157 ppm.



Figur 44: Aromaprofil for de seks øltypene som ble sammenliknet (del 2).

For de resterende komponentene er de presentert i Figur 45. Høyest forekomst av butyl acetat (0,010 ppm), isobutyl acetat (0,048 ppm), etyl oktanoat (0,125 ppm) og dimetylsulfid (0,040 ppm) forekom i St. Bernadus ølet. Orvall inneholder den høyeste konsentrasjonen av etyl heptanoat (0,018 ppm) og 2-metyl-1-propanal (0,032 ppm). P1 inneholder mest 2-butanol med en konsentrasjon på 0,045 ppm.



Figur 45: Aromaprofil for de seks øltypene som ble sammenliknet med hverandre (del 3).

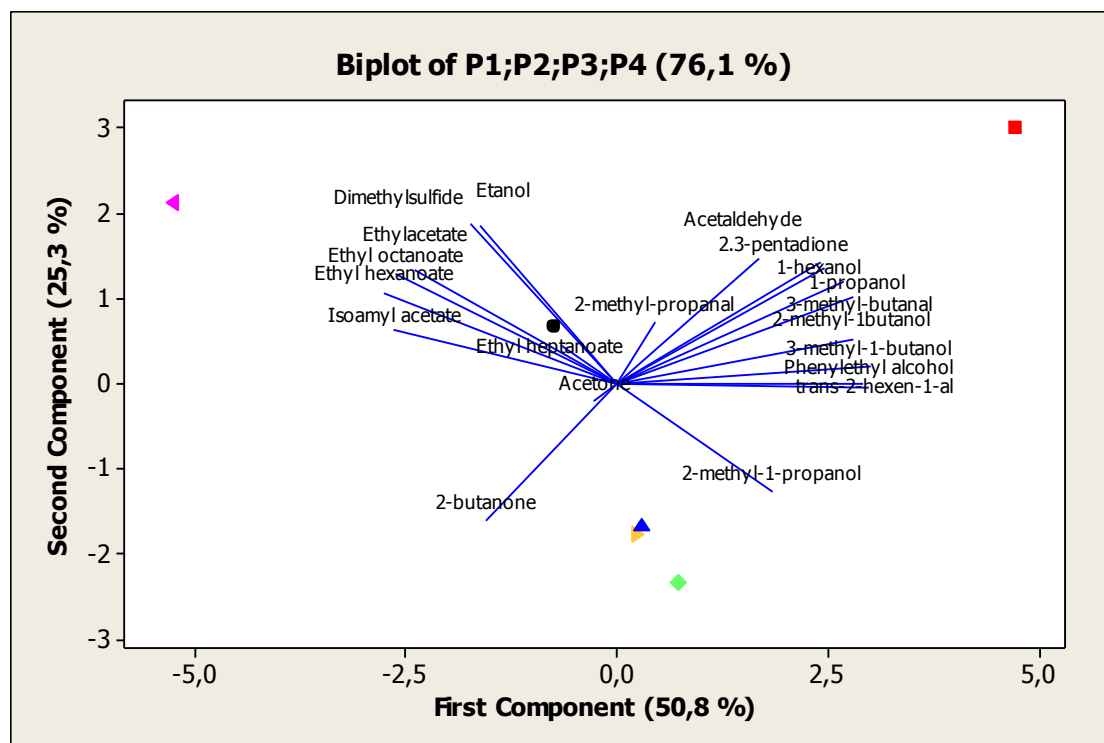


### 3.4.3 Principal Component Analysis av kjemiske komponenter og produkter i pilot og kommersielt øl

For å kunne sammenlikne bryggene laget med gjærstamme P1, P2, P3 og P4 mot de kommersielle produktene med en ønskelig smaks karakteristikk, Orval og St. Bernadus, måtte det fjernes en del komponenter som ble registrert, men som ikke ble detektert (n.d) for å gi et så likt sammenlikningsgrunnlag som mulig av

komponentene alle øltypene har til felles. Som nevnt over vil Minitab fjerne prøve hvis det mangler bare en enkelt komponent.

En sammenlikning av de 4 bryggene opp mot referanseølene er presentert Figur 46 som et PCA-biplott. Prinsipal komponent 1 og 2 forklarer 76,1 % av variasjonen i prøvematerialet.



Figur 46: Biplot som viser hvordan de seks ølene ligger i forhold til hverandre basert på de kjemiske attributtene gjærcellene har dannet etter modning i 48 dager. Følgende prøver er representert i plottet: ● Orval, ■ P1, ◆ grønn firkant P2, ▲ (trekant opp) P3, ▲ (trekant høyre) P4 og ▲ (trekant venstre) St. Bernadus.

### 3.4.4 One-Way Anova for 48 dagers modnet øl

Det er utført One-Way Anova på det ferdig modnete ølet. Testen er utført med en signifikanstest på  $p \leq 0,05$ . Alle de 28 aromatiske stoffene ble kjørt i Minitab for å gi

et bilde over likheter og ulikheter mellom øltypene jeg har brygget i denne oppgaven og referanseølene. Statistikken er lagt til som vedlegg (Vedlegg 26).

Sammenlikningen av ølene gav en p-verdi på 0,986 viser at det ikke er alt for store forskjeller mellom ølene etter 48 dagers modning i romtemperatur.

### 3.4.5 Målinger gjort av øl i Anton Paar

Tabell 17 gir en oversikt over parameterene til øl brygget i denne oppgaven og i kommersielt øl sammenliknet med hverandre.

Tabell 17: Oversikt over pH, CO<sub>2</sub>-konsentrasjon, Original gravity (OG), Final gravity (FG), utgjæring og alkoholinnhold.

Øltype	pH <sup>a</sup>	CO <sub>2</sub> (g/L)	OG <sup>b</sup>	FG	Tilsynelatende utgjæring	Alkohol (% v/v)
Orval Trappiste	4,03	-	-	-	-	6,90
St. Bernadus	4,52	-	-	-	-	10,00
P1 <sup>c</sup>	3,74	3,11 <sup>c</sup>	≈1,087	≈1,033	62,0 %	7,16
P2 <sup>d</sup>	4,29	3,58	≈1,087	≈1,052	40,2 %	4,67
P3 <sup>d</sup>	4,25	3,60	≈1,087	≈1,049	43,7 %	5,02
P4 <sup>d</sup>	4,13	3,78	≈1,087	≈1,049	43,7 %	4,96

<sup>a</sup> pH målt med digitalt lab pH-meter.

<sup>b</sup> Går ut ifra at OG er lik ved start da ølet er brygget på samme batch. Disse målingene ble gjort med refraktometer og er kun estimater på grunn av at sukkerinnholdet viste forskjellige konsentrasjoner ved forskjellige prøveuttak. Gjennomsnitt av flere prøver er tatt av endelig sukkerinnhold i vørteren

<sup>c</sup> P1 er kun målt fra 1 av to batcher da denne gjæren produserte for mye karbondioksid slik at ølet ikke kunne måles.

<sup>d</sup> Prøvene P2, P3 og P4 ble målt med 4 paralleller per batch slik at gjennomsnittet fra de to batchene ble regnet ut, med gjennomsnittlig standardavvik. Dette gjelder også for HSGC-FID prøvene.

## 4 Diskusjon

Å jobbe med levende mikroorganismer er komplisert og tidkrevende. Det er mange faktorer og variabler som påvirker resultatene. Som nevnt i introduksjonen har gjærcellene en begrenset gjenbrukstid og ved jevnlig ompoding med den samme cellekulturen kan det oppstå endringer i genuttrykk i gjærcellene som bidrar til en endring av gjærstammens ” aromaprofil”. Under forsøk som dette vil gjærcellene utsettes for stress, som påvirker cellene. Gjær er dynamiske levende mikroorganismer som er relativt følsomme for ytre påvirkning som temperatur, næringsbetingelser, oksygeninnhold og pH for å nevne noe. Når det utføres vekstforsøk med paralleller kan det forventes noen forskjeller mellom hvert gjentak. Gjærcellenes aromaprofil skal diskuteres med fokus på dannelsen av metabolitter. Det har blitt gjort målinger av metabolittene med hensyn til vekst ved ulike temperaturer over tid i en standard vørterløsning. Metabolittene som produseres eller dannes av gjærcellene påvirkes av celleveksten, sukkeromsetningen, pH- og temperatur. Det skal med denne oppgaven gjøres et forsøk på å gi et lite innblikk i gjærcellenes metabolisme med en sukkerkonsentrasjon på 16,2 °Plato, som kan anses som en øl med høy sukkerkonsentrasjon.

I denne diskusjonen blir det kun drøftet de kjemiske komponentene som anses for å være de største bidragsyterne til smak i øl. Derfor er det ikke hensiktsmessig å gå igjennom alle komponentene for sammenlikning. De viktigste sammenhengene er presentert i resultatdelen og vil bli diskutert her.

### 4.1 Vekstforsøk

#### 4.1.1 Cellevekst

For P1 kunne det observeres en tregere cellevekst enn for prøve P2, P3 og P4. Fra DNA-sekvenseringen ble denne gjærstammen identifisert som en *Brettanomyces* ssp. Og den trengte mer tid på å opparbeide et like høyt celletall som de andre gjærstammene. Den lavere veksthastighet og dens evne til å nå lavere spesifikk gravity (SG) gjør at denne stammen brukes til sekundærgjæring (Andrews and Gilliland, 1952).

Dette vil påvirke alle målingene som gjøres med denne stammen, da vekst og metabolisme henger sammen. Prøve P2 ble identifisert som en *Saccharomyces* ssp. som har en relativt lik veksthastighet som P3 og P4, og som er gjær fra henholdsvis WLP500 og WLP510, som også er *Saccharomyces* spp. For P1 var vekst og produksjon av metabolitter generelt lavere de 168 timene forsøket varte. P1 brukte en uke lenger på å oppnå fullstendig tellbare kolonier på petriskålene. Maksimalt log celletall og vekst ved 24 timer er diskutert videre for henholdsvis de fire prøvene.

For gjærstamme P1 lå det høyeste celletallet på henholdsvis 7,43, 7,61 og 7,63 log kde/mL etter 168 timer ved 18, 22 og 25,5 °C. Fra veksten ved de tre temperaturene observeres en noe høyere vekst for P1 ved 22 og 25,5 °C. Basert på celletallene kan det se ut som at P1 vokste raskere ved økende temperatur, men at celletallet var tilnærmet likt etter 168 timer. Det må nevnes at celletallene etter 168 timer hadde ett relativt høyt standardavvik på  $\pm 0,53$  log kde/mL ved 22 °C og  $\pm 1,45$  log kde/mL ved 25,5 °C, noe som kan anses som svært unøyaktige celletall i parallellene. De første 24 timene økte celletallet til P1 med henholdsvis 0,13, 0,49 og 0,95 log kde/mL ved 18, 22 og 25,5 °C.

For gjærstamme P2 nådde stammen en øvre cellekonsentrasjon på 7,91 log kde/mL etter 96 timer ved 18 °C og 7,96 log kde/mL og 7,92 log kde/mL etter 168 timer, ved 22 og 25,5 °C. De første 24 timene økte celletallene med henholdsvis celletall på 1,36, 1,89 og 2,01 log kde/mL ved 18, 22 og 25,5 °C.

Stamme P3 nådde et maksimalt celletall på 7,95 log kde/mL etter 96 timer og 7,86 log kde/mL etter 168 timer ved 18 °C. Det er noe høyere enn ved 22 og 25,5 °C for denne stammen. Et øvre celletall på henholdsvis 7,86 log kde/mL etter 168 timer ved 22 °C og 7,91 log kde/mL etter 168 timer ved 25,5 °C. For P3 kunne det observeres en økning i cellevekst på 0,99, 1,69 og 1,86 log kde/mL i løpet av de første 24 timene ved 18, 22 og 25,5 °C. Stamme P3 er en WLP500-gjær som har sin foretrukkede gjæringstemperatur ved 18-22 °C (White Labs, 2016b).

For gjærkultur P4 hadde disse prøvene sin topp etter 168 timer på henholdsvis 7,49, 7,63 og 7,63 log kde/mL ved 18, 22 og 25,5 °C. For gjærstamme P4 var det et likt

celletall etter 168 timer ved både 22 og 25,5 °C. Etter 24 timer økte celletallet med 1,14, 1,78 og 1,70 log kde/mL ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C. Stamme P4 er en WLP510-gjær som har sin optimum gjæringstemperatur ved 19-22 °C (White Labs, 2016c).

#### **4.1.2 Omsetning av sukker**

For de fire gjærstammene ble sukkeromsetningen målt med et refraktometer. Verdiene gir en indikasjon på sukkeromsetningen i løpet av fermenteringen i løpet av 168 timer. Ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C kunne det måles en reduksjon av sukkerkonsentrasjonen for P1 på 5,76, 21,5 og 32,4 %. For stamme P2 var disse verdiene på 29,9, 39,2 og 38,6 %. Gjærkultur P3 hadde en sukkeromsetning på henholdsvis 36,6, 38,5 og 38,3 %. Den siste gjærstammen, P4 omsatte 36,9, 40,9 og 39,4 % i løpet av 168 timer.

Sammenliknes omsetning av sukker for disse gjærcellene gjenspeiles den observerte celleveksten. Gjærstamme P2, P3 og P4 hadde en tilnærmet lik attenuasjon. På hjemmesiden til White Labs står det at P3 har en utgjæringsgrad på 75-80 % og P4 74-80 % under optimale forhold. Dette kan antyde at næringsmediumet ikke var optimalt eller at det burde blitt tilsatt mer en  $10^6$  celler/mL fra start av. En redusert mengde sukre i vørteren på grunn av Maillard-reaksjoner eller for høy temperatur under meskingen som gir redusert enzymaktivitet kan også være en av grunnene. For P4 skal stammen i utgangspunktet nå 50 % etter 48 timer (White Labs, 2016c).

#### **4.1.3 pH**

Reduksjon i pH kommer fra en rekke faktorer under celleveksten. Alle prøvene ble tilsatt en vørter med pH rundt 5. For de samtlige prøvene var slutt pH for P1 4,47, 4,09 og 3,99 ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C. For P2 ble pH målt til 4,35, 4,23 og 4,23 etter 168 timer ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C. For P3 var pH henholdsvis 4,30, 4,31 og 4,33 etter 168 dager og for P4 henholdsvis 4,21, 4,06 og 4,15 ved 18, 22 og 25,5 °C. Dette stemmer bra med forventet nedgang i pH for disse gjærstammene. Lea et al. (1995) nevner at acetaldehyd oksideres til acetat i løpet av fermenteringen som reduserer pH til rundt 3,5-4,0.

For gjærstamme P1 var dette den stammen som reduserte pH til den laveste verdien av de fire stammene. Henholdsvis ble pH redusert over 168 timer med 0,49, 0,87 og 0,97 pH enheter ved 18, 22 og 25,5 °C.

Til sammenlikning kunne det observeres en reduksjon i pH for P2 på 0,74, 0,74 og 0,76 i løpet av 96 timer, og en liten økning i pH etter 168 timer ved de ulike temperaturene. For stamme P3 ble pH med 0,75, 0,80 og 0,73 pH enheter etter 96 timer. Også her kan det observeres en liten pH økning mot slutten. Gjærkultur P4 hadde en reduksjon av pH på 0,72, 0,87 og 0,78 etter 168 timer ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C.

Denne utviklingen av pH under cellevekst er forventet og for gjærstammene P2, P3 og P4 var utviklingen relativt lik. P1 hadde den største reduksjonen av pH på 0,97 ved 25,5 °C

#### **4.1.4 CO<sub>2</sub>-produksjon**

Målingene av prøvene ble i utgangspunktet foretatt på 4 gjentak, men de to første ble forkastet på grunn av for stort prøvevolum benyttet. Det ble tilsatt 10 mL podet vorter i CO<sub>2</sub> måleflaskene noe som resulterte i at forseglingskorken sprakk grunnet av for stor CO<sub>2</sub>-produksjon. Ved det andre forsøket førte feil på nullstillingen av apparatet til at for lave verdier ble målt etter sammenlikning av standardgassen som ble brukt til å kontrollere CO<sub>2</sub>-analysatoren. Gjennomsnitt og standardavvik ble derfor kun beregnet for de to siste forsøkene. Denne metoden er kun semikvantitativ og det er stor usikkerhet i resultatene fordi det er vanskelig å ta ut nøyaktig prøvevolum fra flaskene ved høyt trykk, etterfulgt av rask nok injisering inn i systemet. I fremtidige oppgaver kan det anbefales å måle CO<sub>2</sub> med Anton Paar for å få mer nøyaktige resultater. Ulempen med dette er at det må lages større volum for å måle i Anton Paar. Anslagsvis kan disse målingene brukes som indikasjon på vekst og metabolisme i de fire forskjellige gjærstammene, men kan ikke brukes som nøyaktig mål for CO<sub>2</sub> produksjon hos gjærstammene. En forhøyet CO<sub>2</sub> produksjon reflekterer god anaerob metabolismeaktivitet i gjærcellene.

For stamme P1 økte produksjonen med  $28,4 \pm 1,34$ ,  $46,6 \pm 5,13$  og  $50,2 \pm 1,43$  g/L i løpet av 168 timer ved 18, 22 og 25,5 °C. Prøve P2 hadde høyest konsentrasjon etter

96 timer på  $47,47 \pm 13,82$ ,  $48,10 \pm 15,06$  og  $48,85 \pm 10,37$  g/L. En reduksjon i produsert i CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen etter 168 timer kunne observeres, men dette kan sannsynligvis skyldes usikkerheten med målingene. Målingene for stamme P3 ga en CO<sub>2</sub>-konsentrasjon etter 168 timer på  $46,44 \pm 9,90$  og  $47,00 \pm 5,071$  g/L ved henholdsvis 18 og 22 °C. For 25,5 °C var den høyeste målingen etter 96 timer på  $46,69 \pm 10,37$  g/L. Igjen skyldes nok dette usikkerheten i målingene. For gjærstamme P4 kunne det måles konsentrasjoner på henholdsvis  $49,61 \pm 10,67$ ,  $49,56 \pm 14,47$  og  $51,25 \pm 12,03$  g/L etter 168 timer ved henholdsvis 18, 22 og 25,5 °C.

#### 4.1.5 Etanolproduksjon

Det viktigste produktet fra metabolismen til gjær under anaerobe betingelser er etanol. Primærgjæringen skjer mellom 4 og 7 dager og etanolmålingene indikerer hvilke temperaturer som er optimale for hver stamme. Det er å forvente at etanolproduksjonen øker med tid og temperatur.

For P1 hadde prøvene sin høyeste etanolkonsentrasjon etter 168 timer. Ved 18 °C ble det målt en etanolkonsentrasjon på 6238 ppm, ved 22 °C, 23295 ppm og ved 25,5 °C 38255 ppm. Prøve P2 hadde den høyeste etanolkonsentrasjon etter 96 timer på 38539 ppm ved 18 °C. De resterende målingene gav høyeste verdier på 44790 ppm og 47376 ppm etter 168 timer ved 22 og 25,5 °C. For P3 kunne de høyeste konsentrasjonene observeres etter 168 timer. Henholdsvis viste målingene 432490 ppm, 44869 ppm og 45411 ppm ved 18, 22 og 25,5 °C. For P4 ble det etter 168 timer målt en alkoholkonsentrasjon på 38993 ppm og 43411 ppm ved 18 og 22 °C. For 25,5 °C ble den høyeste konsentrasjonen målt etter 96 timer på 44161 ppm.

Etanol og temperatur påvirker gjær på forskjellige måter (Casey et al., 1984). Casey et al. (1984) viser at etanol blir sakte men sikkert toksisk for vekst og levedyktighet ved høyere temperaturer. Etanolen senker optimum og maksimum temperatur for vekst hos gjær og høyere fermenteringstemperaturer reduserer den endelige etanolkonsentrasjonen i vørteren. Grunnen til denne inhibitoriske effekten er fordi etanol akkumulerer i cellen ved høyere temperaturer. Dette kan være en faktor som forklarer hvorfor gjærcellene har et relativt forskjellig vekstforløp ved 18, 22 og 25,5 °C og ender opp med ett tilnærmet likt celletall mot slutten av fermenteringen i denne

oppgaven. Det kan se ut som alkoholproduksjonen økte ved økt temperatur og økt cellevekst noe som er forventet. P1 har den laveste produksjonen som viser en sammenheng med treg cellevekst, lav CO<sub>2</sub>-produksjon og lav sukkeromsetning.

#### 4.1.6 Produksjon av flyktige komponenter

Det kan nevnes at for prøvene P2, P3 og P4 kunne det som regel observeres størst produksjon av de 28 flyktige stoffene etter 24 timer. For gjærstamme P1 ble de kun målt små mengder etter 96 timer. En sammenlikning mellom så mange komponenter kan fort bli uoversiktlig. Det anbefales derfor å se på figurene i resultatdelen som viser aromaprofilen grafisk, for å lettere å se hvilke aromatiske komponenter hver enkelt gjærstamme produserer mye av.

Biprodukter som stammer fra metabolismen til gjærceller påvirker smak og aroma i øl og vil bestemme kvaliteten på det ferdige ølet (Pires et al., 2014), i tillegg til tilsatte ingredienser som malt og humle. Det ble gjort målinger med fire forskjellige prøvetidsuttak og ved tre forskjellige temperaturer. Ester og høyere alkoholer øker i produksjon ved høyere temperaturer (Casey et al., 1984). Det er å forvente at temperatur har noe å si på de helt sentrale komponentene. Det innebærer at i denne oppgaven skal det kun diskuteres helt sentrale aromastoffer som påvirker smaken i ølet. Det ble målt til sammen 28 komponenter i tillegg til etanol.

Flere av målingene var veldig lave eller ble ikke detektert ved HSGC-FID.

Produksjonen av flyktige komponenter er en følsom prosess for gjærcellene og ujevn ompodning mellom forsøkene kan endre konsentrasjonen på sluttproduktet.

Eksempelvis så Gibson et al. (2015) på 14 stammer fra *S. pastorianus* stammer og her ble det observert en forskjell på diacetyl-produksjonen mellom to av stammene.

Konsentrasjonen varierte mellom to stammer med henholdsvis 1,65 ppm og 0,19 ppm, til tross for helt like betingelser (Gibson et al., 2015). Dette er en indikasjon på at når det jobbes med levende materiale, er det å forvente en viss variasjon. Dette kan skyldes flere faktorer. En mulig feilkilde kan være overføring av podet gjærkultur hvor dette skjedde ved 10 ganger risting for innblanding, etterfulgt av overføring fra 500 mL flaske til 50 mL flasker. Flokkulering av gjærceller kan bidra til at celledallet varierer såpass mye i hver enkelt prøve. Ser man på nullprøvene sammenfaller de



ganske bra, dette til tross for at bruk av et manuelt tellekammer ikke tar høyde for døde gjærceller, slik at celletallet kan variere noe allerede fra start. Celletallet er oppgitt fra petriskåler med  $20 <$  og  $>200$  kolonier per skål, men celletallene varierte og for noen prøver var det under 20 kolonier per skål.

I henhold til Abbott et al. (2005) viste de at *Saccharomyces* gjær vokser raskere enn *Brettanomyces* gjær ved en rekke betingelser i en batch-prosess. *Brettanomyces* spp. er kjent for evnen til å produsere eddiksyre (Abbott et al., 2005), som kanskje er en faktor som kan forklare den lave pH målt etter 168 timers fermentering og etter 48 dagers modning av øl, spesielt for P1. Det er heller ikke mulig å utelukke at det kan forekomme bakterier i prøvene da gjærcellene ikke ble tatt ut fra frys mellom hvert forsøk. Abbott et al. (2005) viste også at når sukkerkonsentrasjonen ble redusert over tid, økte eddiksyreproduksjonen. Etter ca. 50 timer viste de at eddiksyrekonsentrasjonen økte fordi sukkerinnholdet da var redusert.

Eddiksyrekonsentrasjonen økte også ved økt oksygeninnhold. Som nevnt i introduksjonen er *Brettanomyces claussenii* følsomme for tilstedeværelse av oksygen og ved hvilende celler fermenterte glukose ved en høyere hastighet under aerobe forhold enn ved anaerobe forhold (Aguilar Uscanga et al., 2003). *Saccharomyces* gjær vokser raskere enn *Brettanomyces*, men *Brettanomyces* spp. når celletall opp imot  $10^9$  celler/mL som er 8-10 ganger flere celler (Abbott et al., 2005).

Når det gjelder oksygeninnholdet i prøvene, burde dette sannsynligvis blitt utført på en bedre og mer nøyaktig måte. Usikkerheten med å tilsette 40 mL podet vørter til en 50 mL flaske kan bidra til at tomrommet imellom vørteren og korken kan gi forskjellig oksygenkonsentrasjon i prøvene. Alle prøvene ble ristet opp og ned 10 ganger i et forsøk på å gjøre innblandingen av oksygen så homogen som mulig. Problemet dersom det er for mye oksygen tilstede bidrar det til at etanol enkelt omdannes til acetaldehyd (Vanderhaegen et al., 2007). Dette har bidratt til at de fleste kommersielle øl-produsentene flasker ølet med et oksygeninnhold på  $<0,2$  mg/L, som er viktig under lagring. Ser man på acetaldehydinnholdet etter 168 timer for de fire gjærstammene inneholder P1 mest acetaldehyd med  $25,5$  °C på 4,28 ppm og P2 høyest ved  $22$  °C med en verdi på 6,92 ppm. For gjærstammene P3 og P4 produserte de mest acetaldehyd ved  $18$  °C, med henholdsvis 18,05 ppm og 9,54 ppm. Det ser ut

som at konsentrasjonen med acetaldehyd øker betraktelig de første 24 timene for alle gjærcellene. Variasjonen mellom temperaturparallelene påvirkes sannsynligvis mest av temperatur og vekst, men oksygeninnholdet i prøven bidrar sannsynligvis noe.

Vicinale diketoner (VDK), diacetyl og pentandioner gir som nevnt smør eller honningaktig smaks karakteristikk som er uønsket i øl. Dimetyl sulfid (DMS) kan være en del av smaksbildet i lys øl. Noe av DMS-konsentrasjonen som kan forekomme i øl kommer fra varmedegradering av komponenter som stammer fra maltet. Noen gjærstammer kan redusere DMS fra malt (Bokulich and Bamforth, 2013). Konsentrasjon av DMS i mine prøver var lave. Høyeste konsentrasjonen var på 0,005 ppm og ble målt fra P4 etter 96 timer ved 18 °C. Sluttkonsentrasjonen ligger generelt på 0,001 ppm for alle prøvene. Dette er under terskelverdi (0,033 ppm) på smak for alle prøvene etter 168 timer. For videre diskusjon av flyktige stoffer gjøres dette i sammenheng med prinsippal komponent analyse.

## **4.2 Principal Component analyse (PCA)**

I PCA-biplotet som viser variansen mellom prøvene og aromakomponentene produsert etter 96 og 168 timer ser en at komponentene dannet etter 96 timer forklarer 73,3 % av variansen til prøvene og etter 168 timer forklares 70,8 % av variansen.

### **4.2.1 Sammenlikning av flyktige komponenter etter 96 timer**

Etter 96 timer kunne det observeres i PCA-biplotet at prøvene P2 (22°C) og P3 (22 °C) var relativt like og hadde høy produksjon av komponentene 2-metyl butanol, fenyletyl alkohol, isobutyl acetat og trans 2 hexenal. P3 lå noe høyere på produksjon av etylacetat enn P2. De to prøvene hadde relativt lik plassering i plottet i forhold til hverandre når det gjelder lik varians av produserte aromakomponenter. P3 (25,5°C) ligger noe lenger i negativretning i plottet i PC1, men høyere i PC2.

På den andre siden av plottet finner man stamme P1 (25,5 °C). Denne stammen har en høy produksjon av 2 butanol og etylacetate ved denne temperaturen. Stammen hadde en større forekomst av etyl heptanoat, 3-metylbutanal og 2 metyl-propanal, enn for de

resterende prøvene. Prøve P2 (25,5 °C) hadde en tilnærmet lik produksjon av komponenter som P3 (22 °C) og P4 (22 °C), men produserte mer etyl acetat. P2 (25,5°C) hadde en lavere forekomst av 2-butanone, etyl hexanoate, aceton, acetaldehyd enn P2 (18 °C) og P3 (18 °C) som lå i motsatt negativ retning på PC2-aksen forhold til P2 (25,5 °C)

P4 (25,5 °C) ligger så og si midt i nullpunktområdet (PC1 og PC2 er lik 0) til PC1 og PC2 for alle komponentene. P4 (22 °C) er tilnærmet lik men trekker noe i negativretning for PC1 mot 2 butanol, etyl heptanoat og 3-methyl butanal og etylacetat.

For de tre prøvene P2, P3 og P4 inkubert ved 18 °C lå disse likt på akse PC2 og etter hverandre i negativ retning på akse PC1. P2 (18°C) hadde en høyere forekomst av acetoin, acetaldehyd, aceton og etyl hexanoat enn de to andre. P3 (18°C) ligger nærme nullpunktet for PC1 og har en høy produksjon på komponenter som acetoin, 2,3-pentadione og diacetyl. P4 (18°C) ligger i negativ retning på PC1-aksen og inneholder kanskje den største konsentrasjonen diacetyl, etyl nonanat og etyl oktanoat.

#### **4.2.2 Sammenlikning av flyktige komponenter etter 168 timer.**

Etter 168 timer ser fordelingen noe annerledes ut for de enkelte prøvene basert på variansen av aromakomponentanalysen. Det må nevnes at her endrer beliggenheten for komponentene seg etter endringer i konsentrasjonen for hver enkelt stamme.

P2 (18 °C) og P3 (22 °C) ligger nærmest nullpunktet i begge akser, men den sistnevnte hadde en noe mer negativ varians på PC2-aksen. P2 (18 °C) er mest nøytral, men heller mot aceton, acetoin og acetaldehyd som de viktigste faktorene. P3 (22 °C) har den sterkeste helningen mot acetaldehyd og acetoin.

Stamme P3 (25,5 °C) og P4 (25,5 °C) forflyttet seg nærere hverandre og P3 (25,5 °C) ble forflyttet nærmere nullpunktet for alle komponentene. Disse ligger veldig nærme hverandre, men P4 (25,5 °C) er noe nærmere null. Det kan indikere at P4 (25,5) holder seg ganske stabil i uttrykket av aromastoffer men øker noe når det gjelder økt

konsentrasjon av høyere alkoholer som fenyletylalkohol og 1-propanol for å nevne noen viktige komponenter. P3 (25,5) forflyttes fra en høy produksjon av etylacetat og 2-metyl-1-propanol og isobutyl acetat etter 96 timer og reduserer konsentrasjonen av disse komponentene etter 168 timer. De to prøvene trekker sterkt mot en høyere konsentrasjon av acetoin, etyl hexanoat, aceton, 2- butanon, 1-hexanol, trans-2-hexenal og isoamyl acetate. For prøve P2 (22 °C) og P2 (25,5 °C) trekker de sterk i positiv retning for begge aksene (PC1 og PC2). De har en høy forekomst av 2-metyl propanol, to metyl propanol, Isobutyl acetat, 1-propanol, fenyletyl alkohol, 3 metyl butanol, hexanal, isoamyl acetate. P2 (25,5 °C) hadde en høyere forekomst av disse to. Det innebærer at de begge øker konsentrasjonen av 2-metyl-1-propanol, 2-metyl-1butanol og isobutylacetat og 1-propanol etter 168 timer. Det kan se ut som konsentrasjonen av etylacetat reduseres for disse prøvene.

P4 (18 °C) hadde høyest forekomst av etyl nonanoat, etyl heptanoat og 2,3-pentadion. For P3 (18 °C) var denne prøven mest negativ i aksene PC1 og PC2 og hadde en høy forekomst av etyl nonanoat etyl heptanoat og acetaldehyd. På den andre siden av plottet i negativ retning på PC1 aksene ligger P1 (22 °C) og P1 (25,5 °C). Denne stammen produserer minimalt med ønskelige alkoholer. De begge står for en sterk produksjon av 2-butanol, 2 metyl propanal og etylacetat og 3-metyl butanal.

Om man ser på biplottene etter 96 og 168 timer kan man se en klar trend for de forskjellige temperaturene. For stamme P1 er dette annerledes da den produserer en stor mengde 2-butanol og etyl acetat. Sammenliknes alle prøvene etter 96 timer og 168 timer er trenden den at P2, P3 og P4 går i positiv retning av PC 1 og PC2 aksene ved økt temperatur. Blant de aromatiske komponentene som øker med temperaturen i denne retningen, kan det observeres at mesteparten av høyere alkoholer som er viktig for smak forekommer. Disse er: 2-metyl-1-propanol, 2-metyl 1-butanol-1propanol, fenyletyl alkohol og 3-metyl-1-butanol. Av esterene som øker i konsentrasjon i denne retningen finner man isobutylacetate og isoamylacetat (i noe mindre grad). Prøvene som er inkubert ved 18 °C ligger plasser i nedre sjiktet for PC2-aksene etter 96 timer og 168 timer. Ett unntak er prøve P2 (18 °C) som etter 196 timer ligger nærmere prøvene inkubert ved høyere temperaturer, men de ligger høyere på aksene enn P3 (22 °C), som er nærmest nullpunktet ved etter 168 timer. P3 (18 °C) og P4 (18) har i

motsetning til de prøvene som ble inkubert ved høyere temperaturer en høyere forekomst av etyl nonanate, etyl heptanoate, 2,3-pentandion, diacetyl og acetaldehyd. P4 (25,5 °C) og P3 (25,5 °C) har en relativt nøytral aromaprofil, og heller mot viktige estere som etyl hexanoate og isoamyl acetate, men disse har også en forekomst av acetoin, acetone og 2-butanon som kan være uønsket i øl i for store mengder.

Etter 168 timer kan det konkluderes med at plottet indikerer at jo høyere temperatur desto høyere er forekomsten av viktige smakskomponenter som 2-metyl-propanal, 2-metyl butanol, isobutyl acetate, 1-propanol, fenyletyl alkohol og 3-metyl-1-butanol. P2 (22°C) og P2 (25 °C) hadde den høyeste forekomsten av disse alkoholene og esterene. For P4 (25,5 °C), P3 (25,5 °C), P3 (22 °C) og P2 (18 °C) lå de samlet og hadde en høyere ester-produksjon, men en noe svakere alkoholproduksjon. Esterne som i større grad påvirker variansen er etyl heptanoat, etyl nonanat og det var også en høyere forekomst av etyl oktanoat.

P4 (18 °C) og P3 (18 °C) hadde den høyeste forekomsten av etyl heptanoat og etyl nonanoat og acetaldehyd. Diacetylkonsentrasjonen var høyest for P4 (18 °C) og P1 (22 °C). Det kan se ut som acetaldehydkonsentrasjonen øker når temperaturen reduseres til 18°C.

PCA-biplotet som viser temperaturens innvirkning alene på variansen av de kjemiske komponentene produsert, viser en trend. Prøvene som er inkubert ved 22 og 25,5 °C ligger i ytterpunktene i plottet lengst fra nullpunktet til PC1 og PC2. Det kan observeres to unntak ved 18 °C. Ved denne temperaturen er det en høy forekomst av 2-metyl-propanal, 3-metyl-butanol og 2-metyl butanol. Dette blir kun en indikasjon på hvordan temperatur påvirker totalt sett.

### **4.2.3 PCA-analyse for ferdigbrygget øl**

*Saccharomyces* gjær vokser raskere enn *Brettanomyces*, men *Brettanomyces* spp. når celledtall opp imot  $10^9$  celler/mL som er 8-10 ganger flere celler enn for *Saccharomyces* gjær (Abbott et al., 2005). Det kan forklare resultatene av målingene gjort av bryggene som modnet i 48 dager. Ølet som inneholdt P1 hadde en overproduksjon av karbondioksid, slik at prøvene måtte forkastes. Prøven med P1

hadde også den laveste SG og høyest alkoholprosent på 7,16 % (v/v) etter målinger i Anton Paar. De tre resterende bryggene laget med stamme P2, P3 og P4 viste en tilnærmet lik SG og alkoholprosent med hverandre. Henholdsvis inneholdt ølet brygget på de tre gjærstammene en alkoholprosent på 4,67, 5,02 og 4,96 % (v/v). Utgjæringsprosenten for de fire gjærstammene var på henholdsvis 62,0 %, 40,2 %, 43,7 % og 43,7%.

Variansen for de kjemiske aromakomponentene dannet i de 6 øltypene som sammenliknes forklares med 76,1 %.

St. Bernadus inneholdt i sterk grad komponenter som dimetyl sulfid, etylacetat, etyl oktanoat, etyl hexanoat, isoamyl acetat, etyl heptanoat. Prøven ligger i koordinatene (-5, 2.2) i plottet og er den øltypen som inneholder høyest ester konsentrasjon. Dette kan forventes da dette er en belgisk øl med mye smak. Orval ligger nærme null for PC1 og PC2, men trekker mer mot St. Bernadus enn de andre bryggene. Ølet brygget i denne masteroppgaven som inneholdt gjærstamme P2, P3 og P4 var relativt like. P3 og P4 ligger oppå hverandre i plottet med høy forekomst av 2 butanon og 2-metyl propanol. P3 og P4 var mest like i aromaprofil da de ligger på hverandre. P2 hadde et noe høyere innhold av 2 metyl propanol som er en viktig komponent på smak. Ingen av disse hadde høy forekomst av estere. Øl brygget med P1 hadde et høyt innhold av andre høyere alkoholer, acetaldehyd og 2,3 pentadion, samt fenyletyl alkohol. P1 har koordinatene (5, 3) og har motsatt beliggenhet i forhold til St. Bernadus.

P3 (WLP500) er en gjærstamme som har sin foretrukket gjæringstemperatur ved 18 til 22 °C. Gjærstammen produserer distinkte noter av frukt og plumme (White Labs, 2016b). P4 (WLP510) er en gjærstamme som gir et tørt øl med en svak syreprofil i slutten. Denne gjærstammen gir en renere fermentering enn WLP500. De to gjærstammene passer godt til brygging av belgisk øl typ dobbel og triple (White Labs, 2016c). De to gjærstammene ligger som nevnt nærme hverandre i biplottet som kan indikere indikerer at de er like i aromaprofilen. P3 produserer høyere konsentrasjoner av 2-metyl-1-propanol som gir en smak av fruktighet samt en vinaktig og whiskeyaktig smak i ølet. Denne gjærstammen produserer også fenyletyl alkohol, transhexenal og 3-metyl-1-butanol i større grad enn P3 og P4. Både P1 og P2 er gjær

som er tilsatt flasken ved tapping. Dette er sannsynligvis grunnen til at P1 og P2 er ekstreme på noen komponenter både etter 168 timer fermentering og etter modning i 48 dager. P3 og P4 er stammer som brukes som hovedgjær.

### 4.3 Flyktige komponenter generelt

Til tross for den lave konsentrasjonen av estere i øl er disse ekstremt viktige for selve smaksprofilen til ølet (Verstrepen et al., 2003). Esterkonsentrasjonen i vanlig øl varierer: Etyl hexanoat (0,1-0,5 ppm), etyl oktanoat (0,9-1,0 ppm), isoamyl acetat (0,3-3,8 ppm) og isobutyl acetat (0,01-0,25 ppm) (Fushiki, 2002). De mest smaksaktive esterene i øl, som er mest relevant for denne oppgave er isoamyl acetat, etyl hexanoat og etyl oktanoat. Det er kun isoamyl acetat som alene forekommer over terskelverdien for smak. Flere estere i små konsentrasjoner derimot gir en synergistisk effekt på smak og bidrar til spesifikke smaker.

For høyere alkoholer vil det som regel også forekomme under terskelverdien for smak, men har som esterene en synergistisk effekt og bidrar hovedsakelig til aroma på fermentert vørter. Det frie amino nitrogen (FAN) innholdet er viktig for dannelsen av høyere alkoholer. Estere er muligens den viktigste smaksaktive komponenten i øl og hovedkomponentene av de flyktige stoffene er etylacetat, isoamyl acetat for å nevne noen. To faktorer er viktig for isoamyl acetate og etyl acetate syntesen og det er konsentrasjonen av etanol og acetyl-CoA og total enzymatisk aktivitet (Coghe et al., 2005). Det forklarer den jevne økningen over tid av konsentrasjon for disse komponentene i vekstforsøket mitt. En forhøyet esterdannelse kunne observeres for alle de fire gjærstammene over tid.

Vørter som inneholder høy gravity og bidrar til en overproduksjon av acetat estere og konsentrasjonen av disse esterene kan være 75 % høyere ved 20 °Plato enn for en 12 P vørter. En økning av temperatur, tilsetning av fettsyrer, nitrogen og oksygen bidrar til estersyntese fordi konsentrasjonen av acetyl CoA bidrar til å øke konsentrasjonen.

Vestrepen et al. (2003) henviser til forskning som viser at supplementering av 3-metyl butanol i øl med forskjellig sukkerinnhold bidro til økt produksjon av isoamyl acetat. Tilgjengelige fusel alkoholer påvirker produksjonen av estere. Høyt innhold av oksygen og umettede fettsyrer reduserer esterproduksjonen. Ved høy gravity brygging

er det en overproduksjon av acetate estere, som bidrar til at øl danner smaker av fruktighet og løsemiddel.

Dersom temperaturen også øker fra 10 til 25 °C vil det føre til økt esterproduksjon, da det er blitt påvist at esterproduksjon påvirkes av temperatur.

Høyere alkoholproduksjon er også temperaturavhengig, og dette kan påvirke esterproduksjonen fordi fusel alkoholer blir mer tilgjengelig (Verstrepen et al., 2003). Eksempelvis kan det se ut som dette stemmer da konsentrasjonen til fenyletyl alkohol og 1-propanol øker betraktelig i løpet av tidsforløpet på 168 timer. Det samme gjelder for isobutyl acetat og etyl oktanoat konsentrasjonen som øker de første 96 timene i celleveksten.

Når det gjelder påvirkning av mørkt spesialmalt på fermenteringen er dette beskrevet av Coghe et al. (2005). I denne oppgaven er det brukt spesial amber malt (125EBC) Ingrediensene som er brukt i denne oppgaven vil derfor påvirke aromaprofilen og påvirke gjærcellene. Dette er viktig å se på for å forstå sammenhengen mellom komposisjon av råvarene og gjærstammen. Tilsetning av mørkt malt bidrar til å redusere attenuasjon fordi det gir et lavere sukkerinnhold og aminosyrer i vørteren. En annen grunn til reduksjon av attenuasjon er den inhiberende effekten som Maillard-produkter har på metabolismen til gjærceller. Mørkt malt kan også gi dårlig fermentering på grunn av en toksisk effekt fra Maillardkomponenter. Vanderhaegen et al. (2007) konkluderte med at for å øke stabiliteten på smak i øl med høy alkoholprosent og mørk farge, er det viktig å unngå å bruke for høy varme under vørterkokingen i bryggeprosessen.

Graden av etyl acetat som forekommer i øl går hånd i hånd med graden av farge ølet har og videre påvirkning av isoamyl acetatkonsentrasjonen ved bruken av røstet malt. Maillard-reaksjonen er reaksjoner mellom aminogruupper og reduserende sukker og gir et lavere innhold av fermenterbart sukker og tilgjengelige aminogruupper. Det påvirker dannelsen av fuselalkoholer, VDKer og estere negativt (Coghe et al., 2005). I vekstforsøket som ble utført i denne oppgaven kan det observeres en økning av diacetyl og 2,3-pentandion i de første 24 timene i fermenteringen, men etter 168 timer er konsentrasjonen generelt lavere enn før fermenteringsoppstart. Det ble vist av



Coghe et al. (2005) at innholdet av vicinale diketonenr som diacetyl og 2,3-pentandion økte med ølfarge, men konsentrasjonen var mindre i det endelige ølet enn i vørteren. Varmebehandling av malt og vørter bidrar til dannelsen av disse komponentene, mens under fermenteringen er dette et indirekte produkt fra metabolismen til gjær. Gjær kan enzymatisk redusere diacetyl til acetoin og videre til 2, 3 pentadion og 2, 3 pentanediol (Coghe et al., 2005). Vørteren som ble laget til vekstforsøket i denne oppgaven ble autoklavert. Det vil si at vørteren ble utsatt for høy varme (120°C) i 1,5 timer. Autoklaveringen har sannsynligvis påvirket komposisjonen i vørteren og påvirket aromaprofilen i dette forsøket, ved at viktige næringsstoffer forsvinner i Maillard-reaksjonene.

For å nevne noen av de flyktige stoffene funnet i oppgaven presenteres de ytteligere videre i teksten. Disse er vanlige aromakomponenter som bidrar til smak og aroma på forskjellige måter.

#### **4.3.1 Isobutyl acetat**

Isobutylkonsentrasjonen økte jevnt over de 168 timene for P1 og hadde sin høyeste konsentrasjon ved 25,5 °C og målte 0,0025 ppm. Den laveste målingen ble gjort for 22 °C med en konsentrasjon på 0,00175 ppm. For P2 kunne det observeres høyest konsentrasjon etter 168 timer, 22 °C på 0,0126 ppm. Laveste konsentrasjonen ble målt ved 18 °C på 0,0045 ppm. For stamme P3 nådde stammen høyeste konsentrasjon etter 168 timer, 18 °C på 0,0057 ppm. Da kunne det observeres at høyest konsentrasjon ble målt ved 18 °C på 0,00575 ppm. Vørteren podet med P4 hadde den høyeste konsentrasjonen etter 168 time ved 22 °C på 0,008 ppm. Laveste konsentrasjon ble målt ved 18 °C på 0,00525 ppm. Terskelverdien for smak av denne komponenten er 1,6 ppm og bidrar med smaker og aroma som banan, søthet, fruktighet, pære, eterisk og ananas. Den forventede konsentrasjonen som normalt finnes i brygg er 0,01-0,25 ppm.

#### **4.3.2 Etyl hexanoat**

Gjær P1 viste en gradvis økning over 168 timer inkubering. Den høyeste verdien ble målt etter 168 timer ved 25,5 °C og laveste ved 18 °C på henholdsvis 0,019 og 0,005 ppm. P2 hadde etter 168 timer, 18 °C sin høyeste konsentrasjon på 0,044 ppm.

Laveste konsentrasjon var ved 25,5 °C og 168 timer med en konsentrasjon på 0,034 ppm. P3 hadde en betraktelig høyere konsentrasjon ved 168 timer ved 18 °C på 0,0597 ppm mot den laveste konsentrasjonen på 0,0315 ppm ved 22 °C som er en liten reduksjon fra 96 timer. For stamme P4 ble den høyeste konsentrasjonen målt ved 22°C etter 168 timer med en konsentrasjon på 0,059 ppm. Ved 25,5 °C var konsentrasjonen noe lavere og ble målt til 0,046 ppm. Terskelverdien for etyl hexanoat er på 0,21 ppm og gir en smak av epler, banan, ananas, vin, fruktighet, anisfrø, sødme. Forventet konsentrasjon i øl er 0,1-0,5 ppm.

### **4.3.3 Etyl oktanoat**

Gjær P1 hadde en gradvis økning over 168 timer inkubering. Etter 168 timer var etyl oktanoate konsentrasjonen tilnærmet lik ved 22 og 25,5 °C på henholdsvis 0,02 og 0,019 ppm. Stamme P2 produserte en relativt lik konsentrasjon etyl oktanoate P3 på henholdsvis 0,007 og 0,0082 ppm etter 168 timer ved 25 °C. Gjærstammen P4 hadde den nest høyeste konsentrasjonen ved 25,5 °C etter 168 timer på 0,014 ppm.

For stamme P3 kunne det registreres en høy måling ved 18 °C etter 168 timer på 0,0137 ppm mot den laveste på 0,0067 ppm ved 22 °C. Etyl oktanoate har en terskelverdi på 0,9-1,0 ppm og gir en aroma av aprikos, epler, pære, blomster, ananas, vin, anisfrø, sødme og fruktighet. Konsentrasjonen som forventes å finne i øl ligger på mellom 0,04-0,53 ppm.

### **4.3.4 2-metyl-1-propanol**

Konsentrasjonen av 2-metyl-1-propanol økte generelt over tid og ved økt temperatur for alle de fire stammene som er undersøkt i denne oppgaven. Den høyeste konsentrasjonen ble målt i vørter-podet med gjærstamme P2 på 55,73 ppm etter 168 timer ved 22 °C. Dette er en aromakomponent som bidrar til fruktighet et hint av whisky, vinaktigsmak og alkoholsmak. Terskelverdien for smak av denne komponenten i øl er 200 ppm. Den forventede konsentrasjonen i øl ligger på 4-57 ppm.

### **4.3.5 1-propanol**

For gjærstamme P1 kunne det observeres en økning i konsentrasjon etter først etter 96 timer. Etter 168 timer ble det målt en konsentrasjonen på 8,43 ppm ved 25,5 °C og 1,93 ppm ved 18 °C. For gjærstamme P2 kunne det observeres en gradvis økning og etter 168 timer hadde det blitt produsert en konsentrasjon på 26,23 ppm ved 25,5 °C mot 15,73 ppm ved 18 °C.

P3 viser en reduksjon i 1-propanol konsentrasjonen fra 96 timer til 168 timer. Den høyeste konsentrasjonen etter 168 dager ble målt ved 25,5 °C på 15,69 ppm, mens den laveste ble målt ved 22 °C på 12,52 ppm. P4 hadde høyest konsentrasjon etter 168 timer ved 22 °C og lavest ved 18 °C på henholdsvis 20,81 ppm og 13,71 ppm. Terskelverdien for 1-propanol er 600 ppm og gir en smak av alkohol, fruktighet og sødme. Konsentrasjon som kan forventes å finne i øl er mellom 4-17 ppm.

### **4.3.6 Fenyletyl alkohol**

For P1 økte fenyletyl alkohol-konsentrasjonen kraftig over tid og det kunne observeres en økt konsentrasjon ved økt temperatur. Etter 168 timer lå den høyeste konsentrasjonen ved 25,5 °C på 32,77 ppm mot bare 0,55 ppm ved 18 °C. Det er først etter 96 timer at en mye større konsentrasjon ble observert ved 25,5 °C.

For gjær P2 kunne det observeres en trend der alkoholkonsentrasjonen økte gradvis over tid. Etter 24 timer kunne det observeres betraktelig høyere konsentrasjon sammenliknet med nullprøven. Etter 168 timer ble det observert økt konsentrasjon med økende temperatur. Høyest konsentrasjon ble målt ved 25,5 °C på 69,22 ppm mot lavest på 37,95 ved 18 °C.

For gjærstamme P3 kunne det observeres maksimal konsentrasjon etter 96 timer ved 22 °C, men etter 168 timer var trenden lik som for P1 og P2 med en økende konsentrasjon med økt temperatur. Etter 168 timer for P3 ble det målt en konsentrasjon på 58,83 ppm ved 25,5 °C mot 46,21 ppm ved 18 °C. For den siste gjærstammen P4 var det en liknende trend der konsentrasjonen over tid øker i takt med økende temperatur. Etter 168 timer var det høyest konsentrasjon ved 22 °C på 53,84 ppm mot 48,53 ppm ved 25,5 °C. Terskelverdien for fenyletyl alkohol er på 40

ppm for lager øl og 125 ppm for mørkere øl og gir en smak av honning og rose. Normal konsentrasjon i øl er mellom 5-100 ppm.

#### **4.4 Terskelverdier**

For de endelige produktene var det bare noen få av komponentene som havnet over terskelverdiene. Ingen av esterene havnet over terskelverdi for noen av prøvene i denne oppgaven. For ølet inokulert med gjærstamme P1 var det kun acetaldehyd, hexanal, 3-metyl-1-butanol og etanol som var over terskelverdien for smak i øl. Fenyletyl alkohol ligger over terskelverdien for lager øl på 40 ppm. I mørkere øl er terskelverdien 125 ppm.

For ølet tilsatt cellekultur fra P2 var det hexanal, 3-metyl-1-butanol, fenyletyl alkohol, etanol og acetoin som lå over terskelverdien. For gjærstamme P3 hadde denne tilsvarende komponenter som lå over terskelverdien som P2, men ikke acetoin. Brygget med gjærstamme P4 var lik P2 og P3, men hadde i tillegg diacetyl over terskelverdien for smak. Fra målingene for Orval som er øl kjøpt på Vinmonopolet ble det registrert hexanal, 3-metyl-1-butanol og etanol over terskelverdiene. St. Bernadus var det ølet der det ble registrert flest komponenter over terskelverdi. Disse var følgende: fenyletyl alkohol (dersom terskelverdi på 40 ppm), etanol, etyl hexanoat, etylacetat, dimetyl sulfid og acetoin.

Til tross for at konsentrasjonen til mange av aromakomponentene tilsynelatende ligger under terskelverdi, betyr ikke dette at de aromatiske komponentene ikke påvirker smaken i ølet. I henhold til Fushiki (2002) ligger normalt konsentrasjonen til komponentene noe under terskelverdi for smak. Eksempelvis er terskelverdien for esterene isobutyl acetat og isoamyl acetat på henholdsvis 1,6 og 1,2 ppm. Den typiske konsentrasjon i øl for disse komponentene er 0,01-0,25 ppm og 0,6-7 ppm.

## 5 Konklusjon

Metabolisme i gjær er et komplisert fagfelt. Det å jobbe med mikroorganismer betyr at det er viktig å jobbe systematisk og nøyaktig. Til tross for aktsomhet underveis viser det seg at gjær er sterkt påvirkelig når det kommer til ytre faktorer som temperatur, pH, næringsinnhold og gjenbruk av stamme. Det er mange faktorer som spiller inn under utførelsen av et prosjekt som dette og man skulle gjerne hatt bedre tid til å utføre flere forsøk der variablene endres på andre måter for å se på forskjellen mellom gjær. Vekstforsøket og ølbryggingen, samt alle analyser er tidkrevende og det har vært en utfordring å gjøre alt man vil på så kort tid. Det innebærer at man må begrense seg.

Standardfeilen beregnet for de fleste prøvene varierer stort innen hver enkelt kategori, men gjennomsnittet gir fortsatt en uniform sammenheng mellom dataene slik at det er mulig å se visse trender. Målingene er gjort over tid ved ulike temperaturer for å følge utviklingen av viktige metabolitter for smak og aroma.

Trender i det amerikanske ølmarkedet er bruk av *Brettanomyces* spp. og melkesyrebakterier i fermenteringsprosessen, ved modningen eller ved refermentering før tapping på flaske, og det er også en antydning i markedet til at det bare brukes *Brettanomyces* til primærfermenteringen (Bokulich and Bamforth, 2013).

Gjærstamme P1 isolert fra Orval Trappist Ale ble identifisert som en *Brettanomyces* spp. viste en klar forskjell fra de tre andre gjærstammene både fysiologisk og kjemisk. Gjærstamme P2 isolert fra St. Bernardus Abt. 12 viste en tilnærmet lik utvikling som P3 og P4 og ble identifisert gjennom DNA-sekvensering som en *Saccharomyces* spp. Sammenliknes gjærcellene i vekstforsøket kan det observeres en vesentlig tregere veksthastighet for *Brettanomyces* stamme P1. Denne stammen brukte opptil en uke lenger tid på å oppnå tilsvarende tellbare kolonier som for P2, P3 og P4. Dette stemmer godt overens med litteraturen da *Brettanomyces* har en tendens til å vokse saktere. For P2, P3 og P4 har disse ett mer forutsigbart forløp i utviklingen noe som ble gjenspeilet i bryggeprosessen. Som nevnt tidligere i diskusjonen kan P1 nå et langt høyere celletall over lang nok tid, enn for de andre gjærstammen i denne oppgaven. Dette burde man ta hensyn til for å unngå at ølet ødelegges under bryggingen.

Erfaringsmessig ble alle gjærcellene utsatt for de samme betingelsene, men *Brettanomyces* (P1) produserte en langt høyere konsentrasjon CO<sub>2</sub> etter 48 dager. Om dette skyldes tilfeldig forurensing av ølet eller gjærstammen er usikkert. Det var lik effekt på karbondioksidnivået i begge batchene som ble brygget.

*Brettanomyces* er helt klart en stamme man burde ha erfaring med for å bruke i brygging. De tre andre gjærcellene viste seg å være tilnærmet like på mange måter, noe som til en viss grad indikerer at P2 sannsynligvis er en *Saccharomyces* spp. Vekstforløpet for de tre gjærstammene, samt CO<sub>2</sub> og etanol-produksjonen er tilnærmet identisk for stammene.

Sammenliknes mine ølprøver med øl kjøpt på Vinmonopolet kan det observeres en forskjell mellom prøvene, noe som er forventet. Disse øltypene produseres av personer med lang erfaring på feltet og fremgangsmåten for bryggingen av mine øl var helt klart annerledes. Smaksmessig vil det med en enkelt cellekultur ikke klare å konkurrere med smaken til kommersielt øl av denne typen, da disse øltypene blir repodet før overføring av ølet til flasker for å gi en mer kompleks smaksprofil. Basert på målingene utført for gjærstammene er det ikke mulig å konkludere med hvilken gjærstamme som kommer nærmest referanseølene i form av smaksprofil. Oppgaven gir først og fremst en indikasjon på hvordan gjærprøvene P1, P2, P3 og P4 oppfører seg forhold til hverandre, i løpet av primærfermentering.

Resultatene generelt viser at temperatur har mye å si for konsentrasjonen av høyere alkoholer og acetat estere. Sammenliknes gjærtypene P2, P3 og P4 er alle, basert på resultatene, egnet til å bruke til å brygge med, men fermenteringstemperaturen må reguleres for å unngå overproduksjon av visse aromastoffer. Basert på observasjonen gjort etter 168 timers fermentering kan det anbefales å bruke følgende temperaturer til følgende gjærstammer under primærfermenteringen: P2 (18 °C), P3 (22 °C), P3 (25,5 °C) og P4 (25,5 °C). Dette vil gi det mest balanserte ølet. Dersom man ønsker en øl med en særegen aromaprofil kan P2 (22 °C) og P2 (25,5 °C) brukes da disse danner store mengder 2-metyl-propanol, isobutyl acetat, 2-metyl-1-butanol og fenyletyl alkohol som alle er viktige aromastoffer i øl.

## 5.1 Videre arbeid

For fremtidige prosjekter som omhandler gjær og metabolisme kan det være interessant å se på andre faktorer som påvirker gjær enn temperatur. I denne oppgaven ble det kun undersøkt gjær som brukes i belgisk-type øl og det hadde vært interessant å se på forskjellen mellom en større variasjon av forskjellige gjærstammer som brukes i forskjellige øltyper. Det kunne også vært interessant å se hvordan mer ekstreme temperaturer vil påvirke vekst og metabolisme.

Maillard-reaksjoner kan påvirke næringsinnholdet i vørter og det kan være lurt å prøve å unngå å autoklavere vørteren før bruk for å få optimale forhold rent næringsmessig for gjærcellene. For målingene av CO<sub>2</sub> som gjøres for alle prøvene anbefales det å bruke Anton Paar i stedet, da det sannsynligvis gir mer nøyaktige resultater.

## Litteraturliste

- ABBEY, O. 2016. *Brewery* [Online]. <http://www.orval.be/en/8/Brewery>: Orval Abbey. Available: <http://www.orval.be/en/8/Brewery> [Accessed 10.05.2016 2016].
- ABBOTT, D. A., HYNES, S. H. & INGLEDEW, W. M. 2005. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 641-647.
- ADAMS, M. R. & MOSS, M. O. 2008. Food microbiology. 3rd ed. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- AGUILAR USCANGA, M. G., DÉLIA, M.-L. & STREHAIANO, P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 157-162.
- ANDREWS, B. J. & GILLILAND, R. B. 1952. SUPER-ATTENUATION OF BEER: A STUDY OF THREE ORGANISMS CAPABLE OF CAUSING ABNORMAL ATTENUATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, 58, 189-196.
- BAMFORTH, C. W. 2001. pH in brewing: an overview. *Technical quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, 38, 1-9.
- BARNES, T. 2013. *The Complete Beer Fault Guide v. 1.4* [Online]. Available: [http://www.carolinabrewmasters.com/PDF/Complete\\_Beer\\_Fault\\_Guide.pdf](http://www.carolinabrewmasters.com/PDF/Complete_Beer_Fault_Guide.pdf).
- BEAL, A. D. & MOTTRAM, D. S. 1994. Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2880-2884.
- BOKULICH, N. A. & BAMFORTH, C. W. 2013. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 157-172.
- BOKULICH, N. A., BAMFORTH, C. W. & MILLS, D. A. 2012. A Review of Molecular Methods for Microbial Community Profiling of Beer and Wine. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70, 150.
- BRIGGS, D. E., BROOKES, P., STEVENS, R. & BOULTON, C. 2004. *Brewing: science and practice*, Elsevier.
- BROOKER, R. J. 2011. *Biology*, McGraw-Hill Education.
- CASEY, G. P., MAGNUS, C. A. & INGLEDEW, W. 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 639-646.
- COGHE, S., D'HOLLANDER, H., VERACHTERT, H. & DELVAUX, F. R. 2005. Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 111, 51-60.
- COOTE, N. & KIRSOP, B. H. 1976. FACTORS RESPONSIBLE FOR THE DECREASE IN pH DURING BEER FERMENTATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 149-153.
- FUSHIKI, T. Y. T. 2002. *Analysis of Taste and Aroma*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- GIBSON, B., KROGERUS, K., EKBERG, J., MONROUX, A., MATTINEN, L., RAUTIO, J. & VIDGREN, V. 2015. Variation in  $\alpha$ -acetolactate production within the hybrid lager yeast group *Saccharomyces pastorianus* and affirmation of the central role of the ILV6 gene. *Yeast*, 32, 301-316.
- HALL, T. 1997. BioEdit-Biological sequence alignment edito. In: BIOSCIENCES, I. (ed.). Ibis Biosciences.



- HAUKELI, A. & LIE, S. 1978. CONVERSION OF  $\alpha$ -ACETOLACTATE AND REMOVAL OF DIACETYL A KINETIC STUDY. *Journal of the Institute of Brewing*, 84, 85-89.
- HE, Y., DONG, J., YIN, H., ZHAO, Y., CHEN, R., WAN, X., CHEN, P., HOU, X., LIU, J. & CHEN, L. 2014. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120, 157-163.
- HENRIKSEN, K. G. 2015. *Årsberetning og årsregnskap 2015* [Online]. Vinmonopolet. Available: <http://www.vinmonopolet.no/artikkel/om-vinmonopolet/%C3%A5rsberetning>.
- HIRALAL, L., OLANIRAN, A. O. & PILLAY, B. 2014. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 57-64.
- LEA, A. G. H. & PIGGOTT, J. R. 1995. *Fermented Beverage Production*, Dordrecht, Springer US.
- MADIGAN, M. T. 2011. *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Education, Limited.
- MEDICINE, N. L. O. 2016. *Standard Nucleotide BLAST* [Online]. National Center for Biotechnology Information. Available: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
- NARVHUS, J. A., OSTERAAS, K., MUTUKUMIRA, T. & ABRAHAMSEN, R. K. 1998. Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 73-80.
- NELSON, D. L., NELSON, D. L., LEHNINGER, A. L. & COX, M. M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*, New York, W.H. Freeman.
- NEVEN, H., DELVAUX, F. & DERDELINCKX, G. S. 1997. Flavour Evolution of Top Fermented Beers. *MBAA Technical Quarterly*, 34, 115-118.
- OPPEGÅRD KOMMUNE. 2015. *Vannkvalitet* [Online]. Oppegård kommune. Available: <https://http://www.oppegard.kommune.no/vann-og-avlop/vannkvalitet>.
- PERPÈTE, P. & COLLIN, S. 2000. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. *Food Chemistry*, 71, 379-385.
- PERRE, J.-L. V. D. 2014. *Annual Report 1014* [Online]. Belgian Brewers: Belgian Brewers. Available: <http://belgianbrewers.be/en/economy/article/employment-104> [Accessed 08.05.2016 1016].
- PIRES, E. & BRÁNYIK, T. 2015. *Biochemistry of Beer Fermentation*, Springer International Publishing.
- PIRES, E. J., TEIXEIRA, J. A., BRÁNYIK, T. & VICENTE, A. A. 2014. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1937-1949.
- POWELL, C. D., VAN ZANDYCKE, S. M., QUAIN, D. E. & SMART, K. A. 2000. Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146, 1023-1034.
- SIGMA-ALDRICH. 2014. *Ingredients Catalog: Flavors & Fragrances* [Online]. SigmaAldrich.com: Sigma-Aldrich. Available:

- [http://www.sigmaaldrich.com//ifb/fnf\\_2014/fnf\\_2014.html?utm\\_campaign=&utm\\_medium=email&utm\\_source=Eloqua-II](http://www.sigmaaldrich.com//ifb/fnf_2014/fnf_2014.html?utm_campaign=&utm_medium=email&utm_source=Eloqua-II) [Accessed 20.05 2016].
- STATENS FORVALTNINGSTJENESTE 1996. Effektiv matsikkerhet. In: HELSEDEPARTEMENTET, S.-O. (ed.) 24 ed. Regjeringen.no: Sosial- og helsedepartementet.
- STATISTISK SENTRALBYRÅ. 2016. *Alkoholomsetning, 4. kvartal 2015* [Online]. Statistisk sentralbyrå. Available: <http://www.ssb.no/varehandel-og-tjenesteyting/statistikker/alkohol/kvartal/2016-03-09?fane=tabell&sort=nummer&tabell=259333>.
- TAN, Y. & SIEBERT, K. J. 2004. Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling of Alcohol, Ester, Aldehyde, and Ketone Flavor Thresholds in Beer from Molecular Features. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3057-3064.
- VANDERHAEGEN, B., DELVAUX, F., DAENEN, L., VERACHTERT, H. & DELVAUX, F. R. 2007. Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*, 103, 404-412.
- VANDERHAEGEN, B., NEVEN, H., COGHE, S., VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G. & VERACHTERT, H. 2003. Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 140-150.
- VERSTREPEN, K. J., DERDELINCKX, G., DUFOUR, J.-P., WINDERICKX, J., THEVELEIN, J. M., PRETORIUS, I. S. & DELVAUX, F. R. 2003. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 110-118.
- WHITE LABS. 2016a. *Attenuation and Flocculation* [Online]. Available: <https://http://www.whitelabs.com/resources/attenuation-and-flocculation>.
- WHITE LABS. 2016b. *WLP500 Monastery Ale Yeast* [Online]. <https://http://www.whitelabs.com/yeast/wlp500-monastery-ale-yeast>: White Labs: Pure Yeast & Fermentation. Available: <https://http://www.whitelabs.com/yeast/wlp500-monastery-ale-yeast> [Accessed 22.05 2016].
- WHITE LABS. 2016c. *WLP510 Bastogne Belgian Ale Yeast* [Online]. White Labs: Pure Yeast & Fermentation. Available: <https://http://www.whitelabs.com/yeast/wlp510-bastogne-belgian-ale-yeast> [Accessed 22.05 2016].
- WIKÉN, T., SCHEFFERS, W. A. & VERHAAR, A. J. M. 1961. On the existence of a negative pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27, 401-433.
- ØYSTÅ, Ø. 2009a. *Malt* [Online]. I Store norske leksikon: I Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/malt>.
- ØYSTÅ, Ø. 2009b. *Renhetsloven* [Online]. I Store norske leksikon: I Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/renhetsloven> [Accessed 14.05 2016].

## Vedlegg 1: HSGC-FID vekstforsøk P1 (18 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

Prøve 1	Gs0 18 °C	St0 18 °C	Gs24 18 °C	St24 18 °C	Gs96 18 °C	St96 18 °C	Gs168 18 °C	St168 18 °C
Acetaldehyde	1,207	0,049	0,593	0,157	1,958	0,964	3,194	0,617
Acetone	0,671	0,052	0,688	0,075	0,396	0,152	0,105	0,058
Dimethylsulfide	0,002	#DIV/0!	0,004	0,002	0,003	0,001	0,002	0,001
2-methyl-propanal	0,169	0,019	0,034	0,013	0,018	0,005	0,017	0,005
1-propanol	0,063	0,008	0,063	0,019	0,280	0,092	1,933	0,619
Diacetyl	0,295	0,077	0,255	0,118	0,306	0,179	0,823	0,076
2-butanone	0,046	0,008	0,042	0,005	0,009	#DIV/0! !	0,016	0,004
2-butanol	0,029	0,004	0,027	0,001	0,044	0,012	0,068	0,013
Ethylacetate	0,030	0,026	0,134	0,146	0,606	0,419	1,495	0,950
2-methyl-1-propanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0! !	0,175	0,198
3-methyl-butanal	0,358	0,018	0,080	0,038	0,016	0,003	0,018	0,001
2-methyl-butanal	0,146	0,016	0,027	0,013	0,015	0,003	0,018	0,003
2.3-pentadione	0,151	0,026	0,173	0,046	0,062	0,029	0,238	0,029
Acetoin	1,336	0,074	1,470	0,213	0,744	0,059	0,763	#DIV/0!
3-methyl-1-butanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,029	#DIV/0! !	0,296	0,239
2-methyl-1butanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,007	#DIV/0! !	0,287	0,153
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,001	#DIV/0!	0,002	0,001	0,002	#DIV/0!
Hexanal	0,003	#DIV/0!	0,002	#DIV/0!	0,009	0,004	0,007	0,005
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,002	#DIV/0! !	0,002	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,036	0,002	0,043	0,004	0,043	0,003	0,049	0,007
1-hexanol	0,014	0,010	0,013	0,006	0,014	0,009	0,007	0,008
Isoamyl acetate	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0!
Ethyl hexanoate	0,002	0,001	0,003	0,001	0,002	0,001	0,005	0,003
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,002	#DIV/0! !	0,005	0,003
Phenylethyl alcohol	1,323	0,559	0,487	#DIV/0!	0,266	0,165	0,556	0,288
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,003	#DIV/0! !	0,008	0,008
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,002	#DIV/0! !	0,002	0,001

## Vedlegg 2: HSGC-FID vekstforsøk P1 (22 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P1	Gs0 22 °C	St0 22 °C	Gs24 22 °C	St24 22 °C	Gs96 22 °C	St96 22 °C	Gs168 22 °C	St168 22 °C
Acetaldehyde	1,207	0,049	0,605	0,391	2,461	0,598	3,425	1,200
Acetone	0,671	0,052	0,610	0,100	0,138	0,045	0,064	0,043
Dimethylsulfide	0,002	#DIV/0!	0,003	0,001	0,003	0,000	0,002	0,001
2-methyl-propanal	0,169	0,019	0,014	0,005	0,012	0,003	0,031	0,010
1-propanol	0,063	0,008	0,037	#DIV/0!	2,019	0,950	6,666	0,745
Diacetyl	0,295	0,077	0,200	0,034	0,870	0,330	0,573	0,324
2-butanone	0,046	0,008	0,039	0,015	0,017	0,004	0,010	#DIV/0! !
2-butanol	0,029	0,004	0,028	0,010	0,065	0,009	0,056	0,017
Ethylacetate	0,030	0,026	0,118	0,107	2,889	3,134	7,632	2,107
2-methyl-1-propanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,178	0,282	7,688	2,047
3-methyl-butanal	0,358	0,018	0,030	0,012	0,017	0,006	0,036	0,018
2-methyl-butanal	0,146	0,016	0,014	0,005	0,012	0,005	0,020	0,012
2.3-pentadione	0,151	0,026	0,147	0,034	0,226	0,084	0,131	0,117
Acetoin	1,336	0,074	n.d	#DIV/0!	0,871	0,552	0,670	0,064
3-methyl-1-butanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,676	0,703	17,293	3,165
2-methyl-1butanol	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,184	0,103	3,920	1,813
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001
Hexanal	0,003	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,009	#DIV/0!	0,004	0,005
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,004	0,000	0,003	#DIV/0!	n.d	#DIV/0! !
trans-2-hexen-1-al	0,036	0,002	0,046	0,008	0,047	0,007	0,056	0,009
1-hexanol	0,014	0,010	0,015	0,006	0,015	0,010	0,017	0,005
Isoamyl acetate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,005	0,004
Ethyl hexanoate	0,002	0,001	0,002	0,001	0,004	0,003	0,012	0,004
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,004	0,002	0,006	0,005
Phenylethyl alcohol	1,323	0,559	0,571	0,228	0,682	0,252	18,941	5,928
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,008	0,005	0,020	0,012
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,003	0,001	0,002	0,001

### Vedlegg 3: HSGC-FID vekstforsøk P1 (25,5 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P1	Gs0 25,5 °C	St0 25,5 °C	Gs24 25,5 °C	St24 25,5 °C	Gs96 25,5 °C	St96 25,5 °C	Gs168 25,5 °C	St168 25,5 °C
Acetaldehyde	1,207	0,049	1,051	0,752	2,756	0,887	4,268	1,111
Acetone	0,671	0,052	0,620	0,079	0,081	0,045	0,074	0,060
Dimethylsulfide	0,002	#DIV/0! !	0,002	0,001	0,003	#DIV/0!	0,003	#DIV/0! !
2-methyl-propanal	0,169	0,019	0,014	0,005	0,021	0,007	0,035	0,010
1-propanol	0,063	0,008	0,121	0,058	5,161	0,391	8,430	0,527
Diacetyl	0,295	0,077	0,307	0,059	0,825	0,457	0,400	0,123
2-butanone	0,046	0,008	0,044	0,013	0,010	0,001	0,008	0,001
2-butanol	0,029	0,004	0,033	#DIV/0! !	0,059	0,024	0,051	0,020
Ethylacetate	0,030	0,026	0,488	0,565	5,980	4,372	12,208	4,729
2-methyl-1-propanol	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	3,374	1,943	15,288	1,449
3-methyl-butanal	0,358	0,018	0,017	0,002	0,038	0,019	0,023	0,008
2-methyl-butanal	0,146	0,016	0,009	0,003	0,019	0,010	0,025	0,009
2,3-pentadione	0,151	0,026	0,097	0,035	0,199	0,153	0,058	0,003
Acetoin	1,336	0,074	0,830	0,467	0,586	#DIV/0!	0,676	#DIV/0! !
3-methyl-1-butanol	n.d	#DIV/0! !	0,057	0,007	9,937	4,209	27,162	3,636
2-methyl-1butanol	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	2,604	1,862	8,526	1,624
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,001
Hexanal	0,003	#DIV/0! !	0,003	0,002	0,003	0,001	0,009	0,005
Butyl acetat	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0! !
trans-2-hexen-1-al	0,036	0,002	0,052	0,003	0,050	0,007	0,054	0,008
1-hexanol	0,014	0,010	0,016	0,009	0,015	0,005	0,016	0,007
Isoamyl acetate	n.d	#DIV/0! !	0,001	#DIV/0! !	0,002	0,001	0,013	0,007
Ethyl hexanoate	0,002	0,001	0,002	0,001	0,005	0,004	0,020	0,004
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	0,007	0,006	0,003	0,002
Phenylethyl alcohol	1,323	0,559	0,581	0,248	11,774	7,131	32,777	4,687
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	0,014	0,009	0,020	0,012
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0! !	n.d	#DIV/0! !	0,002	0,002	0,002	0,002

## Vedlegg 4: HSGC-FID vekstforsøk P2 (18 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P2	Gs0 18 °C	St0 18 °C	Gs24 18 °C	St24 18 °C	Gs96 18 °C	St96 18 °C	Gs168 18 °C	St168 18 °C
Acetaldehyde	1,767	0,389	15,138	2,145	7,776	2,328	6,532	1,394
Acetone	0,637	0,091	0,682	0,121	0,685	0,116	0,636	0,090
Dimethylsulfide	0,002	0,001	n.d	#DIV/0!	0,002	0,001	n.d	#DIV/0!
2-methyl-propanal	0,205	0,026	0,063	0,010	0,014	0,004	0,008	0,002
1-propanol	0,095	0,015	3,307	0,575	19,104	1,788	15,738	7,854
Diacetyl	0,272	0,123	0,159	0,069	1,682	0,603	0,215	0,125
2-butanone	0,039	0,010	0,037	0,008	0,051	0,006	0,046	0,008
2-butanol	0,040	0,000	0,024	0,000	0,031	0,005	0,027	0,003
Ethylacetate	1,261	1,684	0,115	0,108	3,335	0,564	2,970	1,690
2-methyl-1-propanol	0,058	0,016	1,689	0,473	32,235	5,556	24,000	14,687
3-methyl-butanal	0,376	0,051	0,058	0,008	0,018	0,002	0,016	0,002
2-methyl-butanal	0,169	0,024	0,034	0,003	0,005	0,002	0,008	0,001
2.3-pentadione	0,123	0,019	0,126	0,043	1,471	0,459	0,198	0,081
Acetoin	0,488	0,111	8,692	0,817	3,306	1,410	2,465	1,532
3-methyl-1-butanol	0,098	0,113	6,263	1,396	65,069	14,185	47,726	31,138
2-methyl-1butanol	0,057	0,024	1,356	0,317	22,465	3,845	17,375	9,315
Isobutyl acetate	0,001	0,001	0,003	0,003	0,009	0,003	0,005	0,003
Hexanal	n.d	#DIV/0!	0,006	0,004	0,014	0,001	0,018	0,003
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,004	0,003	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,035	0,004	0,061	0,025	0,053	0,007	0,057	0,006
1-hexanol	0,007	0,003	0,018	0,004	0,033	0,002	0,033	0,006
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,002	0,001	0,151	0,048	0,094	0,063
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,002	0,001	0,067	0,015	0,044	0,009
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,004	0,002	0,002	0,001
Phenylethyl alcohol	1,821	0,226	2,805	1,657	47,243	9,836	37,956	19,637
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,013	0,006	0,010	0,005
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,002	0,002	0,001	0,000

## Vedlegg 5: HSGC-FID vekstforsøk P2 (22 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P2	Gs0 22 °C	St0 22 °C	Gs24 22 °C	St24 22 °C	Gs96 22 °C	St96 22 °C	Gs168 22 °C	St168 22 °C
Acetaldehyde	1,767	0,389	8,350	2,198	8,410	4,176	6,918	3,775
Acetone	0,637	0,091	0,688	0,029	0,595	0,175	0,408	0,049
Dimethylsulfide	0,002	0,001	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!
2-methyl-propanal	0,205	0,026	0,044	0,021	0,012	0,005	0,010	0,005
1-propanol	0,095	0,015	12,320	2,470	22,076	6,333	24,242	5,079
Diacetyl	0,272	0,123	1,775	0,834	0,327	0,131	0,091	0,039
2-butanone	0,039	0,010	0,040	0,005	0,040	0,013	0,042	0,011
2-butanol	0,040	0,000	0,023	0,000	0,025	0,003	0,025	#DIV/0!
Ethylacetate	1,261	1,684	0,631	0,334	3,978	1,644	5,232	3,040
2-methyl-1-propanol	0,058	0,016	23,276	5,645	44,286	16,296	47,876	11,948
3-methyl-butanal	0,376	0,051	0,027	0,005	0,016	0,002	0,014	0,002
2-methyl-butanal	0,169	0,024	0,017	0,007	0,007	0,002	0,006	#DIV/0!
2.3-pentadione	0,123	0,019	1,649	0,604	0,252	0,138	0,078	0,049
Acetoin	0,488	0,111	9,606	3,656	2,298	1,141	0,688	0,170
3-methyl-1-butanol	0,098	0,113	27,666	8,480	70,695	31,303	79,918	19,525
2-methyl-1butanol	0,057	0,024	10,663	3,127	27,676	10,258	30,376	7,470
Isobutyl acetate	0,001	0,001	0,002	0,001	0,010	0,005	0,013	0,004
Hexanal	n.d	#DIV/0!	0,015	0,002	0,019	0,001	0,019	0,017
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,035	0,004	0,052	0,007	0,061	0,003	0,057	0,006
1-hexanol	0,007	0,003	0,020	0,005	0,038	0,014	0,035	0,006
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,020	0,011	0,151	0,075	0,177	0,118
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,014	0,009	0,050	0,020	0,039	0,017
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,001	0,000	0,003	0,003	0,001	0,001
Phenylethyl alcohol	1,821	0,226	35,012	11,805	58,433	19,687	58,272	18,762
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,004	0,003	0,010	0,006	0,008	0,002
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,001	0,000	0,003	0,002	0,001	0,000

## Vedlegg 6: HSGC-FID vekstforsøk P2 (25,5 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

Prøve 2	Gs0 25,5 °C	St0 25,5 °C	Gs24 25,5 °C	St24 25,5 °C	Gs96 25,5 °C	St96 25,5 °C	Gs168 25,5 °C	St168 25,5 °C
Acetaldehyde	1,767	0,389	8,775	4,701	7,650	1,912	5,833	1,143
Acetone	0,637	0,091	0,710	0,087	0,540	0,160	0,385	0,070
Dimethylsulfide	0,002	0,001	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!
2-methyl-propanal	0,205	0,026	0,023	0,005	0,011	0,004	0,014	0,006
1-propanol	0,095	0,015	17,309	4,089	21,327	7,595	26,238	7,603
Diacetyl	0,272	0,123	3,527	0,234	0,198	0,152	0,156	0,277
2-butanone	0,039	0,010	0,045	0,010	0,036	0,009	0,037	0,014
2-butanol	0,040	0,000	0,034	0,004	0,038	0,015	0,029	0,005
Ethylacetate	1,261	1,684	1,048	0,147	9,791	1,098	6,141	2,633
2-methyl-1-propanol	0,058	0,016	32,394	7,224	46,163	15,535	55,734	16,191
3-methyl-butanal	0,376	0,051	0,024	0,003	0,014	0,001	0,023	0,014
2-methyl-butanal	0,169	0,024	0,011	0,004	0,007	#DIV/0!	0,011	0,006
2.3-pentadione	0,123	0,019	3,062	0,471	0,117	#DIV/0!	0,053	0,052
Acetoin	0,488	0,111	5,249	5,098	0,815	#DIV/0!	2,617	0,888
3-methyl-1-butanol	0,098	0,113	53,374	21,799	66,431	27,837	85,024	27,566
2-methyl-1butanol	0,057	0,024	17,432	5,408	25,487	9,076	31,903	9,661
Isobutyl acetate	0,001	0,001	0,004	0,002	0,009	0,004	0,011	0,004
Hexanal	n.d	#DIV/0!	0,001	0,001	0,025	0,004	0,034	0,009
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,035	0,004	0,055	0,007	0,056	0,004	0,060	0,008
1-hexanol	0,007	0,003	0,028	0,004	0,037	0,009	0,041	0,007
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,050	0,025	0,127	0,072	0,193	0,085
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,022	0,011	0,033	0,017	0,034	0,002
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,001	0,000	0,003	0,003	0,003	0,002
Phenylethyl alcohol	1,821	0,226	52,628	16,443	54,205	16,832	69,223	27,003
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,004	0,002	0,008	0,007	0,007	0,004
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,001	0,000	0,002	0,002	0,001	0,000



## Vedlegg 7: HSGC-FID vekstforsøk P3 (18 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

Prøve 3	Gs0 18 °C	St0 18 °C	Gs24 18 °C	St24 18 °C	Gs96 18 °C	St96 18 °C	Gs168 18 °C	St168 18 °C
Acetaldehyde	1,816	0,173	5,919	1,977	15,072	12,182	18,052	8,752
Acetone	0,761	0,091	0,831	0,162	0,735	0,172	0,752	0,110
Dimethylsulfi de	0,003	0,003	0,001	0,000	0,001	#DIV/0 !	0,001	#DIV/0!
2-methyl- propanal	0,240	0,027	0,044	0,013	0,013	0,008	0,013	0,006
1-propanol	0,074	0,024	1,390	0,128	15,031	5,869	13,414	8,153
Diacetyl	0,309	0,136	0,038	0,029	1,098	0,580	0,387	0,241
2-butanone	0,037	0,008	0,036	0,017	0,037	0,015	0,044	0,014
2-butanol	0,027	#DIV/0 !	0,032	0,007	0,030	0,007	0,026	#DIV/0!
Ethylacetate	0,392	0,618	0,598	0,741	5,055	5,155	3,524	1,405
2-methyl-1- propanol	n.d	#DIV/0 !	0,433	0,028	14,656	6,745	14,038	8,572
3-methyl- butanal	0,455	0,045	0,110	0,035	0,031	0,018	0,029	0,009
2-methyl- butanal	0,203	0,026	0,034	0,007	0,017	#DIV/0 !	0,010	0,004
2.3- pentadione	0,149	0,034	0,036	0,028	1,051	0,592	0,215	0,132
Acetoin	0,574	0,061	0,869	0,402	3,559	3,627	2,702	1,662
3-methyl-1- butanol	0,076	0,034	5,207	0,271	63,440	19,009	57,235	25,909
2-methyl- 1butanol	0,028	0,010	0,407	0,009	14,053	4,868	13,646	6,673
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,001	#DIV/0 !	0,005	0,002	0,006	0,004
Hexanal	0,001	#DIV/0 !	0,005	0,003	0,009	0,002	0,017	0,006
Butyl acetat	n.d	#DIV/0 !	0,002	#DIV/0 !	0,003	0,002	0,004	#DIV/0!
trans-2-hexen- 1-al	0,033	0,002	0,049	0,005	0,053	0,004	0,058	0,003
1-hexanol	0,020	0,004	0,015	0,002	0,029	0,009	0,041	0,010
Isoamyl acetate	0,002	0,001	0,002	0,001	0,148	0,067	0,159	0,120
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,002	0,001	0,065	0,025	0,060	0,030
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0 !	0,001	#DIV/0 !	0,005	0,005	0,006	0,006
Phenylethyl alcohol	3,469	3,469	2,102	0,286	49,108	15,126	46,213	20,879
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0 !	0,002	#DIV/0 !	0,014	0,006	0,014	0,010
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0 !	0,001	#DIV/0 !	0,003	0,002	0,003	0,003

## Vedlegg 8: HSGC-FID vekstforsøk P3 (22 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P3	Gs0 22 °C	St0 22 °C	Gs24 22 °C	St24 22 °C	Gs96 22 °C	St96 22 °C	Gs168 22 °C	St168 22 °C
Acetaldehyde	1,816	0,173	8,247	2,081	8,348	1,493	12,693	4,795
Acetone	0,761	0,091	0,716	0,071	0,696	0,164	0,701	0,132
Dimethylsulfi de	0,003	0,003	n.d	#DIV/0 !	0,001	0,000	n.d	#DIV/0!
2-methyl- propanal	0,240	0,027	0,025	0,004	0,005	#DIV/0 !	0,005	0,001
1-propanol	0,074	0,024	5,137	1,280	21,080	1,306	12,526	7,195
Diacetyl	0,309	0,136	0,361	0,120	0,316	0,426	0,106	0,066
2-butanone	0,037	0,008	0,041	0,010	0,044	0,014	0,043	0,009
2-butanol	0,027	#DIV/0 !	0,030	#DIV/0 !	0,031	0,005	0,028	0,000
Ethylacetate	0,392	0,618	0,349	0,070	4,429	2,259	2,492	0,791
2-methyl-1- propanol	n.d	#DIV/0 !	3,791	2,678	20,618	6,216	13,271	7,954
3-methyl- butanal	0,455	0,045	0,060	0,017	0,018	0,003	0,016	0,001
2-methyl- butanal	0,203	0,026	0,020	0,007	n.d	#DIV/0 !	0,002	#DIV/0!
2.3- pentadione	0,149	0,034	0,184	0,064	0,253	0,306	0,072	0,039
Acetoin	0,574	0,061	3,792	2,177	1,062	#DIV/0 !	1,042	0,284
3-methyl-1- butanol	0,076	0,034	20,661	6,644	71,574	7,118	48,996	18,868
2-methyl- 1butanol	0,028	0,010	2,569	1,028	16,783	3,159	12,228	5,055
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,001	#DIV/0 !	0,009	0,002	0,004	0,002
Hexanal	0,001	#DIV/0 !	0,008	0,001	0,015	0,003	0,026	0,005
Butyl acetat	n.d	#DIV/0 !	n.d	#DIV/0 !	n.d	#DIV/0 !	n.d	#DIV/0!
trans-2- hexen-1-al	0,033	0,002	0,052	0,005	0,063	0,018	0,056	0,003
1-hexanol	0,020	0,004	0,020	0,010	0,040	0,008	0,036	0,006
Isoamyl acetate	0,002	0,001	0,012	0,008	0,205	0,029	0,101	0,044
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,011	0,008	0,058	0,009	0,032	0,008
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0 !	0,003	0,002	0,004	0,003	0,003	0,002
Phenylethyl alcohol	3,469	3,469	14,621	5,309	71,901	16,281	49,671	23,042
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0 !	0,004	0,002	0,009	0,003	0,007	0,002
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0 !	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002

## Vedlegg 9: HSGC-FID vekstforsøk P3 (25,5 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P3	Gs0 25,5 ° C	St0 25,5 ° C	Gs24 25,5 ° C	St24 25,5 ° C	Gs96 25,5 °C	St96 25,5 °C	Gs168 25,5 ° C	St168 25,5 °C
Acetaldehyde	1,816	0,173	9,841	5,237	11,279	6,054	8,736	3,890
Acetone	0,761	0,091	0,681	0,062	0,678	0,127	0,695	0,113
Dimethylsulfide	0,003	0,003	0,001	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
2-methyl-propanal	0,240	0,027	0,017	0,009	0,007	0,004	0,006	0,003
1-propanol	0,074	0,024	10,730	4,034	17,781	5,713	15,691	7,547
Diacetyl	0,309	0,136	1,027	0,547	0,153	0,186	0,101	#DIV/0!
2-butanone	0,037	0,008	0,040	0,008	0,037	0,016	0,042	0,002
2-butanol	0,027	#DIV/0!	0,028	#DIV/0!	0,033	0,007	0,032	0,009
Ethylacetate	0,392	0,618	0,692	0,191	2,578	0,378	4,203	2,469
2-methyl-1-propanol	n.d	#DIV/0!	9,074	2,891	16,768	7,750	18,858	9,435
3-methyl-butanal	0,455	0,045	0,034	0,012	0,019	0,004	0,012	0,001
2-methyl-butanal	0,203	0,026	0,011	0,001	0,007	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
2.3-pentadione	0,149	0,034	0,769	0,426	0,073	0,080	0,024	0,001
Acetoin	0,574	0,061	4,146	3,414	0,759	0,088	1,068	0,852
3-methyl-1-butanol	0,076	0,034	36,205	10,347	57,095	15,188	53,717	20,319
2-methyl-1butanol	0,028	0,010	5,581	1,648	12,628	3,089	13,225	4,862
Isobutyl acetate	0,001	0,000	0,002	0,001	0,010	0,008	0,005	0,003
Hexanal	0,001	#DIV/0!	0,013	0,004	0,018	0,004	0,031	0,002
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,033	0,002	0,050	0,008	0,057	0,006	0,059	0,004
1-hexanol	0,020	0,004	0,032	0,009	0,035	0,008	0,033	0,010
Isoamyl acetate	0,002	0,001	0,037	0,022	0,131	0,030	0,109	0,049
Ethyl hexanoate	0,003	0,001	0,019	0,014	0,038	0,018	0,034	0,021
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,003	0,003	0,006	0,006	0,006	0,008
Phenylethyl alcohol	3,469	3,469	35,721	14,894	57,604	21,271	59,829	22,267
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,005	0,003	0,008	0,006	0,008	0,008
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,002	0,001	0,003	0,003	0,003	0,002

## Vedlegg 10: HSGC-FID vekstforsøk P4 (18 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P4	Gs0 18 °C	St0 18 °C	Gs24 18 °C	St24 18 °C	Gs96 18 °C	St96 18 °C	Gs168 18 °C	St168 18 °C
Acetaldehyd	2,14075	0,269936258	10,08575	0,651706158	11,2285	5,284201453	9,54225	3,9343841
Acetone	0,802	0,125009333	0,7105	0,048562674	0,8355	0,154308133	0,7595	0,176178886
Dimethylsul fide	0,0025	0,001732051	n.d	#DIV/0!	0,005	#DIV/0!	0,004	0,002645751
2-methyl- propanal	0,24475	0,039330862	0,0395	0,003109126	0,021	0,007071068	0,0115	0,003109126
1-propanol	0,05	0,014142136	2,827	0,274171479	11,117	5,121460924	13,71825	5,457543854
Diacetyl	0,2595	0,088673559	0,182	0,164048773	1,22125	0,412306015	0,45275	0,23536408
2-butanone	0,04425	0,009287088	0,0375	0,009110434	0,042	0,006164414	0,0475	0,010472185
2-butanol	0,0255	0,000707107	0,0385	0,01767767	0,032	#DIV/0!	0,034	#DIV/0!
Ethylacetate	0,3835	0,508375517	1,13675	1,255824928	3,805	2,366251748	6,21725	2,517812328
2-methyl-1- propanol	0,012	0,009899495	1,0295	0,184323086	16,8315	9,327219754	21,0055	10,54013272
3-methyl- butanal	0,496	0,075210815	0,04575	0,012093387	0,02775	0,002061553	0,01975	0,004787136
2-methyl- butanal	0,223	0,041464845	0,0225	0,002516611	0,009	0,003741657	0,0075	0,000707107
2.3- pentadione	0,13675	0,021187654	0,1735	0,03122499	0,5615	0,42173728	0,2405	0,172986512
Acetoin	1,393333 333	0,473304694	5,361	1,149911301	4,237	3,058159032	3,7185	0,437699098
3-methyl-1- butanol	0,100333 333	0,040525712	5,23	0,709517207	44,0035	25,84864113	51,87175	28,72512375
2-methyl- 1butanol	0,0405	0,013527749	0,79775	0,120781828	9,11075	3,635088662	10,899	4,012626405
Isobutyl acetate	0,001333 333	0,00057735	0,002	#DIV/0!	0,00533333 3	0,003511885	0,00525	0,002872281
Hexanal	0,002	0,001732051	0,009	0,002	0,01325	0,009464847	0,0185	0,003316625
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,002	0	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2- hexen-1-al	0,032	0,004546061	0,05125	0,012419742	0,053	0,005354126	0,0565	0,008225975
1-hexanol	0,009666 667	0,002516611	0,0145	0,011357817	0,02575	0,01126573	0,0305	0,009398581
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,001	0	0,06275	0,0626119	0,08125	0,053587156
Ethyl hexanoate	0,003333 333	0,001154701	0,00325	0,002629956	0,03825	0,021899391	0,04475	0,022410935
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,00233333 3	0,002309401	0,005	0,00294392	0,00575	0,004856267
Phenylethyl alcohol	1,718	0,658608128	1,6095	0,301063116	27,749	16,85181037	34,11425	14,9559534
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,002	0,001414214	0,01475	0,006849574	0,01575	0,00670199
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,00166666 7	0,001154701	0,00425	0,002872281	0,0035	0,001732051

## Vedlegg 11: HSGC-FID vekstforsøk P4 (22 °C)

Tabellen viser en oversikt over gjennomsnittlige (Gs) verdier og tilhørende standardavvik(St) ved tid 0,24, 96 og 168 timer målt i HSGC-FID.

P4	Gs0 22 °C	St0 22 °C	Gs24 22 °C	St24 22 °C	Gs96 22 °C	St96 22 °C	Gs168 22 °C	St168 22 °C
Acetaldehyde	2,14075	0,269936258	10,61025	2,19055189	8,07375	1,48160507	5,0595	1,171873856
Acetone	0,802	0,125009333	0,7525	0,076129276	0,7605	0,103564795	0,5445	0,129947425
Dimethylsulfide	0,0025	0,001732051	0,001	0	0,002	0,001414214	0,002	0,001414214
2-methyl-propanal	0,24475	0,039330862	0,0305	0,028548205	0,01275	0,006291529	0,008333333	0,00057735
1-propanol	0,05	0,014142136	9,47075	1,653184276	15,01225	5,764892157	20,8095	0,576122961
Diacetyl	0,2595	0,088673559	1,34325	0,433058406	0,734	0,421058191	0,0625	0,027598309
2-butanone	0,04425	0,009287088	0,047333333	0,005131601	0,03325	0,011295279	0,041	0,007745967
2-butanol	0,0255	0,000707107	0,032333333	0,004725816	0,0465	0,023334524	0,023	#DIV/0!
Ethylacetate	0,3835	0,508375517	1,348	1,349818259	5,36125	1,955504432	9,20375	1,657580843
2-methyl-1-propanol	0,012	0,009899495	15,23525	3,987676631	26,876	10,44206873	38,10275	3,231625842
3-methyl-butanal	0,496	0,075210815	0,03075	0,011206397	0,018	0,004320494	0,01275	0,0025
2-methyl-butanal	0,223	0,041464845	0,01475	0,0075	0,005	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
2.3-pentadione	0,13675	0,021187654	1,4085	0,690669965	0,31275	0,127680265	0,029	0,013076697
Acetoin	1,393333333	0,473304694	6,423	3,555258547	2,1875	0,160513239	6,37825	0,990670606
3-methyl-1-butanol	0,100333333	0,040525712	23,193	2,042722203	53,3885	22,73976952	83,49175	5,625413429
2-methyl-1butanol	0,0405	0,013527749	5,782	0,619519168	11,6355	4,241707714	18,13525	1,792682417
Isobutyl acetate	0,001333333	0,00057735	0,00125	0,0005	0,00575	0,002629956	0,008	0,002
Hexanal	0,002	0,001732051	0,013333333	0,006027714	0,01675	0,005123475	0,02875	0,001258306
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen-1-al	0,032	0,004546061	0,05375	0,004193249	0,054	0,01467424	0,06	0,007615773
1-hexanol	0,009666667	0,002516611	0,0165	0,001732051	0,027	0,013735599	0,044	0,002708013
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,01225	0,005909033	0,0735	0,035688467	0,15125	0,030456253
Ethyl hexanoate	0,003333333	0,001154701	0,01625	0,009535023	0,038	0,021071308	0,05875	0,026625489
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,00375	0,002217356	0,00625	0,006396614	0,007	0,007348469
Phenylethyl alcohol	1,718	0,658608128	24,0605	9,040626029	35,75525	15,31795059	53,84225	5,539138463
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,00675	0,003304038	0,01125	0,008057088	0,01725	0,010404326
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,00275	0,001258306	0,00375	0,003774917	0,00425	0,003947573

## Vedlegg 12: HSGC-FID vekstforsøk P4 (25,5 °C)

P4	Gs0 25,5 °C	St0 25,5 °C	Gs24 25,5 °C	St24 25,5 °C	Gs96 25,5 °C	St96 25,5 °C	Gs168 25,5 °C	St168 25,5 °C
Acetaldehyde	2,14075	0,269936258	13,7935	3,290467292	9,256	5,579387242	7,01675	3,373254746
Acetone	0,802	0,125009333	0,7895	0,093539653	0,69625	0,162768496	0,53575	0,227643544
Dimethylsulfide	0,0025	0,001732051	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!
2-methyl- propanal	0,24475	0,039330862	0,02775	0,016317169	0,01175	0,006184658	0,007333333	0,002516611
1-propanol	0,05	0,014142136	10,464	3,055589414	15,009	6,688119766	18,22375	6,697005867
Diacetyl	0,2595	0,088673559	2,4115	0,942755005	0,641	0,681530141	0,33	#DIV/0!
2-butanone	0,04425	0,009287088	0,04725	0,007274384	0,0445	0,005446712	0,0395	0,002516611
2-butanol	0,0255	0,000707107	0,037	#DIV/0!	0,0345	0,010606602	0,036	0,014142136
Ethylacetate	0,3835	0,508375517	1,371	0,496061152	5,330333333	2,495542493	7,03525	2,248244111
2-methyl-1- propanol	0,012	0,009899495	17,94225	4,035838151	28,58675	13,6100512	34,7775	15,55061888
3-methyl- butanal	0,496	0,075210815	0,029	0,007702813	0,014	0,003829708	0,01225	0,002872281
2-methyl- butanal	0,223	0,041464845	0,0175	0,006363961	0,001	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
2.3-pentadione	0,13675	0,021187654	1,96625	0,975322981	0,259333333	0,208399456	0,02825	0,016398679
Acetoin	1,393333333	0,473304694	5,314	2,656020206	4,024	1,991207674	4,95225	2,427257351
3-methyl-1- butanol	0,100333333	0,040525712	29,555	9,257221577	51,70425	28,42435385	68,5435	33,49601574
2-methyl- 1butanol	0,0405	0,013527749	7,245	1,546278328	13,421	5,529765275	16,752	7,190011544
Isobutyl acetate	0,001333333	0,00057735	0,002	0,001414214	0,005	0,002160247	0,00575	0,002061553
Hexanal	0,002	0,001732051	0,0095	0,000707107	0,02225	0,005909033	0,03225	0,004112988
Butyl acetat	n.d	#DIV/0!	0,001	#DIV/0!	0,004	#DIV/0!	n.d	#DIV/0!
trans-2-hexen- 1-al	0,032	0,004546061	0,0515	0,004932883	0,05675	0,009979145	0,0575	0,00341565
1-hexanol	0,009666667	0,002516611	0,02075	0,004573474	0,02225	0,001258306	0,0325	0,011387127
Isoamyl acetate	0,001	#DIV/0!	0,02275	0,013671747	0,06875	0,035584407	0,10875	0,053705214
Ethyl hexanoate	0,003333333	0,001154701	0,01725	0,006849574	0,0345	0,022869193	0,04675	0,030836937
Ethyl heptanoate	n.d	#DIV/0!	0,003	0,002160247	0,0055	0,00591608	0,006	0,006218253
Phenylethyl alcohol	1,718	0,658608128	22,95825	10,71955293	39,39	16,58048532	48,534	19,26954075
Ethyl octanoate	n.d	#DIV/0!	0,00575	0,002061553	0,0105	0,009848858	0,01375	0,008693868
Ethyl nonanoate	n.d	#DIV/0!	0,00275	0,001258306	0,00325	0,003201562	0,003	0,002708013

## Vedlegg 13: Flyktige stoffer i øl

Aromatisk komponent	P1	P2	P3	P4	Orvall	St. Bernadus	Kjemisk gruppe
Acetaldehyde	14,728	4,747	3,750	4,034	1,110	6,563	Aldehyd
2-methyl-propanal	0,015	0,009	0,008	0,007	0,032	0,007	Aldehyd
3-methyl-butanal	0,027	0,010	0,012	0,011	0,010	0,006	Aldehyd
2-methyl-butanal	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Aldehyd
Hexanal	0,040	0,038	0,038	0,033	0,042	n.d	Aldehyd
trans-2-hexen-1-al	0,091	0,055	0,055	0,056	0,020	0,014	Aldehyd
1-propanol	24,833	18,751	18,297	18,132	19,341	16,890	Alkohol
2-butanol	0,045	0,029	0,025	0,028	n.d	n.d	Alkohol
2-methyl-1-propanol	28,973	44,321	21,340	34,083	25,433	11,882	Alkohol
3-methyl-1-butanol	110,034	77,816	75,976	79,566	88,627	38,906	Alkohol
2-methyl-1butanol	42,319	29,281	19,224	16,723	15,185	11,026	Alkohol
1-hexanol	0,658	0,056	0,053	0,047	0,030	0,005	Alkohol
Phenylethyl alcohol	85,895	58,717	72,000	50,147	57,366	21,881	Alkohol
Etanol	71666,667	46750,000	50287,500	49625,000	69000,000	100000,000	Alkohol
Ethylacetate	15,956	10,052	6,706	11,229	16,296	56,575	Ester
Isobutyl acetate	0,003	0,016	0,012	0,009	n.d	0,048	Ester
Butyl acetat	0,002	0,004	n.d	n.d	n.d	0,010	Ester
Isoamyl acetate	0,047	0,274	0,323	0,178	0,034	1,372	Ester
Ethyl hexanoate	0,058	0,074	0,087	0,063	0,179	0,544	Ester
Ethyl heptanoate	0,002	0,002	0,002	0,002	0,018	0,004	Ester
Ethyl octanoate	0,021	0,011	0,017	0,014	0,063	0,125	Ester
Ethyl nonanoate	0,001	n.d	0,001	n.d	n.d	n.d	Ester
Acetone	0,324	0,366	0,333	0,325	0,031	0,405	Keton
Diacetyl	0,073	0,075	0,013	1,157	n.d	n.d	Keton
2-butanone	0,012	0,033	0,029	0,026	0,016	0,028	Keton
2.3-pentadione	0,077	0,024	0,028	0,028	0,029	0,023	Keton
Acetoin	0,823	3,032	1,492	4,895	n.d	3,100	Keton
Dimethylsulfide	0,025	0,009	0,009	0,014	0,031	0,040	Sulfat





## Vedlegg 15: Sukkeromsetningen i løpet av 168 timer

Table 18: Oversikt over sukkerkonsentrasjonen over tid ved tre forskjellige temperaturer. 1 °Plato tilsvarer 1 g sukker per 100 g (Perpète and Collin, 2000).

Gjærstamme	Tid (timer)	°Plato 18 °C	°Plato 22°C	°Plato 25,5 °C
P1	0	16,13 ± 0,15	16,13 ± 0,15	16,13 ± 0,15
	24	16,10 ± 0,14	16,10 ± 0,14	16,08 ± 0,13
	96	15,95 ± 0,10	15,18 ± 0,26	13,65 ± 0,30
	168	15,20 ± 0,28	12,65 ± 0,34	10,90 ± 0,38
P2	0	16,10 ± 0,14	16,10 ± 0,14	16,10 ± 0,14
	24	15,60 ± 0,23	13,40 ± 0,16	11,45 ± 0,90
	96	10,25 ± 0,66	10,35 ± 0,88	10,38 ± 1,00
	168	11,28 ± 1,34	9,78 ± 0,66	9,88 ± 0,59
P3	0	16,10 ± 0,14	16,10 ± 0,14	16,10 ± 0,14
	24	15,88 ± 0,10	14,63 ± 0,13	13,08 ± 0,61
	96	10,33 ± 0,66	9,75 ± 0,64	9,95 ± 0,47
	168	10,20 ± 0,83	9,90 ± 0,56	9,93 ± 0,32
P4	0	16,08 ± 0,15	16,08 ± 0,15	16,08 ± 0,15
	24	15,55 ± 0,24	13,65 ± 0,39	12,58 ± 0,63
	96	11,05 ± 1,38	10,25 ± 0,57	10,35 ± 0,87
	168	10,15 ± 0,93	9,50 ± 0,60	9,75 ± 1,04

## Vedlegg 16: Reduksjon i pH i løpet av 168 timer

Oversikt over de gjennomsnittlige målingene av pH gjort over 168 timer for de fire gjærcellene, med standardavvik.

Gjærstamme	Tid (Timer)	pH 18 °C	pH 22°C	pH 25,5 °C
P1	0	4,960 ± 0,027	4,960 ± 0,027	4,960 ± 0,027
	24	4,965 ± 0,017	4,950 ± 0,018	4,920 ± 0,027
	96	4,820 ± 0,062	4,433 ± 0,104	4,173 ± 0,065
	168	4,470 ± 0,083	4,095 ± 0,030	3,993 ± 0,056
P2	0	4,958 ± 0,019	4,958 ± 0,019	4,958 ± 0,019
	24	4,678 ± 0,050	4,245 ± 0,056	4,123 ± 0,059
	96	4,215 ± 0,013	4,213 ± 0,059	4,195 ± 0,058
	168	4,348 ± 0,135	4,228 ± 0,036	4,233 ± 0,010
P3	0	4,970 ± 0,016	4,970 ± 0,016	4,970 ± 0,016
	24	4,838 ± 0,038	4,548 ± 0,022	4,280 ± 0,160
	96	4,220 ± 0,160	4,170 ± 0,050	4,235 ± 0,052
	168	4,303 ± 0,154	4,318 ± 0,084	4,333 ± 0,041
P4	0	4,935± 0,035	4,935± 0,035	4,935± 0,035
	24	4,690± 0,035	4,228± 0,121	4,165± 0,107
	96	4,228± 0,214	4,135± 0,105	4,153± 0,095
	168	4,208± 0,173	4,060± 0,018	4,148± 0,104

## Vedlegg 17: Etanolproduksjon i løpet av 168 timer

Oversikt over de gjennomsnittlige målingene av etanol gjort over 168 timer for de fire gjærcellene, med relativt standardavvik (%RSD) for å gi noe penere utforming av tabellen.

Gjærstamme (ppm±%RSD)	Tid (timer)	Etanol (ppm) 18 °C	Etanol (ppm) 22 °C	Etanol (ppm) 25,5 °C
P1	0	0,000	0,000	0,000
	24	132,93 ± 19,83 %	132,93 ± 31,79 %	380,43 ± 22,65 %
	96	1242,50 ± 48,78 % <sup>a</sup>	6606,07 ± 29,61% <sup>a</sup>	12264,68 ± 62,59 %
	168	6238,23 ± 27,67 %	23294,90 ± 10,27 %	38255,35 ± 3,18 %
P2	0	0,000	0,000	0,000
	24	4032,67 ± 17,66 %	17691,38 ± 14,01 % <sup>a</sup>	30393,33 ± 17,90 %
	96	38539,03 ± 10,61 % <sup>a</sup>	37146,50 ± 18,07 % <sup>a</sup>	40797,73 ± 22,45 %
	168	33879,85 ± 34,63 %	44789,88 ± 16,79 %	47376,60 ± 25,67 %
P3	0	0,000	0,000	0,000
	24	2037,53 ± 12,87 %	9502,85 ± 15,98 %	21078,78 ± 22,10 %
	96	38550,70 ± 19,32 %	44875,73 ± 16,39 %	45359,33 ± 7,93 %
	168	43249,78 ± 14,65 %	44868,85 ± 13,78 %	45411,15 ± 12,32 %
P4	0	0,000	0,000	0,000
	24	3754,98 ± 6,78 %	17266,60 ± 14,31 %	23344,40 ± 16,04
	96	32574,67 ± 14,45 % <sup>a</sup>	42080,33 ± 5,65 % <sup>a</sup>	44161,75 ± 11,85 %
	168	38992,83 ± 16,69 %	43411,13 ± 14,72 %	42825,97 ± 25,43% <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Prøvene ble ødelagt ved frysing, så det er kun beregnet standardavvik for 3 av 4 paralleller.

## Vedlegg 18: CO<sub>2</sub> -produksjon i løpet av 168 timer

Oversikt over de gjennomsnittlige målingene av etanol gjort over 168 timer ved tre forskjellige temperaturer for de fire gjærcellene, med tilhørende standardavvik. \*Prøven ble ødelagt, så det er 1 måling av denne parallellen og derfor ikke noe standardavvik.

Gjærstamme	Tid (timer)	CO <sub>2</sub> (g/L) 18 °C	CO <sub>2</sub> (g/L) 22 °C	CO <sub>2</sub> (g/L) 25,5 °C
P1	0	0,112 ± 0,067	0,112 ± 0,067	0,112 ± 0,067
	24	0,308 ± 0,220	0,467 ± 0,017	0,986 ± 0,005
	96	3,772 ± 0,757	35,890 ± 4,968	41,263 ± 8,643
	168	28,567 ± 1,348	46,787 ± 5,127	50,320 ± 1,427
P2	0	0,066 ± 0,025	0,066 ± 0,025	0,066 ± 0,025
	24	9,719 ± 0,175	28,162 ± 2,312	39,968 ± 9,000
	96	47,533 ± 13,826	48,090 ± 15,064	48,922 ± 10,377
	168	39,363 ± 1,037	42,592 ± 0,908	44,764 ± *
P3	0	0,051 ± 0,003	0,051 ± 0,003	0,051 ± 0,003
	24	4,512 ± 0,886	23,879 ± 8,004	44,184 ± 8,389
	96	46,033 ± 15,757	44,683 ± 11,000	46,689 ± 10,377
	168	46,336 ± 9,899	47,002 ± 5,071	45,042 ± 12,871
P4	0	0,047 ± 0,015	0,047 ± 0,015	0,047 ± 0,015
	24	11,198 ± 6,094	31,881 ± 11,398	42,950 ± 10,435
	96	43,210 ± 7,331	46,500 ± 11,432	48,760 ± 9,827
	168	49,611 ± 10,675	49,563 ± 14,467	51,249 ± 12,034

## Vedlegg 19: Høyere alkoholer i ferdig øl modnet i 48 dager

Table 19: Konsentrasjonen til høyere alkoholer etter modning på 48 dager.

Alkoholer (ppm±%RSD)	P1	P2	P3	P4	Orval I*	St. Bernadus*
1-propanol	24,83 ± 2,37 %	18,75 ± 1,89 %	18,29 ± 3,12%	18,13 ± 3,05 %	19,341	16,890
2-butanol	0,045 ± 4,767 %	0,029 ± 5,97 %	0,025 ± 14,14 %	0,030 ± 10,10 %	n.d	n.d
2-methyl-1- propanol	28,98 ± 2,31 %	44,32 ± 1,74 %	21,34 ± 2,02 %	34,08 ± 1,89 %	25,433	11,882
3-methyl-1- butanol	110 ± 2,12%	77,81 ± 1,81 %	75,97 ± 2,06 %	79,56 ± 1,96 %	88,627	38,906
2-methyl- 1butanol	42,32 ± 1,72 %	29,28 ± 1,49 %	19,22 ± 2,08 %	16,72 ± 1,87 %	15,185	11,026
1-hexanol	0,66 ± 2,55%	0,056 ± 22,31 %	0,053 ± 11,65 %	0,047 ± 18,05 %	0,030	0,005
Phenylethyl alcohol	85,89 ± 4,17%	58,71 ± 4,37 %	72,000 ± 7,83 %	50,14 ± 3,97 %	57,366	21,881
Etanol	71666 ± 1,25 %	46750 ± 0,74 %	5028 ± 0,25 %	49625 ± 0,41 %	69000	100000

\* Det ble ikke målt standardavvik eller gjennomsnitt for Orval og St. Bernadus, da det kun ble gjort en måling i HSGC-FID. Etanol innholdet er hentet fra etiketten på flasken.

## Vedlegg 20: Aldehydekonsentrasjonen etter modning i 48 dager

Konsentrasjonen til forskjellige aldehydkomponenter som forekommer i øl etter 48 dagers modning.

(ppm±%RSD)						
Acetaldehyde	14,728 ± 8,610 %	4,747 ± 34,231 %	3,750 ± 28,295 %	4,034 ± 21,730 %	1,11 0	6,563
2-methyl-propanal	0,015 ± 34,439 %	0,009 ± 29,322 %	0,008 ± 32,747 %	0,007 ± 15,071 %	0,03 2	0,007
3-methyl-butanal	0,027 ± 12,469 %	0,010 ± 13,354 %	0,012 ± 17,897 %	0,011 ± 10,072 %	0,01 0	0,006
2-methyl-butanal	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Hexanal	0,040 ± 19,039 %	0,038 ± 7,310 %	0,038 ± 9,076 %	0,033 ± 9,412 %	0,04 2	n.d
trans-2-hexen-1-al	0,091 ± 4,832 %	0,055 ± 4,592 %	0,055 ± 6,101 %	0,056 ± 3,555 %	0,02 0	0,014

## Vedlegg 21: Esterkonsentrasjon etter 48 dagers modning

Tabellen viser konsentrasjonen til forskjellige esterkomponenter i øl modnet i 48 dager.

Estere (ppm±%RSD)	P1 <sup>a</sup>	P2 <sup>b</sup>	P3 <sup>c</sup>	P4 <sup>d</sup>	Orval <sup>e</sup>	St. Bernadus <sup>c</sup>
Ethylacetate	15,956 ± 4,669 %	10,052 ± 66,999 %	6,706 ± 8,088 %	11,229 ± 18,338 %	16,296	56,575
Isobutyl acetate	0,003 ± 15,385 %	0,016 ± 4,701 %	0,012 ± 7,952 %	0,009 ± 13,429 %	n.d	0,048
Butyl acetat	0,002 ± 38,490 %	0,004**	n.d	n.d	n.d	0,010
Isoamyl acetate	0,047 ± 3,653 %	0,274 ± 5,475 %	0,323 ± 2,506 %	0,178 ± 3,714 %	0,034	1,372
Ethyl hexanoate	0,058 ± 3,330 %	0,074 ± 9,695 %	0,087 ± 10,719 %	0,063 ± 5,537 %	0,179	0,544
Ethyl heptanoate	0,002 ± 22,222 %	0,002 ± 11,765 %	0,002 ± 24,393 %	0,002 ± 30,974 %	0,018	0,004
Ethyl octanoate	0,021 ± 8,449 %	0,011 ± 10,622 %	0,017 ± 7,679 %	0,014 ± 11,979 %	0,063	0,125
Ethyl nonanoate	0,001**	n.d	0,001**	n.d	n.d	n.d

\* Det ble ikke målt standardavvik eller gjennomsnitt for Orval og St. Bernadus, da det kun ble gjort en måling i HSGC-FID.

<sup>a</sup> Standardavvik og gjennomsnitt for P1 er målt fra fire paralleller fra Batch 2. Første batch ble ødelagt av kullsyreinnholdet. Det ble ikke målt standardavvik eller gjennomsnitt for Orval og St. Bernadus da det kun ble gjort en måling i HSGC-FID. VDK-konsentrasjon etter 48 dagers modning

## Vedlegg 22: Ketonkonsentrasjonen etter modning i 48 dager

Table 20: Tabellen viser ketonkonsentrasjonen fra forskjellige komponenter i ølet etter modning i 48 dager.

Ketoner (ppm±%RSD)	P1	P2	P3	P4	Orval	St. Bernadus
Acetone	0,324 ± 7,020 %	0,366 ± 16,345 %	0,333 ± 6,355 %	0,325 ± 5,900 %	0,03 1	0,405
Diacetyl	0,073 ± 56,056 %	0,075 ± 114,685 %	0,013 ± 5,546 %	1,157*	n.d	n.d
2-butanone	0,012 ± 58,926 %	0,033 ± 21,051 %	0,029 ± 17,506 %	0,026 ± 54,333 %	0,01 6	0,028
2.3-pentadione	0,077 ± 47,261 %	0,024 ± 36,854 %	0,028 ± 56,675 %	0,028 ± 61,204 %	0,02 9	0,023
Acetoin	0,823	3,032 ± 29,146 %	1,492 ± 44,864 %	4,895 ± 10,572 %	n.d	3,100



# Vedlegg 23: Statistikk PCA, One-way Anova

## Principal Component Analysis

### Vekstforsøk etter 96 timer

Eigenanalysis of the Correlation Matrix

10 cases used, 2 cases contain missing values

Eigenvalue	12,599	4,985	2,196	1,978	0,806	0,614	0,421	0,251	0,150
Proportion	0,525	0,208	0,092	0,082	0,034	0,026	0,018	0,010	0,006
Cumulative	0,525	0,733	0,824	0,907	0,940	0,966	0,983	0,994	1,000

### Vekstforsøk etter 168 timer

Eigenanalysis of the Correlation Matrix

11 cases used, 1 cases contain missing values

Eigenvalue	12,690	4,302	3,119	1,648	0,910	0,577	0,340	0,213	0,117
Proportion	0,529	0,179	0,130	0,069	0,038	0,024	0,014	0,009	0,005
Cumulative	0,529	0,708	0,838	0,907	0,945	0,969	0,983	0,992	0,997

### Biplot av temperatur og innvirkning på flyktige stoffer

Eigenanalysis of the Correlation Matrix

25 cases used, 11 cases contain missing values

Eigenvalue	11,212	5,055	2,899	2,205	0,892	0,669	0,500	0,377	0,285
Proportion	0,448	0,202	0,116	0,088	0,036	0,027	0,020	0,015	0,011
Cumulative	0,448	0,651	0,767	0,855	0,890	0,917	0,937	0,952	0,964

Eigenvalue	0,276	0,170	0,127	0,083	0,071	0,063	0,039	0,037	0,021
Proportion	0,011	0,007	0,005	0,003	0,003	0,003	0,002	0,001	0,001
Cumulative	0,975	0,982	0,987	0,990	0,993	0,995	0,997	0,998	0,999

Eigenvalue	0,011	0,006	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Proportion	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cumulative	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

## Sammenlikning av 6 ølvariantene

Eigenanalysis of the Correlation Matrix

Eigenvalue	10,164	5,059	4,046	0,542	0,189	0,000	0,000	0,000	0,000
Proportion	0,508	0,253	0,202	0,027	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
Cumulative	0,508	0,761	0,963	0,991	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

## Sammenlikning av gjær i brygget øl

Eigenanalysis of the Correlation Matrix

Eigenvalue	17,907	4,112	2,981	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Proportion	0,716	0,164	0,119	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cumulative	0,716	0,881	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

## Vedlegg 24: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle 27 aromakomponentene

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	26	87953,3	3382,8	50,48	0,000
Error	970	65008,7	67,0		
Total	996	152962,0			

S = 8,187 R-Sq = 57,50% R-Sq(adj) = 56,36%

Level	N	Mean	StDev
Acetaldehyde	40	7,137	4,412
Acetone	40	0,596	0,220
Dimethylsulfide	30	0,002	0,001
2-methyl-propanal	40	0,039	0,061
1-propanol	40	10,402	8,106
Diacetyl	40	0,620	0,709
2-butanone	40	0,037	0,012
2-butanol	40	0,035	0,011
Ethylacetate	40	3,290	3,038
2-methyl-1-propanol	34	19,009	15,516
3-methyl-butanal	40	0,068	0,122
2-methyl-butanal	36	0,033	0,056
2.3-pentadione	40	0,414	0,643
Acetoin	39	2,762	2,355
3-methyl-1-butanol	37	37,378	28,199
2-methyl-1butanol	36	10,702	9,187
Isobutyl acetate	40	0,004	0,003
Hexanal	38	0,013	0,009
Butyl acetat	16	0,002	0,001
trans-2-hexen-1-al	40	0,052	0,008
1-hexanol	40	0,024	0,010
Isoamyl acetate	35	0,071	0,067
Ethyl hexanoate	40	0,025	0,021
Ethyl heptanoate	32	0,004	0,002
Phenylethyl alcohol	40	29,138	23,507
Ethyl octanoate	32	0,010	0,005
Ethyl nonanoate	32	0,002	0,001

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	-----+-----+-----+-----
Acetaldehyde	(-*-)
Acetone	(-*-)
Dimethylsulfide	(-*-)
2-methyl-propanal	(-*-)
1-propanol	(-*-)
Diacetyl	(--*-)
2-butanone	(-*-)
2-butanol	(-*-)
Ethylacetate	(-*-)
2-methyl-1-propanol	(-*-)
3-methyl-butanal	(-*-)
2-methyl-butanal	(-*-)
2.3-pentadione	(-*-)
Acetoin	(-*-)
3-methyl-1-butanol	(-*-) (-*-)
2-methyl-1butanol	(-*-)
Isobutyl acetate	(-*-)
Hexanal	(-*-)

Butyl acetat	(--*--)	
trans-2-hexen-1-al	(-*--)	
1-hexanol	(-*--)	
Isoamyl acetate	(-*--)	
Ethyl hexanoate	(-*--)	
Ethyl heptanoate	(-*--)	
Phenylethyl alcohol		(-*--)
Ethyl octanoate	(-*--)	
Ethyl nonanoate	(-*--)	

-----+-----+-----+-----+-----  
0      12      24      36

Pooled StDev = 8,187

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
3-methyl-1-butanol	37	37,378	A
Phenylethyl alcohol	40	29,138	B
2-methyl-1-propanol	34	19,009	C
2-methyl-1butanol	36	10,702	D
1-propanol	40	10,402	D
Acetaldehyde	40	7,137	D E
Ethylacetate	40	3,290	E F
Acetoin	39	2,762	E F
Diacetyl	40	0,620	E F
Acetone	40	0,596	E F
2.3-pentadione	40	0,414	E F
Isoamyl acetate	35	0,071	F
3-methyl-butanal	40	0,068	F
trans-2-hexen-1-al	40	0,052	F
2-methyl-propanal	40	0,039	F
2-butanone	40	0,037	F
2-butanol	40	0,035	F
2-methyl-butanal	36	0,033	F
Ethyl hexanoate	40	0,025	F
1-hexanol	40	0,024	F
Hexanal	38	0,013	F
Ethyl octanoate	32	0,010	E F
Isobutyl acetate	40	0,004	F
Ethyl heptanoate	32	0,004	E F
Ethyl nonanoate	32	0,002	E F
Butyl acetat	16	0,002	E F
Dimethylsulfide	30	0,002	E F

Means that do not share a letter are significantly different.

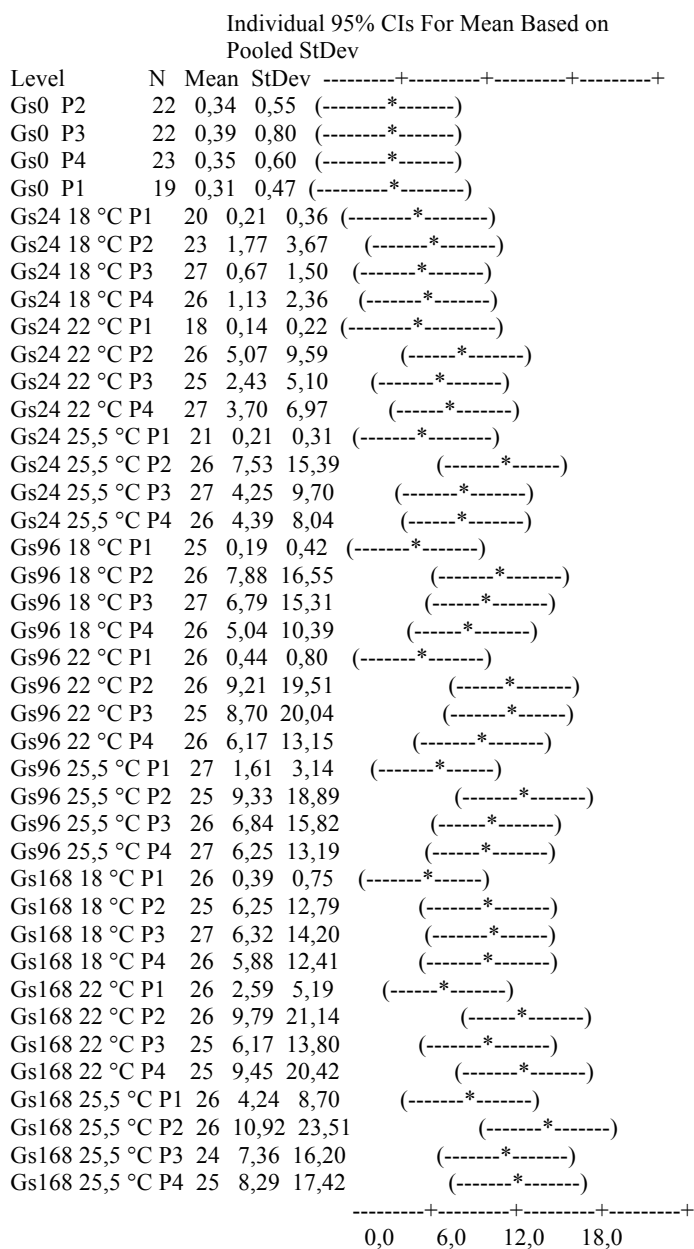
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,98%

# Vedlegg 25: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle gjærstammene ved forskjellige tiduttak og temperaturer

Source DF SS MS F P  
 Factor 39 11047 283 1,91 0,001  
 Error 957 141915 148  
 Total 996 152962

S = 12,18 R-Sq = 7,22% R-Sq(adj) = 3,44%



Pooled StDev = 12,18

### Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Gs168 25,5 °C P2	26	10,92	A
Gs168 22 °C P2	26	9,79	A
Gs168 22 °C P4	25	9,45	A
Gs96 25,5 °C P2	25	9,33	A
Gs96 22 °C P2	26	9,21	A
Gs96 22 °C P3	25	8,70	A
Gs168 25,5 °C P4	25	8,29	A
Gs96 18 °C P2	26	7,88	A
Gs24 25,5 °C P2	26	7,53	A
Gs168 25,5 °C P3	24	7,36	A
Gs96 25,5 °C P3	26	6,84	A
Gs96 18 °C P3	27	6,79	A
Gs168 18 °C P3	27	6,32	A
Gs168 18 °C P2	25	6,25	A
Gs96 25,5 °C P4	27	6,25	A
Gs96 22 °C P4	26	6,17	A
Gs168 22 °C P3	25	6,17	A
Gs168 18 °C P4	26	5,88	A
Gs24 22 °C P2	26	5,07	A
Gs96 18 °C P4	26	5,04	A
Gs24 25,5 °C P4	26	4,39	A
Gs24 25,5 °C P3	27	4,25	A
Gs168 25,5 °C P1	26	4,24	A
Gs24 22 °C P4	27	3,70	A
Gs168 22 °C P1	26	2,59	A
Gs24 22 °C P3	25	2,43	A
Gs24 18 °C P2	23	1,77	A
Gs96 25,5 °C P1	27	1,61	A
Gs24 18 °C P4	26	1,13	A
Gs24 18 °C P3	27	0,67	A
Gs96 22 °C P1	26	0,44	A
Gs0 P3	22	0,39	A
Gs168 18 °C P1	26	0,39	A
Gs0 P4	23	0,35	A
Gs0 P2	22	0,34	A
Gs0 P1	19	0,31	A
Gs24 25,5 °C P1	21	0,21	A
Gs24 18 °C P1	20	0,21	A
Gs96 18 °C P1	25	0,19	A
Gs24 22 °C P1	18	0,14	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,99%

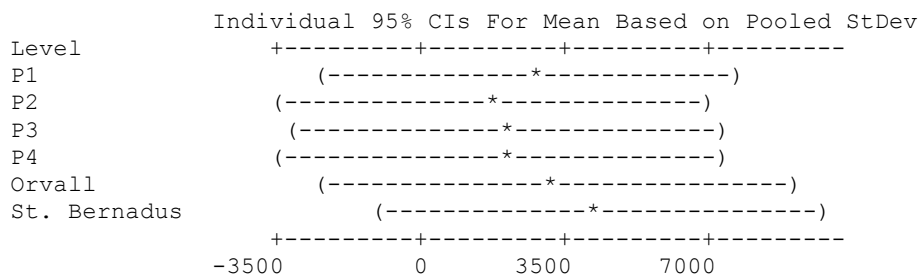
## Vedlegg 26: One-way ANOVA: Sammenlikning av alle 27 aromakomponentene etter 48 dager modning

### One-way ANOVA: P1; P2; P3; P4; Orvall; St. Bernadus 48 dagers modnet øl

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	117802068	23560414	0,13	0,986
Error	142	25935370232	182643452		
Total	147	26053172299			

S = 13515    R-Sq = 0,45%    R-Sq(adj) = 0,00%

Level	N	Mean	StDev
P1	27	2666	13790
P2	26	1808	9167
P3	26	1943	9860
P4	25	1994	9923
Orvall	21	3296	15055
St. Bernadus	23	4355	20850



Pooled StDev = 13515

#### Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
St. Bernadus	23	4355	A
Orvall	21	3296	A
P1	27	2666	A
P4	25	1994	A
P3	26	1943	A
P2	26	1808	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals  
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 99,56%

## Vedlegg 27: Oversikt over de kjemiske gruppene

Aldehyder	Alkoholer	Estere	Ketoner	Sulfider
Acetaldehyd	Etanol	Butylacetat	Acetoin	Dimethyl sulfide
Hexanal	Fenyletyl alkohol	Etyl acetat	Diacetyl (Butane-2,3-dione)	
Trans-2-hexen-1-al	1-hexanol	Etyl hexanoat	Acetone	
2-methyl-butanal	1-propanol	Etyl heptanoat	2-butanone	
2-methyl-propanal	2-butanol	Etyl oktanoat	2.3-pentadione	
3-methyl-butanal	2-methyl-1-butanol	Isoamyl acetat		
	2-methyl-1-propanol	Isobutyl acetat		
	3-methyl-1-butanol			

# Vedlegg 28: Oppskrift på ølet som ble brygget i denne oppgaven

**ODE testøl ved NMBU**  
American Pale Ale (10 A)

**Type:** All Grain  
**Batch Size:** 50,00 l  
**Boil Size:** 60,94 l  
**Boil Time:** 60 min  
**End of Boil Vol:** 55,94 l  
**Final Bottling Vol:** 48,00 l  
**Fermentation:** Ale, Single Stage  
**Taste Notes:**

**Date:** 01 Feb 2016  
**Brewer:** Ole Dischler Enger  
**Asst Brewer:**  
**Equipment:** Dummy 50 liter bryggeri  
**Efficiency:** 72,00 %  
**Est Mash Efficiency:** 77,5 %  
**Taste Rating:** 0,0

**Ingredients**

Amt	Name	Type	#	%/IBU
10,00 kg	Pale Malt, Maris Otter (Thomas Fawcett) (5,9 EBC)	Grain	1	66,7 %
4,00 kg	Amber Malt (43,3 EBC)	Grain	2	26,7 %
1,00 kg	Wheat Malt (Barrett Bursion) (2,3 EBC)	Grain	3	6,7 %
200,00 g	Fuggles (4,50 %) - Boil 60,0 min	Hop	4	39,1 IBUs
2,2 pkg	West Yorkshire Ale (Wyeast Labs #1469) [1000,00 ml]	Yeast	5	-

**Gravity, Alcohol Content and Color**

**Est Original Gravity:** 16,189 Plato  
**Est Final Gravity:** 5,245 Plato  
**Estimated Alcohol by Vol:** 6,1 %  
**Bitterness:** 39,1 IBUs  
**Est Color:** 21,7 EBC

**Measured Original Gravity:** 0,000 Plato  
**Measured Final Gravity:** 0,000 Plato  
**Actual Alcohol by Vol:** 0,0 %  
**Calories:** -4,0 kcal/l

**Mash Profile**

**Mash Name:** Single Infusion, Full Body, Batch Sparge  
**Sparge Water:** 36,84 l  
**Sparge Temperature:** 75,6 C  
**Adjust Temp for Equipment:** FALSE

**Total Grain Weight:** 15,00 kg  
**Grain Temperature:** 22,2 C  
**Tun Temperature:** 22,2 C  
**Mash PH:** 5,20

**Mash Steps**

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Mash In	Add 39,12 l of water at 75,7 C	68,9 C	45 min

**Sparge:** Batch sparge with 3 steps (Drain mash tun, 18,42l, 18,42l) of 75,6 C water  
**Mash Notes:** Simple single infusion mash for use with most modern well modified grains (about 95% of the time).

**Carbonation and Storage**

**Carbonation Type:** Keg  
**Pressure/Weight:** 65,21 KPA  
**Keg/Bottling Temperature:** 2,5 C  
**Fermentation:** Ale, Single Stage

**Volume of CO2:** 2,4  
**Carbonation Used:** Keg with 65,21 KPA  
**Age for:** 15,00 days  
**Storage Temperature:** 3,0 C

**Notes**

Created with BeerSmith



# Vedlegg 29: Identifisering av gjær isolert fra Orval

## Sekvens

F: 70-430, R: 60-440, >Contig-0

TTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTCTCTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTGATAACTGGGGGAGAAGAAAA  
 AATAATGAACGGCCGAAACCTTAAATCATTATCCCCTCACTCTCCCCTCTTCCCTTTGAAGAAAACACCCCTCGTGTA  
 ATCTCATAAACCACTAAATAGTGAGAAGGAAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAAGAGGGCGCAA  
 TGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGAAAAATCTGCAATTCACATTAAGTATCGCAATTCGCTGCGCTCTTCATC  
 GACGCGAACAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAAAATCTTCTTGACTAAACTAAATAAATTAATGTATT  
 TTTATCCTTGCTTATCCACGTGCTGCACGGGCTTGCGCCAGCATCTGTAATGATCCTTCCGACAGTTACCTAC  
 GGA

Description	Max score	total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Dekkera bruxellensis genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain R-52489	841	841	98%	0.0	100%	LK024189.1
Dekkera bruxellensis strain ATCC 200341, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete set	817	817	97%	0.0	99%	FJ545249.1
Dekkera bruxellensis voucher Bb, Tou, Fr1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete set	798	798	95%	0.0	99%	JG327829.1
Dekkera bruxellensis voucher Bb, Tou, Fr2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete set	797	797	95%	0.0	99%	JG327830.1
Dekkera bruxellensis 18S rRNA gene, ITS1, 26S rRNA and 5S rRNA genes (DNA tandem repeat 1), and partial 18S rRNA gene (DNA tandem repeat 2), strain CBS 2499	787	787	100%	0.0	98%	AM850055.1
Dekkera bruxellensis voucher Bb, FS, USJ1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	782	782	95%	0.0	99%	JG327831.1
Dekkera bruxellensis voucher Bb, FS, USJ3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	776	776	95%	0.0	99%	JG327833.1
Breitanomices bruxellensis CBS 72 ITS region, from TYPE material	730	730	85%	0.0	100%	NR_111030.1
Breitanomices bruxellensis strain CBS 73 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	713	713	85%	0.0	99%	AF043500.1
Breitanomices bruxellensis strain UCD 615 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	704	704	85%	0.0	99%	AF043505.1
Breitanomices bruxellensis strain UCD 605 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	699	699	85%	0.0	99%	AF043504.1
Breitanomices bruxellensis strain CBS 4914 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	693	693	85%	0.0	98%	AF043503.1
Dekkera bruxellensis strain L70 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, a	688	688	84%	0.0	98%	DQ674253.1
Dekkera bruxellensis isolate YMC 3.3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	688	688	85%	0.0	98%	AY518595.1
Dekkera bruxellensis strain ATCC 56886, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete set	684	684	97%	0.0	94%	JX094777.1

# Vedlegg 30: Identifisering av gjær isolert fra St. Bernadus

Sekvens, F: 90-580, R:60-490, >Contig-1

TTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGCAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTAC  
 TTGCATTATACCTCAAGCAGCAGAGAAACCTCTCTTTGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTT  
 CAAGTTAACTCAAAGAGTATCACTCACTACCAAAACAGAATGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAAACAGGCATGC  
 CCCCTGGAATACCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATTCACGGGAATTCGCAATTCACATTACGTA  
 TCGCATTTTCGCTGCGTTCTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTTAATATTTAAAATTC  
 CAGTTACGAAAATTCTGTTTTTGACAAAAATTTAATGAATAAATAAAATT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM1307 chromosome XII sequence	795	1.218e+05	100%	0.0	100%	CP006391.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate YN2_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	795	795	100%	0.0	100%	KJ602681.1
<i>Saccharomyces</i> sp. YC9-13_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and	795	795	100%	0.0	100%	KF747750.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and	795	795	100%	0.0	100%	KF447149.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain JN22 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	795	795	100%	0.0	100%	KC342927.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain JN2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	795	795	100%	0.0	100%	KC342907.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain Chicha 08_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	795	795	100%	0.0	100%	KC183729.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain Chicha 07_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete	795	795	100%	0.0	100%	KC183728.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain K2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	795	795	100%	0.0	100%	JQ1768412.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence, strain: IFO 2080	795	795	100%	0.0	100%	AB212265.1
Uncultured fungus clone IN_185_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	789	789	100%	0.0	99%	KR535597.1
Uncultured fungus clone IN_175_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	789	789	100%	0.0	99%	KR535597.1
Uncultured fungus clone IN_174_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	789	789	100%	0.0	99%	KR535598.1
Uncultured fungus clone IN_164_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	789	789	100%	0.0	99%	KR535576.1
Uncultured fungus clone IN_163_18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	789	789	100%	0.0	99%	KR535575.1

## Vedlegg 31: Materialer brukt i oppgaven

Materiale	Produsent
15 mL sentrifugerør	VWR
Mikroskop	Leica ICC50 HD (program til å ta bilde med: Leica LAS EZ)
pH-meter	PHM 92 LAB pH METER, Radiometer, Copenhagen
Petriskål	Heger AS
<b>PDA-agar</b> Dextrose Broth Agar	Difco Potato Dextrose Broth, BD, USA Agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<b>GYP-buljong</b> D(+)-Glucose Yeast Extract Mykologisk pepton	D(+)-Glucose monohydrate, Merck KGaA, Darmstadt, Germany LP0021 Yeast Extract, Oxoid, LTD, Hampshire, England LP0040 Mycological, Oxoid, LTD, Hampshire, England
Orval Trappiste (6,90%) St. Bernadus Abt. 12 Magnum Edition 2015 (10%)	Brasserie d'Orval Brouwerij St Bernardus
Blåtopplasker 50 mL	VWR
Blåtopplasker 500 mL	VWR
Blåtopplasker 1000mL	VWR
Vortexer	
CO2-måler	ADC 225 MK3
Filterpapir 596 ½ ø125	Schleicher & Schuell
Trakt	VWR
Erlend-Meyer kolbe 250 mL	VWR
Headspace-flasker	Machery Nagel, DUeren, Tyskland
Forseglingkorker med teflonbelegg (HSGC)	PTFA/Si septa, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA.
Refraktometer N1	Atago, Japan
Beer Brew	Model No.: BB30-3
Pasteur Pipette 5 mL	VWR
Pasteur Pipette 7 mL	VWR
Varmeskap 18 °C	Tamro Fermaks
Varmeskap 22 °C	Fermaks
Varmeskap 25,5 °C	Fermaks
Fryser -22 °C	Fryser (Gram)
Kjøleskap 4 °C	Kjølerom (LU-VE) Contardo kjøleelement
WLP500	White Labs: Pure Yeast & Fermentation
WLP510	White Labs: Pure Yeast & Fermentation
Pale Malt	Maris Otter, 5,9 (EBC)
Amber Malt	Maltsters, Castleford (125 EBC)
Wheat Malt	Barret Burston (4 EBC)
Malkvern	
Maltvekt DX342	Avery Berkel
Finvekt Mettler PM480	DeltaRange®
Humle	Fuggles (4,2%), England
30 L Fermenteringsdunk	
Bryggesystem	CoEnCo 60 L Pro
Automatpipette 1-5 mL	Finnpipette Thermo scientific FJ26392 4500
Automatpipette 0,2-1 mL	Finnpipette Thermo Electron Corporation CH84730 4500
Automatpipette 1-10 µL	Finnpipette Thermo Electron Corporation
Automatpipette 20-200 µL	Finnpipette Thermo Electron Corporation
<b>Isolering av DNA:</b> Gelred Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) SeaKem LE Agarose (Lonza)	
iProof High fidelity DNA Polymerase (Catalog #172- 5301)	BioRad Laboratories
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen (Cat No. 28104)
ITS1 (forward primer)	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS4 (reverse primer)	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
UltraClean Microbial DNA Isolation Kit	Mo Bio Laboratories Inc. (Catalog #12224-250)
C1000™ Thermal Cycler	Bio Rad

Ringers 9,9 mL	
Tellekammer	Bürker tellekammer
Gjærlåser	Bryggeland
Autoklav	(Getinge Ref. GEL2606ECK-1) 121 grader øvretemp i 1,5 timer.
Stor sentrifuge	Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X3R Centrifuge
Anton Paar	
Excel	Microsoft
Minitab	Statistikk-programvare
Oppvaskmaskin	Jeros Model 9117, Odense, Danmark

## Næringsmedium brukt til vekst av gjærceller

### Potato Dextrose Agar (PDA-agar)

- 24 g/L Dextrose Broth (Difco Potato Dextrose Broth, BD, USA)
- 15 g/L Agar (Agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Blandingen ble overført i 5 x 1L blåtoppflasker, etterfulgt av koking og autoklivering.

### Glucose Yeast Peptone (GYP) næringsbuljong

- 20 g/L D(+)-Glucose (D(+)-Glucose monohydrate, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 1,5 g/L gjærekstrakt (LP0021 Yeast Extract, Oxoid, LTD, Hampshire, England)
- 10 g/L Mykologisk pepton (LP0040 Mycological, Oxoid, LTD, Hampshire, England)

Mediet ble autoklavert sammen med PDA-agaren. Det ble overført 5 mL til 50 stk.

Reagensrør og resten i 250 mL blåtoppflasker. GYP-agaren ble brukt til innstøpning av gjærceller i vekstforsøket.





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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway