

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi bioteknologi og matvitenskap

Ko-fermentering av surøl med bruk av kveik, *Lb brevis* og *B. bruxellensis*

Co-fermentation of sour beer using kveik, *Lb. brevis*
and *B. bruxellensis*

Elias Ernestus Prytz

Matvitenskap, produksjon og utvikling (KBM)

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende del av en Mastergrad i Matvitenskap ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Norges miljø og biovitenskapelige universitet.

Oppgaven utgjør 30 studiepoeng og er gjennomført høsten og vinteren 2020. Året 2020 har vært et vanskelig år for de fleste, og det har vært mange utfordringer på veien til å fullføre studiet. Jeg vil derfor gjerne takke alle som har hjulpet meg å fullføre studiet og denne masteroppgaven.

En spesiell takk til begge veilederne mine Hilde Marit Østlie og Trude Wicklund som med deres kombinerte ekspertise har gitt meg grunnlaget for å utføre og skrive denne oppgaven. Tusen takk til alle dere på labben og pilotbryggeriet for mye hjelp og gode samtaler i løpet av denne høsten. En spesiell takk til May Aalberg for praktisk hjelp og ikke minst for alle literne med kaffe gjennom høsten. Takk til Kari Olsen for hjelp og gjennomføring av kjemiske analyser og takk til Reidar Barfod Schüller for utføring av reologiske analyser på kort varsel. Jeg er også veldig takknemlig for all støtte og motivasjon fra familie og spesielt samboeren min Tina Øvrebø som både har motivert meg og korrekturlest på tross av sin egen sykdom og arbeidspresset ved å være nyutdannet lektor under en pandemi.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Ås, 07 januar 2021

Elias Ernestus Prytz

Sammendrag

I denne oppgaven ble det utført et småskala vekstforsøk og et bryggeforsøk, for å undersøke om man ved bruk av kofermentering med kveik gjær, melkesyrebakterier og villgjær kan lage et surøl. Som har høy aromakompleksitet på en mer økonomisk og hurtigere måte enn tilsvarende spontanfermenterte surøl produkter. Småskala vekstforsøket ble gjentatt 3 ganger. pH, sukkerinnhold og celletall ble analysert ved dag 0, 2, 4 og 7. Det ble også utført «headspace» gasskromatografi analyse for å analysere innholdet av organiske syrer og karbohydrater ved dag 0 og dag 7. Flyktige forbindelser ble også analysert ved dag 0 og dag 7 med “high-performance liquid chromatography”. I bryggeforsøket ble pH og sukkerinnhold målt ved dag 0, 2, 4, 7, 14, 21 og 28. Ølet ble deretter flasket og analysert for viskositet, etanolinnhold og farge.

I småskalaforsøket ble det observert saktere nedgang i sukkerinnhold prøvene med ølgjæren US-05 og *Lb. brevis* sammenlignet med alle Sigmund Voss kveik prøvene og også ren US-05. Ren US-05 hadde like rask nedgang i sukkerinnhold som Sigmund Voss kveik prøvene. Som tyder på ingen forskjell i fermenteringshastighet. Celletallsanalysene viste ingen nedgang i celletall hos Sigmund Voss kveik prøvene, selv flere dager etter sukkerinnholdet stabiliserte seg som tyder på at hovedfermenteringen er over. Det høye celletallet av kveik celler i prøvene gjorde det vanskelig å tyde celletall resultatene til de andre mikroorganismene, grunnet lav selektivitet i vekstmediet benyttet.

US-05 prøvene med *Lb. brevis* hadde høyere dannelse av laktat og lavere pH enn tilsvarende prøver med Sigmund Voss kveik. Dette tyder på at kveiken har utkonkurrert *Lb. brevis* de første dagene av fermenteringen. Ren US-05 hadde ved dag 7 verdier for 3-metyl-1-butanol over terskelverdien. Sigmund Voss kveik prøvene dannet acetaldehyd over terskelverdien i prøvene som ikke var tilsatt *B. bruxellensis*. Det var ingen store forskjeller i ester dannelse mellom Sigmund Voss kveik og US-05 for de andre esterene som ble analysert. I bryggeforsøket ble det observert høy viskositet i flere flasker under sensorisk analyse, reologiske analyser bekreftet dette. Den høye viskositeten tyder på en infeksjon av en ukjent bakterie som produserer ekstracellulære polysakkarider.

Konklusjonen med denne studien er at resultatene viser positive indikasjoner på muligheten for bruk av kveik i kofermentering av surøl. På grunn av infeksjon i bryggeforsøket og kort fermenteringstid i småskalaforsøket, må videre forskning til før man kan si om kveik kan benyttes til å lage et surøl med høy aromakompleksitet i løpet av kortere tid enn tradisjonelle metoder.

Abstract

In this thesis a small-scale growth and metabolism study and a larger scale brewing study was done. The purpose of the study was to examine if it is possible to produce a sour beer with high aroma complexity in a short amount of time using kveik yeast, lactic acid bacteria and wild yeast with co-fermentation. In the small-scale study measurements of pH, sugar content and cell count were done after 0, 2, 4 and 7 days. A headspace gas chromatography analysis was also done at day 0 and 7 to analyse the content of organic acids and carbohydrates in the samples. Volatile components were also analysed at day 0 and 7 using high-performance liquid chromatography. In the brewing study measurements of pH and sugar content was done after 0, 2, 4, 7, 14, 21 and 28 days. After 28 days of fermentation the beer was bottled and carbonated, and thereafter the viscosity, ethanol content and colour were analysed.

In the small-scale study it was observed a slower decrease in sugar content in the samples containing the yeast US-05 and *Lb. brevis* compared to all the samples containing Sigmund Voss kveik and also compared to pure US-05. Pure US-05 had approximately the same decrease in sugar content as the samples with Sigmund Voss kveik. Indicating no difference in fermentation rate. The cell count analysis showed no decrease in cell count in all the samples with Sigmund Voss kveik, even after the sugar content had stabilized indicating stop in the primary fermentation. The high cell count of kveik yeast cells made it difficult to evaluate the cell count for the other microorganisms in the sample due to low selectivity in the growth media used.

The US-05 samples with *Lb. brevis* had a higher formation of lactate and a lower pH compared to the samples with Sigmund Voss kveik and *Lb. brevis*. This indicates that the kveik has outcompeted *Lb. brevis* the first days of the fermentation. Pure US-05 had at day 7 values of 3-methyl-1-butanol over the sensorial threshold values. Sigmund Voss kveik had formation of acetaldehyde over the sensorial threshold value, but however not when *B. bruxellensis* was present together with the kveik. There were no big differences in ester formation between US-05 and Sigmund Voss kveik for the other esters that were analysed. In the brewing study it was observed high viscosity in multiple of the bottles during a sensory evaluation, rheological analysis confirmed this observation further. The high viscosity indicates an infection from an unknown bacteria that produces extra cellular polysaccharides.

The conclusion of this study is that the results shows positive indication for the possibility of using kveik in the co-fermentation of sour beer. Because of the infection in the brewing study and short fermentation time in the small-scale study, further research must be done before it is possible to determine if kveik can produce a sour beer with high aroma complexity quicker than traditional methods.

Forkortelser

AAT	Alkohol acetyltransferase
AEAT-ase	Acyl-CoA:ethanol O-acyltransferaser
CoA	Koenzyme A
DMS	Dimethyl sulfide
EBC	European brewery convention
EPS	Ekstracellulære polysakkarider
FID	flame ionization detection
HPLC	high performance liquid chromatography
HSGC	head space gas chromatography
KDE	kolonidannende enheter
MCFA	Medium-chain fatty acid
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
MSB	Melkesyrebakterier
POF	Phenolic off flavour / fenolsk bismak
RB	Rose Bengal
SV	Sigmund Voss Kveik
SVL	Sigmund Voss Kveik med <i>Lb. Brevis</i>
SVLB	Sigmund Voss Kveik med <i>Lb. Brevis</i> og <i>B. bruxellensis</i>
US	US-05
USL	US-05 med <i>Lb. Brevis</i>
USLB	US-05 med <i>Lb. Brevis</i> og <i>B. bruxellensis</i>
VDK	Vicinale diketoner
YM	Yeast and mold

Innhold

Forord	i
Sammendrag.....	ii
Abstract.....	i
1. Innledning	1
2. Teori.....	2
2.1 Ølbrygging.....	2
2.1.1 Malting	2
2.1.2. Vørterproduksjon	3
2.1.3 Fermentering.....	6
2.1.4 Surøl produksjon.....	8
2.2 Mikroorganismer i øl	10
2.2.1 Saccharomyces.....	10
2.2.2 Kveik	11
2.2.3 Brettanomyces	12
2.2.4 Melkesyrebakterier.....	13
2.3 Aromakomponenter i øl	14
2.3.1 Høyere alkoholer.....	14
2.3.2 Estere.....	14
2.3.3 Aldehyder	16
2.3.4 Vicinale diketoner (VDK)	16
2.3.5 Svovelkomponenter.....	16
2.3.6 Aromakomponenter fra <i>B. bruxellensis</i>	18
3 Materialer og metoder.....	19
3.1 Forberedelser og tillaginger.....	19

3.1.1	Tillaging vekstmedier.....	19
3.1.2	Tillaging frysestock av <i>Lactobacillus brevis</i> BSO464.....	19
3.1.3	Tillaging 20% laktat.....	19
3.2	Småskala vekstforsøk.....	20
3.2.1	Tillaging starterkultur.....	20
3.2.2	Vekstforsøk i steril vørter.....	20
3.2.3	Analyser.....	22
3.3	Pilotskala øl brygging.....	24
3.3.1	Tillaging starter kultur.....	24
3.3.2	Vørter produksjon.....	25
3.3.3	Inokulering av vørter.....	26
3.3.4	Fermentering og modning.....	27
3.3.5	Prøvetaking og analyser.....	27
4	Resultater.....	30
4.1	Småskala vekstforsøk resultater.....	30
4.1.1	Analyse av pH og sukkerinnhold under fermentering.....	30
4.1.2	Analyse av vekst.....	32
4.1.3	HPLC analyse.....	36
4.1.4	Flyktige komponenter.....	39
4.2	Bryggeforsøk resultater.....	47
4.2.1	Sukkerinnhold under fermentering.....	47
4.2.2	pH analyse.....	49
4.2.3	Anton Paar analyse.....	50
4.2.4	Sensorisk analyse.....	51
4.2.5	Reologisk viskositets analyse.....	51
5	Diskusjon.....	53
5.1	Småskala vekstforsøk.....	53

5.1.1 Sukkerinnhold analyse	53
5.1.2 Celletall analyse	53
5.1.3 pH analyse	55
5.1.4 HPLC analyse	56
5.1.5 Høyere alkoholer.....	58
5.1.6 Estere.....	59
5.1.7 Diacetyl	61
5.1.8 Acetaldehyd	61
5.2 Bryggeforsøk	62
5.2.1 Sukkerinnhold analyse	62
5.2.2 pH analyse	63
5.2.3. Alkoholinnhold og farge.....	63
5.2.4 Sensorisk analyse	64
5.2.5 Reologiske egenskaper	64
6 Konklusjon, oppsummering og videre arbeid	65
7 Referanser	68
8 Vedlegg	73

1. Innledning

Drikking av alkoholholdige drikker stammer mest sannsynlig helt tilbake til midten av steinalderen. Vi kan anta at alkohol ble oppdaget ved tilfeldigheter ved for eksempel å la fortynnet honning eller annen sukkerholdig drikke stå ute over lang tid slik at etanol ble dannet i væsken. Tidligste arkeologiske funn som tyder på øl (alkoholholdig drikke basert på korn) produksjon ble funnet i Egypt og Mesopotamia som stammer fra 3000-5000 f.Kr (Hornsey, 2003).

Norge har en lang historie med ølbrygging, nøyaktig hvor lenge er man ikke helt sikker på, men det første nedskrevne beviset i dag er Gulatingsloven som ble vedtatt i ca. år 1000 e.Kr. Denne loven sa at alle frie menn var pålagt å brygge juleøl (Garshol, 2016). Dersom man ikke brygget juleøl tre år på rad kunne man bli fratatt alt man eide (Ringnes, u.å.). For at en lov som Gulatingsloven skulle bli vedtatt må ølbrygging allerede ha vært en stor del av kulturen og da startet lenge før. Den gamle ølbryggingskulturen døde ut i Norge for rundt 300 år siden, men noen gårdsbryggere har holdt tradisjonen i live. Flere av disse tradisjonsbryggerne bruker egne gjærkulturer som kalles kveik. Disse gjærkulturene er vist til ha særegne egenskaper sammenlignet med kommersiell ølgjær og har i de siste årene fått stor oppmerksomhet internasjonalt og nasjonalt (Preiss et al., 2018; Garshol, 2016).

I starten av bryggehistorien var alt ølet som ble laget en form for surøl da alt ble spontanfermentert og ingen metoder for å forhindre en bakteriell infeksjon ble brukt. Et av verdens dyreste og mest ettertraktede øl er Lambic øl fra Belgia. Lambic er et surøl laget på tradisjonelt vis og lagret i minimum 1-3 år (Bordenave, 2003; Tonsemeire, 2014). Idag er pre-fermentering den vanligste måten å produsere surøl på da det er mye billigere og raskere å produsere surøl med pre-fermentering, men ølet får en mye lavere aromakompleksitet sammenlignet med spontanfermentert øl slik som Lambic. (Bossaert et al., 2019).

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke om man kan gjennom kofermentering med kveik sammen med renkulturer av melkesyrebakterier og villgjær lage et surøl med høy aromakompleksitet, på en raskere og mer kostnadseffektiv måte enn den tradisjonelle lambic metoden.

2. Teori

2.1 Ølbrygging

Bryggeprosessen består av 6 trinn: kverning er første steg der maltet kvernes for å øke overflateområdet, mesking, skylling, koking, fermentering og flasking/modning (Palmer, 2006).

2.1.1 Malting

Selv om at malting ofte ikke regnes som en del av bryggeprosessen er det en viktig forbehandling av kornet for å få mest mulig ut av kornet i form av både aromakomponenter og fermenterbart sukker. Malting er prosessen der stivelse og andre komplekse næringsstoffer i kornet brytes ned av enzymer slik at næringsstoffene blir mer tilgjengelige for gjæren. Bygg er den vanligste kornsorten brukt til malting, men også andre kornsorter som hvete og mais kan brukes (Palmer, 2006).

Støping

Malting består av tre stadier der støping er det første. Ved støping legges kornet i vann slik at fuktigheten i kornet økes til 35-45%. Dette fører til økt respirering i kornet som bruker opp oksygen og danner varme. For å sikre nok mengder oksygen og riktig temperatur tappes vannet av og kornet kjøles ned med luft eller med tilsetning av nytt kaldt vann. Dette kan gjøres kontinuerlig eller ved behov under støpingen som kan vare fra 20-50 timer (Rasmusson et al., 1985).

Germinering

Når støpe prosessen er ferdig legges kornet til spiring/germinering. Kornet spres ut på et flatt underlag og kjøles ned med kald luft eller med vending av kornet for å holde temperaturen nede (Rasmusson et al., 1985). Under germineringen bryter β -glukanaser ned celleveggen og amylaser og proteaser bryter ned henholdsvis stivelse til glukose og proteiner til aminosyrer som kornet trenger som næring for å spire (Lea & Piggott, 2012).

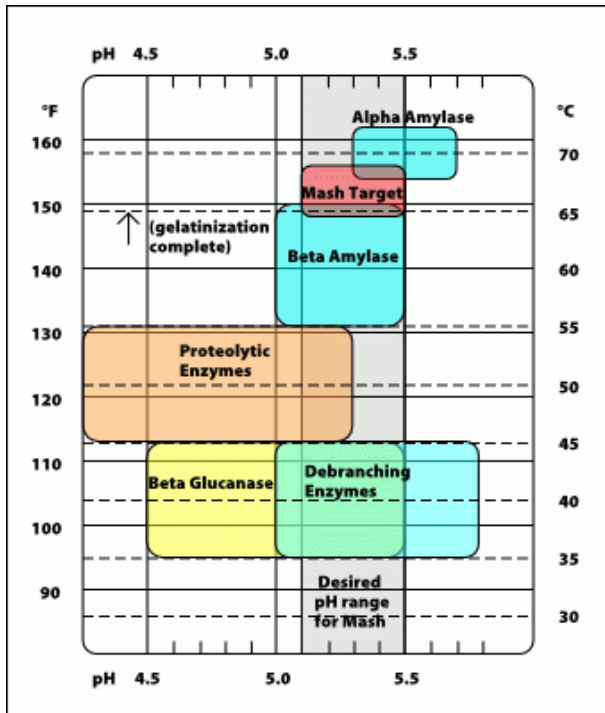
Kjølling

I siste del av maltingsprosessen tørkes kornet for å gjøre maltet klar til lagring. Først tørkes kornet til ca. 20%. I dette trinnet brukes lave temperaturer for å hindre denaturering av enzymer. Når fuktigheten har sunket til 20% er enzymene mer varmetolerante og temperaturen økes for å tørke kornet videre ned til 4-5% fuktighet. Kornet kan varmebehandles enda ytterligere for å øke Maillard reaksjoner for å gi ekstra farge og smak til kornet. Malt som varmebehandles over 85°C kalles ofte karamell malt eller krystall malt og er en type spesialmalt som har mindre enzymaktivitet, men stor påvirkning på det endelige produktet gjennom alle Maillard komponentene som blir dannet (Rasmusson et al., 1985).

2.1.2. Vørterproduksjon

2.1.2.1. Mesking

Under mesking blandes det kvernedede maltet sammen med vann ved visse temperaturer. Det brukes tre forskjellige metoder for å få ønsket temperatur under meskingen. En meskemetode er dekoksjon mesking. I denne metoden varmes en liten andel av mesken opp til høy temperatur for å så blandes sammen med resten for å øke total temperaturen. Dette kan gjøres flere ganger i løpet av meskeperioden (Pires & Brányik, 2015b). Den vanligste meske metoden for de fleste hjemmebryggere idag er et trinns infusjons mesking. I denne metoden holdes mesken ved en jevn temperatur under hele meskingen. Temperaturen som brukes varierer mellom 64°C og 69°C. Den siste metoden er flertrinns infusjons mesking. Ved denne metoden øker man temperaturen i flere steg med hensikt å få høy aktivitet av forskjellige spesifikke enzymer ved hver temperatur (Lea & Piggott, 2012). De vanligste enzymgruppene i mesking er vist i figur 2.1 sammen med optimal pH og temperatur for de forskjellige enzymgruppene.



Figur 2.1. Diagram med vanlige enzymgrupper i mesking og deres optimale pH- og temperaturområder (Palmer, 2006).

Det laveste temperaturområdet er fra 35-45°C, i dette temperaturområder brytes β -glukaner enzymatisk ned av β -glukanaser (Palmer, 2006). β -glukaner er vannløselige fiber som finnes i celleveggen i kornet. β -glukaner består av glukosemolekyler bundet sammen med både β -(1-3) bindinger og β -(1-6) bindinger (Samaan, 2017). Nedbrytning av disse komponentene eksponerer stivelseskornene i større grad som gir bedre utbytte av kornet. Høyt innhold av β -glukaner i mesken kan føre til økt viskositet i vørteren som kan gi problemer med skylling og mesking (Vis & Lorenz, 1997). Enzymet fytase har også optimumsområde rundt 35 °C. Fytase bryter ned fytin slik at det dannes mineraler og fytinsyre som gir en nedgang av pH i mesken (Palmer, 2006).

Ved 45-55°C er det proteaser og peptidaser som er mest aktive. Proteaser bryter ned proteinkomplekser til peptider og peptidaser bryter peptidene videre ned til aminosyrer som er nødvendig næring for gjærceller. Store proteiner sammen med polyfenoler fører til uklarehet i ølet ved at det dannes en kolloidal løsning der proteinene er så store at de reflekterer lys. Et meskesteg ved disse temperaturene kan da gi klarere øl med å forhindre dette (Siebert et al.,

1996). De mindre peptidkjedene som dannes etter at proteinasene har vært aktive virker også positivt for skumfasthet da slike peptider kan stabilisere overflaten mellom luft og væske i et skum (Damodaran et al., 2007; Palmer, 2006).

Temperaturområdet 55-70°C er det viktigste under meskingen, det er i dette temperaturområdet amylasene er mest aktive. Amylaser er ansvarlige for å bryte ned stivelse til mindre karbohydrat enheter. β -amylase har temperaturoptimum fra 55-66°C (Palmer, 2006) og klipper av et og et maltose molekyl fra den reduserende enden av stivelsesmolekylet. α -amylase derimot klipper opp stivelsesmolekylet på tilfeldige plasser og danner dekstriner. α -amylase har et noe høyere temperaturoptimumsområde (67-70°C) enn β -amylase (Lea & Piggott, 2012). Under meskingen kan man selektere for α - eller β - amylase aktivitet ved å justere temperaturen. Ved høyere temperatur (67-70°C) vil α -amylase være mer aktiv og danne mer dekstriner, dette gir ølet mer restsødme og fylde. Mesking ved lavere temperaturer (55-66°C) vil gi et øl med mer fermenterbart sukker og da mindre restsødme (Palmer, 2006).

2.1.2.2. Humle og koking

Humle er en slyngplante som vokser i store deler av verden. Humle har separate hann og hun planter, det er hun-planten som lager konglene som brukes i ølbrygging. Humle ble i utgangspunktet tilsatt øl på grunn av de antimikrobielle egenskapene humlen har, men i dag blir de sensoriske egenskapene også høyt verdsatt. Det er kvaen til humlen som står for mange av de ønskede egenskapene til humlen. Kvaen inneholder α -syrer og β -syrer å gir bitterhet til ølet (Palmer, 2006). Det har blitt vist at humle har gode antimikrobielle egenskaper mot Gram positive bakterier men ikke Gram negative (Shimwell, 1937). Dette skyldes at α -syrer i humle kvaen foreligger i udisosiert form i vørteren. Dette vill si at de ikke har en ladning og kan da føres over cellemembranen. Inne i cellen er det en høyere pH (over pKa) som fører til dissosiering og da en pH nedgang inne i cellen som igjen fører til ødeleggelse av PMF (proton motive force) og samtidig kan enzymene inne i cellen denatureres ved forandring i pH (Simpson & Smith, 1992).

Varmebehandling av humlen (koking)

Under koking oppkonsentreres vørteren og proteiner feller ut, men det er hovedsakelig humletilsetning og isomersisering av α -syrer som er det viktigste i dette steget av bryggingen. I hvilken grad humlen varmebehandles under kokingen har stor betydning for hvordan humlen påvirker det ferdige ølet. Aromakomponentene fra humlen er hovedsakelig aromatiske oljer som er flyktige. Disse vil fordampe ved de høye temperaturene under koking. α -syrene i humlen er i utgangspunktet ikke løselig i vann, men med varmebehandling vil α -syre isomeriseres til iso- α -syre som er vannløselig og gir bitterhet og antimikrobielle egenskaper til vørteren (Malowicki & Shellhammer, 2005; Palmer, 2006). Dersom humle tilsettes sent i kokingen vil lite isomerisering inntreffe og ølet vil få lite bitterhet, men ha store andeler av de aromatiske oljene igjen i vørteren. Humle som tilsettes sent i kokingen kalles derfor ofte aromahumle. Humle kan også tilsettes etter koking når fermenteringen har begynt og denne prosessen kalles tørr-humling (Palmer, 2006). Humle inneholder også tanniner men disse reagerer med proteiner og salter i vørteren og felles ut slik at de ikke påvirker smaken i stor grad (Doyle et al., 2007).

Lagring av humle

I produksjon av Lambic øl er det vanlig å bruke lagret humle. Humlen lagres under oksygenrike forhold og ved moderate til høye temperaturer fører dette til autooksidasjon av noen stoffer i humlen slik som α -syrer. Denne omdannes til flere oksidative produkter som ikke gir noen form for bitterhet, men fortsatt har antimikrobiell effekt (De Keukeleire & Verzele, 1971; Taniguchi et al., 2013).

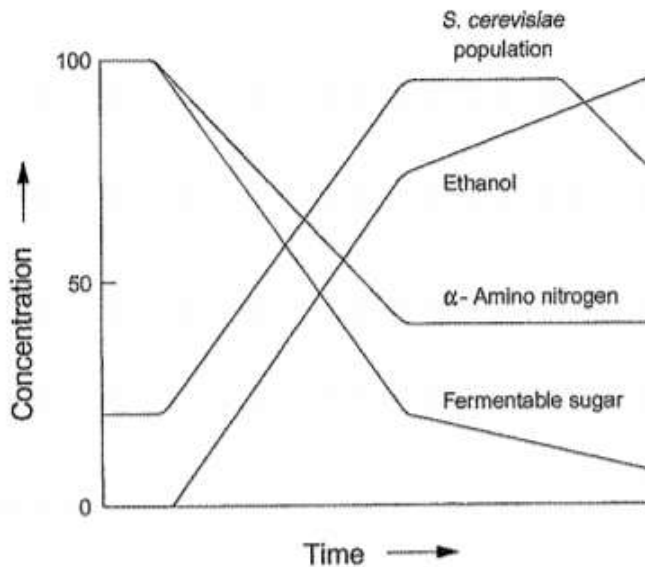
2.1.3 Fermentering

2.1.3.1. Oksygenering

Når ølet er kokt kjøles det først ned til under 30 °C før vørteren oksygeneres og gjær blir tilsatt (Palmer, 2006). Det er nødvendig å oksygenere vørteren ettersom oksygen er viktig i syntesen av umettede fettsyrer og ergosteroler som er essensielle for dannelse av membraner hos gjær. Oksygen er spesielt viktig tidlig i fermenteringen for å restaurere gjærcellene og for dannelse av cellemembran som kun foregår under aerobe forhold (Campbell, 2003; Doyle et al., 2007).

2.1.3.4. Fermenteringsforløpet

Fermenteringsforløpet kan deles inn i fire faser, lag fasen, log fasen, stasjonær fase og døds fasen (Figur 2.2)



Figur 2.2 Celletall av *S. cerevisiae*, etanol mengde, α -amino nitrogen tilgjengelig og mengde fermenterbart sukker i vørteren gjennom fermenteringsforløpet (Doyle et al., 2007).

Lag fasen er de første 6-12 timene av fermenteringen da gjæren tilvenner seg til det nye mediet. Oksygenet i vørteren er viktig i dette stadiet ettersom syntese av de nødvendige umettede fettsyrene og sterolene er oksygen avhengige. Fettsyrene og sterolene er nødvendige for celleveksten som forekommer i den logaritmiske (log) fasen. I log fasen økes celletallet eksponentielt, celletallet øker opp til 8x fra original konsentrasjon. Når veksten avtar starter stasjonær fase, celletallet øker ikke, men det er fortsatt tilstrekkelig med substrat til å fortsette aktiv fermentering. Etter hvert som substrat mengden minsker starter døds fasen der gjæren begynner å aggregere og felle ut (flokkulering) og deretter gå i dvale (Doyle et al., 2007). I tillegg til karbohydrater, fettsyrer og oksygen trenger også gjærcellene nitrogen og aminosyrer for å vokse. I tillegg til at aminosyrer dannes under malting finnes næringsstoffene naturlig i bygg i form av fritt aminonitrogen (Palmer, 2006). Detaljer om mikroorganismene brukt i øl fermentering og deres metabolske veier er beskrevet i kapittel 2.2 og 2.3.

2.1.4 Surøl produksjon

Surøl er en stor gruppe øl med bakgrunn fra flere forskjellige land. Stilene varierer mye, men noen fellestrekk er at de utnytter både gjær og bakterier ved fermentering, smaker syrlig og har høy konsentrasjon av organiske syrer som laktat og acetat (pH 3.0-3.9) (Tonsmeire, 2014). Når man først startet å brygge øl var mest sannsynlig alt øl som ble laget surøl.

Syreproduserende bakterier er naturlig tilstede på kornet og i luften (Kvam, 2017). Dette førte til syrning av ølet ettersom antimikrobielle metoder og ingredienser som regel ikke ble brukt. Dette var ikke utelukkende negativt ettersom tilsetning av antibakterielle ingredienser som humle ikke var vanlig, organiske syrer hindret vekst av ikke syretolerante patogener (Hornsey, 2003). I dag er det hovedsakelig to store kategorier surøl, spontanfermentert og inokulert surøl.

2.1.4.1 Spontanfermentering

Spontanfermentering er den eldste måten å brygge øl på. Gjær og bakterier naturlig til stede på utsiden av kornet, på utstyret eller i luften utnyttes for å fermentere vørteren. En av de eldste og mest kjente øl stilene som er laget på denne måten er Lambic fra Belgia. Lambic vørteren blir laget med store andeler umaltet hvete for å øke mengden dekstriner i vørteren. Dekstriner er komplekse karbohydrater som de fleste ølgjær ikke klarer å nyttiggjøre seg av (Verachtert & Iserentant, 1995). Andre mikroorganismer tilstede som kan bryte ned dekstriner vil da vokse frem etter at hoved- gjæringen er ferdig (Van Oevelen et al., 1977). Høyt innhold av dekstriner i vørteren kan på denne måten være positivt for kompleksiteten i Lambic (Tonsmeire, 2014). Lambic bryggerne tilsetter også humle lagret i flere år i ølet som gir lite bitterhet. Inokulering foregår ved at vørteren blir overført til store, åpne kar kalt «koelschip» som står enten utendørs eller i rom med god luftgjennomstrømning. Vørteren blir liggende i karene over natten slik at gjær og bakterier fra miljøet inokulerer vørteren.

Fermentering og modningsprosessen i Lambic øl kan ofte ta flere år (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert & Iserentant, 1995). Den første uken av fermenteringen er dominert av Enterobakterier og *Kloeckera apiculata*. Etter en uke starter hoved- fermenteringen. Denne varer i opptil 4 måneder og er dominert av *Saccharomyces* spp. Når hoved- fermenteringen er ferdig tar melkesyrebakterier over og *Pediococcus damnosus* er den dominerende slekten

(Van Oevelen et al., 1977). *P. damnosus* produserer laktat, aromastoffer og ekstracellulære polysakkarider (ESP). Den resterende tiden der ølet lagres er det *Brettanomyces* som dominerer. *Brettanomyces* produserer flere aromastoffer ved å bryte ned gjenværende karbohydrater som dekstriner (Van Oevelen et al., 1977; Van Oevelen & Verachtert, 1979).

2.1.4.2 Inokulert surøl

Tidsperspektivet ved spontanfermentering og tilgjengeligheten på renkulturer har ført til at spontanfermenterings tradisjonene har dødd ut flere steder. Å tilsette renkulturer (inokulering) med syreproduserende organismer har overtatt som den vanligste måten å produsere surøl på. Det er hovedsakelig blitt utviklet to metoder for å lage surøl med inokulering. Metodene kalles prefermentering («kettle sour») og kofermentering. Ved bruk av prefermenterings metoden syrnes vørteren med ulike *Pediococcus* eller *Lactobacillus* arter. Syrningen foregår etter meskingen. Når ønsket syrenivå er nådd kokes vørteren slik at melkesyrebakteriene dør. Etter koking nedkjøles og inokuleres vørteren med kommersiell gjær som regel av typen *S. cerevisiae*. Denne prosessen gir et surøl på kort tid, men med lite aromakompleksitet. Kofermentering er en annen metode for å produsere surøl ved inokulering. En eller flere syreproduserende bakterier tilsettes samtidig som *Saccharomyces* og eventuelt også ikke *Saccharomyces* gjær etter koking og nedkjøling. Dette er en mer kontrollert prosess enn spontanfermentering da det er mindre sannsynlighet for vekst av uønskede organismer. Riktig inokuleringsmengde og valg av riktige stammer av gjær og bakterier er essensielt for et godt resultat ved bruk av kofermentering (Bossaert et al., 2019).

2.2 Mikroorganismer i øl

2.2.1 Saccharomyces

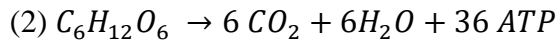
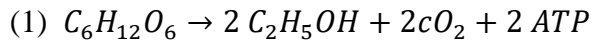
Det brukes tradisjonelt to gjærtyper i moderne ølbrygging. Topfermenterende gjær (ale) og bunn fermenterende gjær (lager). Top fermenterende gjær er av slekten *Saccharomyces cerevisiae* og fermenterer ved 18-20 °C. Den har fått navnet grunnet at gjæren legger seg på toppen av vørteren under stormgjæringen. Bunnfermenterende gjær er av slekten *Saccharomyces pastorianus* (tidligere kalt *Saccharomyces carlsbergensis*) og fermenterer ved 8-15 °C og legger seg i bunnen av fermenteringskaret (Hill, 2015). *Saccharomyces Cerevisiae* er en av de mest brukte gjærtypene i matindustrien og brukes til mange forskjellige produkter i tillegg til øl. *Saccharomyces* er en ekte gjær som formerer seg hovedsakelig med aseksuell knoppskyting, men kan også formere seg seksuelt med konjugasjon som fører til dannelse av askosporer (Bullerman, 2003).

Karbohydratmetabolisme

Gjær har mulighet til å metabolisere flere typer karbohydrater for å danne ATP. Gjærcellene benytter seg av de forskjellige sukkerenhetene etter en spesifikk rekkefølge der de minste enhetene glukose og fruktose tas opp først. Glukose og fruktose tas opp gjennom samme permease i cellemembranen, men glukose har høyest affinitet til permeasen og tas derfor opp først. Sukrose omdannes til glukose og fruktose utenfor cellen via enzymet invertase (Pires & Brányik, 2015). Maltose og deretter maltotriose omdannes ikke før mesteparten av de enklere karbohydratene allerede er metabolisert (Doyle et al., 2007). Maltose tas opp i cellen gjennom egne maltose permeaser og spaltes til D-glukose ved α -glukosidase enzymer inne i cellen. Både maltose permeaser og α -glukosidase kodes av egne gener. Noen spesifikke stammer av *Saccharomyces* mangler en eller flere av genene og kan føre til fenomenet «Maltose lag» der fermenteringen delvis eller helt stopper opp ved skiftet mellom heksose og maltose metabolisering (Hazell & Attfield, 1999).

Under fermenteringen omdannes glukose gjennom to forskjellige metabolske veier. Anaerobt gjennom Embden Meyerhof Parnas syntesevei (EMP) og aerobt gjennom cellulær respirasjon.

Reaksjonsligning for EMP er vist i ligning 1 og reaksjonsligning for cellulær respirasjon i ligning 2.



Selv om respirasjon danner mye mer energi har forskning vist at flere typer gjær slik som *S. cerevisiae* respirerer i veldig liten grad ved tilstedeværelse av D-glukose (Barnett & Entian, 2005; Koutsokali & Valahas, 2020). Dette fenomenet kalles Crabtree effekten og kan være evolusjonsmessig betinget for å gi en konkurransemessig fordel med å produsere etanol ved mye glukose til stede (Barnett & Entian, 2005).

2.2.2 Kveik

Kveik er en samlebetegnelse på gjærkulturer med særegne egenskaper som har blitt brukt til ølbrygging på flere norske gårder over lang tid. Kulturene er ofte tatt vare på i mange generasjoner og er sjelden renkulturer (Garshol, 2016). Antall forskjellige gjær og bakterier i kveik er vist i en studie til å variere mellom 1-9, kun 2 av 25 kveik kulturer var renkulturer (Preiss et al., 2018). Samme studien viste også at all gjæren i kveikene utenom en var av slekten *S. cerevisiae*. Alle artene var fenol negative («phenolic off flavour negative (POF)) som er et tegn på at gjæren er blitt domestisert (Preiss et al., 2018). Den ene gjæren som ikke var *S. cerevisiae* er i ettertid blitt undersøkt videre og er mest sannsynlig ikke en ekte kveik, men en kontaminasjon av en moderne gjærart (Krogerus, 2019). Det som skiller kveik fra moderne ølgjær er deres evne til å gjære ved temperaturer opp mot 42°C som nærmer seg den teoretiske grensen for vekst av *S. cerevisiae* (Preiss et al., 2018). Norske tradisjonsbryggere tilsetter ofte kveiken til vørteren ved høye temperaturer (30-40°C) (Garshol, 2020) og gjærer ofte kun i et par dager i motsetning til moderne bryggere som gjærer i 1-2 uker minst. Et annet kjennetegn ved kveik er veldig høyt nivå av flokkulering. Det er mulig å observere at ølet blir klart i løpet av få minutter (Garshol, 2016). I studien til Preiss et al. (2018) ble det påvist høyt nivå av flokkulering i flere av gjærstammene funnet i kveik, noe som støtter denne observasjonen (Garshol, 2016; Preiss et al., 2018).

2.2.3 *Brettanomyces*

Brettanomyces har i lang tid vært sett på som en uønsket gjærtype forbundet med forurensing og usmak i øl. Kun noen få land som Belgia har gjennom tidene benyttet seg av *Brettanomyces* spp. i øl-fermenteringen, men selv da kun i form av spontan inokulering sammen med et stort antall andre mikroorganismer. Taksonomien til *Brettanomyces* har vært mye diskutert da denne gjæren kan opptre i to former, en ikke sporedannende form (anamorf) og en sporedannende form (telomorf). Når gjærcellene er i en telomorf form brukes ofte slektsnavnet *Dekkera* istedenfor *Brettanomyces* men i denne oppgaven vil kun *Brettanomyces* brukes da nye regler for navngiving av gjær sier at kun et navn skal brukes. Per i dag er det beskrevet fem separate slekter av *Brettanomyces* der kun to har mulighet for å danne sporer, *B. bruxellensis* og *B. anomalus* (Steensels et al., 2015).

Brettanomyces produserer etanol på samme måte som *S. cerevisiae* og er Crabtree positiv (kapittel 2.2.1). Crabtree effekten er kun gjeldende når det er store mengder enkle karbohydrater som glukose tilstede (De Deken, 1966). *Saccharomyces* slekter går over til respirasjon når mengden enklere karbohydrater brukes opp, dette fenomenet kalles Pasteur effekten, men *Brettanomyces* påvirkes av det som kalles Custer effekten også kalt negativ Pasteur effekt. Dette vil si at *Brettanomyces* danner alkohol ved tilstedeværelse av oksygen uavhengig av karbohydrat komposisjonen og mengde. Når oksygenet er brukt opp går cellene inn i en lang lag-fase. Dette forklares ved at under aerobe forhold produserer *Brettanomyces* ikke bare etanol, men også acetat gjennom aldehyd dehydrogenase. Denne prosessen omdanner NAD⁺ til NADH, men uten oksygen til stede til å oksidere NADH tilbake til NAD⁺ stopper glykolysen opp. Glykolysen starter først opp igjen etter lang tid når saktegående prosesser gjenoppretter redoksbalansen (Steensels et al., 2015). *Brettanomyces bruxellensis* unngår Custer effekten når større mengder nitrat er tilstede i vekstmediet. I nitrat rike medier vil *B. bruxellensis* også danne acetat anaerobt. Under noen forhold er *B. bruxellensis* vist til å fermentere raskere enn *S. cerevisiae* (Galafassi et al., 2013).

B. bruxellensis kan fermentere en stor mengde forskjellige karbohydrater i varierende grad. Slik som *S. cerevisiae* kan den fermentere glukose, fruktose og maltose, men i tillegg også mer komplekse karbohydrater som dekstriner og cellobiose som ikke fermenteres av *S. cerevisiae*. Dette gjøres mulig med α/β glukosidase aktivitet (Menoncin & Bonatto, 2019).

Ekstracellulær glukosidase aktivitet virker synergistisk med noen melkesyrebakterier i Lambic øl. *B. bruxellensis* bryter ned komplekse karbohydrater slik at de kan metaboliseres av bakteriene samtidig som melkesyrebakterier som *Pediococcus* spp. danner ekstracellulære polysakkarider (EPS) som *B. bruxellensis* kan metabolisere (Sakamoto & Konings, 2003).

2.2.4 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) er en gruppe Gram positive bakterier som produserer laktat som en av sine primære metabolitter. MSB kan danne ATP gjennom to forskjellige metabolske veier og grupperes ofte etter hvilken av disse metabolske veiene som brukes.

Homofermentative MSB danner ATP gjennom glykolysen (Embden-Meyerhof-Parnas syntesevei) og produserer kun laktat som metabolitt. Heterofermentative MSB utnytter pentose fosfoketolase syntesevei anaerobt og danner da CO₂ og etanol i tillegg til laktat. Aerobt dannes eddiksyre istedenfor etanol og en ekstra ATP dannes (Doyle, Diez-Gonzalez, & Hill, 2007). MSB kan produsere flere sekundære metabolitter, men om de produseres og i hvilken mengde varierer mye mellom slekter og arter (Cui et al., 2019; Doyle et al., 2007).

MSB kan deles inn i seks forskjellige familier som inneholder totalt tolv slekter.

Lactobacillus er en av slektene innenfor familien *Lactobacillaceae*. Lactobaciller er stavformede MSB som finnes i en rekke forskjellige miljøer og næringsmidler. Slekten inneholder over 100 arter som har svært varierende funksjonelle egenskaper, noen er obligat homofermentative, noen fakultativt heterofermentative og noen obligat heterofermentative (Doyle et al., 2007). Det er blitt vist at noen lactobaciller kan omdanne maltose i vørter til glukose og glukose-1-fosfat gjennom maltose fosforylase, og dette kan føre til mer glukose enn bakteriene utnytter slik at glukose konsentrasjonen i mediet øker (Stolz et al., 1993).

Lactobacillus brevis som brukes i denne oppgaven er obligat heterofermentativ (Von Wright & Axelsson, 2011). Den spesifikke stammen *L. brevis* BSO464 som brukes er også vist til å være veldig robust og tåle mer iso- α -syrer, etanol, lav pH og høy temperatur enn flere andre MSB som ofte er brukt til surøl produksjon (Dysvik et al., 2020).

2.3 Aromakomponenter i øl

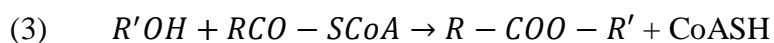
Øl er et komplekst produkt bestående av aromakomponenter som stammer fra alle de forskjellige stegene i bryggeprosessen. Fermenteringsprosessen er spesielt viktig for dannelse av noen aromakomponenter som er både ønsket og uønsket i forskjellige øltyper. Noen av de mest vanligste aromakomponentene fra fermenteringen vill bli gjennomgått i dette kapitelet (Pires & Brányik, 2015b).

2.3.1 Høyere alkoholer

Den største aromakomponent gruppen i øl er høyere alkoholer. Høyere alkoholer er alkoholer med lengre karbonkjeder enn 2 karbonatomer. Høyere alkoholer produseres som en sekundær metabolitt gjennom Ehrlich syntesevei og også gjennom aminosyre metabolisme (Holt et al., 2018; Willaert, 2012). Ehrlich syntesevei starter med en transaminering av aminosyrer i vørterren til α -keto syrer. Deretter dekarboksyleres α -keto syren over til et aldehyd som videre reduseres til et høyere alkohol. Propanol sin syntesevei er litt avvikende da første steg er en oksidativ deaminering av aminosyren treonin. Aminosyre- metabolismen er en anabolsk syntesevei i motsetning til Ehrlich syntesevei som er katabolsk. Syntesen via aminosyre metabolismen varierer for hver enkelt høyere alkohol. Det er mest kortkjedete høyere alkoholer som dannes gjennom anabolsk syntese. Mange faktorer påvirker syntese av høyere alkoholer. Faktorene kan være økt temperatur, oksygenering og høy inokuleringsmengde og hvor disse fører til økt mengde høyere alkoholer. De forskjellige høyere alkoholene til stede i øl kan deles inn i gruppene alifatiske og aromatiske (Willaert, 2012). En oversikt er vist i tabell 2.3

2.3.2 Estere

Estere er sekundære metabolitter som produseres i små mengder, men er den viktigste gruppen metabolitter med hensyn til ølets smak og aroma. Dette skyldes de lave terskelverdiene for estere hos mennesker (Pires & Brányik, 2015b). Estere produseres i stor grad under log fasen (60%) og også under stasjonær fase (40%) av fermenteringen (European Brewery Convention, 2000). Estere dannes gjennom en kondenseringsreaksjon (ligning 3) mellom fettsyrer bundet til koenzym A (CoA) og alkoholer (Willaert, 2012).



Acetyl-CoA er et sentralt molekyl i fettsyre metabolismen som forklarer hvorfor estere hovedsakelig dannes under primær fermenteringen der det enda er nok oksygen til stede i vørteren til syntese av fettsyrer (Willaert, 2012). Det finnes tre grupper flyktige estere i øl «medium chain fatty acid» (MCFA), etyl estere og acetat estere. Acetat estere er den gruppen estere som finnes i størst konsentrasjon i ølet. Disse esterene dannes ved at Acetyl-CoA reagerer med etanol, isoamyl alcohol eller 2-phenyletanol. Reaksjonene er katalysert av alkohol acetyltransferase (AAT) som kodes av egne gener som er til stede i varierende grad hos forskjellige MSB og gjær. MCFA etyl estere dannes derimot ved at etanol reagerer med et acyl-CoA molekyl (Pires & Brányik, 2015a). Reaksjonen katalysere av acyl-CoA:etanol O-acyltransferaser (AEATaser), men hvilke gener som koder for disse enzymene er ikke helt kjent ennå (Saerens et al., 2006). De viktigste esterene innenfor hver gruppe sammen med terskelverdier og aroma er beskrevet i tabell 2.3.

Det er flere måter for å regulere esterproduksjonen i øl. Den enkleste måten er å velge ut en stamme som produserer store mengder AAT og AEAT-aser. Dersom man ikke ønsker å bruke en av disse stammene kan man også øke fermenteringstemperaturen og/eller bruke en lav inokuleringsmengde. Dette fører til økt cellevekst som fører igjen til økt dannelse av de ønskede enzymene (Willaert, 2012). Verstrepen et. al. (2003) kom i sine forsøk fram til at redusert oksygenering førte til økt ester produksjon grunnet at fettsyresyntesen som er oksygenavhengig bruker opp acetyl-CoA som er nødvendig for esterdannelse. Mer nylige forsøk fra Kucharczyk og Tuszyński viste derimot at oksygenering ikke signifikant påvirket ester produksjon (Kucharczyk & Tuszyński, 2017; Verstrepen et al., 2003).

2.3.3 Aldehyder

Acetaldehyd er en kjemisk komponent som ofte ikke er ønsket i øl. Acetaldehyd er et mellomsteg i alkoholfermenteringen til gjærceller fra pyruvat til etanol. Acetaldehyd er ofte til stede i større mengder tidlig under fermenteringen, men blir omdannet til etanol av alkohol dehydrogenase etter hvert som fermenteringen fortsetter. Tilstedeværelse av aktive gjærceller er nødvendig for dannelse av alkohol dehydrogenase, gjær som flokkulerer tidlig kan da føre til økte mengder acetaldehyd. Tilføring av oksygen under fermenteringen kan også øke acetaldehyd mengden (Willaert, 2012).

2.3.4 Vicinale diketoner (VDK)

Det er to typer VDK som dannes under øl fermentering, nemlig diacetyl (2,3-butandion) og 2,3-pentandion. Ettersom disse dannes i omtrentlike like mengder og terskelverdien til diacetyl er mye lavere enn 2,3-pentandion er det diacetyl man fokuserer mest på (Pires & Brányik, 2015a). Diacetyl er kjent for sin karakteristiske smørsmak og er ikke ønsket i aromaprofilen til de fleste øl. Diacetyl er spesielt uønsket i bunnfermenterte øl slik som pils der det er lite andre aromaer som maskerer diacetyl aromaen (Palmer, 2006). Diacetyl dannes som et biprodukt under syntese av aminosyrene valin og isoleucin. Et av mellom produktene under denne syntesen er α -acetolaktat som skiller ut av cellen av ukjente grunner og dekarboksyleres til diacetyl. Etter primærfermenteringen absorberes diacetyl tilbake inn i cellen og reduseres til acetoin og deretter 2,3-butandiol som har høyere terskelverdi enn diacetyl. Bryggere kan nytte seg av dette fenomenet ved å lagre øl for å minske mengden diacetyl før salg (Pires & Brányik, 2015a).

2.3.5 Svovelkomponenter

Det finnes mange forskjellige flyktige svovelkomponenter i øl, men mesteparten av disse komponentene stammer fra råvarene og ikke fra fermenteringsprosessen. De tre viktigste svovelkomponenten er sulfitt, hydrogen sulfid og dimetylsulfid (DMS) (Mourão Ferreira & Guido, 2018). DMS er komponenten som er mest undersøkt og vært mest fokus på i øl. DMS stammer fra aminosyren S-metyl-metionin som blir syntetisert under germinerings steget i maltingen. S-metyl -metionin blir videre omdannet til DMS ved varmebehandling slik som ved kjølling og vørterkoking (Baldus et al., 2018),

Tabell 2.3: Oversikt over aromastoffer i øl med tilhørende terskelverdier, vanlig konsentrasjoner i øl og sensoriskprofil.

Aromakomponent	Gruppe	Sensorisk profil	Konsentrasjon i øl (ppm)	Konsentrasjon i Lambic (ppm)	Terskelverdi (ppm)
Høyere alkoholer					
<i>n</i> -propanol	Alifatisk	Alkohol ¹	6-30 ¹	9-38,6 ⁶	600 ¹
Isobutanol (2-metyl-1-propanol)	Alifatisk	Alkohol ¹	6-32 ¹	16,3-21 ⁶	80-200 ¹
2-metylbutanol	Alifatisk	Alkohol ¹	9-25 ¹	-	50-70 ¹
3-metylbutanol (isoamyl alkohol)	Alifatisk	Fusel, Skarp lukt ¹	25-75 ¹	44,3-67 ⁶	50-65 ¹
2-metyl -1-propanol	Alifatisk	Fruktig, Alkohol ³	4-57 ³	-	200 ³
2-metyl- 1-butanol	Alifatisk	Alkohol, Vinøs ³	7-34 ³	-	65 ³
2-phenyletanol	Aromatisk	Rose, Søt ¹	4-22 ¹	-	5-125 ¹
Tyrosol (Phenyl etyl alkohol)	Aromatisk	Bitter, kjemisk ¹	6-15 ¹	-	10-200 ¹
Tryptophol	Aromatisk	Mandel ¹	0,5-15 ¹	-	10-200 ¹
Estere					
Etyl acetat	Acetat ester	Fruktig ¹	5-40 ¹	33-167 ⁶	20-30 ¹
Isoamyl acetat	Acetat ester	Banan, pæredrops ¹	<0,01-3,8 ¹	<0,1-5 ⁶	0,6-1,2 ¹
Isobutyl acetat	Acetat ester	Banan, søt ³	0,01-0,25 ³	-	1,6 ³
2-phenyletyl acetat	Acetat ester	Rose, honning, eple, søt ¹	0,1-0,73 ¹	-	3,8 ¹
Etyl hexanoat	MCFA etyl ester	Eple, anis ¹	0,01-0,54 ¹	-	0,17-0,21 ¹
Etyl octanoat	MCFA etyl ester	Eple ¹	0,01-1,2 ¹	1,62-5,72 ⁷	0,3-0,9 ¹
Andre					
Diacetyl	VDK	Smør ²	0,02-0,07 ²	-	0,1-0,15 ²
Acetaldehyd	Aldehyd	Epleskall, grønne blader ³	1,2-2,4 ³	3-8.2 ⁶	10 ³
3-metyl-butanal	Aldehyd	Malt ⁷	-	-	0,032 ⁷
Dimetylsulfid (DMS)	Svovelkomponent	Kokt kål	0,1-1 ⁵	-	30-100 ⁴

¹Willaert, 2012; ²Pires & Brányik, 2015; ³Yonezawa & Fushiki, 2002; ⁴Baldus et al., 2018; ⁵Baxter & Hughes, 2001; ⁶Oevelen et al., 1976

2.3.6 Aromakomponenter fra *B. bruxellensis*

Brettanomyces bruxellensis produserer mange særegne aromakomponenter. Spesielt mot slutten av fermenteringen produseres det store mengder estere. Esterne som produseres i denne fasen er hovedsaklig etylacetat, etyl hexanoat og etyl octonoat. *B. bruxellensis* bryter også ned esteren isoamyl acetat ved hydrolytisk esterase aktivitet. Når det kommer til høyere alkoholer produserer *B. bruxellensis* hovedsaklig 2-metyl-1-butanol, isoamyl alcohol og 2-etylheksanol (MilkTheFunk, u.å.)

B. bruxellensis produserer også flere svovelkomponenter. Disse gir stor påvirkning på produktet i form av veldig særegne aromaer som stall og hestepedd. Spesielt 4-etylguaiacol, 4-etylphenol og 4-vinylguaiacol er en stor del av aromabildet til *B. Bruxellensis* (Steensels et al., 2015). I denne oppgaven blir disse svovelkomponentene og 2-etylheksanol ikke analysert.

3 Materialer og metoder

3.1 Forberedelser og tillaginger

3.1.1 Tillaging vekstmedier

Mediepulver ble løst opp i destillert vann etter forholdene oppgitt av produsentene.

«Yeast and mold» (YM) agar (Oxoid, Basingstoke, England): 41 g/L

Rose Bengal agar (Merck, Darmstadt, Tyskland): 32, g/L

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) buljong (Merck): 52,2 g/L + 1,5% agar

Løsningene ble satt til koking i et kokevannbad (SBB Aqua 26 plus, Grant instruments LTD, Royston, Storbritannia) og ristet med 10 minutters mellomrom til mediet var fullstendig løst opp. Oppløst medium ble fordelt i 250 mL flasker med 200 mL i hver og autoklavert ved 121°C i 15 min. Etter autoklaving ble Rose Bengal mediet tildekket med aluminiumsfolie. Alle mediene ble oppbevart ved 4°C frem til bruk.

3.1.2 Tillaging frysestock av *Lactobacillus brevis* BSO464

Lb. brevis BSO464 (videre kalt kun *Lb. brevis*) ble tatt opp fra -80°C fryser og podet i MRS (Merck) buljong før inkubering ved 30°C i 24 timer. Kulturen ble podet (1%) tre ganger der den siste podingen var i 2L medium. Etter inkubering ble kulturen fordelt i sterile sentrifugekopper og sentrifugert ved 10000 rpm. og 4°C i 10 minutter i en JZ-MC sentrifuge (Beckman, California, USA). Supernatanten ble helt av og pelleten løst opp i Ringers løsning (Merck), og deretter sentrifugert på ny under samme forhold. Supernatanten ble helt av og pelleten ble løst opp i 20 mL steril vørter tilsatt 3,5 mL 85% glyserol. Løsningen ble fordelt på 20 stk. 1mL fryserør og oppbevart ved -80°C. Konsentrasjon kolonidannende enheter (KDE) per mL i frysestock ble bestemt etter nedfrysning med fortytning og utplating på MRS medie.

3.1.3 Tillaging 20% laktat

Laktat (88%, Kebo Lab AB, Bromma, Sverige) ble fortynnet til 20% med destillert vann og deretter steril filtrert med et non-pyrogenic sterilt R 0,2 µm filter (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) og en 20 mL plast sprøyte (BD plastipak, New Jersey, USA)

3.2 Småskala vekstforsøk

3.2.1 Tillaging starterkultur

Nedfrost vørter fra brygge forsøket ble tint og dekantert over til 500 mL flasker før autoklaving ved 121°C i 15 minutter og lagring ved 4°C. Starterkulturer for de forskjellige kulturene ble forberedt som beskrevet under.

Gjæren *B. bruxellensis* WLP650 (White Labs, by, USA) Kulturen ble podet (2%) i steril vørter og oppbevart ved 30°C og podet om hver 7 dag. Før inokulering ble kulturen podet (2%) og inkubert i 7 dager ved 30°C.

Sigmund Voss kveik WLP4045 (White Labs) Kulturen ble podet (2%) i steril vørter og oppbevart ved 4°C og podet om hver 7 dag. Før inokulering ble kulturen podet om (2%) i steril vørter og inkubering i 48 timer på et Biosan PSU20i ristebord (Montebollo Diagnostics A/S, Oslo, Norge) ved romtemperatur.

Gjæren US-05 (Fermentis, Lille, Frankrike) Kulturen ble podet med 0,5g tørrgjær /100mL vørter før inkubering i 48 timer på et Biosan PSU20i (Montebello Diagnostics A/S) ristebord ved romtemperatur.

3.2.2 Vekstforsøk i steril vørter

Det ble utført vekst- og metabolismeforsøk av de forskjellige øltypene (tabell 3.1) Forsøket ble gjentatt totalt tre ganger over tre forskjellige uker.

Gjærstarterkulturene laget på forhånd ble fortynnet 50x og deretter telt i et Bürker tellekammer (Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Tyskland). 12 B-ruter ble telt per prøve i et Leica DM750 mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Tyskland). og gjennomsnittet ble regnet ut. Videre ble antall celler/mL beregnet med formelen under.

$$\bar{B} * (1,6 * 10^5) * \text{fortynningsfaktor} = \text{Antall celler/mL}$$

Mengde gjærstarterkultur for å oppnå rett inokuleringsmengde ble regnet ut med formelen under der C_1 er konsentrasjon av gjærceller i starteren (celler/mL).

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Det ble podet i 210 mL vørter med gjær og *Lb. brevis* som vist i tabell 3.1 og til ønskede konsentrasjoner som vist i tabell 3.2. Videre ble hver prøve fordelt på 8 sterile 50 mL flasker med 25 mL i hver flaske og satt i inkubatorskap ved 30°C. ‘

Tabell 3.1: Oversikt over prøvene som ble laget

Prøver	Mikroorganismer
SV	Sigmund Voss kveik
SVL	Sigmund Voss kveik + <i>Lb. brevis</i>
SVLB	Sigmund Voss kveik + <i>Lb. brevis</i> + <i>B. bruxellensis</i>
US	US-05
USL	US-05 + <i>Lb. brevis</i>
USLB	US-05 + <i>Lb. brevis</i> + <i>B. bruxellensis</i>

Tabell 3.2: Ønsket konsentrasjon av celler i vørteren for hver mikroorganisme

Kultur	Antall (celler/ml)
Sigmund Voss kveik	10^6
US-05	10^6
<i>B. bruxellensis</i>	$2 \cdot 10^6$
<i>Lb. brevis</i> BSO464	$2 \cdot 10^6$

3.2.3 Analyser

Analyser ble tatt av alle prøvene ved forskjellige tidsintervaller. De forskjellige tidsintervallene og hvilke analyser som ble gjort er vist i tabell 3.3. For hvert prøveuttak ble en ny flaske brukt.

Tabell 3.3: Oversikt over analyser og når de skal utføres

Tid	24t	48t	4 dager	7 dager
Utplating	X	X	X	X
Plato	X	X	X	X
pH	X	X	X	X
HSGC	X		X	X
HPLC	X			X

3.2.3.1 Utplating

Tidligere laget agar medie ble satt til koking i et kokevannbad (SBB Aqua 26 plus Grant instruments) fram til agaren var smeltet. Deretter ble de satt i et vannbad (Grant instruments LTD) ved 47°C. Smeltet og temperert YM agar ble tilsatt 20% laktat til pH 4 rett før utplating.

Prøvene ble fortynnet med Ringers løsning, til 10^{-6} og ble platet ut med to paralleller på Rose Bengal agar, MRS agar) og YM agar. MRS agar ble inkubert ved 30°C i 3 dager, YM agar ved 30°C i 3 dager og Rose Bengal agar ved 22°C i 5 dager.

3.2.3.2 Plato og pH

Plato ble målt med en Palette PR-201 refraktometer (Atago, Saitama, Japan) og pH med et PHM92 LAB pH meter (Radiometer, København, Danmark).

3.2.3.3 "Head Space Gas Chromatography"

Flyktige forbindelser ble målt i prøvene med hjelp av "head space" gass kromatografi (HSGC) med flamme ioniserings detektor (HSGC-FID). Prøver fra deg 4 og 7 ble først filtrert gjennom et foldefilter (597 ½ ø 125 GE Healthcare Life Sciences, by, land) ved 4°C i ca. 15 minutter. Etter eventuell filtrering for å fjerne CO₂ ble 10,00 gram av prøven veid opp i et HSGC-rør og forseglet med et PTFE/Si septa (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). HSGC rørene

ble lagret ved -20°C frem til analysering. Prøvene ble tint før de ble plassert i en Agilent Technologies 7679A headspace sampler tilkoblet en Agilent 6890GC GC med en flamme ioniserings detektor. Helium grad 6.0 ble brukt som bæregass (Aga, Lidingö, Sverige). Gass strømmen var konstant på 5.0 ml/min . Manifoldtemperatur var 60°C og "headspace" bad temperatur var 50°C . Ekvilibreringstiden brukt var 45 minutter. Flaskene ble ristet under oppvarmingen ved 70 risting per minutt. Før injeksjon ble prøvene trykksatt til 10 PSI og injeksjonstiden var 30 sekund. Injektortemperatur var 180°C og detektortemperatur var 200°C .

Kolonnen som ble brukt var en CP-SIL 5CB GC kolonne (Varian, Middelburg, Nederland) med en lengde på 25 m. Filmtykkelsen var $5\mu\text{m}$ og indre diameter $0,53\text{mm}$.

Temperaturprogrammet brukt var følgende. 35°C , 5 min; økning med $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 40°C , 2 min; økning med $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 70°C , 2 min; økning med $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 130°C , 4 min; økning med $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 160°C , 4 min; økning med $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 180°C , 2min; økning med $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ til 200°C , 2 min.

De forskjellige flyktige komponentene ble separert ut fra flyktighetsgrad og affinitet til den stasjonære fasen til kolonnen. For å indentifisere og kvantifisere de ulike forbindelsene ble det brukt standardløsninger med kjente konsentrasjoner. Standardløsningene brukt var 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. Der hvor ikke annet er spesifisert var Merck produsenten.

3.2.3.4 «High Performance Liquid Chromatography»

Innhold av karbohydrater og organiske syrer ble målt med "high performance liquid chromatography" (HPLC). Analysen ble utført etter en metode laget av Grønnevik et al. (2011) men med noen modifikasjoner. 1,00 gram av prøven ble veid inn i et 10 mL rør. Prøvene ble tilsatt 2,5 mL ionebyttet H_2O , 200 μl 0,5 M H_2SO_4 (Merck) og 8 mL acetonitril (Merck). Prøvene ble så satt i en Multi-RS-60 BIOSAN vendemaskin (Montebello

Diagnostics A/S) i 30 minutter før de ble sentrifugert ved 3500 rpm i 15 minutter i en Kubota 2010 sentrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan)

Supernatanten fra hver prøve ble filtrert gjennom et PTFE membran filter (Acrodisc CR 13 mm syringe, PALL, Storbritannia) med porestørrelse 0,2 µm over til et HPLC rør. Analysen ble gjort med et HPLC-instrument (Agilent Technologies 1260 Infinity II, Agilent Technologies), bestående av pumpe (Agilent Technologies), autosamplere (Agilent Technologies), kolonneovn (Agilent Technologies), DAD-UV detektor (Agilent Technologies), og RI-detektor (Agilent Technologies). Programvaren brukt til analysen var OpenLab CDS (Agilent Technologies). 25 µL av prøven ble injisert og separert med en Aminex HPX-87H kolonne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Prøvene ble først kjørt gjennom en forkolonne av typen Cation-H refill (Bio Rad Laboratories) for beskyttelse av kolonnen. Kolonnetemperatur var satt til 32 °C. Den mobile fasen som ble brukt var 5 mM H₂SO₄ (Merck), med en hastighet på 0.4 mL/min.

Standardløsninger for kalibrering av instrumentet ble fremstilt på samme måte som prøvene som ble analysert. Komponentene i prøvene ble identifisert og kvantifisert på bakgrunn av retensjonstid sammenlignet med standardløsningene. Karbohydrater benyttet til standardløsning var maltose, fruktose, laktose, glukose og galaktose (Merck) og av organiske syrer ble sitronsyre, pyrodruesyre, orotinsyre, ravsyre, maursyre, melkesyre, eddiksyre, urinsyre, propionsyre og pyro-glutaminsyre (Sigma-Aldrich, Kina) benyttet til standardløsninger. Karbohydratene og eddiksyre ble detektert ved hjelp av en RI-detektor, mens organiske syrer ble detektert ved hjelp av en DAD-UV detektor.

3.3 Pilotskala øl brygging

3.3.1 Tillaging starter kultur

"Pilsen light growler" maltekstrakt (Briess, USA) ble blandet ut med vann til 12,5 °Plato, og deretter kokt i 10 minutter. Refraktometeret ga verdier gitt med °Brix, dette ble regnet om til °Plato med omregningstabellen i vedlegg 2.

Etter koking ble vørteren avkjølt til 30°C og podet slik som i småskala forsøket. I tillegg til kulturene brukt i småskala vekstforsøket ble også Gausemel kveik brukt (lokal frysestock v/ Nadia Marlen Aasen, KBM, NMBU) Den ble først tinet og deretter podet på samme måte som Sigmund Voss Kveik.

3.3.2 Vørter produksjon

Vørter ble brygget med to stykk Beer Brew 30L automatic bryggesystem (Ølbrygging AS, Grimstad, Norge). Det ble brygget totalt 5 ganger. En oversikt over hva som ble brygget hvilken dag er vist i vedlegg 1. Bryggedag 1 ble 50 L vørter produsert, dag 2-4 60 L og dag 5 70 L. Volum på 70 L viste seg å være for stort da det førte til større temperaturgradient i kornet under mesking. Dette ga en lavere gjennomsnittstemperatur og resultatene fra denne batchen ble ikke analysert grunnet store variasjoner i resultatene. Batchen skilte seg spesielt ut med mye raskere nedgang i °Plato sammenlignet med alle de andre batchene.

Maltet korn etter oppskriften vist i tabell 3.4 ble veid opp og kvernet. Det kvernede kornet ble tilsatt meskekaret sammen med 2,5 L vann per kg malt som var blitt varmet opp til 40°C. Temperaturen ble deretter økt til 69°C, med holdetid på 60 minutter. Utmesking ble utført ved 78°C i 5 minutter. Temperaturen var noe ustabil under meskingen og sank ofte 2-3°C før den igjen ble varmet opp til ønsket temperatur.

Skylling ble utført med vann ved 70°C. Vann ble tilsatt frem til avlest verdi i vørteren var mellom 11,2 og 11,5 °Plato for å kompensere for avdamping under koking.

Tabell 3.4: Oppskrift til vørterproduksjon

Råvare	Kg per 30 l vørter
Pale malt (Bestmalz, Heidelberg, Tyskland)	6,12
Hvetemalt (Weyermann, Bamberg, Tyskland)	0,12
Carahell (Weyermann, Tyskland)	0,06
Wai-iti 2015 hel humle (Humlegården, Sollentuna, Sverige)	0,05

*: mengde alfasyrer i humlen

Etter oppkok ble humle tilsatt, og vørteren ble kokt videre i 60 minutter før den ble kjølt ned med en spiralkjøler. Når temperaturen var senket til 30°C ble vørteren fra de to bryggemaskinene blandet sammen for å minske variasjoner mellom bryggene. Første bryggedag ble 9 L overført til desinfiserte 10 L fermenteringskar i plast med vannlås. Desinfeksjonsmiddel brukt var 0,25% Star San HB (Five Star Chemicals, Arvada, USA). Ettersom bryggene fra første dag gjæret ut av vannlåsen ble det ved alle de senere bryggedagene kun overført 8 L til hvert fermenteringskar.

3.3.3 Inokulering av vørter

Vørteren ble først oksygenert ved å riste på fermenteringskarene før de ble inokulert til ønsket konsentrasjon av bakterier og gjær, henholdsvis 2×10^6 kde/mL *Lb. brevis*, 2×10^6 celler/mL *B. bruxellensis*, 10^6 celler/mL Sigmund Voss kveik, 10^6 celler/mL Gausemel kveik og 10^6 celler/mL US-05 gjær (tabell 3.5). Antall celler i starterkulturen var blitt bestemt med Bürker tellekammer som beskrevet tidligere under småskala vekstforsøk.

Tabell 3.5: Ønsket konsentrasjon av celler i vørteren ved brygging av hver mikroorganisme

Kultur	Antall (celler/ml)
Sigmund Voss kveik	10^6
Gausemel kveik	10^6
US-05	10^6
<i>B. bruxellensis</i>	$2 \cdot 10^6$
<i>Lb. brevis</i> BSO464	$2 \cdot 10^6$

Det ble brygget totalt 8 forskjellige øl med forskjellige kombinasjoner av de ulike mikroorganismene. De forskjellige kombinasjonene er vist i tabell 3.6 Det ble gjort totalt tre gjentak fordelt på de fem bryggedagene (vedlegg 1).

Tabell 3.6: Oversikt over de forskjellige ølene som ble laget

Øl	Mikroorganismer
SV	Sigmund Voss kveik
SVL	Sigmund Voss kveik + <i>Lb. brevis</i>
SVLB	Sigmund Voss kveik + <i>Lb. brevis</i> + <i>B. bruxellensis</i>
USL	US-05 + <i>Lb. brevis</i>
USLB	US-05 + <i>Lb. brevis</i> + <i>B. bruxellensis</i>
GM	Gausemel kveik
GML	Gausemel kveik + <i>Lb. brevis</i>
GMLB	Gausemel kveik + <i>Lb. brevis</i> + <i>B. bruxellensis</i>

3.3.4 Fermentering og modning

Etter inokulering ble ølet satt ved 30°C i et vannbad (Alpha 8, Lauda, Lauda-Königshofen, Tyskland) i 7 dager før overføring til 19 L Corneliusfat oppbevart i romtemperatur i 28 dager. Etter 28 dager ble ølet overført til desinfiserte plastbøtter. Sukker (6g/L vørter) ble blandet ut med 100 mL kokt i 2 minutter deretter nedkjølt og tilsatt ølet. Sukkerløsningen ble forsiktig rørt ut i ølet før ølet ble overført til flasker og korket. Flaskene ble lagret i 2 uker ved romtemperatur og deretter satt på kjølerom ved 4°C. Tre uker etter første flasking ble det oppdaget at det ikke var dannet store mengder CO₂ i ølet. For å få dannet mer CO₂ ble frisk gjær tilsatt ølet som allerede var flasket ved å blande ut 10 g US-05 (Fermentis, Frankrike) i 1 L kokt vann, hvorav 1 mL av løsningen ble tilsatt hver flaske før flaskene ble forseglet på nytt. De andre bryggene ble tilsatt 2 mL gjærløsning per liter øl før flasking.

3.3.5 Prøvetaking og analyser

Under fermenteringen ble pH målt med et PHM 92 LAB pH meter og Plato målt med et palette PR-201 refraktometer (Atago, Japan). Prøver (25 ml) til HPLC og HSGC analyser ble tatt ut ved tidspunkt vist i tabell 3.6 og de ble fryst ned ved -20°C til preparering og analysering i etterkant. Tidspunktene for prøvetaking og analysering er vist i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Oversikt over prøvetakinger under bryggingen.

Dag	0	2	4	7	14	21	28	Etter flaske- modning
Plato	X	X	X	X	X	X	X	
pH	X	X	X	X	X	X	X	
HPLC	X						X	
HSGC	X			X	X		X	
Anton Paar								X
Reologisk analyse								X
Sensorisk analyse								X

Anton Paar

Ferdig karbonerte flasker ble satt inn i en PBA-B Generation M Packaged Beverage Analyser (Anton Paar, Graz, Østerrike) med modulene DMA 4500M Density meter, Alcoalyzer Beer ME, Carbo QC ME og Haze QC ME. Alkoholinnhold og fargeverdi i EBC (European Brewery Convention) ble analysert.

Reologisk analyse

Etter flasking av ølet ble det observert at ølet hadde høy viskositet. For å bekrefte/avkrefte dette ble det utført reologiske analyser ved bruk av en UDS200 (Anton Paar, Østerrike) analysator med en CC27 bob/cup måle celle. De reologiske målingene ble utført av professor Reidar Barfood Schüller ved Norges Miljø og Biovitenskaplige Universitet på et utvalg av de ferdig modnede ølene med minst 2 gjentak av hver prøve. Viskositet ble målt med skjærhastighet på både 105 1/s og 300 1/s.

Sensorisk analyse

Når det var gått 14 dager etter tilsetning av gjær ble to gjentak av hver prøve uformelt sensorisk analysert av meg selv og hovedveileder til oppgaven (Trude Wicklund)

HSGC og HPLC analyser

HSGC og HPLC analysene ble ikke gjennomført grunnet infeksjon i prøvene som gjorde analyseringen umulig da prøvematerialet ikke kunne filtreres og det ble antatt at resultatene ikke ville være representative grunnet infeksjonen.

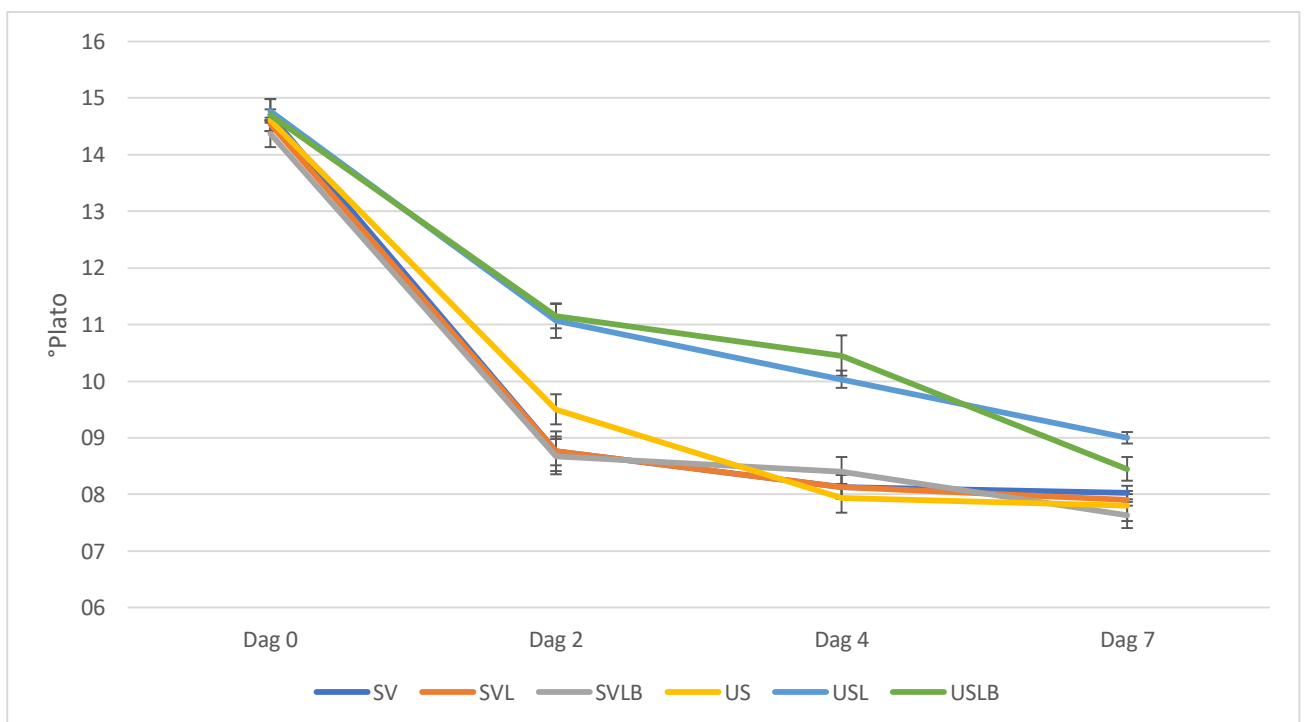
4 Resultater

For alle figurer og tabeller i kapitel 4 er verdiene presentert som et gjennomsnitt av tre gjentak. Dersom et av datapunktene fra et av gjentakene hadde avvikende resultater fra de to andre gjentakene ble det ikke tatt med i utregningen av gjennomsnitt og standardavvik. Rådata med alle verdiene samt hvilke verdier som er utelatt er vist i vedlegg som er spesifisert ved hver analyse.

4.1 Småskala vekstforsøk resultater

4.1.1 Analyse av pH og sukkerinnhold under fermentering

Sukkerinnhold i prøvene fra småskalaforsøket ble målt med et refraktometer som °Plato og er presentert som et linjediagram i figur 4.1. Figuren viser gjennomsnitt med standardavvik. Kun to av gjentakene for USLB prøven er tatt med i utregningen pga. avvikende resultater. Rådata er vist i vedlegg 3.

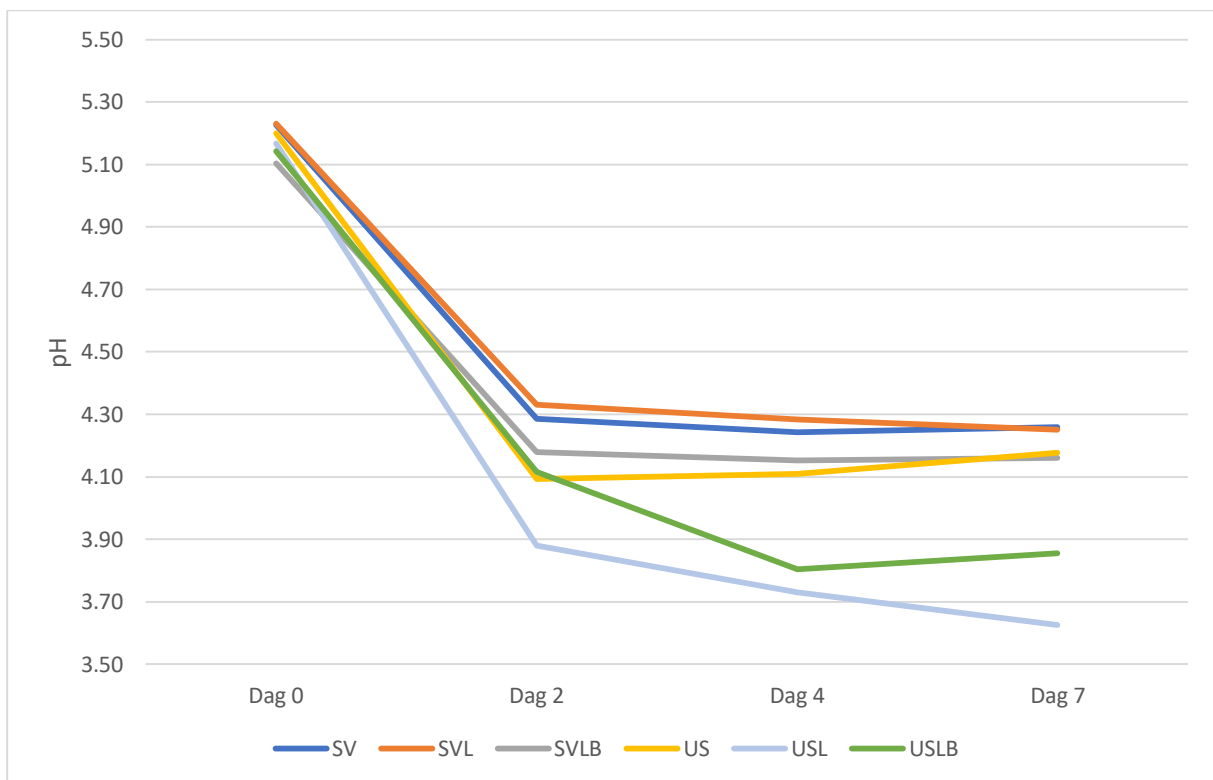


Figur 4.1: Forandring i sukkerinnhold (°Plato) i vørter ved 30°C for alle småskalaforsøks-prøvene gjennom fermenteringen. Vertikale linjer viser standardavvik.. Forkortelser: SV= Sigmund Voss

Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + Lb. brevis, SVLB= Sigmund Voss kveik + Lb. brevis + B. bruxellensis, US= US-05, USL= US-05 + Lb. brevis, USLB= US-05 + Lb. brevis + B. bruxellensis

Alle prøvene med Sigmund Voss kveik (SV, SVL, SVLB) har stor nedgang i °Plato de 2 første dagene før kurvene flater ut mot dag 4. Prøvene SV og SVL flater helt ut fra dag 4 til dag 7, mens SVLB har fortsatt en svakt nedgående kurve. US prøven viser en litt svakere nedgang fra dag 0 til dag 2 sammenlignet med kveik prøvene, men ender opp med omtrent samme °Plato ved dag 4 og 7. Prøvene USL og USLB viser svakere nedgang i °Plato fra dag null til dag to sammenlignet med de andre prøvene. USLB har en noe svakere nedgang i °Plato enn USL fra dag to til fire, men har en sterkere nedgang fra dag 4 til dag 7. USLB har store standardavvik ved både dag fire og syv.

pH ble målt i de seks ulike prøvene ved dag 0, 2, 4 og 7 og gjennomsnittresultatene er presentert i figur 4.2. Standardavvik og rådata finnes i vedlegg 3.



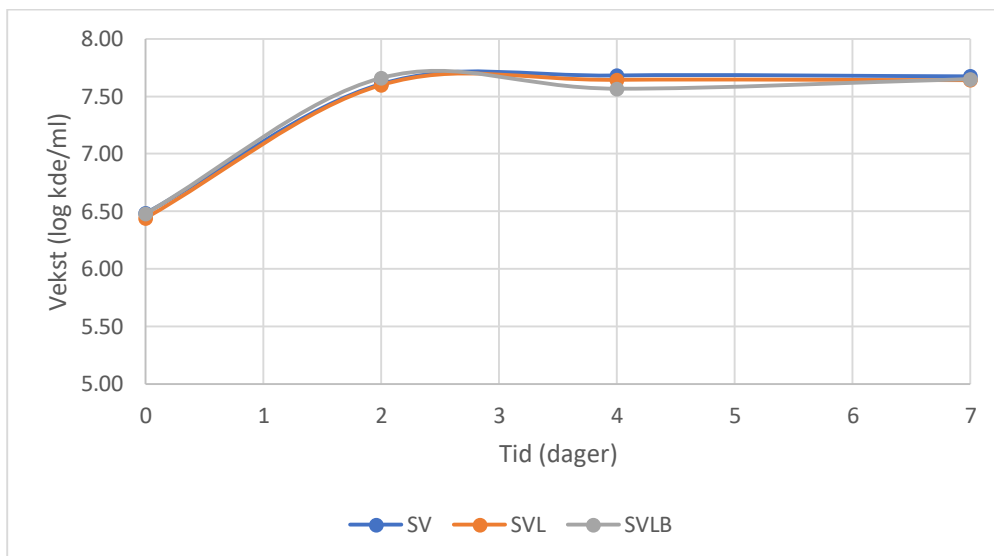
Figur 4.2: GjennomsnittspH verdier forsmåskalaforsøks- prøvene i vørter ved 30°C gjennom fermenteringen. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + Lb. brevis,

SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

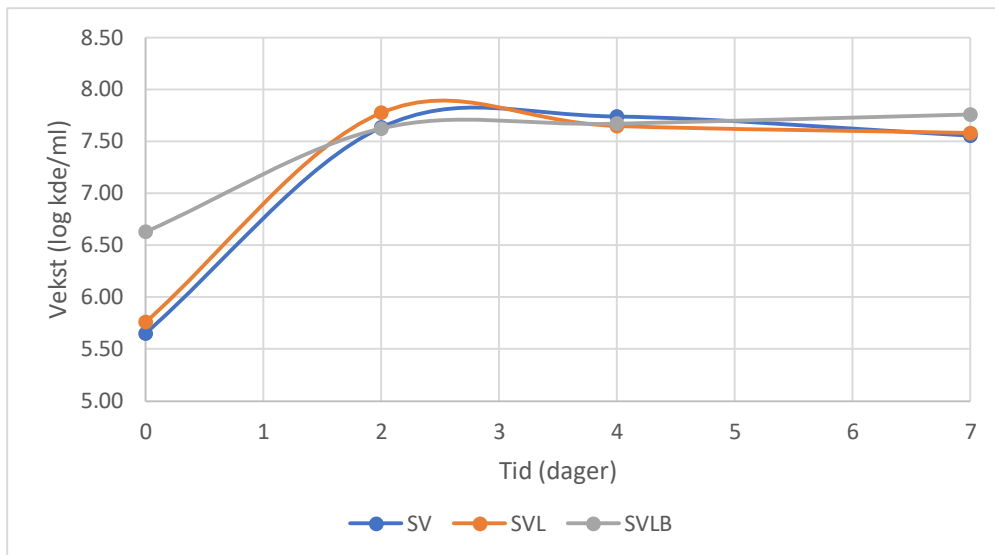
Figur 4.2 viser at prøvene SV og SVL begge synker til pH 4,3-4,4 etter 2 dager og er videre stabile. Prøvene SVLB, US og USLB synker alle til pH 4,1-4,2 ved dag 2. US og SVLB er deretter stabile, mens USLB synker videre ned til pH 3,8-3,9 ved dag 4 og 7. USL skiller seg ut med stor nedgang i pH ved dag 2 (pH 3,88) og er også eneste prøve med pH under 4 ved dag 2. pH-en synker deretter svakt ned til 3,6 ved dag 7

4.1.2 Analyse av vekst

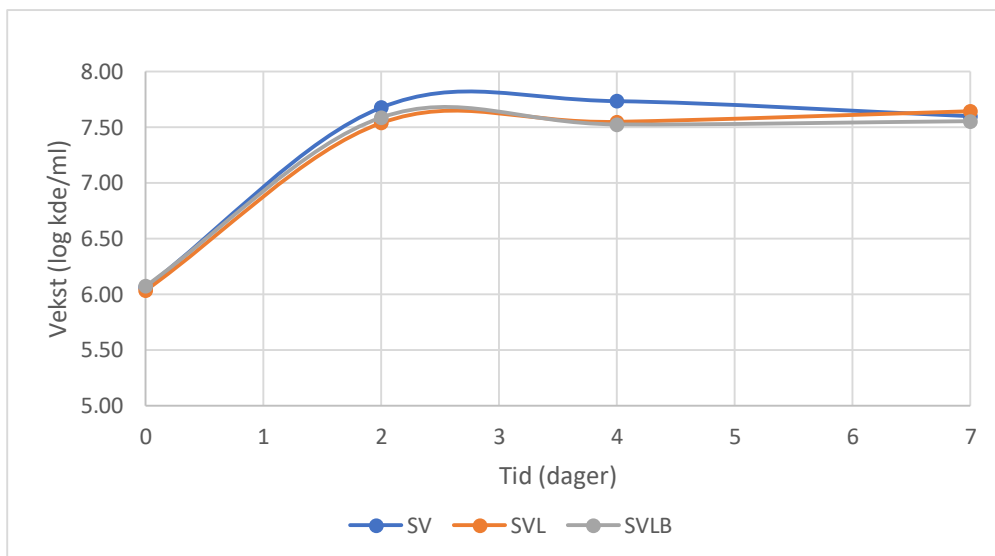
Vekst av presumptivt melkesyrebakterier og gjær i prøvene med Sigmund Voss kveik ble analysert med utplating på MRS, YM og RB agar. Gjennomsnittsvekstresultatene er regnet om til log kolonidannende enheter (kde) per mL prøve i figur 4.3, 4.4 og 4.5 Utplatinger er gjort ved dag 0, 2, 4 og 7. Rådata med standardavvik er vist i vedlegg 3



Figur 4.3: Vekst på MRS agar skåler av Sigmund Voss kveik prøvene. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*



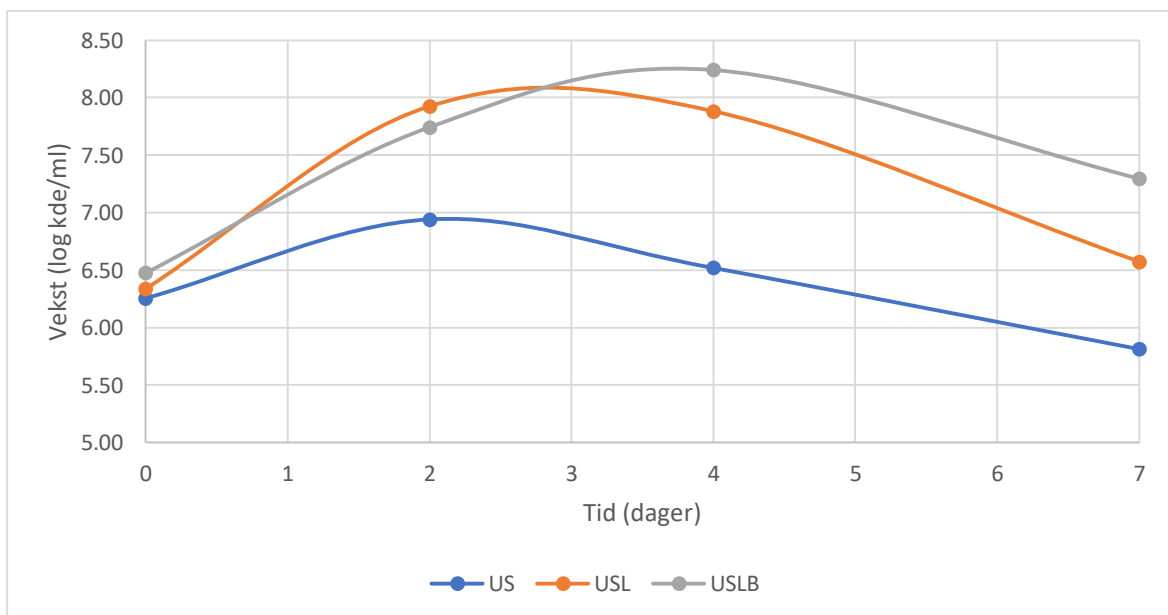
Figur 4.4: Forandring på YM agar skåler fra kveik prøvene. Skåler ble inkubert ved 30°C i 7 dager. Gjennomsnittsverdier vist i log (10) av kolonidannende enheter per mL (kde/ml). Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*



Figur 4.5: Vekst på Rose Bengal agar skåler fra kveik prøvene inkubert ved 22°C i 5 dager. Gjennomsnittsverdier vist i log(10) av kolonidannende enheter per mL (kde/ml). Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*.

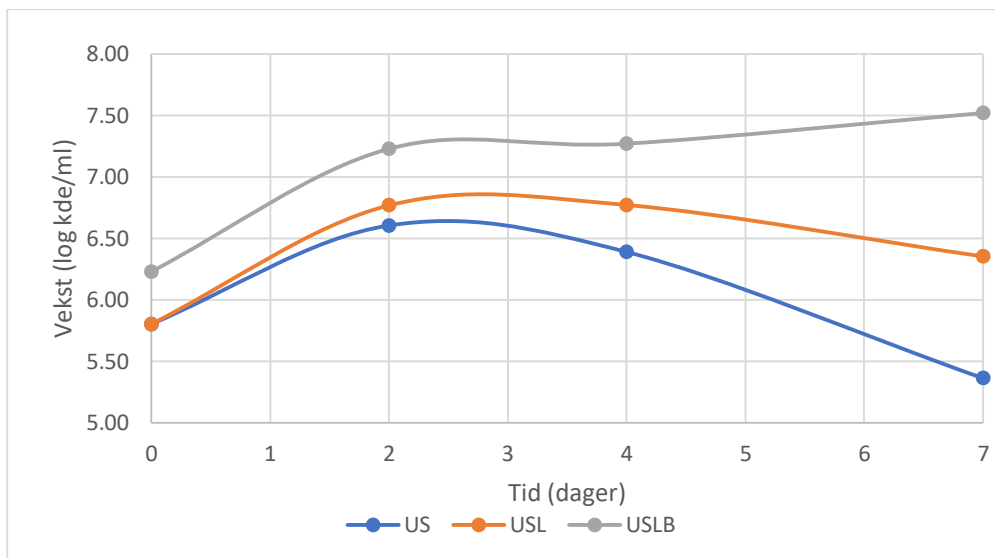
Resultatene fra MRS skålene viser like tall for alle prøvene med 6,5 log kde/mL ved dag 0 som øker til 7,7 log kde/mL etter dag 2 og holder seg stabilt ved dette nivået frem til dag 7. YM resultatene viser en start konsentrasjon på cirka 5,5 log kde/mL for SV og SVL prøvene, mens SVLB hadde en start konsentrasjon på 6,7 log kde/mL. Alle tre kveikprøvene stiger til ca. 7,7 log kde/mL ved dag to og er stabile der til dag 7. Hos SVLB kan man se antydning til stigning i log kde/mL ved dag 7. RB resultatene viser lik startkonsentrasjon for alle kveikprøvene på 6 log kde/mL. Etter 2 dager stiger konsentrasjonen til 7,7 log kde/mL hos alle kveikprøvene og er deretter stabil ved dette nivået.

Vekst av presumptivt melkesyrebakterier og gjær i prøvene med US-05 ble analysert med utplating på MRS agar, YM agar og RB agar på samme måte som kveikprøvene. Resultatene er regnet om til gjennomsnittlige log tall og er presentert som vekstgrafer i figur 4.6, 4.7 og 4.8. Utplatinger er gjort ved dag 0, 2, 4 og 7. Rådata med standardavvik er vist i vedlegg 3.



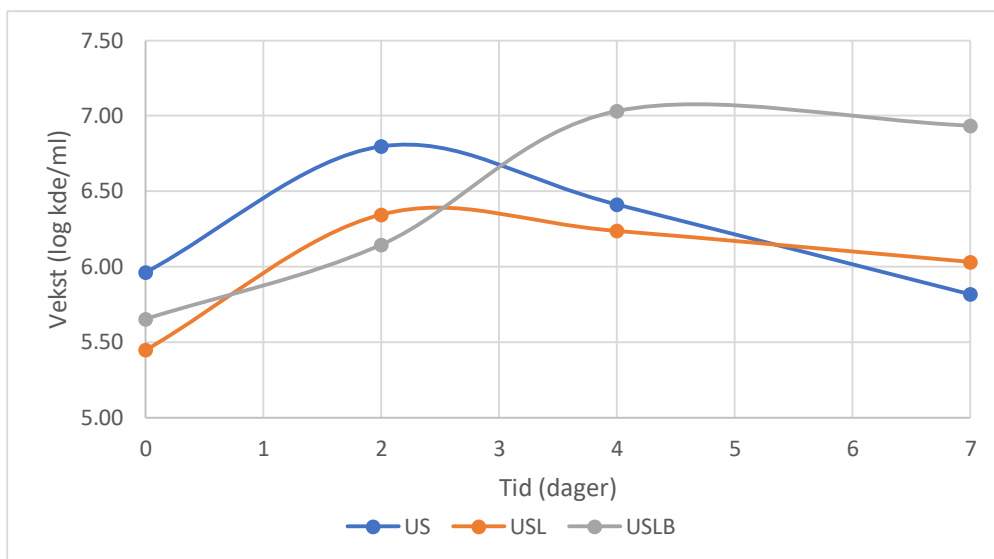
Figur 4.6: Vekst av US-05 prøvene på MRS agar skåler gjennom fermenteringen i vørter ved 30°C. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.6 viser omtrent likt antall log kde/mL for de tre prøvene med US-05 ved dag 0 med 6,3-6,5 log kde/mL. US har lavest vekst av de tre prøvene og vokser til en toppkonsentrasjon på 7 log kde/mL ved dag 2 og synker deretter gradvis. USL har samme lignende trend med økning mot en topp ved dag 2 og for å så synke frem til dag 7, men celletallet ved dag 2 er over 1 log høyere for USL enn US. USLB har omtrent samme vekst mot dag 2 som USL, men istedenfor å synke ved dag 4 fortsetter celletallet å øke til 8,2 log kde/mL ved dag 7 hvor celletallet deretter synker.



Figur 4.7: Vekst av US-05 prøvene på YM agar gjennom fermenteringen i vørter ved 30°C. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Resultatene i figur 4.7 viser at startkonsentrasjon av log kde/mL er det samme for USL og US med 5,8 log kde/mL, mens USLB ligger cirka 1 log kde/mL høyere. Alle prøvene øker i celletall mot dag 2, hvor US har litt svakere økning med kun 0,8 log kde/mL økning mot 1 log kde/mL økning for USL og USLB. USL og USLB har ingen forandring i log kde/mL frem til dag 4 i motsetning til US som synker med 0.2 log kde/mL. Ved dag 7 synker celletallet til US videre ned til 5,36 log kde/mL. Også USL synker fra dag 4 til dag 7 fra 6,8 til 6,4 log kde/mL. USLB stiger derimot svakt fra dag 4 til dag 7 fra 7,3 til 7,50 log kde/mL.



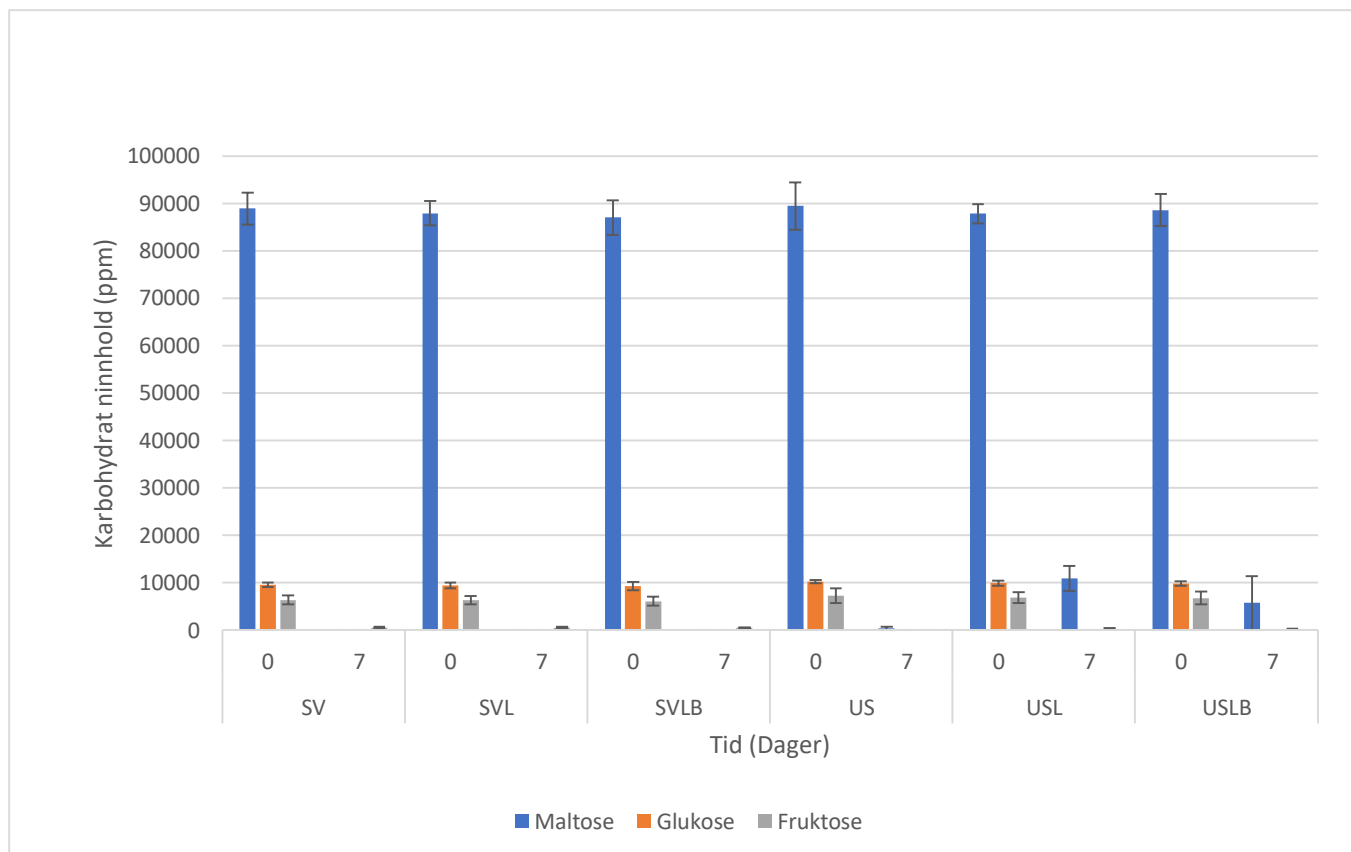
Figur 4.8: Vekst av US-05 prøvene på RB agar skåler agar gjennom fermenteringen i vørter ved 30°C. Gjennomsnittsverdier av 3 gjentak er presentert. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.8 viser at prøvene har varierende startkonsentrasjon av log kde/mL der US, USL og USLB har henholdsvis 6,0, 5,7 og 5,5 log kde/mL. Både US og USL har en økning i log kde/mL på cirka 0,9 fra dag 2 til 4, mens USLB øker bare 0,49 log kde/mL i samme tidsrom. Fram mot dag 7 synker US med 1 log kde/mL og USL med 0,3 log kde/mL. USLB øker derimot med 0,9 log kde/mL fra dag 2 til 4 og synker deretter med 0,1 log kde/mL mot dag 7.

4.1.3 HPLC analyse

4.1.3.1 Karbohydrat analyse

Maltose, fruktose og glukose innholdet i prøvene ble analysert med HPLC. Målingene ble gjort ved dag 0 og dag 7. Gjennomsnitt resultatene med standardavvik er vist fram i figur 4.9. Rådata er vist i vedlegg 4.

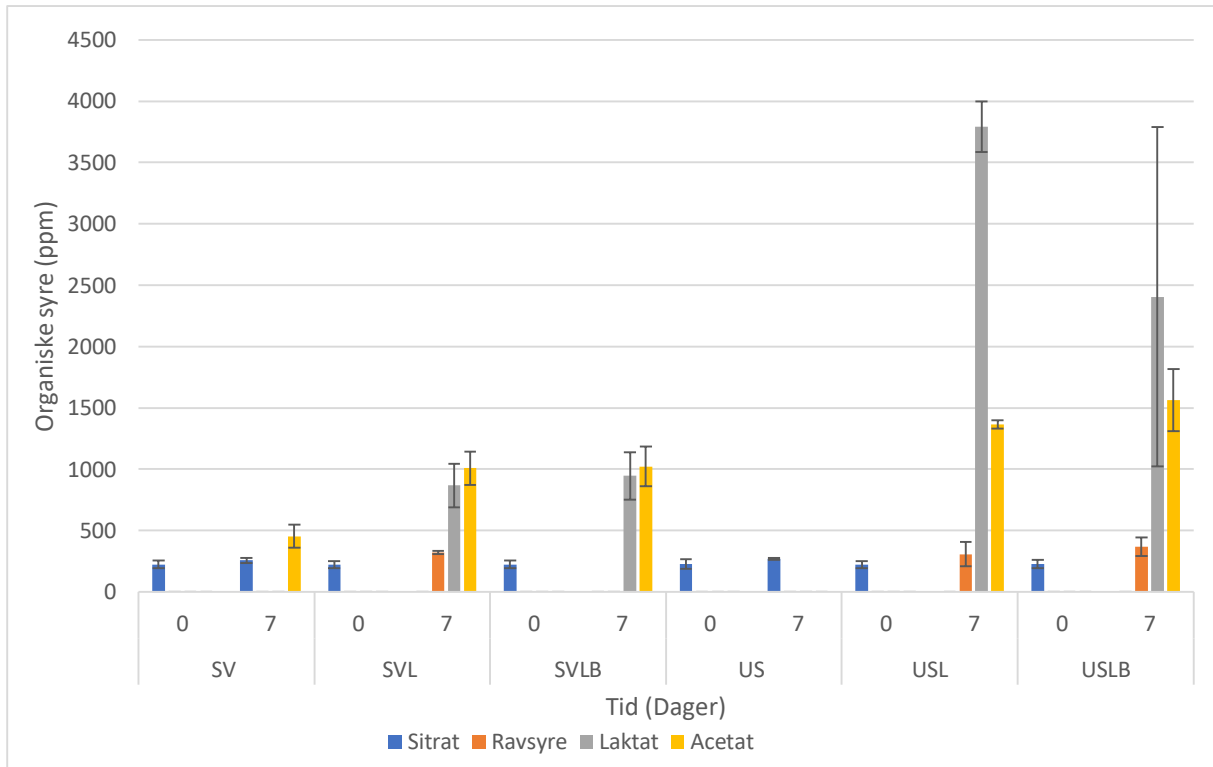


Figur 4.9: Karbohydratutvikling i vørter ved 30°C analysert ved dag 0 og dag 7. Resultatene er vist som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Ved dag 0 har alle prøvene 80 000 – 90 000 ppm maltose, 9 400 – 10 000 ppm glukose og mellom 6 000 – 8 000 ppm fruktose. Prøvene SV, SVL og SVLB har fullstendig brutt ned maltose og glukose ved dag 7. Det er 500 ± 32 ppm av fruktose som ikke er omsatt i de samme prøvene etter 7 dager. US, USL og USLB har omsatt maltose i varierende grad. Prøven USL har ved dag 7, 10000 ± 2640 ppm maltose i prøven, USLB har 5726 ± 5728 ppm maltose og US har 396 ± 45 ppm maltose igjen ved dag 7. USL og USLB inneholder også ca. 150 ppm fruktose og ingen glukose ved dag 7, mens US har 51 ± 45 ppm glukose til stede, men ikke noe fruktose.

4.1.3.2 Innhold av organiske syrer

Innholdet av de organiske syrene sitrat, ravsyre, laktat og acetat i prøvene ble analysert med HPLC. Prøvene ble analysert ved dag 0 og dag 7. Gjennomsnittsverdiene med standardavvik er vist i figur 4.10. Rådata er vist i vedlegg 4.



Figur 4.10: Organiske syrer i vørter ved 30°C analysert ved dag 0 og dag 7. Resultatene er vist som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Resultatene i figur 4.10 viser at prøvene alle hadde tilnærmet lik konsentrasjon av sitrat ved dag 0 med 220 – 230 ppm. SV og US har ingen forandring i sitrat gjennom 7 dagers fermentering. SVL, SVLB, USL og USLB har ingen sitrat til stede ved dag 7.

Ravsyre er ikke til stede ved dag 0 for noen av prøvene. SV, US, SVLB har ikke ravsyre ved dag 7. SVL har produsert 322 ppm, SVLB 131 ppm, USL 306 ppm og USLB 368 ppm ravsyre ved dag 7.

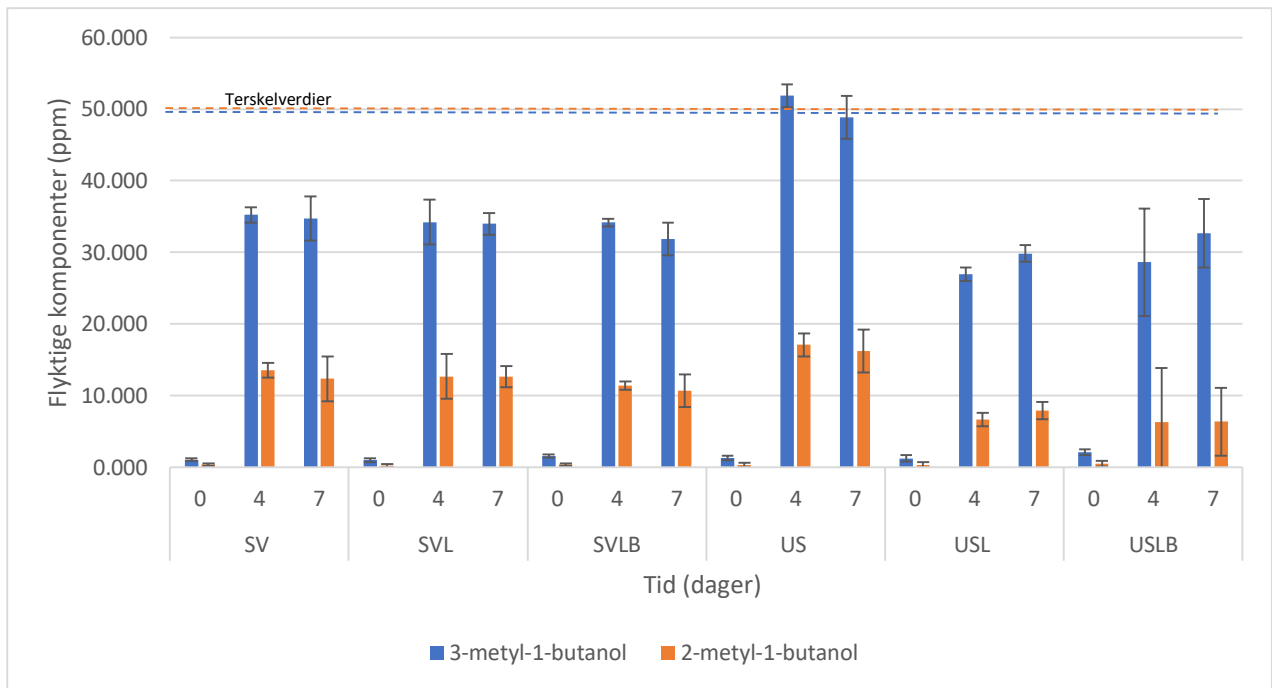
Det ble ikke detektert melkesyre og eddiksyre ved dag 0 i noen av prøvene. For laktat er US eneste prøve uten hverken laktat eller acetat til stede ved dag 7. SV har ved dag 7 454 ppm acetat og ingen laktat. Av kveik prøvene har SVLB det høyeste innholdet av laktat og acetat med henholdsvis 946 ppm og 1022 ppm fulgt av SVL med 868 ppm og 1008 ppm. USL og USLB skiller seg fra alle de andre prøvene med høyt innhold av laktat på henholdsvis 3791 ppm og 2404 ppm. USLB har et stort standardavvik for laktat på ± 1382 ppm. USL og USLB har høyere verdier av acetat sammenlignet med kveik prøvene, men forskjellen er ikke like stor som for laktat. Acetat verdiene for USL og USLB var henholdsvis 1366 ppm og 1565 ppm.

4.1.4 Flyktige komponenter

Småskala prøvene ble analysert for et utvalg flyktige aromatiske komponenter med HSGC. Målingene ble gjort ved dag 0,4 og 7. I tillegg til stoffene presentert i dette kapitlet ble også esterne isobutyl acetat og etyl hexanoate analysert, men ettersom verdiene var langt under terskelverdiene og det var lite variasjon mellom prøvene er de ikke presentert. Prøvene ble også analysert for svovelkomponenten dimetylsulfid (DMS) men da verdiene alle var under 0,01 ppm er heller ikke denne komponenten presentert.

4.1.4.1 Høyere alkoholer

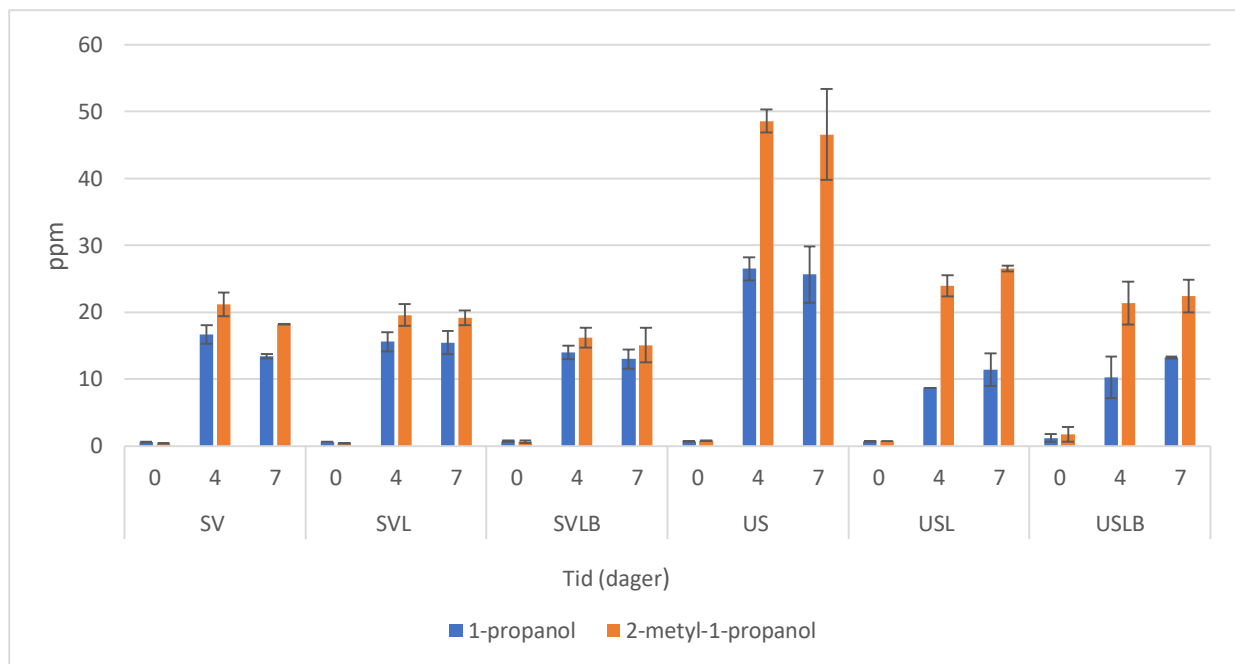
Innholdet av utvalgte høyere alkoholer i prøvene er vist i figur 4.11 og 4.12. Rådata er vist i vedlegg 5. Figur 4.11 viser gjennomsnittsverdiene av 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol. Figur 4.12 viser gjennomsnittsverdiene for 1-propanol og 2-metyl-1-propanol. Terskelverdier for 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol er vist i figuren som en stiplet linje, hvor terskelverdien er hentet fra kapittel 2.3. Figur 4.12 inneholder ikke terskelverdier da terskelverdiene for 1-propanol (600 ppm) og 2-metyl-1-propanol (200 ppm) er utenfor grafens akse for ppm.



Figur 4.11: Høyere alkoholer, 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol, i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik.

Terskelverdier for komponentene er vist som en stiplet linje på figuren. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.11 viser at i alle prøvene øker innholdet av 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-butanol fra dag 0 til dag 4 og det er liten forandring fra dag 4 til dag 7. Verdiene for 3-metyl-1-butanol er for alle prøvene mer enn dobbelt så høye som for 2-metyl-1-butanol. Prøvene med Sigmund Voss kveik (SV, SVL, SVLB) har omtrent like verdier for begge komponentene med størrelsesorden 30 000-35 000 ppm for 3-metyl-1-butanol og 11 000-14 000 ppm for 2-metyl-1-butanol. Prøvene USL og USLB har begge litt lavere verdier for begge komponentene sammenlignet med kveik prøvene. US skiller seg ut med de høyeste verdiene for 3-metyl-1-butanol med 52 000 ppm ved dag 4 og er eneste som overskrider terskelverdien til denne komponenten. Ingen prøver overskrider terskelverdien for 2-metyl-1-butanol. USLB skiller seg ut med større standardavvik enn de andre prøvene.

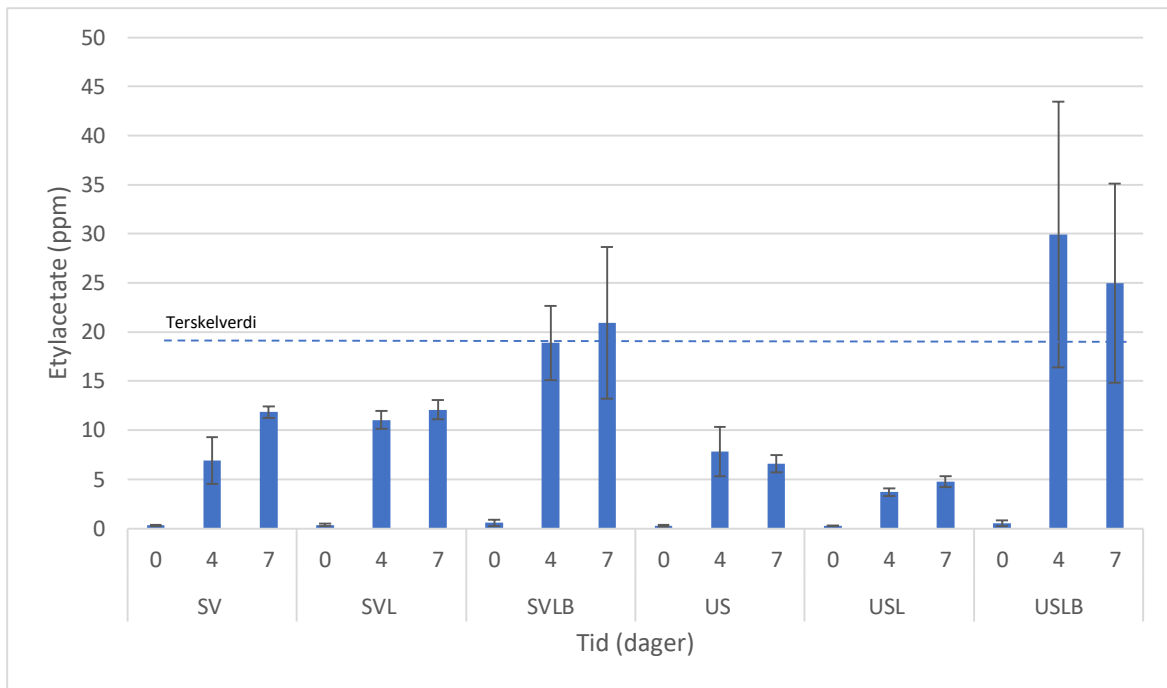


Figur 4.12: Høyere alkoholer, 1-propanol og 2-metyl-1-propanol, i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnitt av tre gjentak med standardavvik. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.12 viser at innholdet av 1-propanol og 2-metyl-1-propanol øker fra dag 0 til 4 i alle prøvene, og at det er lite forandring fra dag 4 til 7. Prøvene med Sigmund Voss kveik har alle verdier som ligger mellom 13 og 22 ppm for begge komponentene ved dag 4 og 7. USL og USLB har litt høyere verdier for 2-metyl-1-propanol sammenlignet med kveik prøvene og litt lavere for 1-propanol. US skiller seg ut med den høyeste verdien for begge komponentene med 25-27 ppm for 1-propanol og 47-49 ppm for 2-metyl-1-propanol ved dag 4 og 7.

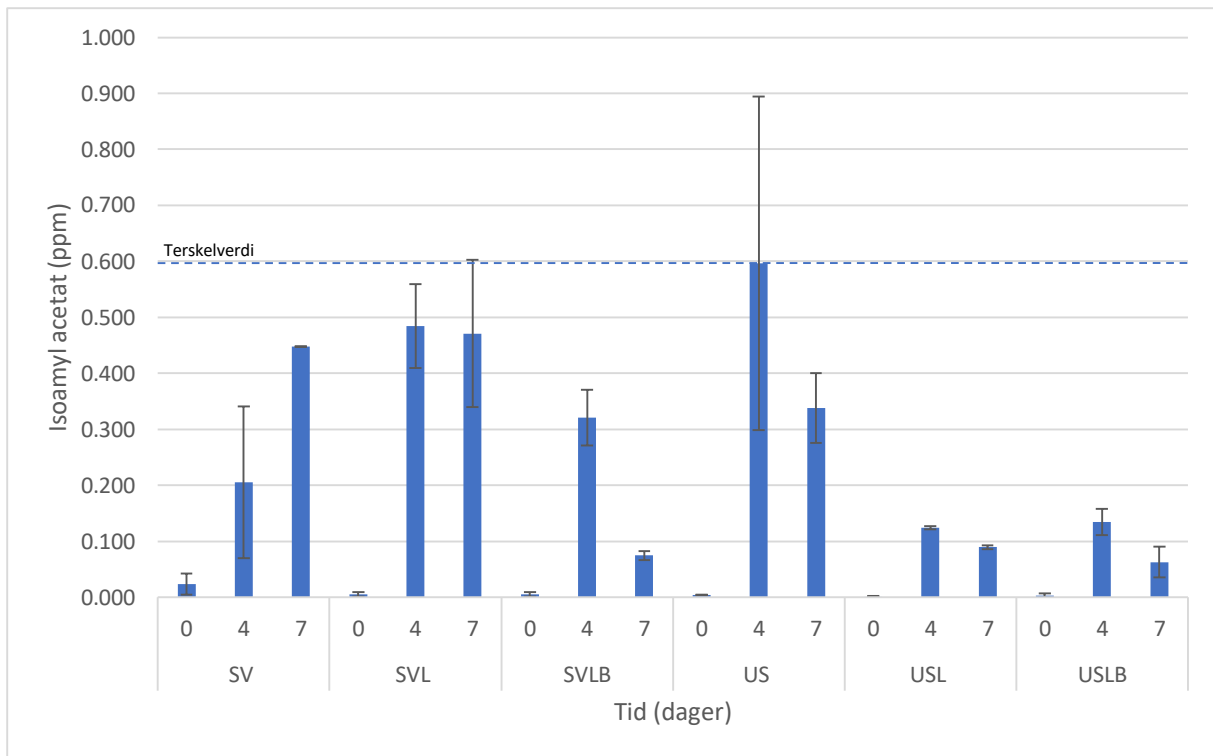
4.1.4.2 Estere

Innholdet av esterene etylacetat, isoamylacetat, etyl octonoat og etyl hexanoat ble analysert med HSGC analyse og resultatene er vist i figur 4.13 til 4.15. Figurene viser gjennomsnittsverdier med standardavvik regnet ut fra tre gjentak. Terskelverdier er lagt inn i figurene som en stiplet linje. Terskelverdiene er tatt fra kapittel 2.3. Rådata er vist i vedlegg 5.



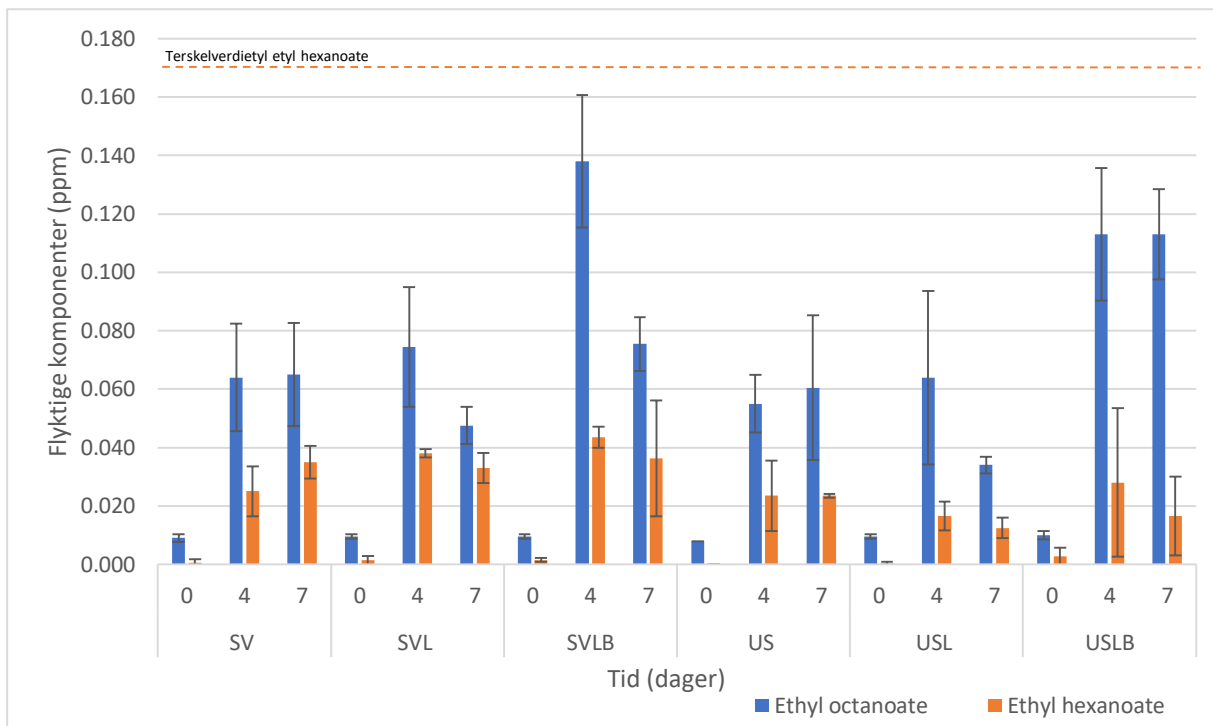
Figur 4.13: Esteren etylacetat i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnittet av tre gjentak med standardavvik. Terskelverdien for esterene er langt inn i figuren som en stiplet linje. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

For etylacetat øker alle prøvene fra dag 0 til dag 4. SV, SVL og SVLB har også svak økning fra dag 4 til dag 7. Prøvene SVLB og USLB skiller seg ut med høyere verdier enn de andre prøvene. SVLB har verdier over terskelgrensen ved dag 7 med 21 ppm. USLB har verdier over terskelverdien ved dag 4 og 7 med henholdsvis 30 og 25 ppm. Det er store standardavvik for SVLB ved dag 7 og for USLB ved dag 4 og 7. SV og SVL har høyere verdier for etylacetat enn US og USL gjennom fermenteringen.



Figur 4.14: Esteren isoamyl acetat i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnittet av tre gjentak med standardavvik. Terskelverdi for esterene er langt inn i figuren som en stiplet linje. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.14 viser at alle prøvene øker fra dag 0 til dag 4. Ingen av verdiene går over terskelverdien for isoamyl acetat. SVLB synker fra dag 4 til 7, fra 0,32 ppm til 0,06 ppm. USL og USLB skiller seg ut med lave verdier (under 0,15 ppm) ved alle dagene. US har stort standardavvik ved dag 4 og har en gjennomsnittsverdi rett rundt terskelverdien på 0,6 ppm.

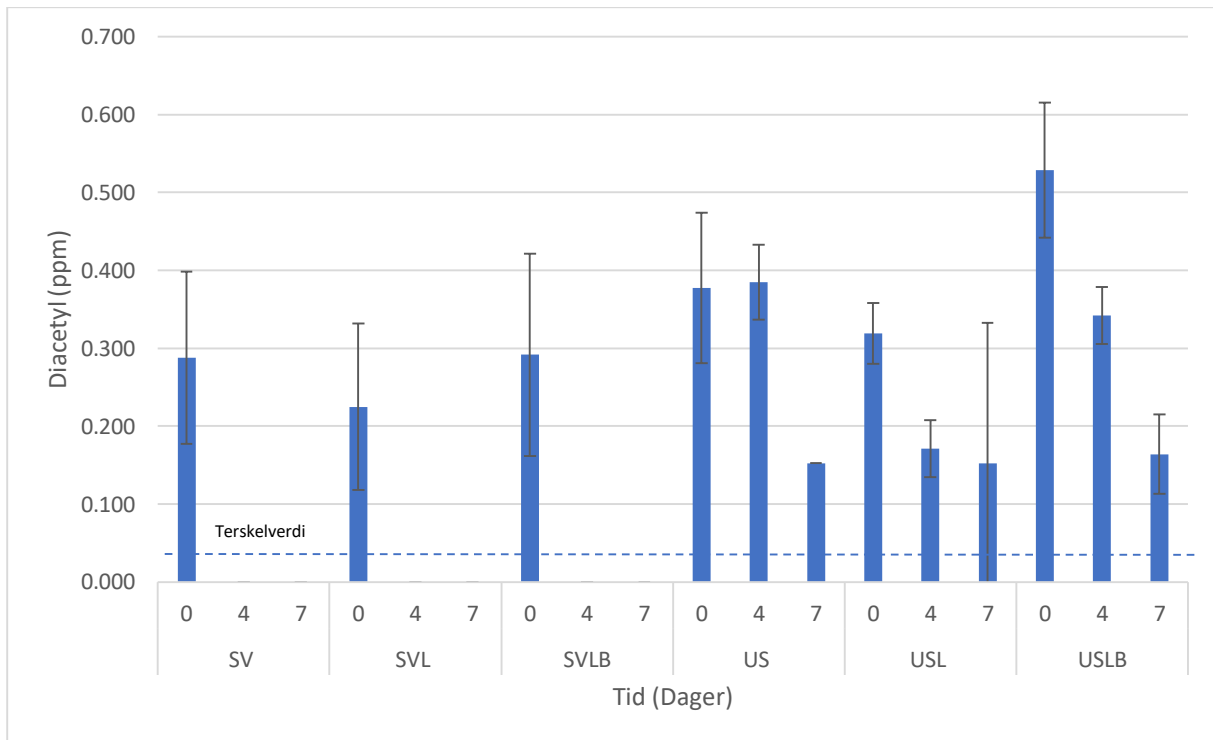


Figur 4.15: Esterne etyl octonoat og etyl hexanoat i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnittet av tre gjentak med standardavvik. Terskelverdi for etyl hexanoate er langt inn i figuren som en stiplet linje. Terskelverdi for etyl octonoate er ikke tatt med da den er utenfor figurens dataområde (0,3 ppm). Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

For både etyl octonoat og etyl hexanoat viser figur 4.15 at alle prøvene øker fra dag 0 til dag 4 og at ingen av verdiene overstiger terskelverdiene. Prøvene med Sigmund Voss kveik har generelt litt høyere innhold av etyl hexanoat enn tilsvarende prøver med US-05. SVLB og USLB har de høyeste verdiene for etyl octonoat med henholdsvis 0,138 ppm og 0,113 ppm ved dag 4. Etyl octonoat synker i stor grad for SVLB fra dag 4 til dag 7 fra 0,138 ppm til 0,076 ppm, mens USLB er stabil. Det er for flere av prøvene store standardavvik.

4.1.4.4 Ketoner

Innholdet av diacetyl i prøvene er vist i figur 4.16. Figuren viser gjennomsnittsverdiene med standardavvik regnet ut fra tre gjentak. Rådata er vist i vedlegg 5. Terskelverdien i figuren er vist med en stiplet linje. Terskelverdien er tatt fra kapittel 2.3.

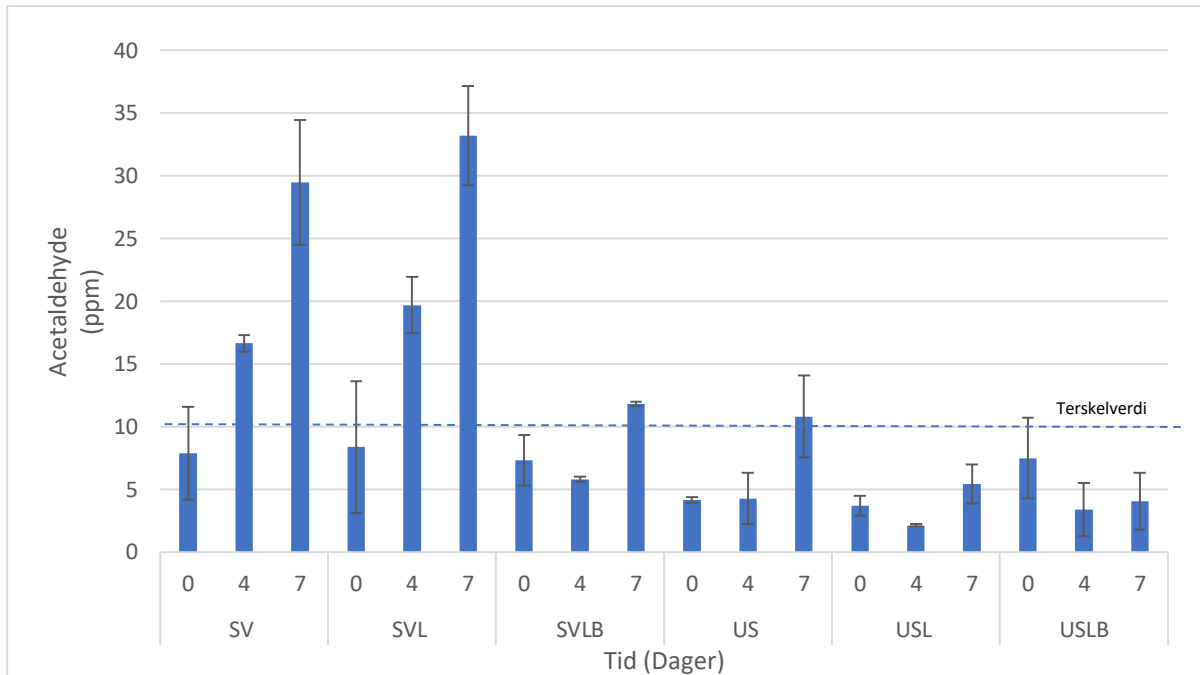


Figur 4.16: Diacetyl i vørter ved 30°C analyser t ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnittet av tre gjentak med standardavvik. Terskelverdi er langt inn i figuren som en stiplet linje. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + Lb. brevis, SVLB= Sigmund Voss kveik + Lb. brevis + B. bruxellensis, US= US-05, USL= US-05 + Lb. brevis, USLB= US-05 + Lb. brevis + B. bruxellensis

Figur 4.16 viser at alle nullprøvene har verdier over terskelverdien på 0,1 ppm for diacetyl. Prøvene med Sigmund Voss kveik avtar til 0 ppm ved dag 4 og 7. Prøvene med US-05 har verdier over terskelverdien ved alle målinger. US holder seg stabil fra dag 0 til dag 4 og avtar deretter til 0,153 ppm ved dag 7. Diacetyl i USL og USLB prøvene avtar fra dag 0 til dag 7. Alle prøvene med US-05 ender opp med en diacetyl konsentrasjon mellom 0,1 ppm og 0,2 ppm ved dag 7. Sigmund Voss prøvene ved dag 0 og USL ved dag 7 har store standardavvik for diacetyl.

4.1.4.4 Aldehyder

Innholdet av acetaldehyd i prøvene er vist i figur 4.17. Figuren viser gjennomsnittsverdiene med standardavvik regnet ut fra tre gjentak. Rådata er vist i vedlegg 5. Terskelverdien i figuren er vist med en stiplet linje. Terskelverdien er hentet fra kapittel 2.3.



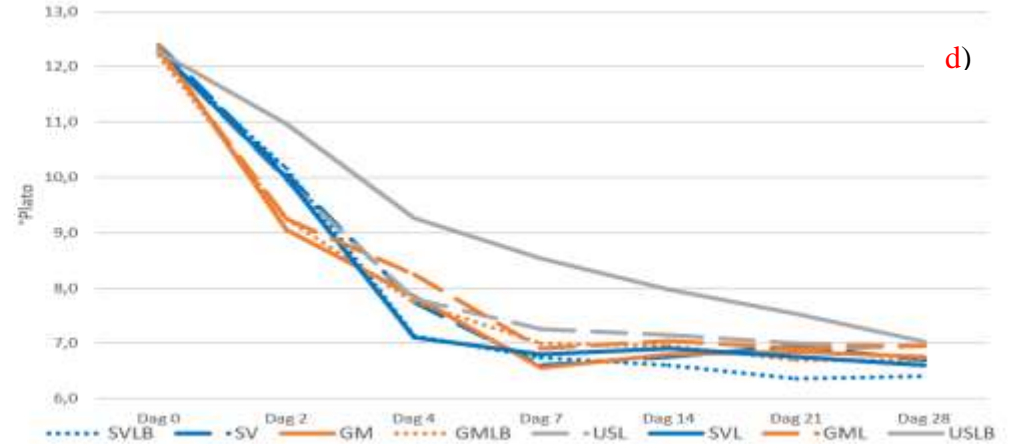
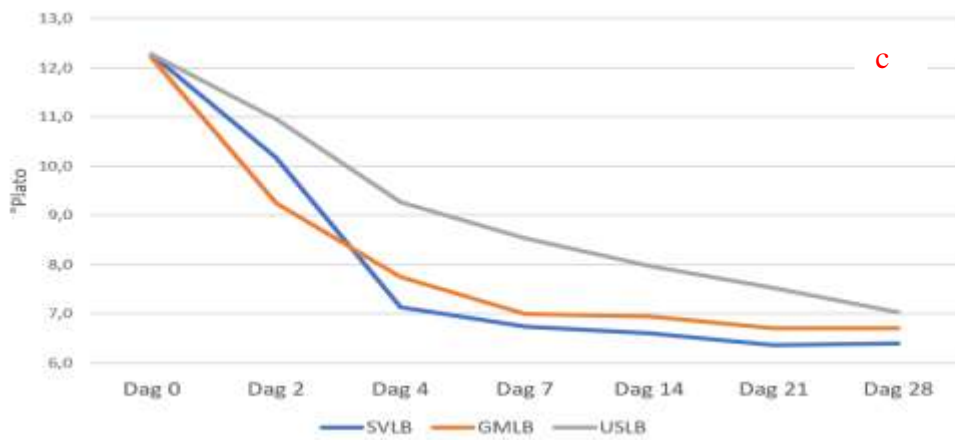
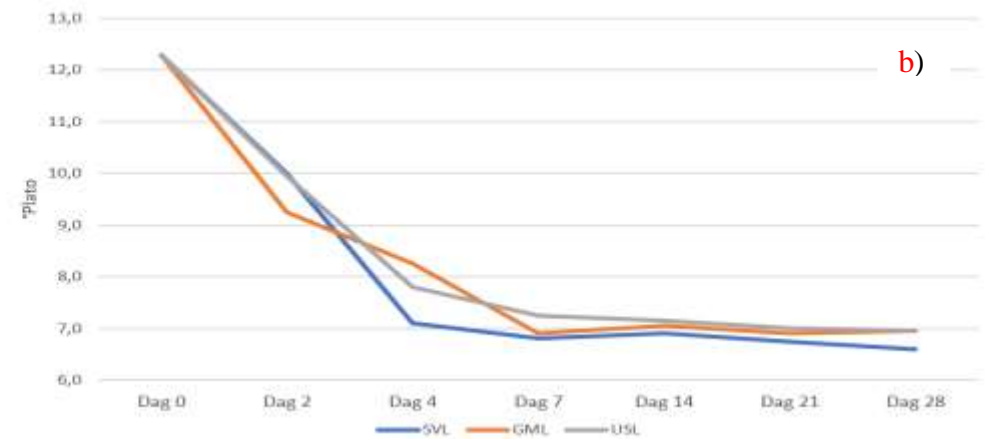
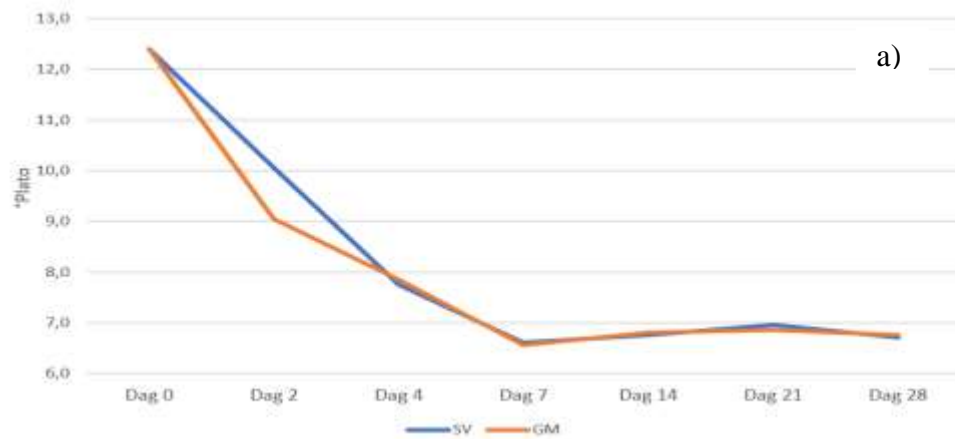
Figur 4.17: Acetaldehyd i vørter ved 30°C analysert ved dag 0, 4 og 7. Resultatene er vist som gjennomsnittet av tre gjentak med standardavvik. Terskelverdi er langt inn i figuren som en stiplet linje. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + Lb. brevis, SVLB= Sigmund Voss kveik + Lb. brevis + B. bruxellensis, US= US-05, USL= US-05 + Lb. brevis, USLB= US-05 + Lb. brevis + B. bruxellensis

Figur 4.17 viser at i prøvene SV og SVL øker i mengden acetaldehyd gjennom forsøket. Begge prøvene ender med verdier godt over terskelverdien med henholdsvis 29 ppm og 33 ppm etter 7 dager. Prøven SVLB har ikke like stor økning av acetaldehyd, men verdien øker noe fra dag 4 til dag 7 slik at verdien ender opp litt over terskelverdien på 10 ppm. US prøven viser lignende resultater som SVLB med lite forandring fra dag 0 til 4, men så en liten økning mot dag 7 som gjør at prøven ender opp rett over terskelverdien. Innholdet av acetaldehyd i USL og USLB øker ikke i stor grad under fermenteringen og holder seg under terskelverdien.

4.2 Bryggeforsøk resultater

4.2.1 Sukkerinnhold under fermentering

Sukkerinnholdet i prøvene ble målt som °Plato med et refraktometer. Målingene ble utført etter 1, 2, 4, 7, 14, 21 og 28 dager. Gjennomsnittsverdier fra tre gjentak er vist som flere grafer i figur 4.18. Figuren består av fire grafer, en graf med prøver som inneholder kun gjær, en med prøver som inneholder gjær og MSB, en graf for prøver med gjær, MSB og *B. bruxellensis* og en oppsamlings graf med alle prøvene samlet. Rådata er vist i vedlegg 6.

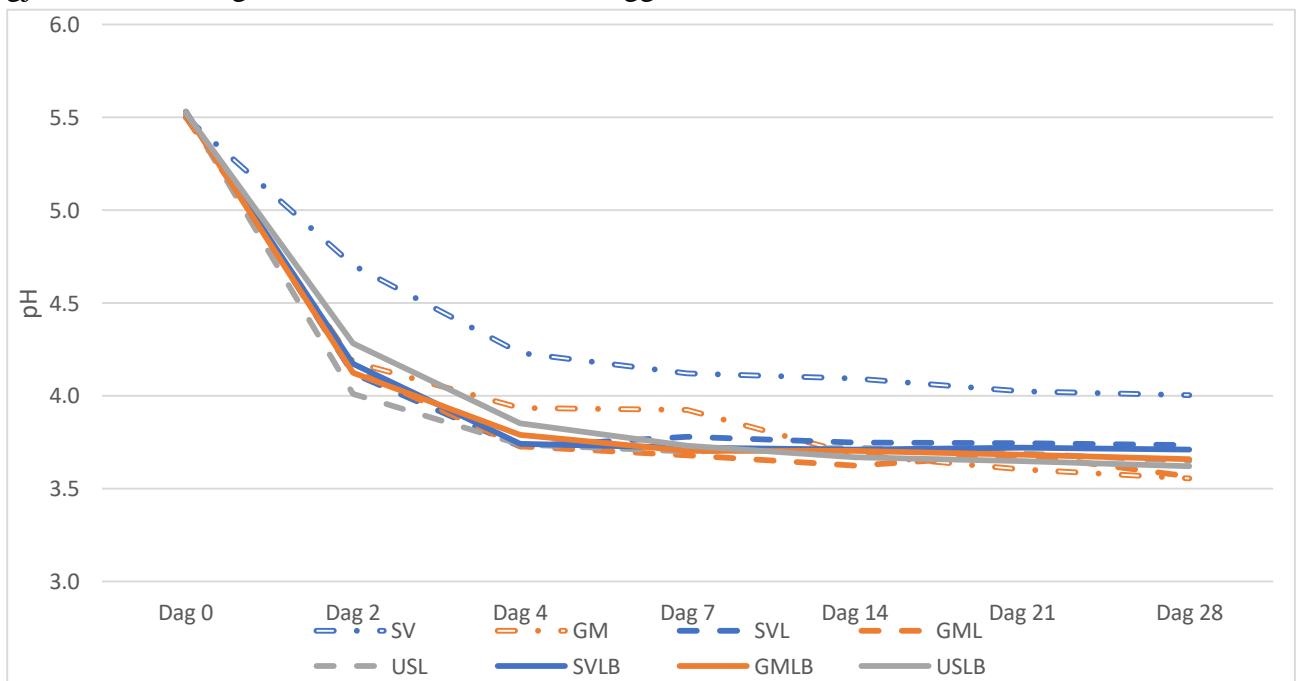


Figur 4.18: °Plato målinger under ølbryggingen a) Rene kveik gjær prøver, b) Prøver med gjær og *Lb. brevis*, c) Prøver med gjær, *Lb. brevis* og *B. bruxellensis*, d) Alle prøvene samlet. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Figur 4.18 viser at det er lite forskjeller i °Plato målingene for prøvene med bare kveik gjær. Gausemel (GM) kveik har en litt større nedgang i °Plato de første 2 dagene og flater så litt ut, mens Sigmund Voss (SV) kveik synker jevnt de første 4 dagene før den flater ut ved dag 7. Det er heller ingen store forskjeller mellom prøvene som inneholder gjær og MSB. Den samme trenden vises for GML som for GM, men for SVL øker nedgangen enda litt mer fra dag 2 til 4 sammenlignet med SV. US-05 med MSB har en jevn nedgang til dag 4 og flater så noe ut. For gjærprøvene som inneholder *B. bruxellensis* og *Lb. brevis* sees det at prøven US05 skiller seg ut fra kveik prøvene med en mindre nedgang i °Plato de første dagene. Alle prøvene utenom USLB har stabile °Plato verdier etter dag 7, på rundt 7,0 °Plato. USLB fortsetter å synke gjennom alle de 28 dagene

4.2.2 pH analyse

pH i prøvene ble målt etter 1, 2, 4, 7, 14, 21 og 28 dager. Gjennomsnittts resultatene fra tre gjentak er vist i figur 4.19. Rådata er vist i vedlegg 6.

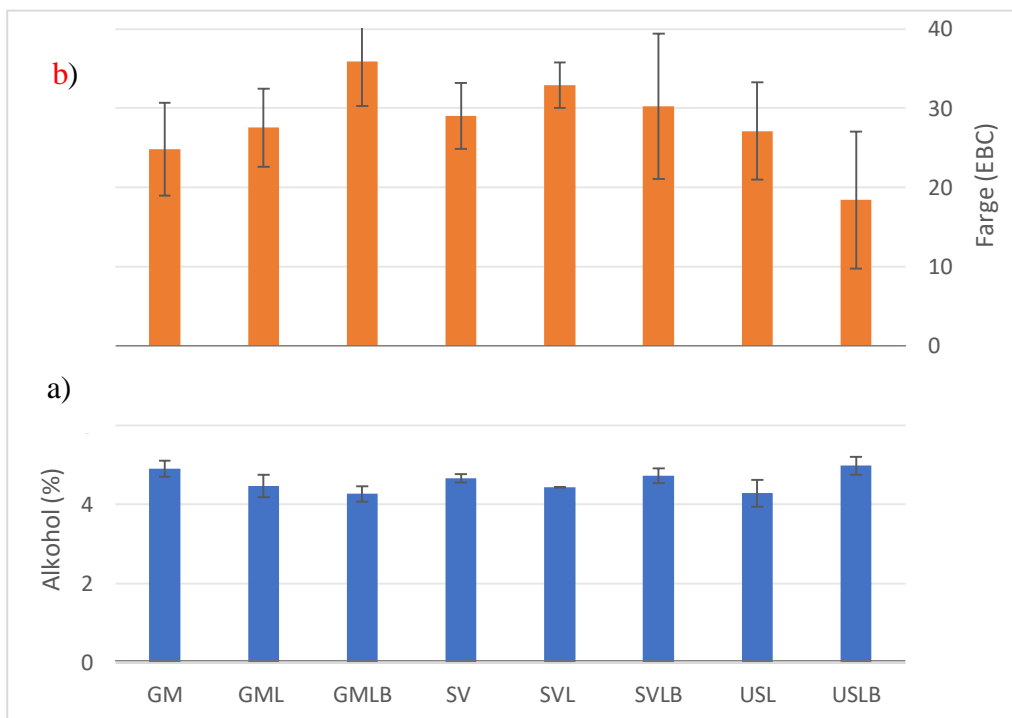


Figur 4.19: pH målinger under ølbryggingen. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

pH resultatene i figur 4.19 viser at SV skiller seg ut fra alle de andre prøvene med både en saktere nedgang i pH de første 4 dagene og med en høyere slutt pH på 4.0 etter 28 dager. Samtlige andre prøver hadde en rask nedgang i pH fra dag 0 til dag 4 og en stabil pH mellom 3,7 og 3,6 etter 7 dager som vedvarte fermenteringen ut.

4.2.3 Anton Paar analyse

Alkohol innhold og fargen på prøvene ble analysert med en Anton Paar beverage analyser. Gjennomsnittresultatene er presentert i figur 4.19. Det nederste stolpediagrammet viser alkoholprosent mens den øverste viser fargeverdien målt i EBC. Rådata vist i vedlegg 7



Figur 4.19: Anton Paar analyse av ølbryggingsprøvene. a). Alkohol prosent og b) Farge verdi «European Brewery Convention» (EBC) Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

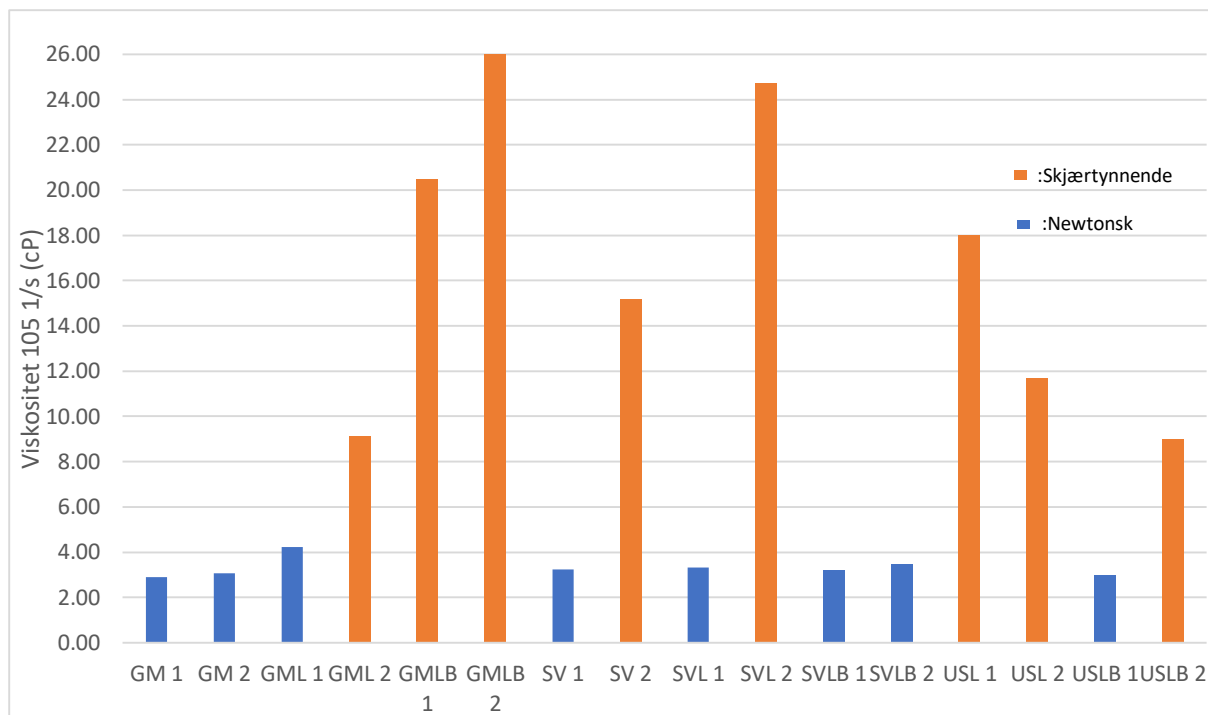
Alkoholprosenten varierte i prøvene fra 4,3 til 5,3%. Alle prøvene med gjær og MSB har lavere alkoholprosent enn tilsvarende prøver med bare gjær. USLB og SVLB har høyere alkoholprosent enn de andre prøvene med samme *S. cerevisiae* gjær. Fargeverdiene varierer fra 18-36 EBC. Det er også her store variasjoner mellom prøvene. Resultatene for farge er omvendt proporsjonale med alkoholprosentens resultatene for alle prøvene utenom USL. Det er store standardavvik på fargeverdiene.

4.2.4 Sensorisk analyse

Under den sensoriske analysen ble det oppdaget at mesteparten av ølene hadde en høy viskositet og en skarp eddiklignende syre smak. Den eneste prøven som gjennomsnittlig hadde en tilnærmet normal viskositet var det første ølet som ble flasket av USLB prøven. Det var noen enkelte flasker av de andre prøvene som også hadde lavere viskositet. Prøvene med høy viskositet hadde også lite merkbar CO₂ dannelse i ølet. De store forskjellene mellom gjentakene og den høye viskositeten gjorde at ingen videre sensorisk analyse ble utført.

4.2.5 Reologisk viskositets analyse

Viskositeten til to av gjentakene fra hver prøve ble reologisk analysert og resultatene fra analysen er presentert i figur 4.20. I analysen ble det brukt to skjærhastigheter, 100 1/s og 300 1/s. Kun data fra 105 1/s er presentert i figur 4.20. Rådata er vist i vedlegg 8. Dersom verdiene sank markant ved skjærhastighet på 300 1/s (skjærtynnende) er kolonnene farget oransje. De som ikke forandret verdi (newtonske) er farget blå. På grunn av stor variasjon mellom gjentakene er hver enkelt måling presentert istedenfor gjennomsnitt med standardavvik.



Figur 4.20: Viskositetsanalyse av to av gjentakene fra bryggingen. Verdiene er målt med skjærhastigheten 100 1/s. Rådata er vist i vedlegg 11. Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + *Lb. brevis*, SVLB= Sigmund Voss kveik + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*, US= US-05, USL= US-05 + *Lb. brevis*, USLB= US-05 + *Lb. brevis* + *B. bruxellensis*

Det er stor variasjon i viskositet både mellom prøvene og mellom flere av gjentakene. Alle prøvene med høyere viskositet enn 5 cP er skjærtynnende. GM 1, GM22, GML 1, SV 1, SVL 1, SVLB1, SVLB2 og USLB 1 er alle newtonske og varierer mellom 2,91 cP og 4,22 cP. GML 2, GMLB 1, GMLB2, SV 2, SVL 2, USL 1, USL2 og USLB 2 er alle skjærtynnende og varierer fra 9,16 cP til 26 cP.

5 Diskusjon

5.1 Småskala vekstforsøk

5.1.1 Sukkerinnhold analyse

Alle prøvene med Sigmund Voss kveik hadde en veldig rask nedgang i °Plato ved fermentering ved 30°C sammenlignet med US-05 prøvene noe som stemmer godt overens med antagelsen om at kveik har bedre varmetoleranse sammenlignet med moderne ølgjær (Preiss et al., 2018). Masteroppgaven til Aasen (2020) viste ingen signifikante forskjeller mellom kveik og US-05 i fermenteringshastighet ved 30°C. Heller ikke i denne oppgaven var forskjellen mellom kveikprøvene og ren US-05 store, selv om ren US-05 hadde litt høyere sukkerinnhold ved dag 2. Blandingskulturene med US-05 skiller seg ut fra de andre prøvene med en mye saktere nedgang i sukkerinnhold og alle hadde °Plato målinger ved dag 7 som var høyere enn °Plato verdien ren US-05 stabiliserte seg ved. Dette indikerer at fermenteringen fortsatt ikke var fullført ved dag 7 for disse prøvene, eller at vekst og metabolisme var hemmet på grunn av lav pH. Altså kan vi anta at ved 30°C fører konkurranse fra andre mikroorganismer til at US-05 fermenterer mindre effektivt enn Sigmund Voss kveik som ikke forandret fermenteringsrate når andre mikroorganismer ble tilsatt. En forklaring på disse resultatene kan være at US-05 har en optimaltemperatur som er lavere enn 30°C som ble brukt i denne oppgaven. Sigmund Voss kveik blir i motsetning til vanlig benyttet ved enda høye temperaturer enn 30°C. Kveik er oftest ikke renkulturer og kan ha dannet forsvarsmekanismer som hjelper til med å utkonkurrere de andre mikroorganismene i prøven (Garshol, 2016; Garshol, 2020; Preiss et. al., 2018).

5.1.2 Celletall analyse

Celletallresultatene fra utplating på MRS, YM og RB agar støtter observasjonen om rask fermentering for Sigmund Voss kveik funnet i sukkerinnhold analysen med en rask stigning i celletall til et maksimum ved dag 2 for alle mediene. Man kunne forventet en nedgang i celletall etter at hoved- fermenteringen var ferdig, men kveik prøvene hadde derimot et stabilt

celletall gjennom hele 7 dagers forsøket på alle mediene, selv om °Plato stabiliserte seg mellom dag 2 og 4. Stabil °Plato kan indikere at det er tomt for maltose i prøvene og at hovedfermenteringen er over (Palmer, 2006). Lignende høye celletall hos over lang tid hos kveik sammenlignet med US-05 og ved 30°C er observert også hos Aasen (2020) i 3 andre kveik kulturer. Evnen til å opprettholde et høyt celletall selv etter endt fermentering kan være en del av forklaring til den korte lag fasen, raske fermenteringen og evnen til å tåle tørking som kveik ofte forbindes med (Garshol, 2016; Preiss et al., 2018).

YM resultatene viser at SVLB har 1 log høyere startkonsentrasjon enn alle de andre kveik prøvene som har 6,3 log kde/mL som startkonsentrasjon. Det er forventet noe høyere startkonsentrasjon hos denne prøven på YM agar da prøvene inneholdt *B. bruxellensis* i tillegg til gjær. YM agar skålene ble inkubert over lengre tid slik at *B. bruxellensis* som vokser saktere også fikk dannet synlige kolonier på skålene (Robinson, 2014). Det var likevel ikke forventet så stor forskjell da kun 2x så mange *B. bruxellensis* celler som kveik celler ble tilsatt. Dette tilsvarer teoretisk kun 0,2 log kde/mL. Det var forventet et lavere celletall for prøvene med bare gjær i forhold til prøvene med *Lb. brevis* og gjær. At dette ikke ble observert kan skyldes feilkilder i ved utplatingen som kan gi variasjoner opp til 0,5 log kde/mL.

US-05 prøvene skiller seg ut fra kveik prøvene ved alle analysene. YM og MRS resultatene for US-05 prøvene stemmer godt overens med fermenteringsforløp teorien hvor man forventer en nedgang i celletall etter stasjonær fase (Doyle et al., 2007). For prøvene uten *B. bruxellensis* ser man en oppgang i celletall de to første dagene før celletallet igjen synker når fermenteringen avtar (stabilt sukkerinnhold). For prøven med *B. bruxellensis* ser man den samme trenden på MRS resultatene, mens på YM øker celletallet fra dag 4 til dag 7. Dette er forventet da *B. bruxellensis* vil fortsette å metabolisere de gjenværende dekstrinene etter hovedfermenteringen er over og da fortsette å vokse opp mot sin maksimale cellekonsentrasjon på grunn av langsommere vekst. *B. bruxellensis* har en høyere maksimal cellekonsentrasjonen enn de andre prøvene slik at celletallet kan gå høyere enn maks celletall under hovedfermenteringen (Harris et al., 2008). Ettersom prøven med ren US-05 hadde en mer effektiv fermentering utfra sukkerinnholdanalysen forventes det også en raskere nedgang i celletall for denne prøven, noe som ble observert.

Det ble platet ut på RB agar i tillegg til YM agar selv om begge er gjær selektive medier. Grunnen til bruk av begge mediene er at de har to forskjellige måter å selektere for gjær på. YM agar selekter ved at den har lav pH, mens RB selekterer ved både senket pH ved tilsetning av laktat og i tillegg har kloramfenikol tilstede som har antibakterielle egenskaper (Legemiddelhandboka, 2016). Tidligere forsøk har vist at *B. bruxellensis* ikke vokste på RB agar (Kvam, 2017). RB agar skulle da kun vise celledtall for *S. cerevisiae*. For prøvene uten *B. bruxellensis* observeres det like trender på RB agar som på YM agar, noe som er forventet. For prøven med US-05 og *B. bruxellensis* øker celledtallet i mye mindre grad utfra resultatene fra RB agar enn fra YM agar. Prøven har også lavere celledtall ved dag 2 sammenlignet med de andre US-05 prøvene på RB agar. Dette tyder på at US-05 har brukt lengre tid på å vokse med *B. bruxellensis* til stede og at store deler av cellene i prøven ved dag 2 på YM agar er *S. cerevisiae*. Denne forskjellen kommer ikke frem i °Plato målingene da *B. bruxellensis* sannsynligvis har metabolisert sukkeret like raskt som US-05 i de andre prøvene.

5.1.3 pH analyse

pH resultatene skiller prøvene USL og USLB seg ut som de eneste prøvene med pH under 4. Etter 7 dagers fermentering ble pH målt til henholdsvis 3,63 og 3,86 i USL og USLB. At disse prøvene har lav pH er som forventet da de er tilsatt *Lb. brevis* som er en heterofermentativ melkesyrebakterie som danner laktat og kan danne acetat aerobt. Dette gir lav pH som i for eksempel surøl. (Tonsmeire, 2014) Samme lave pH var forventet i kveik prøvene tilsatt *Lb. brevis* (SVL og SVLB), men disse prøvene har begge pH over 4. Slutt pH var etter 7 dagers fermentering henholdsvis 4,25 og 4,16 i SVL og SVLB. Dette kan være grunnet at kveiken har fermentert så hurtig at MSB ikke har fått tilpasset seg forholdene og økt i celledtall før etanol dannelse og senket pH fra kveik metabolismen har gitt ugunstige forhold for MSB. Dette kan enten ha ført til hemming av MSB som ville ført til videre nedgang av pH under 4 om forsøket hadde gått over lengre tid. Eller så kan stresset ha ført til at MSB har blitt drept og vi ville ikke observert ytterligere nedgang i pH uavhengig av lengden på forsøket. Ved bruk av en kommersiell MSB stamme som er mindre robust enn *Lb. brevis* BS046 er det høy sannsynlighet for at stresset ville ført til ingen videre reduksjon i pH. Prøven med *B. bruxellensis* (SVLB) har noe lavere pH enn de andre kveik prøvene, noe som kan skyldes acetat produksjon av *B. bruxellensis* enten aerobt gjennom etanolomdanning ved hjelp av

alkohol dehydrogenase eller anaerobt senere da vørter er et nitrogenrikt medie som kan føre til acetat dannelse anaerobt (Steensels et al., 2015). En alternativ forklaring er at den økte konkurransen ved tilsetning av en annen type gjær som *B. bruxellensis* har hemmet kveiken slik at MSB har fått muligheten til å metabolisere mer substrat og da danne mer laktat. HPLC analysen viser noe mer laktat i denne prøven (SVLB) sammenlignet med kun kveik og *Lb. brevis* (SVL) Selv om det ofte er mange forskjellige mikroorganismer i kveik kulturer er det kun funnet gjær av typen *S. cerevisiae* i Sigmund Voss kveik (Krogerus, 2019; Preiss et al., 2018). Det er da en mulighet at denne kveiken ikke har mekanismer for å utkonkurrere andre gjærtyper i like stor grad som utkonkurrering eller sameksistens med MSB som ofte finnes i kveik kulturene (Aasen, 2020; Preiss et al., 2018).

5.1.4 HPLC analyse

5.1.4.1 Karbohydrat innhold

Karbohydrat resultatene fra HPLC analysen viser at alle kveik prøvene (SV, SVL, SVLB) og ren US-05 (US) har metabolisert alt av maltose, noe som tyder på en fullstendig fermentering. Blandingskulturene med US-05 (USL, USLB) har enda maltose gjenværende i prøvene ved dag 7, henholdsvis 10000 ppm og 5726 ppm i US og USLB, som vil si at disse prøvene ikke har fermentert full ut slik som også antatt i kapittel 5.1.1 ved tolking av sukkerinnhold. Det er små mengder fruktose igjen i prøvene som går imot teorien at gjær ønsker å benytte seg av enklere karbohydrater før de mer komplekse, men verdien er såpass lave at gjærcellene har mest sannsynlig merket de lave mengdene enkle karbohydrater og da gått over til å fermentere maltose før fruktosen var blitt fullstendig metabolisert. Glukose metaboliseres lettere enn fruktose da fruktosemetabolisme krever aktivitet av invertase enzymet som forklarer hvorfor glukose er fullstendig metabolisert men ikke fruktose (Doyle et al., 2007).

5.1.4.2 Organiske syrer

De organiske syrene sitrat, ravsyre, laktat og acetat ble analysert ved HPLC analyse. pH analyse resultatene bekreftes videre i denne analysen ettersom man ser mye større mengder organiske syrer i prøvene med US-05 og *Lb. brevis* (USL+USLB) som hadde pH under 4 enn i prøvene med kveik og *Lb. brevis* (SVL+SVLB) som hadde pH over 4.

Alle prøvene med *Lb. brevis* har fullstendig omsatt sitrat som stemmer godt overens med teorien om sitrat omsetning hos heterofermentative MSB (Vinderola et al., 2019). SVL, USL og USLB har også dannet ravsyre som også stemmer overens med denne teorien. SVLB har ikke ravsyre tilstede selv etter at sitrat syre er metabolisert. Det er mulig at ravsyren har blitt metabolisert av enten *B. bruxellensis* eller kveiken gjennom en ukjent mekanisme.

I alle prøvene med *Lb. brevis* sees omsetning av sitrat. Alle prøvene utenom SVLB sees også dannelse av ravsyre. Syntese av ravsyre fra sitrat er forventet av heterofermentative MSB slik som *Lb. brevis* (Vinderola et al., 2019). Ut ifra dette hadde vi også forventet ravsyre syntese i SVLB prøven, der er mulig at sitrat kan ha blitt omdannet til diacetyl. De høye verdiene av diacetyl fra HSGC analysen i nullprøven gjør at vi ikke kan observere om dette har skjedd (Comasio et al., 2019).

Prøvene SV og US har ikke laktat tilstede slik som forventet da ingen MSB er tilstede i prøvene til å danne laktat (Von Wright & Axelsson, 2011). Prøvene med US-05 og *Lb. brevis* (USL og USLB) har høyere verdier for både acetat og spesielt laktat sammenlignet med tilsvarende prøver med kveik (SVL og SVLB). Dette stemmer overens med pH resultatene som tydet på mindre aktivitet av *Lb. brevis* i kveik prøvene (kapitel 5.1.3). Det at det er blitt dannet noe laktat i disse prøvene kan tyde mer på hemming av *Lb. brevis* i prøvene og ikke at stresset har drept *Lb. brevis* cellene.

US-05 prøven med *B. bruxellensis* har veldig store standardavvik for laktat. HSGC-FID analysen gir også store standardavvik for denne prøven for flere av de flyktige komponentene. Under mikroskopering av starterkulturen før inokulering ble det observert at *B. bruxellensis* kulturen hadde store variasjoner i morfologiske egenskaper. Ved en av forsøksdagene var de fleste *B. bruxellensis* cellene i anamorf stadiet da aseksuelle formering ved knoppsskyting ble observert, mens de to andre dagene ble det observert sporedannelse som tyder på at kulturen

hadde gått over til telomorfi stadiet (Steensels et al., 2015). Dette kan ha gitt de store variasjonene i resultatene for denne prøven. Flere ompodinger og kortere inkubasjonstid av kulturen før inokulering av prøvene ville mest sannsynlig gitt sikrere resultater.

Gjærkulturen US-05 er den eneste prøven uten acetat til stede i noen av målingene. Dette tyder på at Sigmund Voss kveik produserer acetat. Prøvene med US-05 og *Lb. brevis* har også alle acetat til stede ved dag 7, dette kan skyldes en av to grunner. Enten at det er *Lb. brevis* som produserer acetat eller at US-05 produserer acetat under forhold med konkurranse fra andre mikroorganismer. Produksjon av acetat ved økt stress er blitt vist i flere arter av *S. cerevisiae* (Erasmus, 2005), men at det er *Lb. brevis* som produserer acetat er mest sannsynlig da *Lb. brevis* BS046 er tidligere vist til å produsere 400 ppm acetat inokulert alene i vørter (Dysvik et al., 2020). Dette er som forventet da *Lb. brevis* er en heterofermentativ melkesyrebakterie som kan danne acetat (Ibrahim og Ouwehand, 2019). Det er høyere acetat verdier i prøvene med *B. bruxellensis* (USLB), og dette stemmer overens med teorien i Steensels et al. (2015) som sier at *Brettanomyces* spp. danner acetat i aerobe forhold og anaerobt ved høyt innhold av nitrat.

5.1.5 Høyere alkoholer

For flere av aromakomponentene som ble analysert var det ingen av prøvene som oversteg terskelverdiene, men ettersom terskelverdier blir satt når kun det ene aromastoffet er til stede er resultatene fortsatt diskutert. Når flere aromakomponenter er tilstede kan additive effekter inntre slik at den sensoriske profilen til ølet påvirkes uten at komponentene enkeltvis overstiger terskelverdien.

For alle de høyere alkoholene observeres det at de kun dannes i starten av fermenteringen. Selv om synteseveien av høyere alkoholer er kjent er det lite forskning på hva som regulerer syntesen av høyere alkoholer.

Prøven med kun US-05 skiller seg ut med klart høyere verdier for alle de høyere alkoholene spesielt 3-metyl-1-butanol og 2-metyl-1-propanol. Økt temperatur skal ifølge Willaert (2012) gi økte mengder høyere alkoholer som da stemmer med resultatene her siden 30°C ble benyttet som er mye høyere enn det anbefalte temperatur området for US-05 som er 15-24 °C

(Bryggselev.no, 2020). De lave verdiene for alle kveik prøvene støttet opp antagelsen om at aromaprofilen til kveik ikke påvirkes negativt av høyere temperaturer (Garshol, 2016; Preiss et al., 2018). De lavere verdiene for blandingskulturene med US-05 kan skyldes at US-05 gjærcellene har blitt hemmet av konkurransen med *Lb. brevis* og *B. bruxellensis* slik som diskutert tidligere og da motvirket effekten av økt temperatur på cellevekst slik at det ikke er blitt produsert like store mengder av høyere alkoholer i disse prøvene. US-05 prøven med *B. bruxellensis* har store standardavvik for 3-methyl-1-butanol og 2-methyl-1-butanol antageligvis grunnet variasjoner i starterkulturen som beskrevet i kapittel 5.1.2. Alle verdiene for høyere alkoholer er innenfor vanlig konsentrasjon i øl (tabell 2.3).

5.1.6 Estere

For flere av esterene var det store standardavvik hos mange av prøvene, spesielt prøvene med *B. bruxellensis*. Flere av standardavvikene ville vært enda større om ikke et av gjentakene hadde blitt fjernet fra utregningene (vedlegg 7). Dette gjør at variasjonene mellom prøvene mest sannsynlig ikke hadde vært signifikante dersom statistiske analyser hadde blitt gjennomført.

For esteren isoamyl acetat skiller blandingskulturene med US-05 og *Lb. brevis* (USL, USLB) seg ut med lavere verdier sammenlignet med kveik prøvene (SV, SVL, SVLB) og US-05 alene. Kveik er kjent for særegen og fruktig aroma (Garshol, 2016) og ut fra dette er det naturlig å anta at kveik produserer mer estere. I dette forsøket ble det derimot ikke observert en klar sammenheng mellom gjærtypen brukt til hoved- fermenteringen og produksjonen av estere. For isoamyl acetat hadde prøvene med rask nedgang i sukkerinnhold også et høyt innhold av esteren uavhengig av gjærtype. Dette stemmer overens med teorien om at økt cellevekst fører til økt ester produksjon (Willaert, 2012). For etylacetat, etyl octanoate og etyl hexanoate ser man ingen store forskjeller mellom kveik prøvene (SV, SVL, SVLB) og US-05 prøvene (US, USL, USLB). Dette stemmer ikke overens med antagelsen om at kveik produserer mer fruktige aromaer enn kommersiell ølgjær som US-05 (Garshol, 2016). Selv om kveik er kjent for sin fruktige aroma er det ikke gjort mye forskning som sammenligner ester dannelse av kveik mot kommersiell ølgjær (Preiss et al., 2018). En tidligere masteroppgave av Aasen i 2020 analyserte ester dannelse hos 3 andre kveik typer som viste

noe høyere dannelse av disse esterene sammenlignet med US-05 ved 30°C. Dette kan tyde på at høyere dannelse av estere ikke er et kjennetegn for alle kveik typer.

Prøvene med *B. bruxellensis* (SVLB+USLB) og US-05 alene skiller seg ut med en nedgang i isoamyl acetat fra dag 4 til dag 7. Dette er forventet da prøver med *B. bruxellensis*, ettersom flere stammer av *Brettanomyces* er vist til å ha esterase aktivitet mot flere estere blant annet isoamyl acetat. Den samme nedgangen er ikke forventet i prøven med ren US-05 da *S. cerevisiae* ikke er vist til å ha esterase aktivitet (MilkTheFunk, u.å.; Spaepen & Verachtert, 1982). Nedgangen i isoamyl acetat i prøven med kun US-05 kan skyldes en kombinasjon av feilkilder som gir et for høyt resultat ved dag 4. Det veldig store standardavviket for denne prøven ved dag 4 støtter denne antakelsen.

Prøvene med *B. bruxellensis* har begge høyere verdier sammenlignet med de andre prøvene. *Brettanomyces* produserer etylacetat, etyl octonoate og etyl hexanoate som en av sine sekundære metabolitter (MilkTheFunk, u.å.) så resultatene er som forventet, og tyder også på at *B. bruxellensis* har vært aktiv i begge prøvene (SVLB, USLB). Prøven med *B. bruxellensis* og kveik (SVLB) har tydelig nedgang i esteren etyl octonoate grunnet esterase aktivitet fra dag 4 til dag 7, men det samme observeres ikke hos US-05 med *B. bruxellensis* (USLB). En mulig forklaring på dette er at den raske veksten av kveiken i prøven har brukt opp store deler av fettsyrene og oksygenet i mediet som er nødvendige for fettsyresyntese og cellevekst før *B. bruxellensis* cellene har hatt mulighet til å komme ut av log fasen. Gjennom esterase aktivitet kan fettsyrer frigjøres igjen og utnyttes av *B. bruxellensis* til cellevekst (Campbell, 2003; Doyle et al., 2007; Spaepen & Verachtert, 1982). °Plato målingene og HPLC resultater har vist at US-05 gjæren ikke har fermentert like raskt som kveiken, og dette kan ha gitt *B. bruxellensis* tid til å komme ut av log fasen før fettsyrene og oksygenet er brukt opp. YM celletall resultatene styrker denne antakelsen da det observeres en økning i kde/mL ved dag 7 i US-05 prøven med *B. bruxellensis* (USLB), men ikke hos kveik prøven med *B. bruxellensis* (SVLB) som tyder på større vekst av *B. bruxellensis* i USLB prøven.

5.1.7 Diacetyl

Diacetyl resultatene viser at det er diacetyl til stede i alle nullprøvene over terskelverdien. Dette er ikke forventet da diacetyl er en aromakomponent som blir produsert av gjærcellene under fermentering med oksygen til stede (Pires & Brányik, 2015a). Diacetyl i vørteren kan komme fra starterkulturen som ble tilsatt. Under inkubering av starterkulturene til US-05 og Sigmund Voss kveik var oksygen tilgjengelig hele tiden slik at større mengder diacetyl kan ha blitt dannet. Men ettersom kun små volumer med starterkultur er tilsatt hadde dette krevd veldig høye konsentrasjoner i starterkulturen for å gi så store verdier i nullprøvene. En annen forklaring er at det er et annet stoff med samme retensjonstid gjennom den stasjonære fasen i HSGC analysen som ble identifisert som diacetyl. Mengden med komponenten reduseres gjennom fermenteringen, noe som er forventet for diacetyl (Pires & Brányik, 2015b). Alle prøvene med Sigmund Voss kveik prøvene (SV, SVL, SVLB) har null diacetyl allerede ved dag 4, mens prøvene med US-05 (US, USL, USLB) har alle verdier fortsatt over terskelverdien ved dag 7. Dette tyder på at Sigmund Voss kveik hadde bedre evne til å reabsorbere diacetyl og redusere dette til 2,3 butandiol enn US-05 dersom det var diacetyl som var tilstede i nullprøvene.

5.1.8 Acetaldehyd

Prøvene med Sigmund Voss kveik og ikke *B. bruxellensis* (SV, SVL) har acetaldehyd verdier som er høyere enn terskelverdien og normal konsentrasjon i øl (tabell 2.3). Dette vil kunne gi uønsket grønn smak i ølet. Gjær som flokkulerer raskt og tidlig kan ha høye nivåer av acetaldehyd da gjærcellene må være suspendert i medie for at alkohol dehydrogenasen skal kunne omdanne acetaldehyd til etanol effektivt (Willaert, 2012). Kveik gjær er vist til å kjennetegnes av rask og kraftig flokkulering (Garshol, 2016; Preiss et al., 2018). Prøven med Sigmund Voss kveik og *B. bruxellensis* (SVLB) har ikke like høye verdier for acetaldehyd. Studier av *B. bruxellensis* har vist at den produserer alkohol dehydrogenase under noen forhold (Carmona et al., 2016). Gjæren *B. bruxellensis* WLP 650 (White Labs) har lav flokkulering (Bryggselv.no, u.å.) slik at cellene var mest sannsynlig er suspendert i mediet gjennom hele forsøket og kan da ha omsatt acetaldehyd til etanol.

5.2 Bryggeforsøk

Nesten samtlige av ølene produsert hadde en tykk og slimete konsistens, kalt «ropiness» på engelsk. Dette tyder på en infeksjon av en EPS produserende bakterie. (Shimwell, 1947).

Infeksjonen gjør at resultatene fra forsøket blir vanskelige å diskutere og ingen konklusjoner kan bli trukket uten gjentak av hele forsøket, noe det ikke var tid til i denne masteroppgaven.

Infeksjonen gjorde også at HSGC og HPLC analyser av bryggeforsøket ble droppet.

Resultatene kan uansett gi oss noen indikasjoner på trender og kan sammenlignes med småskala forsøket der det ble arbeidet sterilt slik at ingen infeksjon forekom.

Alle gjentak fra bryggedag 5 ble fjernet fra forsøket da det ble brukt en større mengde korn under denne bryggedagen, noe som førte til lavere temperatur inne i meskekaret og da endret enzymaktivitet. Dette førte igjen til stor variasjon i prøvene med denne vørteren.

Sukkerinnholdet sank mye raskere for prøvene fra bryggedag 5. Ved lavere mesketemperatur er dette forventet da det dannes større andeler enkle karbohydrater som krever mindre tid å fermentere, samtidig som eventuell «maltose lag» vill kommer senere i fermenteringen.

(Hazell & Attfield, 1999; Palmer, 2006)

5.2.1 Sukkerinnhold analyse

I sukkerinnhold analysen er det en prøve som skiller seg sterkt ut og det er USLB prøven som har en mye saktere nedgang i °Plato sammenlignet med de andre prøvene. Forskjellige forhold og forskjellig behandling av vørter gjør at man ikke direkte kan sammenligne brygge forsøket og småskala forsøket, men at USLB prøven har saktere karbohydratmetabolisme enn kveik prøvene i begge forsøkene styrker hypotesen om at US-05 har lavere fermenteringsrate når andre mikroorganismer er til stede. Prøven med kun US-05 og MSB hadde i småskala forsøket også en saktere karbohydrat metabolismene enn kveik, men i brygge forsøket fermenterte samme prøve like raskt som ren US-05 og kveik prøvene. Dette kan skyldes at forholdene i brygge forsøket enten hemmet *Lb. brevis* eller fremmet vekst av US-05 i større grad slik at US-05 ikke ble påvirket av tilstedeværelsen av melkesyrebakteriene når *B. bruxellensis* ikke var tilstede.

5.2.2 pH analyse

pH analysen i bryggeforsøket ga en prøve (SV) som skilte seg ut med en høyere pH enn alle de andre prøvene. Det var forventet at denne prøven skulle ha en høyere pH enn alle de andre prøvene da alle de andre prøvene utenom ren Gausemel kveik og Sigmund Voss kveik ble tilsatt *Lb. brevis* som danner organiske syrer. Gausemel ble forventet å få lavere pH da Gausemel kulturen er vist til å inneholde flere ukjente bakterier blant annet *Lactobacillus plantarum* og *Acetobacter malorum* som begge også produserer organiske syrer (Aasen, 2020; Garshol, 2020). I småskala forsøket hadde også blandingskulturene med Sigmund Voss kveik høyere pH over 4.0 ved dag 7, men i brygge forsøket var de samme prøvene ved ca. pH 3,7 allerede ved dag 4. De forskjellige forholdene kan ha hemmet Sigmund Voss kveiken slik at *Lb. brevis* kan ha vokst frem og produsert laktat og acetat som har senket pH. Det er også en mulighet at det er den ukjente forurensingen som har senket pH.

5.2.3. Alkoholinnhold og farge

Prøvene med gjær og *Lb. brevis* (GML, SVL, USL) har litt lavere alkohol verdier enn de andre prøvene. Dette er som forventet ettersom *Lb. brevis* bruker opp noe av karbohydratene til sin heterofermentative metabolisme og ikke danner like mye etanol per mol glukose som gjær cellene gjør gjennom EMP (Doyle et al., 2007). De høyere verdiene for USLB og SVLB prøvene er også som forventet da *Brettanomyces* omdanner dekstriner til etanol. Dekstrinene blir ikke omdannet av de andre mikroorganismer og gir da økt etanol innhold prøvene. Det var også forventet det samme i prøven med Gausemel kveik og *Brettanomyces* (GMLB), men det er mulig at en eller flere av de ukjente organismene i Gausemel kulturen har hemmet vekst av *B. bruxellensis* eller metabolisert opp dekstrinene før *B. bruxellensis*. De ukjente organismene kan også ha metabolisert noe av de enklere karbohydratene uten å danne etanol.

For alle prøvene utenom US-05 med *Lb. brevis* observeres det en motsatt proporsjonalitet mellom alkohol og fargeverdiene. Fargen i ølet kommer hovedsakelig fra to komponenter fra maltet: Melanoidiner fra Maillard reaksjoner (Wang et al., 2011) og karamelliseringskomponenter (Golon & Kuhnert, 2012). *Brettanomyces* er vist til å kunne bryte ned mer komplekse karbohydrater enn flere av de som dannes under karamellisering, noe som kan forklare hvorfor SVLB og USLB prøvene med *B. bruxellensis* har lavere fargeverdier.

(Crauwels et al., 2016; Golon & Kuhnert, 2012). Denne antagelsen forklarer ikke forskjellen mellom de andre prøvene eller at GMLB hadde høy fargeverdi. En mulighet er nedbrytning av farge komponenten melanoidin under fermentering. Gjær med mangan peroksidase aktivitet er vist til å bryte ned melanoidiner men om *S. cerevisiae* har denne egenskapen er det ikke gjort forskning på i stor grad (Mahgoub et al., 2016). En tredje faktor kan være at uklarhet i ølet påvirker fargeavlesningen til instrumentet. Tidligere forsøk gjort med instrumentet til analysen har vist at uklarhet kan påvirke fargeverdi resultatene. En forklaring på denne observasjonen er at økt alkoholinnhold vil gi økt klaret i ølet ved denaturering og utfelling av proteiner (Booth, 1930) som potensielt kan ha påvirket analysen.

5.2.4 Sensorisk analyse

Det ble observert høy viskositet og lite dannelse av CO₂ i mesteparten av flaskene som ble sensorisk analysert. De få flaskene som hadde lavere viskositet hadde ingen sammenheng med hvilke mikroorganismer som var tilsatt. Dette tyder på en infeksjon av en EPS produserende bakterie. Den høye viskositeten kan også ha ført til at lite CO₂ ble dannet i ølet ved å forhindre bevegelse av gjær cellene samtidig som CO₂ som var blitt dannet ble fanget i væsken og da gir en mindre sensorisk opplevelse av CO₂. US-05 med *B. Bruxellensis* (USLB) hadde gjennomsnittlig lavere viskositet enn all de andre prøvene. Ettersom denne prøven også gjæret saktere enn alle de andre prøvene er det mulig at den ukjente bakterien ikke enda hadde dannet like mye EPS grunnet hemming av aktiv vekst av *S. cerevisiae* og *Lb. brevis*. En alternativ forklaring er at *B. bruxellensis* var i mer aktiv vekst i denne prøven på grunn av den treigere fermenteringen slik at den mer effektivt klarte å bryte ned EPS dekstrinene dannet av den ukjente kontaminanten. (Sakamoto & Konings, 2003) Det høye celledetallet på YM agar for USLB prøven i små skala forsøket støtter denne forklaringen.

5.2.5 Reologiske egenskaper

Viskositetsverdier for øl ligger vanligvis mellom 1,45 og 1,96 cP. (Briggs et al., 2004). Alle prøvene som ble analysert i denne oppgaven var over disse verdiene. Det var stor variasjon i hvor høye resultatene var, både mellom gjentakene og mellom øl typene. Noen av prøvene lå mellom 2 og 5 cP, mens andre var over 20 cP. De høye verdiene i flere av prøvene styrker

antakelsen om produksjon av EPS som har ført til den økte viskositeten i prøvene. Om det var en av de tilsatte mikroorganismene som var ansvarlig for dannelse av EPS ville man ikke sett så store variasjoner mellom gjentakene. Man hadde heller ikke sett så høye verdier i både prøver med forskjellige typer *S. cerevisiae* og med og uten *Lb. brevis* / *B. bruxellensis*. Om en av de tilsatte mikroorganismene hadde dannet EPS ville man sett at prøvene med den EPS produserende organismen hadde skilt seg sterkt ut fra de andre. Utplating på agar og mikroskopering bekreftet at det var en stav-formet bakterie til stede i en av prøvene som bare skulle inneholde gjær. Som bekrefter mistanken om en kontaminasjon. Prøvene med høy viskositet var skjærtynnende som vil si at viskositeten minsket med økt skjærhastighet. EPS fra andre bakterier er også vist til å ha denne egenskapen (Tuinier et al., 1999).

6 Konklusjon, oppsummering og videre arbeid

Oppsummering og Konklusjon

I dette forsøket ble det utført både småkalavekstforsøk og bryggeforsøk for å undersøke egenskapene til kveik under kofermentering med *Lb. brevis* BS046 og *B. bruxellensis*. Resultatene ble sammenlignet med tilsvarende prøver med kommersiell ølgjær (US-05) istedenfor kveik (Sigmund Voss + Gausemel).

I småskala forsøket ble det observert saktere fermentering hos blandingskulturprøvene med US-05 sammenlignet med alle de andre prøvene. Denne trenden ble observert både ved sukkerinnhold, HPLC- og celletall-analyser. Ren US-05 og Sigmund Voss kveik fermenterte tilnærmet like raskt ved 30°C. I prøvene med Sigmund Voss kveik og *Lb. brevis* ble MSB utkonkurrert av den raske veksten til kveiken, slik at slutt pH etter 7 dager var ca. 4,1-4,3. Denne verdien er ikke lavt nok til å klassifisere ølet som surøl, som skal ha pH under 4,0 tilsvarende prøver med US-05 hadde pH 3,6-3,9. HPLC resultatene bekreftet dette med lavere mengder laktat i prøvene med Sigmund Voss kveik og *Lb. brevis* enn prøvene med US-05 og *Lb. brevis*. Sitrat ble omdannet i alle disse prøvene som tyder på aktivitet av MSB. Både Sigmund Voss kveik og *Lb. brevis* ble vist til å danne acetat.

Celletallanalysene for Sigmund Voss kveik viste ingen nedgang i celletall. US-05 viste i motsetning en nedgang i celletall allerede ved dag 4. Dette kan tyde på bedre levedyktighet hos kveik som kan vær en av årsakene til de særegne egenskapene til kveik. Det høye og

sammenfallende celletallet på agarene benyttet gjennom hele forsøket gjorde det vanskelig å tyde celletall for de ulikemikroorganismene da kveik celletallene overskygget eventuelle forandringer i celletall hos *B. bruxellensis* og *Lb. brevis*. Dette kunne blitt unngått med bruk agar med høyere selektivitet.

HSGC resultatene viste verdier over terskelverdien for den høyere alkoholen 3-metyl-1-butanol hos ren US-05 prøven. Høyere alkoholer er en uønsket aromakomponent i større mengder, som vill si at US-05 kan danne usmak under fermentering ved 30°C. Sigmund Voss kveik dannet acetaldehyd over terskelverdien i prøvene uten *B. bruxellensis*. Acetaldehyd er også ansett som en uønsket aromakomponent. Når *B. bruxellensis* var til stede oversteg acetaldehyd ikke terskelverdien. Dette kan da være en positiv effekt ved å kofermentere *B. bruxellensis* sammen med Sigmund Voss kveik.

For esterne isoamyl acetat, etylacetat, etyl octonoate og etyl hexanoate var det ingen store forskjeller mellom US-05 og Sigmund Voss kveik. For isoamyl acetat så vi lavere verdier for prøvene med US-05 og *Lb. brevis* som hadde saktere nedgang i sukkerinnhold enn de andre prøvene. Dette tyder på at fermenteringshastigheten påvirker ester dannelsen i større grad en gjærtype. Begge prøvene med *B. bruxellensis* hadde økte verdier for etylacetat og etyl octonoat, og esterase aktivitet. Store standardavvik og analysering over for kort tid i forhold til fermenteringshastigheten til *B. Bruxellensis* gjør at ingen konklusjoner kan bli tatt om bruk av kveik fører til raskere *B. Bruxellensis* fermentering.

Det ble målt høye verdier for et stoff med retensjonstiden til diacetyl i alle nullprøvene. Sigmund Voss kveik prøvene hadde metabolisert alt av denne komponenten på under 48 timer, mens US-05 fortsatt ikke hadde redusert verdiene til under terskelverdien innen dag 7. Dette kan være enda et positiv aspekt ved å bruke Sigmund Voss kveik fremfor tradisjonell ølgjær som US-05 da kveiken viser evnen til å fjerne diacetyl raskere som er en uønsket komponent.

I brygge forsøket ble økt viskositet funnet i flere av gjentakene, som tyder på en infeksjon av en EPS produserende bakterie. Dette gjør at ingen konklusjoner kan tas ut fra resultatene da den kjente bakterien kan ha påvirket resultatene. Saktere fermentering i prøven med US-05, *Lb. brevis* og *B. bruxellensis* styrker hypotesen om at kveik kan brukes i blandet fermentering av surøl for å redusere fermenteringstiden sammenlignet med tradisjonell spontanfermentert

surøl. Analysene av alkoholprosent og farge ga resultat som viste en motsatt proporsjonalitet mellom disse to verdiene. Dette kan muligens skyldes enten metabolisering av fargekomponenter eller utfelling av proteiner.

Konklusjonen med studien er at kveiks evne til å fermentere ved høye temperaturer uten å danne høyere alkoholer, den lave dannelsen av acetaldehyd sammen med *B. bruxellensis* og hurtig nedbrytning av diacetyl gir positive indikasjoner på muligheten for bruk av kveik i kofermentering av surøl. På grunn av infeksjon i bryggeforsøket og for kort fermenteringstid i småskalaforsøket må videre forskning til før en konklusjon kan bli tatt om kveik kan produsere et surøl med høy aromakompleksitet på kort tid.

Videre arbeid

På grunn av infeksjonen i brygge forsøket og de positive resultatene fra småskalaforsøket burde hele brygge forsøket blitt gjentatt med økt fokus på hygiene og desinfeksjon av alt utstyr. Ved et vellykket forsøk uten infeksjon ville en sensorisk analyse av ølet sammen med både HPLC- og HSGC-analyse kunne gi interessante resultater om hvorvidt kveik er egnet til å produsere et komplekst surøl på kortere tid enn tradisjonell gjær. I dette forsøket ville det også vært nyttig med en referanse surøl fermentert med US-05 på 18-22°C.

Et nytt småskalaforsøk over lengre tid ville også vært nyttig for å observere om eller hvor lang tid MSB ville brukt på å vokse opp og senke pH i kveik prøvene. For celletall -analyser er bruk av cycloheximide i MRS agaren å anbefale for å kunne lese av MSB celletall i kveikprøvene. Det burde også blitt undersøkt vekst og metabolisme (pH og °Plato målinger og utplatinger) i vørter av renkulturer med *Lb. brevis* og *Brettanomyces*.

Et forsøk med bruk av forskjellige inokuleringsmengder av MSB i forhold til kveik ville også vært interessant for å undersøke om dette kan motvirke dominansen til kveiken som ble observert i småskala forsøket. Dette ville også vært en mulighet og prefermentert vørteren i kort tid (et par timer) med MSB for å sikre at bakteriene var ute av lagfasen før gjærcellene ble tilsatt får å se om det kan føre til raskere syring av ølet.

I alle videre forsøk med bruk av *B. bruxellensis* burde kulturen podes om hyppigere enn hver 7 dag for å forhindre at cellene går over til telomorfe form. Eventuelt burde en frysestock lages av gjærkulturene slik som gjort for *Lb. brevis* slik at inokulum blir identisk i hver gang.

7 Referanser

- Aasen, N. M. (2020). Growth, metabolism and beer brewing with kveik, Masteroppgave Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Baldus, M., Klie, R., Biermann, M., Kreuzschner, P., Hutzler, M. & Methner, F.-J. (2018). On the behaviour of dimethyl sulfoxide in the brewing process and its role as dimethyl sulfide precursor in beer. *BrewingScience*, 71. doi: 10.23763/BrSc18-01baldus.
- Barnett, J. A. & Entian, K. D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism 1. *Yeast*, 22 (11): 835-894.
- Baxter, E. D. & Hughes, P. S. (2001). Flavour determinants of beer quality. I: *Beer*, s. 40-73.
- Booth, N. (1930). The denaturation of proteins: Denaturation in the presence of alcohol. *The Biochemical journal*, 24 (6): 1699-1705. doi: 10.1042/bj0241699.
- Bordenave, G. (2003). Louis Pasteur (1822–1895). Microbes and infection, 5(6), 553-560.
- Bossaert, S., Crauwels, S., De Rouck, G. & Lievens, B. (2019). The power of sour-a review: old traditions, new opportunities. *BrewingScience*, 72 (3-4): 78-88.
- Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. & Boulton, C. (2004). *Brewing: science and practice*: Elsevier.
- Bryggselv.no. (2020). Safale US-05 11,5g
- Bryggselv.no. (2020). Tørrgjær til ølbrygging. Tilgjengelig fra: <https://www.bryggselv.no/fermentis/210005/safale-us-05-11-5g-t%c3%b8rrgj%c3%a6r-til-%c3%b8lbrygging> (lest 27.12.2020).
- Bryggselv.no. (u.å.). WLP650 Brett. *bruxellensis* vill- gjær til ølbrygging Tilgjengelig fra: <https://www.bryggselv.no/white-labs/101948/wlp650-brettbruxellensis-vill-gj%c3%a6r-til-%c3%b8lbrygging> (lest 07.12.2020).
- Bullerman, L. B. (2003). Spoilage | fungi in food – An Overview. I: Caballero, B. (red.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, s. 5511-5522. Oxford: Academic Press.
- Campbell, I. (2003). Brewing Microbiology. I: *Brewing Microbiology*: Springer.
- Carmona, L., Varela, J., Godoy, L. & Ganga, M. A. (2016). Comparative proteome analysis of *Brettanomyces bruxellensis* under hydroxycinnamic acid growth. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23: 37-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.005>.
- Comasio, A., Harth, H., Weckx, S. & De Vuyst, L. (2019). The addition of citrate stimulates the production of acetoin and diacetyl by a citrate-positive *Lactobacillus crustorum* strain during wheat sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol*, 289: 88-105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.030.
- Crauwels, S., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Steensels, J., Verreth, C., Bosmans, L., Paulussen, C., Herrera-Malaver, B., de Jonge, R., De Clippeleer, J., et al. (2016). Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *FEMS Yeast Research*, 17 (1). doi: 10.1093/femsyr/fow105.
- Cui, S., Zhao, N., Lu, W., Zhao, F., Zheng, S., Wang, W. & Chen, W. (2019). Effect of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation. *Food Science & Nutrition*, 7 (7): 2214-2223. doi: 10.1002/fsn3.1010.
- Damodaran, S., Parkin, K. L. & Fennema, O. R. (2007). *Fennema's food chemistry*: CRC press.

- De Deken, R. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44 (2): 149-156.
- De Keukeleire, D. & Verzele, M. (1971). The absolute configuration of the isohumulones and the humulinic acids. *Tetrahedron*, 27 (20): 4939-4945. doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)98199-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)98199-2).
- Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C. (2007). Food microbiology: fundamentals and frontiers. 3 utg.: John Wiley & Sons.
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B. & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* species tolerant to brewing-related stress factors for controlled and rapid production of sour beer. *Frontiers in Microbiology*, 11: 279.
- Erasmus, D. J. (2005). Production of acetic acid by *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentations: University of British Columbia.
- European Brewery Convention. (2000). Fermentation and maturation. European Brewery Convention Manual of Good Practice.
- Galafassi, S., Capusoni, C., Moktaduzzaman, M. & Compagno, C. (2013). Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40 (3): 297-303. doi: 10.1007/s10295-012-1229-3.
- Garshol, L. M. (2016). Gårdsøl: Det norske ølet: Cappelen Damm.
- Garshol, L. M. (2020). Farmhouse yeast registry. Tilgjengelig fra: <https://www.garshol.priv.no/download/farmhouse/kveik.html> (lest 29.10.2020).
- Golon, A. & Kuhnert, N. (2012). Unraveling the Chemical Composition of Caramel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (12): 3266-3274. doi: 10.1021/jf204807z.
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21 (9): 601-606.
- Harris, V., Ford, C. M., Jiranek, V. & Grbin, P. R. (2008). *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (6): 997-1006.
- Hazell, B. & Attfield, P. (1999). Enhancement of maltose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae* in medium containing fermentable hexoses. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 22 (6): 627-632. doi: 10.1038/sj.jim.2900672.
- Hill, A. (2015). Brewing microbiology: Managing microbes, ensuring quality and valorising waste: Woodhead Publishing.
- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R. & Thevelein, J. M. (2018). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiology Reviews*, 43 (3): 193-222. doi: 10.1093/femsre/fuy041.
- Hornsey, I. S. (2003). A history of beer and brewing, b. 34: Royal Society of Chemistry.
- Koutsokali, M. & Valahas, M. (2020). Anaerobic and Aerobic Respiration in Yeast: Small-Scale Variations on a Classic Laboratory Activity. *Journal of Chemical Education*, 97 (4): 1041-1047. doi: 10.1021/acs.jchemed.9b00994.
- Krogerus, K. (2019). Solving the Muri mystery. Suregork loves beer, 29.10.2020.
- Kucharczyk, K. & Tuszyński, T. (2017). The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 123 (1): 31-38. doi: 10.1002/jib.392.

- Kvam, G. (2017). Vekst, metabolisme og ølbrygging med melkesyrebakterier og gjær. Masteroppgave. Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Lea, A. G. & Piggott, J. R. (2012). Fermented beverage production: Springer Science & Business Media.
- Legemiddelhandboka. (2016). L1.2.15.5 Kloramfenikol. Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.15.5/Antimikrobielle_midler (lest 27.12.2020).
- Mahgoub, S., Tsiptsias, C. & Samaras, P. (2016). Biodegradation and decolorization of melanoidin solutions by manganese peroxidase yeasts. *Water Science and Technology*, 73 (10): 2436-2445.
- Malowicki, M. G. & Shellhammer, T. H. (2005). Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11): 4434-4439. doi: 10.1021/jf0481296.
- Menoncin, M. & Bonatto, D. (2019). Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 125 (4): 402-411. doi: 10.1002/jib.580.
- MilkTheFunk. (u.å.). *Brettanomyces*. Tilgjengelig fra: http://www.milkthefunk.com/wiki/Brettanomyces#Brettanomyces_Metabolism (lest 07.11.2020).
- Mourão Ferreira, I. & Guido, L. (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A Review. *Fermentation*, 23. doi: 10.3390/fermentation402002.
- Oevelen, D. V., De l'Escaille, F. & Verachtert, H. (1976). Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*, 82 (6): 322-326.
- Palmer, J. J. (2006). How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time: Brewers Publications.
- Pires, E. & Brányik, T. (2015a). Biochemistry of Beer Fermentation. I: *Food Biochemistry and Food Processing*, s. 627-653.
- Pires, E. & Brányik, T. (2015b). Biochemistry of beer fermentation: Springer.
- Preiss, R., Tyrawa, C., Krogerus, K., Garshol, L. M. & Van Der Merwe, G. (2018). Traditional norwegian kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Frontiers in microbiology*, 9: 2137.
- Preiss, R. (2020). Episode 48 – Kveik yeast with Richard Preiss of Escarpment Labs. Wilson, C. (red.). Homebrewing DIY.
- Rasmusson, D. C., Burger, W. C. & LaBerge, D. E. (1985). Malting and Brewing Quality. I: *Barley*, s. 367-401.
- Ringnes. (u.å.). Ølets historie. Tilgjengelig fra: <https://ringnes.no/laer-om-ol/olets-historie/> (lest 29.10.2020).
- Robinson, R. K. (2014). Encyclopedia of food microbiology: Academic press.
- Saerens, S. M., Verstrepn, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R. & Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (7): 4446-4456.
- Sakamoto, K. & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89 (2): 105-124. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3).

- Samaan, R. A. (2017). Dietary fiber for the prevention of cardiovascular disease: Fiber's interaction between gut microflora, sugar metabolism, weight control and cardiovascular health: Academic Press.
- Shimwell, J. (1937). On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic. *Journal of the Institute of Brewing*, 43 (2): 111-118.
- Shimwell, J. (1947). A study of ropiness in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 53 (6): 280-294.
- Siebert, K. J., Carrasco, A. & Lynn, P. Y. (1996). Formation of Protein–Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (8): 1997-2005. doi: 10.1021/jf950716r.
- Simpson, W. & Smith, A. (1992). Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied bacteriology*, 72 (4): 327-334.
- Smith, M. T. (2011). Dekkera van der Walt (1964). I: The Yeasts, s. 373-377: Elsevier.
- Spaepen, M. & Verachtert, H. (1982). Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. *Journal of the Institute of Brewing*, 88 (1): 11-17.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206: 24-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>.
- Stolz, P., Böcker, G., Vogel, R. F. & Hammes, W. P. (1993). Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters*, 109 (2): 237-242.
- Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Ozaki, H., Nishimura, K. & Shindo, K. (2013). Identification and quantification of the oxidation products derived from α -Acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (12): 3121-3130. doi: 10.1021/jf3047187.
- Tonsmeire, M. (2014). American sour beer: Innovative techniques for mixed fermentations: Brewers Publications.
- Tuinier, R., Zoon, P., Stuart, M. A. C., Fler, G. J. & de Kruif, C. G. (1999). Concentration and shear-rate dependence of the viscosity of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers*, 50 (6): 641-646. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199911\)50:6<641::AID-BIP8>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199911)50:6<641::AID-BIP8>3.0.CO;2-D).
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. & Verachtert, H. (1977). Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*, 83 (6): 356-360. doi: 10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x.
- Van Oevelen, D. & Verachtert, H. (1979). Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37 (1): 34-37.
- Verachtert, H. & Iserentant, D. (1995). Properties of belgian acid beers and their microflora.
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M. & Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and environmental microbiology*, 69 (9): 5228-5237.

- Vis, R. B. & Lorenz, K. (1997). β -Glucans: Importance in Brewing and Methods of Analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 30 (4): 331-336. doi: <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0196>.
- Von Wright, A. & Axelsson, L. (2011). Lactic acid bacteria: an introduction. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*, 4: 1-16.
- Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., von Wright, A. (2019). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects.
- Wang, H.-Y., Qian, H. & Yao, W.-R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food chemistry*, 128 (3): 573-584.
- Willaert, R. (2012). Biochemistry of beer fermentation. *Food Biochemistry and Food Processing*: 627-653.
- Yonezawa, T. & Fushiki, T. (2002). Testing for Taste and Flavour of Beer. I, s. 29-45.

8 Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over de forskjellige bryggedagene og brygg.

Tabell 1. Oversikt over de forskjellige bryggedagene og hvilket øl som ble brygget når.

Testbrygg	øl		
Bryggedag 1	SV-1		
	SV-2		
	GM-1	Bryggedag 4	GMLB-2
	GM-2		SVLB-3
Bryggedag 2	SVLB-1	Bryggedag 4	USL-2
	USL-1		SVL-2
	SVL-1		USLB-3
	GML-1	Bryggedag 5	GML-3
	USLB-1		SVL-3
Bryggedag 3	SVLB-2	Bryggedag 5	USL-3
	GMLB-1		GMLB-3
	GML-2		GM-3
	USLB-2		
	SV-3		

* Forkortelser: SV= Sigmund Voss Kveik, SVL= Sigmund Voss Kveik + Lb. brevis, SVLB= Sigmund Voss kveik + Lb. brevis + B. bruxellensis, US= US-05, USL= US-05 + Lb. brevis, USLB= US-05 + Lb. brevis + B. bruxellensis

Vedlegg 2: Omregningstabell

Tabell 2: Omregningstabell fra Brix/ specific gravity til Plato

Brix	Plato	SG	Brix	Plato	SG	Brix	Plato	SG
0.0	0.0000	1.0000	13.4	13.4027	1.0543	26.8	26.7948	1.1140
0.2	0.1970	1.0008	13.6	13.6028	1.0551	27.0	26.9944	1.1150
0.4	0.3970	1.0016	13.8	13.8029	1.0560	27.2	27.1940	1.1159
0.6	0.5970	1.0024	14.0	14.0030	1.0568	27.4	27.3936	1.1168
0.8	0.7970	1.0031	14.2	14.2030	1.0577	27.6	27.5932	1.1178
1.0	0.9970	1.0039	14.4	14.4031	1.0586	27.8	27.7928	1.1187
1.2	1.1970	1.0047	14.6	14.6031	1.0594	28.0	27.9924	1.1197
1.4	1.3971	1.0054	14.8	14.8032	1.0603	28.2	28.1919	1.1206
1.6	1.5971	1.0062	15.0	15.0032	1.0611	28.4	28.3915	1.1216
1.8	1.7971	1.0070	15.2	15.2033	1.0620	28.6	28.5910	1.1225
2.0	1.9972	1.0078	15.4	15.4033	1.0628	28.8	28.7905	1.1235
2.2	2.1972	1.0086	15.6	15.6033	1.0637	29.0	28.9901	1.1244
2.4	2.3973	1.0094	15.8	15.8034	1.0646	29.2	29.1896	1.1254
2.6	2.5973	1.0101	16.0	16.0034	1.0654	29.4	29.3891	1.1263
2.8	2.7974	1.0109	16.2	16.2034	1.0663	29.6	29.5886	1.1273
3.0	2.9975	1.0117	16.4	16.4034	1.0672	29.8	29.7880	1.1282
3.2	3.1975	1.0125	16.6	16.6034	1.0680	30.0	29.9875	1.1292
3.4	3.3976	1.0133	16.8	16.8034	1.0689	30.2	30.1870	1.1302
3.6	3.5977	1.0141	17.0	17.0034	1.0698	30.4	30.3864	1.1311
3.8	3.7977	1.0149	17.2	17.2034	1.0706	30.6	30.5859	1.1321
4.0	3.9978	1.0157	17.4	17.4034	1.0715	30.8	30.7853	1.1330
4.2	4.1979	1.0165	17.6	17.6034	1.0724	31.0	30.9847	1.1340
4.4	4.3980	1.0173	17.8	17.8034	1.0733	31.2	31.1841	1.1350
4.6	4.5981	1.0181	18.0	18.0033	1.0741	31.4	31.3835	1.1359
4.8	4.7982	1.0189	18.2	18.2033	1.0750	31.6	31.5829	1.1369
5.0	4.9983	1.0197	18.4	18.4033	1.0759	31.8	31.7823	1.1379
5.2	5.1984	1.0205	18.6	18.6032	1.0768	32.0	31.9817	1.1389
5.4	5.3985	1.0213	18.8	18.8032	1.0777	32.2	32.1810	1.1398
5.6	5.5986	1.0221	19.0	19.0031	1.0785	32.4	32.3804	1.1408
5.8	5.7987	1.0229	19.2	19.2030	1.0794	32.6	32.5797	1.1418
6.0	5.9988	1.0237	19.4	19.4030	1.0803	32.8	32.7791	1.1428
6.2	6.1989	1.0245	19.6	19.6029	1.0812	33.0	32.9784	1.1437
6.4	6.3990	1.0253	19.8	19.8028	1.0821	33.2	33.1777	1.1447
6.6	6.5991	1.0261	20.0	20.0027	1.0830	33.4	33.3770	1.1457
6.8	6.7992	1.0269	20.2	20.2026	1.0839	33.6	33.5763	1.1467
7.0	6.9994	1.0277	20.4	20.4025	1.0848	33.8	33.7756	1.1477
7.2	7.1995	1.0285	20.6	20.6024	1.0857	34.0	33.9749	1.1487
7.4	7.3996	1.0294	20.8	20.8023	1.0866	34.2	34.1741	1.1497
7.6	7.5997	1.0302	21.0	21.0021	1.0875	34.4	34.3734	1.1507
7.8	7.7998	1.0310	21.2	21.2020	1.0884	34.6	34.5727	1.1516
8.0	7.9999	1.0318	21.4	21.4018	1.0892	34.8	34.7719	1.1526
8.2	8.2000	1.0326	21.6	21.6017	1.0901	35.0	34.9711	1.1536
8.4	8.4002	1.0334	21.8	21.8015	1.0911	35.2	35.1703	1.1546
8.6	8.6003	1.0343	22.0	22.0014	1.0920	35.4	35.3695	1.1556
8.8	8.8004	1.0351	22.2	22.2012	1.0929	35.6	35.5687	1.1566
9.0	9.0005	1.0359	22.4	22.4010	1.0938	35.8	35.7679	1.1576
9.2	9.2006	1.0367	22.6	22.6008	1.0947	36.0	35.9671	1.1586
9.4	9.4007	1.0376	22.8	22.8006	1.0956	36.2	36.1663	1.1596
9.6	9.6009	1.0384	23.0	23.0004	1.0965	36.4	36.3655	1.1606
9.8	9.8011	1.0392	23.2	23.2002	1.0974	36.6	36.5646	1.1617
10.0	10.0011	1.0400	23.4	23.4000	1.0983	36.8	36.7638	1.1627
10.2	10.2012	1.0409	23.6	23.5997	1.0992	37.0	36.9629	1.1637
10.4	10.4013	1.0417	23.8	23.7995	1.1001	37.2	37.1620	1.1647
10.6	10.6014	1.0425	24.0	23.9992	1.1011	37.4	37.3612	1.1657
10.8	10.8015	1.0434	24.2	24.1990	1.1020	37.6	37.5603	1.1667
11.0	11.0016	1.0442	24.4	24.3987	1.1029	37.8	37.7594	1.1677
11.2	11.2017	1.0450	24.6	24.5984	1.1038	38.0	37.9585	1.1688
11.4	11.4018	1.0459	24.8	24.7982	1.1047	38.2	38.1576	1.1698
11.6	11.6019	1.0467	25.0	24.9979	1.1057	38.4	38.3566	1.1708
11.8	11.8020	1.0475	25.2	25.1976	1.1066	38.6	38.5557	1.1718
12.0	12.0021	1.0484	25.4	25.3972	1.1075	38.8	38.7548	1.1728
12.2	12.2022	1.0492	25.6	25.5969	1.1084	39.0	38.9538	1.1739
12.4	12.4023	1.0501	25.8	25.7966	1.1094	39.2	39.1529	1.1749
12.6	12.6024	1.0509	26.0	25.9963	1.1103	39.4	39.3519	1.1759
12.8	12.8025	1.0518	26.2	26.1959	1.1112	39.6	39.5509	1.1770
13.0	13.0026	1.0526	26.4	26.3956	1.1122	39.8	39.7500	1.1780
13.2	13.2027	1.0534	26.6	26.5952	1.1131	40.0	39.9490	1.1790

Vedlegg 3: Rådata vekstforsøk småskala

Tabell 3: Rådata til figur 4.1 1 Plato vekstforsøk USLB gjentak 3 er ikke tatt med grunnet stor variasjon i resultater fra de to andre gjentakene

	Dag 0	Dag 2	Dag 4	Dag 7
SVLB	14,1	9	8,2	7,5
	14,5	8,6	8,3	7,9
	14,5	8,4	8,7	7,5
SV	14,8	9,1	8,2	8,1
	14,7	8,8	8,3	8,1
	14,6	8,4	7,9	7,9
SVL	14,6	8,8	8,2	8
	14,4	9	8,3	7,9
	14,6	8,5	7,9	7,8
USL	15	10,8	9,9	9,1
	14,7	11,4	10,2	9
	14,6	11	10	8,9

US	14,6	9,3	8,2	8
	14,6	9,4	7,9	7,9
	14,6	9,8	7,7	7,5
USLB	14,9	11,3	10,7	8,3
	14,5	11	10,2	8,6

Tabell 4: Rådata til figur 4.2 pH vekstforsøk, de merket med oransje er fjernet grunnet avvikende resultat fra de andre gjentakene.

	Dag 0 pH	Dag 2 pH	Dag 4 pH	Dag 7 pH
SVLB gjentak 1	4,78	4,18	4,16	3,93
Gjentak 2	5,14	4,24	4,06	4,18
Gjentak 3	5,15	4,12	4,24	4,14
SV gjentak 1	5,23	4,4	4,34	4,27
Gjentak 2	5,21	4,35	4,29	4,38
Gjentak 3	5,24	4,11	4,1	4,13
SVL gjentak 1	5,2	4,36	4,27	4,16
Gjentak 2	5,27	4,34	4,28	4,27
Gjentak 3	5,22	4,29	4,3	4,32
USL gjentak 1	5,08	4,26	4,11	3,94
Gjentak 2	5,19	3,91	3,75	3,68
Gjentak 3	5,23	3,85	3,71	3,57

US gjentak 1	5,15	4,12	4,13	4,11
Gjentak 2	5,19	4,04	4,09	4,22
Gjentak 3	5,26	4,12	4,11	4,2
USLB gjentak 1	5,11	4,2	4,12	3,82
Gjentak 3	5,12	4,03	3,87	3,89
Gjentak 2	5,2	3,81	3,74	3,57

Tabell 5: Rådata fra platetellinger (figur 4.3 til 4.8) av MRS, YM og RB agar. Gjennomsnittsverdier med standardavvik er presentert

YM				
	Dag 0	Dag 2	Dag 4	Dag 7
SVLB	6,63±0,21	7,62±0,08	7,67±0,11	7,76±0,10
SV	5,65±0,03	7,63±0,24	7,74±0,00	7,55±0,05
SVL	5,76±0,47	7,77±0,03	7,65±0,08	7,58±0,26
USL	6,18±0,14	6,77±0,16	6,77±0,22	6,35±0,37
US	5,80±0,36	6,60±0,25	6,39±0,07	5,36±0,37
USLB	6,23±0,40	7,23±0,42	7,27±0,36	7,52±0,64

MRS				
	Dag 0	Dag 2	Dag 4	Dag 7
SVLB	6,48±0,01	7,66±0,07	7,57±0,10	7,65±0,04
SV	0,06±0,00	7,61±0,10	7,68±0,04	7,67±0,09
SVL	6,44±0,06	7,60±0,06	7,64±0,07	7,64±0,12
USL	6,34±0,76	7,93±0,16	7,88±0,14	6,57±0,32
US	6,26±0,23	6,94±0,43	6,52±0,05	5,81±0,81
USLB	6,47±0,30	7,74±0,35	8,24±0,90	7,30±0,68
RB				
	Dag 0	Dag 2	Dag 4	Dag 7
SVLB	6,07±0,33	7,59±0,07	7,53±0,17	7,55±0,14
SV	6,06±0,23	7,68±0,04	7,73±0,07	7,60±0,05
SVL	6,03±0,24	7,54±0,04	7,55±0,17	7,64±0,08
USL	5,45±0,43	6,35±0,03	6,24±0,21	6,03±0,00
US	5,96±0,18	6,80±0,17	6,41±0,03	5,82±0,37
USLB	5,65±0,05	6,15±0,62	7,03±0,82	6,94±0,93

Vedlegg 4: Rådata HPLC analyser

Tabell 6: Rådata fra HPLC analyse (figur 4,9 og 4,10). ruter merket med oransje er fjernet på grunn avvikende resultater

		Maltose	Glukose	Fruktose	Sitronsyre	Ravsyre /succininc	Laktat	Acetat (RI)
	Gjentak	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
SVLB 0	1	84942,31	8285,49	6000,04	248,20	0,00	0,00	0,00
	2	91181,72	9652,02	5250,78	232,61	0,00	0,00	0,00
	3	84952,42	9927,20	7100,61	190,34	0,00	0,00	0,00
SVLB 7	1	0,00	0,00	444,41	0,00		729,90	
	2	0,00		597,37	0,00	0,00	1007,93	1137,55
	3	0,00	0,00	459,24	0,00	0,00	1098,80	907,33
SV 0	1	91275,56	9092,14	6837,27	251,60	0,00	0,00	0,00
	2	90500,96	9681,79	5282,56	231,08	0,00	0,00	0,00
	3	85088,52	9915,45	7072,77	189,14	0,00	0,00	0,00
SV 7	1	0,00	0,00	542,88	272,82	0,00	0,00	388,83
	2	0,00		678,26	241,94	0,00	0,00	519,72
	3	0,00	0,00	475,11		0,00		
SVL 0	1	88535,96	8710,06	6515,88	246,25	0,00	0,00	0,00
	2	90160,12	9635,19	5381,29	228,09	0,00	0,00	0,00
	3	85088,52	9915,45	7072,77	189,14	0,00	0,00	0,00
SVL 7	1	0,00	0,00	360,15	0,00	312,21	741,77	1104,75

	2	0,00	0,00	562,23	0,00	332,71	993,73	910,81
	3	0,00		665,47				
USL 0	1	88525,07	9416,71	7518,05	244,53	0,00	0,00	0,00
	2	89366,57	9874,72	5552,77	228,73	0,00	0,00	0,00
	3	85596,13	10478,39	7616,20	191,54	0,00	0,00	0,00
USL 7	1	9699,26	0,00	116,39	0,00	420,42		
	2	9003,37	0,00	428,28	0,00	260,56	3646,95	1342,79
	3	13884,11	0,00	0,00	0,00	238,11	3936,01	1388,27
US 0	1	94735,21	10370,41	8666,46	263,31	0,00	0,00	0,00
	2	88807,97	9792,65	5593,29	228,49	0,00	0,00	0,00
	3	84813,27	10436,30	7587,71	187,54	0,00	0,00	0,00
US 7	1	0,00	0,00		277,85	0,00	0,00	0,00
	2	477,04	85,44	0,00	266,91	0,00	0,00	0,00
	3	712,29	68,07	0,00	259,53	0,00	0,00	0,00
USLB 0	1	92200,96	9746,84	8077,02	265,17	0,00	0,00	0,00
	2	85531,17	9418,00	5348,60	221,13	0,00	0,00	0,00
	3	88042,52	10419,11	6852,16	196,68	0,00	0,00	0,00
USLB 7	1	5720,37	0,00	141,02	0,00	453,77	1204,48	1853,88
	2	0,00	0,00	346,06	0,00	346,06	2093,18	1395,51
	3	11456,53	0,00	0,00	0,00	303,45	3916,32	1444,32

Vedlegg 5: Rådata for HSGC analyse

Tabell 7 – Rådata fra HSGC-FID analyse (figur 4,11 til 4,17) datapunkter merket med gult er ikke tatt med i gjennomsnitts og standardavvik utregninger.

	Gjentak	Acetaldehyd											
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
		Dimethylsuffi	1-propanol	Diacetyl	Ethylacetate	2-methyl-1-p	3-methyl-1-b	2-methyl-1-b	Isobutyl acet	Isoamyl acet	Ethyl hexano	Ethyl octano	
SVLB 0	1	18,932	0,005	2,212	0,155	9,764	2,696	7,413	1,436	0,009	0,103	0,013	0,027
	2	8,731	0,002	0,673	0,414	0,344	0,553	1,454	0,332	0,002	0,008	0,001	0,009
	3	5,868	0,009	0,806	0,306	0,788	0,781	1,734	0,464	n.d.	0,002	0,002	0,01
SVLB 4	1	5,937	0,01	14,377	n.d.	43,02	14,708	34	9,448	0,014	0,356	0,171	0,113
	2	5,665	0,002	12,839	n.d.	16,223	16,269	33,706	11,077	0,007	0,286	0,046	0,144
	3	24,365	n.d.	14,697	n.d.	21,574	17,651	34,788	11,717	0,008	0,076	0,041	0,157
SVLB 7	1	11,922	n.d.	13,652	n.d.	29,168	17,693	34,498	11,32	0,01	0,08	0,032	0,082
	2	5,811	0,001	11,397	n.d.	13,864	15,08	30,771	10,035	0,005	0,069	0,019	0,069
	3	11,696	n.d.	14,014	n.d.	19,76	12,489	30,379	7,948	0,006	0,03	0,058	0,131
SV 0	1	11,927	0,004	1,148	0,078	0,391	1,038	2,827	0,685	0,003	0,037	0,002	0,01
	2	7,114	0,005	0,568	0,366	0,238	0,419	1,228	0,303	n.d.	0,01	n.d.	0,008
	3	4,632	0,012	0,636	0,21	0,333	0,475	0,961	0,244	0,005	0,002	n.d.	n.d.
SV 4	1	16,166	0,014	16,478	0,036	27,239	23,172	35,91	14,995	0,076	1,84	0,161	0,373
	2	21,065	n.d.	15,416	n.d.	5,246	19,758	34,018	12,246	0,008	0,11	0,019	0,051
	3	17,12	n.d.	18,18	n.d.	8,586	20,693	35,765	13,46	0,013	0,301	0,031	0,077
SV 7	1	25,967	0,001	17,639	n.d.	11,414	21,88	38,142	14,608	0,017	0,448	0,031	0,055
	2	32,997	n.d.	13,22	n.d.	8,967	18,25	34	11,874	0,014	0,272	0,019	0,03
	3	6,885	0,001	13,684	0,052	12,269	18,19	32,037	12,858	0,017	0,447	0,039	0,11
SVL 0	1	13,683	0,009	1,316	0,329	0,526	1,271	3,594	0,891	0,004	0,044	0,003	0,01
	2	3,156	0,008	0,625	0,23	0,296	0,464	0,861	0,251	n.d.	0,002	n.d.	n.d.
	3	8,288	0,003	0,672	0,116	0,254	0,402	1,224	0,27	n.d.	0,008	0,001	0,009
SVL 4	1	21,299	0,002	15,339	n.d.	14,994	18,543	30,988	11,936	0,025	0,464	0,127	0,336
	2	18,094	n.d.	17,127	n.d.	11,67	21,432	37,3	14,072	0,022	0,567	0,037	0,06
	3	4,931	0,001	14,328	n.d.	10,383	18,784	34,407	12,105	0,019	0,422	0,039	0,089
SVL 7	1	12,259	0,001	15,018	n.d.	12,787	20,419	35,452	13,621	0,02	0,564	0,036	0,052
	2	30,382	n.d.	13,982	n.d.	11,409	18,699	33,964	12,204	0,017	0,378	0,027	0,043
	3	35,989	n.d.	17,334	n.d.	7,333	18,432	32,495	12,29	0,01	0,16	0,036	0,178
USL 0	1	14,412	0,008	1,186	0,7	1,33	2,01	3,557	0,864	0,003	0,001	0,001	0,01
	2	3,134	0,007	0,654	0,35	0,279	0,778	0,978	0,29	n.d.	0,002	n.d.	n.d.
	3	4,26	0,006	0,754	0,405	0,252	0,774	1,574	0,344	n.d.	n.d.	n.d.	0,009
USL 4	1	5,56	0,008	15,57	1,038	13,322	40,675	43,852	12,435	0,081	0,903	0,115	0,29
	2	2,193	0,002	8,722	0,411	3,967	25,067	27,604	6,896	0,016	0,126	0,013	0,043
	3	2,073	0,002	8,695	0,359	3,419	22,864	26,274	6,526	0,017	0,122	0,02	0,085
USL 7	1	4,072	n.d.	13,881	0,356	7,912	38,603	42,475	11,571	0,029	0,28	0,034	0,176
	2	7,106	n.d.	11,325	n.d.	4,397	26,823	30,676	8,645	0,016	0,092	0,015	0,036
	3	5,084	n.d.	9,025	0,102	5,146	26,205	29,005	7,186	0,01	0,087	0,01	0,032
US 0	1	16,379	0,006	1,305	0,422	0,364	2,282	4,157	0,951	n.d.	0,004	0,001	0,011
	2	4,328	0,005	0,742	0,304	0,19	0,733	1,533	0,338	n.d.	0,005	n.d.	0,008
	3	3,973	0,006	0,702	0,231	0,288	0,807	1,101	0,289	n.d.	0,003	n.d.	0,008
US 4	1	11,589	0,005	24,501	0,291	19,307	49,41	53,697	18,099	0,122	2,011	0,094	0,181
	2	2,818	n.d.	27,405	0,223	9,632	46,608	51,257	16,422	0,049	0,807	0,032	0,062
	3	5,715	n.d.	27,614	n.d.	6,078	49,755	50,661	16,85	0,026	0,386	0,015	0,048
US 7	1	7,75	n.d.	22,193	n.d.	7,544	40,586	47,009	15,326	0,03	0,517	0,015	0,043
	2	14,245	n.d.	24,388	n.d.	6,494	45,16	47,17	16,012	0,02	0,294	0,024	0,128
	3	10,434	n.d.	30,351	0,142	5,74	53,946	52,258	17,449	0,028	0,382	0,023	0,078
USLB 0	1	17,193	0,011	1,875	0,461	6,63	2,985	6,294	1,226	0,007	0,044	0,006	0,025
	2	9,759	0,008	1,022	0,626	0,736	1,329	2,42	0,653	0,003	0,006	0,002	0,011
	3	5,207	0,004	0,767	0,499	0,296	0,887	1,84	0,411	n.d.	n.d.	n.d.	0,009
USLB 4	1	17,247	n.d.	13,027	0,223	20,343	24,46	35,967	10,849	0,011	0,118	0,046	0,129
	2	1,889	0,003	6,881	0,275	9,997	18,08	20,982	5,183	0,008	0,055	0,01	0,047
	3	4,89	0,011	10,787	0,528	39,484	21,678	28,994	7,483	0,026	0,151	0,237	0,097
USLB 7	1	10,921	n.d.	13,336	0,128	32,065	24,732	37,738	10,796	0,013	0,094	0,026	0,102
	2	2,431	n.d.	9,251	n.d.	13,335	22,583	28,246	6,373	0,009	0,042	0,007	0,034
	3	5,661	n.d.	13,107	0,2	29,443	19,952	32,058	6,366	0,013	0,053	0,142	0,124

Vedlegg 6: Rådata brygging

Tabell 8 – °Plato målinger fra brygge vekstforsøket vist i figur 4,18. Ruter merket med gult er ikke tatt med i gjennomsnitts utregninger.

	Vørter	Dag 2	Dag 4	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 28
Dag 1	SV-1	12,4	9,9	7,9	6,7	6,8	6,80
Dag 1	SV-2	12,4	10,2	7,6	6,5	6,7	6,60
Dag 1	GM-1	12,4	9,2	8	6,6	6,8	6,80
Dag 1	GM-2	12,4	8,9	7,7	6,5	6,8	6,70
Dag 2	SVLB-1	12,4	9,90	7,00	6,80	6,70	6,60
Dag 2	USL-1	12,4	9,8	7,4	7	7,2	6,90
Dag 2	SVL-1	12,4	9,9	7	6,7	7,0	6,70
Dag 2	GML-1	12,4	9,7	8,5	7,1	7,2	7,1
Dag 2	USLB-1	12,4	12,1	11,2	10,6	9,7	7,6
Dag 3	SVLB-2	12,2	10,5	7,4	6,8	6,6	6,40
Dag 3	GMLB-1	12,2	9,3	7,9	7	7,0	6,70
Dag 3	GML-2	12,2	8,8	8	6,7	6,9	6,8
Dag 3	USLB-2	12,2	10,4	8,4	7,7	7,2	7,2
Dag 3	SV-3	12,2	9,6	7,1	6,6	6,5	6,2
Dag 4	GMLB-2	12,2	9,2	7,6	7	6,9	6,7
Dag 4	SVLB-3	12,2	10,1	7	6,6	6,5	6,2
Dag 4	USL-2	12,2	10,1	8,2	7,5	7,1	7
Dag 4	SVL-2	12,2	10,1	7,2	6,9	6,8	6,5
Dag 4	USLB-3	12,2	10,4	8,2	7,3	7,0	6,3
Dag 5	GML-3	12,3	7,1	6,1	6,1	6,1	6,3
Dag 5	SVL-3	12,3	6,6	6,3	6,3	6,1	6,3
Dag 5	USL-3	12,3	8,3	6,8	7	6,8	7,2
Dag 5	GMLB-3	12,3	6,3	5,9	6,1	5,9	5,9
Dag 5	GM-3	12,3	6,8	5,9	5,9	5,9	5,8

Tabell 9 – pH målinger fra brygge vekstforsøket vist i figur 4.19. Ruter merket med gult er ikke tatt med i gjennomsnitts utregninger.

	Vørter	Dag 2	Dag 4	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 28
Dag 1	SV-1	5,50	4,68	4,19	4,06	4,02	4,00
Dag 1	SV-2	5,50	4,73	4,27	4,18	4,17	4,01
Dag 1	GM-1	5,50	4,20	3,92	3,97	3,64	3,52
Dag 1	GM-2	5,50	4,17	3,95	3,88	3,73	3,59
Dag 2	SVLB-1	5,52	4,12	3,70	3,74	3,70	3,75
Dag 2	USL-1	5,52	3,99	3,69	3,73	3,66	3,64
Dag 2	SVL-1	5,52	4,08	3,70	3,74	3,71	3,75
Dag 2	GML-1	5,52	4,06	3,71	3,65	3,59	3,65
Dag 2	USLB-1	5,52	4,65	3,99	3,85	3,67	3,64
Dag 3	SVLB-2	5,52	4,24	3,80	3,67	3,68	3,69
Dag 3	GMLB-1	5,52	4,25	3,84	3,66	3,69	3,70
Dag 3	GML-2	5,52	4,23	3,75	3,71	3,66	3,72
Dag 3	USLB-2	5,52	4,14	3,83	3,63	3,64	3,58
Dag 3	SV-3	5,52	4,72	4,01	3,52	3,53	3,48
Dag 4	GMLB-2	5,53	4,00	3,74	3,75	3,72	3,67
Dag 4	SVLB-3	5,53	4,16	3,73	3,78	3,75	3,72
Dag 4	USL-2	5,53	4,01	3,74	3,70	3,72	3,69
Dag 4	SVL-2	5,53	4,16	3,76	3,82	3,79	3,74
Dag 4	USLB-3	5,53	4,06	3,74	3,72	3,70	3,64
Dag 5	GML-3	5,51	3,95	3,81	3,86	3,80	3,76
Dag 5	SVL-3	5,51	3,68	3,72	3,74	3,71	3,67
Dag 5	USL-3	5,51	3,69	3,58	3,60	3,64	3,55
Dag 5	GMLB-3	5,51	3,82	3,79	3,79	3,77	3,75
Dag 5	GM-3	5,51	4,16	4,13	4,09	3,99	3,89

Vedlegg 7: Rådata Anton Paar

Tabell 10 – resultater fra Anton Paar analyse vist i figur 4.20

Alcolyzer Beer: BEER													
Unique Sample Id	Date	Time	Sample Name	Density Condition	Alcohol (% v/v) %w/v	Haze Value EBC	Density g/cm ³	Er (real extract) (% w/w) %w/w	Ea (app. extract) (% w/w) %w/w	p (original extract) (% w/w) %Plato	RDF (real deg. of ferm.) %	ADF (% w/w) %w/w	Color Value EBC
1B	11.10.2020	10:05:45 a.m.		valid	4,97	23,99	1,01165	5,03	3,24	12,53	61,43	74,14	23,52
2B	11.10.2020	10:10:22 a.m.		valid	4,61	76,17	1,01583	6,12	4,46	13,03	54,77	65,76	30,69
3B	11.10.2020	10:14:26 a.m.		valid	4,42	67,48	1,01115	4,93	3,33	11,63	59,10	71,39	32,93
2F	11.10.2020	10:18:44 a.m.		valid	4,56	24,48	1,01310	5,36	3,71	12,24	57,85	69,73	26,41
4F	11.10.2020	10:23:26 a.m.		valid	4,30	92,21	1,01370	5,52	3,96	12,01	55,64	67,03	39,39
5F	11.10.2020	10:27:36 a.m.		valid	4,70	50,21	1,00911	4,52	2,81	11,66	62,73	75,91	33,58
2A	11.10.2020	10:32:10 a.m.		valid	4,57	46,20	1,01267	5,25	3,59	12,15	58,41	70,44	32,79
3A	11.10.2020	10:37:54 a.m.		valid	4,88	28,49	1,01138	4,94	3,18	12,32	61,46	74,21	27,72
4A	11.10.2020	10:43:15 a.m.		valid	4,94	20,23	1,01177	5,19	3,41	12,64	60,57	73,04	21,13
2E	11.10.2020	10:48:54 a.m.		valid	4,29	59,69	1,01406	5,58	4,03	12,06	55,29	66,59	29,14
4E	11.10.2020	10:53:51 a.m.		valid	4,28	49,21	1,01421	5,59	4,04	12,05	55,22	66,50	25,05
5E	11.10.2020	10:59:52 a.m.		valid	4,34	44,02	1,01364	5,53	3,96	12,07	55,80	67,21	29,92
3D	11.10.2020	11:05:10 a.m.		valid	4,34	54,86	1,01271	5,28	3,70	11,84	56,99	68,73	32,98
4D	11.10.2020	11:11:59 a.m.		valid	4,19	96,14	1,01389	5,52	4,00	11,85	54,98	66,23	38,88
5D	11.10.2020	11:16:39 a.m.		valid	5,31	37,87	1,00743	4,26	2,34	12,30	66,87	80,98	30,81
2H	11.10.2020	11:21:07 a.m.		valid	5,51	1,67	1,00810	4,33	2,35	12,68	67,31	81,48	13,03
3H	11.10.2020	11:25:38 a.m.		valid	5,14	7,33	1,00982	4,70	2,84	12,47	63,87	77,19	13,35
4H	11.10.2020	11:30:34 a.m.		valid	4,29	48,04	1,01236	5,12	3,57	11,62	57,44	69,32	28,93
C1	11.10.2020	11:34:52 a.m.		valid	5,04	15,87	1,01076	4,82	3,00	12,44	62,81	75,88	20,82
C2	11.10.2020	11:39:39 a.m.		valid	4,76	42,77	1,01188	5,12	3,41	12,31	59,94	72,32	28,79
C5	11.10.2020	11:44:19 a.m.		valid	5,48	34,89	1,00584	3,92	1,94	12,25	69,38	84,15	27,62
2G	11.10.2020	11:49:10 a.m.		valid	4,71	18,86	1,01295	5,20	3,50	12,31	59,33	71,55	23,21
3G	11.10.2020	11:53:41 a.m.		valid	4,23	50,15	1,01260	5,23	3,69	11,63	56,59	68,27	31,89
5G	11.10.2020	11:58:16 a.m.		valid	5,29	39,43	1,00817	4,45	2,54	12,46	65,81	79,63	29,60

Vedlegg 8: Rådata viskositetsanalyse

Tabell 11 – Resultater fra viskositetsanalyse vist i figur 4.21

Skjærhastighet =	105 1/s	300 1/s	
Prøve	Viscositet (cP)	Viscositet (cP)	Kommentar
2F	3,32	3,87	Newtonsk
2E	18,00	9,09	Skjærtynnende
2G	4,22	3,99	Newtonsk
3D	20,50	11,20	Skjærtynnende
3G	9,16	5,92	Skjærtynnende
3H	3,00	3,35	Newtonsk
4D	26,00	13,50	Skjærtynnende
4E	11,70	6,96	Skjærtynnende
4F	24,70	12,00	Skjærtynnende
4H	9,00	7,67	Skjærtynnende
3A	3,21	3,58	Newtonsk
4A	3,46	3,61	Newtonsk
C1	2,91	3,38	Newtonsk
B2	15,20	7,54	Skjærtynnende
B1	3,23	3,69	Newtonsk
C2	3,08	3,42	Newtonsk



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway