



Högskolan
Kristianstad

Högskolan Kristianstad
291 88 Kristianstad
044-250 30 00
www.hkr.se

Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp, för
Kandidatexamen i mat- och måltidsvetenskap
VT 2021
Fakulteten för Naturvetenskap

Hur påverkar olika lokala jäststammar aromutveckling och smak vid fermentering av äppeljuice?

Philip Lavin

Författare

Philip Lavin

Titel

Hur påverkar olika lokala jäststammar aromutveckling och smak vid fermentering av äppeljuice?

Engelsk titel

How does different indigenous yeast strains influence the aroma development and taste during fermentation of apple juice?

Handledare

Kimmo Rumpunen och Viktoria Olsson

Examinator

Stina-Mina Ehn Börjesson

Sammanfattning

Intresset för lokalproducerad dryck ökar. Konsumenten efterfrågar produkter med mer komplexa smaker. Främst gäller detta produktkategorin öl, vin och cider. Det har i flera studier visats att lokala stammar av mikroorganismer kan användas för att tillverka produkter med en större smakkomplexitet än de produkter som baseras på konventionella stammar. Detta har fått bryggare och vinmakare att experimentera med såväl val av råvara som mikroorganismer i syfte att ta fram unika produkter. I denna studie har tre lokala stammar av *Saccharomyces cerevisiae* undersökts avseende eventuella skillnader i fermenteringsförlopp och aromutveckling samt smak vid fermentering av äppeljuice. Resultatet från studien visar att alla stammarna överlag beter sig lika inklusive enskilda sensoriska attribut och att en fermentering på tre dagar ger upphov till högre totalt gillande av produkt än vid sju dagars fermentering.

Ämnesord

Fermentering, jäst, äppeljuice, aromgivande ämnen, sensorisk analys

Author

Philip Lavin

Title

How does different indigenous yeast strains influence the aroma development and taste during fermentation of apple juice?

Supervisor

Kimmo Rumpunen och Viktoria Olsson

Examiner

Stina-Mina Ehn Börjesson

Abstract

There is an increasing interest in locally produced drinks. Consumers demand products with complex taste profiles. Especially when it comes to wine, beer and cider. Several studies have shown that indigenous strains of microorganisms can be used to produce products that's deemed more complex than the products based on conventional strains. This has led brewers and winemakers to experiment with both the raw material as well as the local microorganisms in order to develop unique products. In this study, three local strains of *Saccharomyces cerevisiae* have been studied for potential differences regarding aroma development and taste during fermentation of apple juice. The results from the study showed that the different strains generally behaved the same, and that fermentation during three days resulted in greater taste liking compared to seven days.

Keywords

Fermentation, yeast, apple juice, volatile compounds, sensory analysis

Förord

Det finns ett ökat intresse för lokalproducerade drycker som kan ge unika smakupplevelser. Konsumenten vill ha fler alternativ till vin och öl som kan matcha den goda måltiden. Detta har lett till ett ökat intresse bland såväl forskare som bryggare att identifiera och använda sig av naturligt förekommande, vilda stammar av såväl bakterier som jäst, som kan fermentera och ger upphov till sensoriskt önskvärda egenskaper. Det har i flera studier visats att dessa okonventionella mikroorganismer kan ge upphov till unika och komplexa smaker i drycker som till exempel öl, vin och cider. Fermenterade livsmedel är populära av flera anledningar, också p.g.a. de eventuella hälsofrämjande egenskaperna intag av dessa livsmedel kan medföra. Även förändringar i smak, doft och textur gör dem eftertraktade. Att genom naturligt förekommande eller tillsatta mikroorganismer, under relevanta förhållanden, transformera en söt druv- eller fruktjuice till vin och cider höjer samtidigt statusen på den ursprungliga råvaran. Genom att identifiera mikroorganismer med särskilda egenskaper kan unika produkter tas fram och dessa mikroorganismer kan vara ännu ett verktyg i produktutvecklarens verktygslåda. I detta arbete undersöker jag hur tre nya jäststammar, naturligt förekommande på äpple, påverkar fermenteringsförlopp och aromutveckling vid fermentering av äppeljuice. Jag vill därmed bidra till ökad användning av lokala mikroorganismer och inspirera andra att intressera sig för liknande studier för att öka möjligheterna att ta fram nya unika produkter.

Jag skulle vilja rikta ett stort tack till alla som hjälpt mig i mitt arbete, mina kurskamrater och lärare för tre fantastiska år på Gastronomiprogrammet. Dock är det tre personer jag vill rikta ett extra tack till. Kimmo, tack för givande samtal, för inspiration och för att du utmanade mig! Tack Viktoria för stöd och för att du höll mig på rätt kurs. Till sist, tack Betty Collin, utan din hjälp hade jag nog fortfarande stått och stampat i labbet.

Förkortningar och ordförklaringar

Aerob: Mikroorganismer som kräver tillgång till syre för att tillväxa.

Anaerob: Mikroorganismer som tillväxer utan syre.

°Brix: Enhet för mängden löslig torrsubstans mätt med refraktometer. Främst sockerarter och andra ämnen som bryter ljus i t.ex. juicer.

CFU: Colony Forming Units. Enhet för mikroorganismer som bildar kolonier.

Fenoler: Naturligt förekommande skyddsämne hos växter. Exempel på fenoler är tanniner och antocyaniner. Anses ha betydelse för smak- och doftupplevelsen och kan också ha hälsoeffekter.

Fermentering: En kemisk process som katalyseras av enzymer från mikroorganismer, såväl jästsvampar som bakterier.

GC: Gas chromatography. Gaskromatografi. Utrustning för att mäta flyktiga ämnen.

Inkubering: Förvaring i en bestämd temperatur under en specifik tid. I denna rapport hänvisar inkubering till när de färdigpreparerade proverna ställs in och förvaras i värmeskåp i 30°C i 24-48h.

Inokulum: Cellsuspension för att starta en mikrobiell kultur.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight. En metod för att identifiera arter av mikroorganismer mot en databas innehållande information om olika mikroorganismers genetik.

Mikroflora: De mikroorganismer, bakterier, jäst och svampar, som finns naturligt förekommande i en viss miljö. Till exempel i eller på människor, frukt, grönsaker etc.

Patogen: Mikroorganism som kan orsaka sjukdom.

pH: Koncentrationen vätejoner (H^+) i en lösning och ett logaritmiskt mått på surhet.

Supernatant: Separerad vätska. I detta arbete är det vätskan som befinner sig ovanför pelleten med jäst.

OD: Optical density. Optisk densitet/täthet. Mäter hur mycket ljus ett ämne eller produkt absorberar.

Off-flavour: Oangenäm smak i en produkt och bidrar till lägre total acceptans och sämre kvalitet.

Titring: Metod för att mäta koncentrationen av ett visst ämne. I följande rapport används titring med bas för att mäta koncentrationen syra i de olika proverna.

Innehållsförteckning

Inledning	9
Syfte	11
Frågeställningar	11
Bakgrund	12
Äpple som råvara för drycker	12
Fermentering	15
Sensorisk analys	16
Material och metod	18
Litteraturinsamling och informationssökning	18
Urval av mikroorganismer	18
Artbestämning av mikroorganismer	19
Preparering och uppförökning av jästceller	20
Substrat, inokulering och fermenteringsuppställning	21
Studiedesign	22
Övervakning av fermenteringsprocessen	22
pH-värde.....	23
Totalsyrahalt.....	23
Löslig torrsubstans	23
Etanolhalt	23
Aromämnen.....	24
Sensorisk analys	24

Statistisk analys	25
Etiska överväganden.....	26
Resultat	27
Antalet jästceller	27
pH-värde.....	28
Totalhalt syra.....	29
Löslig torrsubstans	30
Etanolhalt	31
Kvoten socker/syra.....	32
Aromämnen.....	33
Sensorisk analys	34
Diskussion	40
Resultatdiskussion.....	40
Metoddiskussion	44
Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap	46
Slutsats	46
Litteraturförteckning.....	48
Bilagor	55

Inledning

Det finns ett växande intresse för lokalt producerad mat och dryck (Rumpunen et al., 2015). Detta har fått såväl ölbryggare, vinmakare som cidertillverkare att intressera sig för användandet av okonventionella och naturligt förekommande mikroorganismer i syfte att ta fram nya och för platsen unika produkter (Gamero et al., 2020). Enligt Gutiérrez et al. (2018) blir det allt vanligare bland bryggare och vinmakare att återgå till hur öl, vin och cider ursprungligen framställdes. Ursprungligen framställdes dessa drycker genom spontanfermentering där den lokala mikrofloran, som finns på såväl råvaran som i lokalen och på utrustningen, gav upphov till fermentering. Idag används ofta spontanfermentering för att skapa mer karaktär och smakkomplexitet i produkterna (Gamero et al., 2020; Gutiérrez et al. 2018). *Saccharomyces cerevisiae* är den vanligaste jäststammen vid öl, vin och ciderframställning (Liu, Lu, Duan, & Yan, 2016). Faktum är att *S. cerevisiae* är en jäststam som människan använt sig av i tusentals år till såväl brödbakning som vid ölbrygning (Adams et al., 2016). Hutkins (2019) menar att det är den enskilt mest betydelsefulla mikroorganismen när det kommer till livsmedelsproduktion såväl historiskt som idag. Dagens kommersiella stammar som används är domesticerade stammar av vildjäst vars egenskaper förädlats för att passa den specifika produkten (bröd, öl, vin) och produktionsmetoden. Idag används endast ett fåtal stammar vid kommersiell produktion (Hutkins, 2019). Det finns en uppenbar risk att detta leder till likartade och tämligen enformiga produkter (Carrau et al., 2017).

Äpple är en av de mest odlade frukterna i världen och odlas i stor skala även i Sverige (Al Daccache et al., 2020; Rumpunen, 2015). Ca 90% av all äppelproduktion sker i Skåne och det är framför allt utländska sorter som ger hög avkastning som prioriteras bland yrkesodlarna (Rumpunen et al., 2015). Dock

ökar efterfrågan på lokala sorter, exempel på sådana är 'Aroma', 'Alice' och 'Katja' som alla är genuina skånska sorter framtagna på Balsgård av växtförädlare vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) (Rumpunen, 2015). I denna studie kommer äppeljuice av sorten 'Aroma' att användas som fermenteringsmedium. Exempel på fermenterade äppelprodukter är äppelvin, spritprodukter, fermenterade juicer och cider (Cousin, et al., 2017).

Ciderproduktion är tämligen begränsad i Sverige men Livsmedelsföretagen (2019) menar att det på senare år har uppstått ett ökat intresse för småskalig och hantverksmässig ciderproduktion. Mer kända producenter är Kiviks Musteri, Pomologik, Brännland Cider och de tämligen nystartade skånska Fruktstereo. För ciderproduktion har äppelråvaran stor betydelse (Guiné et al., 2021).

Svenskodlade dessertäpple har emellertid inte tillräckligt med bitterämnen (fenoler) för traditionell cidertillverkning. Därför har SLU påbörjat utvecklingen av nya härdiga must- och cideräpplesorter (SLU, 2021). Fruktstereo beskriver i den egenförfattade boken *Cider Revolutionen* hur de vill utmana bilden av vad traditionell cider är och sudda ut gränserna mellan öl, vin och cider. Detta genom att blanda olika frukter och bär för att skapa produkter där smakupplevelsen står mer i fokus än den formella klassificeringen till olika dryckestyper (Nypelius & Sjöström, 2019). Suárez Valles et al. (2008) menar att användandet av lokala jäststammar kan vara mer effektivt vid produktion av cider då dessa jäststammar är mer anpassade till de lokala förhållandena. Naturligt förekommande jäststammar har en enorm potential med mer än 1500 olika identifierade stammar, och med möjliga nya, som också skulle kunna användas industriellt (Gutiérrez et al., 2018). Även om intresset för utnyttjandet av lokala mikroorganismer ökar, är det fortfarande ett tämligen utforskat område, och det finns flera utmaningar med deras användning. Förutom att ge upphov till intressanta smaker kan de även bidra med flera "off-flavours", bismaker som kan vara otilltalande och försämrar kvaliteten på den slutliga produkten (Capece et al., 2014). De icke domesticerade

stammarna kan dessutom ha sämre fermenteringsförmåga än de kommersiella stammarna (Hutkins, 2019). Om fermenteringen inte startar snabbt kan icke önskvärda oppurtionistiska mikroorganismer växa till. De kan även vara svåra att uppföröka till den koncentration som behövs för en standardiserad process (Hutkins, 2019).

Utgångspunkten för detta examensarbete är fermenterande mikroorganismer som isolerats från lokala äpplesorter i syfte att identifiera nya stammar med önskvärda egenskaper, såväl sensoriska som processmässiga, för framställning av lokalproducerade drycker.

Syfte

Syftet med denna studie är att undersöka hur tre lokala stammar av *Saccharomyces cerevisiae* påverkar aromutveckling och smak vid fermentering av äppeljuice. Hypotesen är att olika vildjäster ger olika aromutveckling och smak.

Frågeställningar

- Hur utvecklas juicens arom och smak vid fermentering i rumstemperatur i sju dagar?
- Kan något samband mellan koncentrationen av aromämnen och intensiteten av enskilda sensoriska attribut observeras?
- Skiljer sig fermenteringsförloppet mellan stammarna med avseende på pH-värde, löslig torrs substans, totalsyra- och etanolhalt under tio dagar?
- Påverkar fermenteringen av äppeljuice det totala gillandet av produkten?

Bakgrund

Äpple som råvara för drycker

Äpple är en populär frukt världen över. I Sverige odlades det 22 200 ton år 2019 (Jordbruksverket, 2021) och merparten av odlingen sker i Skåne (Rumpunen, 2015). Äpple är främst en uppskattad frukt på grund av dess goda friska smak, textur och näringsinnehåll. Frukten är rik på fiber, vitaminer och andra näringsämnen (Guiné et al., 2021). Dessutom är äpple relativt billigt och kan lagerhållas länge (Guiné et al, 2021). Enligt Espino-Díaz et al (2016) bestäms äppelns kvalitet av attribut som utseende, fasthet och smak samt av frånvaron av skador eller sjukdomar. Kvaliteten på frukten och sortegenskaperna är viktiga faktorer för att kunna tillverka fermenterade produkter av hög kvalitet. Frukten sammansättning av närings- och aromämnen har en direkt påverkan på fermenteringsprocessen och den fermenterade produktens slutliga sensoriska kvalitetsegenskaper. Rumpunen (2015) menar att det är sorten och mognadsgraden hos äpplet som har allra störst påverkan på smaken i den pressade äppeljuicen. Äppeljuice är huvudråvaran i cider och äppelvin (Cousin et al., 2017). Socker- och syrainnehållet i frukten förändras under mognad och vid lagring. Därför menar Rumpunen (2015) att det är särskilt viktigt att mäta socker och totalsyrahalt för att kunna välja äpple i rätt mognadsstadium för att tillverka en juice av högsta kvalitet. Äppeljuice innehåller flera olika sockerarter i olika koncentrationer (Wang et al., 2004). Den främsta sockerarten är fruktos som utgöra ca 70% av sockerarterna följt av sukros och glukos (Williams, 1974). Dessa är alla fermenterbara sockerarter vilket gör äppeljuice till ett bra substrat för fermentering med såväl jäst som bakterier (Chen et al., 2019; Gutiérrez et al., 2018; Szutowska, 2020; Cousin et al., 2017).

Rumpunen (2015) menar att förhållandet mellan socker och syra i stor utsträckning påverkar den upplevda smaken som karaktäriserar olika frukter. Förhållandet mellan socker och syra är ett användbart mått för kvalitetssäkring av såväl äppelråvara som äppeljuice. Som tidigare nämnts är det flera egenskaper hos frukten som slutligen påverkar den fermenterade produktens kvaliteter. Inom vinvärlden är det välkänt att platsen där druvorna odlas har en direkt koppling och påverkan på vinets sensoriska egenskaper och begreppet *terroir* är välkänt. Rumpunen et al. (2015) menar att begreppet inbegriper den traditionella definition om växtplatsens påverkan (klimat, mikroflora, mikroklimat, jordmån, underliggande geologi, topografi och altitud) på vins smakegenskaper samt att begreppet har breddats till att även inbegripa sorten, odlingsteknikens och framställningsmetodernas påverkan på vinets kvaliteter.

Det har i flera studier visats att äppeljuice fungerar bra för att skapa olika fermenterade drycker med unika sensoriska egenskaper (Guiné et al., 2021; Granato et al., 2010; Cousin et al., 2017; Suárez Valles, et al., 2008; Wu et al., 2020; Gutiérrez et al., 2018). Espino-Díaz et al. (2016) menar att smaken är ett viktigt kvalitetsattribut och att den i hög grad påverkas av flyktiga aromämnen. Sammansättningen och koncentrationen av dessa ämnen varierar stort mellan sorter och kan påverkas av hantering före och efter skörd. Exempel på flyktiga aromföreningar i äppel och cider är estrar, alkoholer, aldehyder, ketoner och etrar (Espino-Díaz et al., 2016). De ger upphov till aromer som smörighet, blommighet, fruktighet, rostade toner med mera. Flyktiga föreningar bildas under fermentering och kallas för sekundära metaboliter eftersom de inte fyller några viktiga funktioner för tillväxt, utveckling eller reproduktion av jästcellen (Cousin et al., 2017). Espino-Díaz et al. (2016) menar att det är främst estrar som bidrar till äpplets fruktigaaromer. Estrar och alkoholer är de huvudsakliga aromgivande ämnena i cider (Cousin et al., 2017). En av anledningarna till att *S. cerevisiae* är en populär jäststam vid framställning av alkoholhaltiga drycker är just

esterproduktionen. Även oangenäma aromämnen kan bildas och öka i koncentration under fermentering. Dessa beskrivs som 'off-flavours'. Exempel på 'off-flavours' i cider är höga koncentrationer av ättiksyra och aldehyden acetaldehyd. I mindre mängder bidrar ättiksyra dock till en angenäm smak, karaktäristisk för cider (Williams, 1974). Främst beror oangenäm aromutveckling på felaktiga fermenteringsförhållanden och kontamination av andra mikroorganismer. Exempelvis kan ättiksyrabakterier omvandla etanol till ättiksyra om det finns syre tillgängligt (Adams et al., 2016).

Fenoler är icke flyktiga ämnen som skyddar växten och bidrar med strävhet och beska. De finns naturligt i äpple och äppelprodukter (Espino-Díaz et al., 2016). Koncentrationen kan varieras genom filtrering. Fenoler anses ha hälsofrämjande egenskaper (Guiné et al., 2021). Williams (1974) betonar att smak och doft är komplext och att många faktorer interagerar och påverkar varandra. Även om de icke-flyktiga ämnena främst bidrar till munkänsla och grundsmaker (sötma, syra, salta, beska & umami) påverkar de dryckens slutliga smakprofil. Williams (1974) understryker att även om olika ämnen bidrar till olika aromer och har olika tröskelvärden kan den enes effekt på den andra inte förbises. Alkoholer som etanol förstärker smaker medan mängden socker och pH-värdet påverkar mängden flyktiga ämnen i aromämnet (Williams, 1974). I äppeljuice är det främst socker, syror, fenoler som bidrar till smakprofilen. Val av jäststam har också inverkan på ciderns slutliga smak (Suárez Valles et al., 2008). För skapa en fermenterad äppeljuice med hög acceptans menar Granato et al. (2010) att det är framförallt smak och arom som påverkar acceptansen av den fermenterade äppeljuicen och således bör fokus ligga på att indentifiera stammar och fermenteringsförhållanden som gynnar aromutvecklingen.

Fermentering

Att fermentera livsmedel är något människan gjort i tusentals år, främst i syfte att förlänga hållbarhet och öka säkerheten på livsmedlet (Szutowska, 2020; Adams et al, 2016; Hutkins, 2019). Fermentering är inget entydigt begrepp utan betyder olika saker i olika sammanhang. Thourgaard et al. (2007, s. 353) använder begreppet i en vidare mening och beskriver det som: ”En fermentering är en process som katalyseras av enzymer från mikroorganismer”. Det handlar således om en energigivande nedbrytningsprocess där främst kolhydrater (socker) omvandlas under anaeroba förhållanden (syrefritt). Jästsvampar som *S. cerevisiae* och mjölksyrabakterier (de homofermentativa) metaboliserar sockerarter genom glykolysen och Emden-Meyerhof-Parnas-väg till pyruvat (Adams et al., 2016). Medan mjölksyrabakterier reducerar pyruvat direkt till mjölksyra dekarboxylerar *S. cerevisiae* pyruvat och bildar acetaldehyd som sedan reduceras till etanol (Hutkins, 2019). Slutprodukterna vid fermentering med *S. cerevisiae* är således etanol och koldioxid samt andra biprodukter som bidrar till smak.

För en lyckad fermentering krävs att jästen har tillgång till näringsämnen samt rätt miljömässiga förutsättningar. Några av de miljöfaktorerna är substratets pH-värde, sockerinnehåll och temperatur (Guiné et al., 2021). Felaktiga fermenteringsförhållanden kan stressa jästen och hämma fermenteringsprocessen (Adams et al., 2016). Exempelvis leder ett för högt sockerinnehåll till osmotisk stress och en för hög etanolhalt dödar jästcellerna (Hutkins, 2019). *S. cerevisiae* trivs i temperaturer mellan 20-30°C, vid pH 4,5–6,5 och kan tillväxa vid det höga sockerinnehåll som äppeljuice har (Walker & Stewart, 2016). *S. cerevisiae* kan även tillväxa vid lägre temperatur och pH eftersom denna jäst är syratolerant (Gutiérrez et al., 2018). Enligt Cousin et al. (2017) varierar pH-värdet i äppeljuice normalt mellan 3,0–3,5 och mellan 3,3–4,0 i cider. Vid så låga pH-värde hämmas tillväxt av icke önskvärda mikroorganismer men även önskvärda kan hämmas.

Därför är det viktigt att först undersöka om de isolerade mikroorganismerna kan anpassa sig till substratet.

De kommersiella jäststammar som används för fermentering idag är framodlade för att medföra en snabb fermentering, önskvärda sensoriska egenskaper samt vara stabila över tid (Hutkins, 2019). Således är det stor skillnad i egenskaper hos stammar av *S. cerevisiae* som används vid framställning av alkoholhaltiga drycker och de som används inom bageriindustrin. Enligt Adams et al. (2016) finns det över 80 kommersiella stammar av *S. cerevisiae* och av dessa används endast ett fåtal till öl, vin och ciderproduktion världen över. Detta menar Carrau et al. (2017) medför alltför likartade och enformiga produkter. Det har i flera studier visats att användningen av inhemska och lokala stammar av *S. cerevisiae* medför unika sensoriska egenskaper och en ökad komplexiteten i drycken (Lorenzini et al., 2019; Song et al., 2019). Flera av dessa stammar har hög fermenteringskapacitet då de redan är anpassade till miljön (Song et al., 2019). Gutiérrez et al. 2018 och Capece et al. (2014) menar att det finns en ökad trend bland ölbryggare, vinproducenter och cidermakare att gå tillbaka till en spontanfermentering med den mikroflora som finns på råvaran, i lokalen och på utrustningen i syfte att ta fram unika produkter. Genom att isolera och identifiera nya jäststammar, utvärdera dessa efter tillväxt samt deras förmåga att bilda etanol och aromämnen, kan nya och innovativa produkter unika för råvaran och platsen skapas. Capece et al. (2014) menar att utmaningen främst ligger i att identifiera stammar som kan används vid industriell tillverkning. Flera av de okonventionella stammarna kan vara svåra att uppföröka i tillräckliga koncentrationer för att fungera vid en standardiserade, storskalig, produktion.

Sensorisk analys

Författarna Albinsson, Wendin & Åström (2017) beskriver sensorisk analys som ett begrepp som används för att beskriva hur vi upplever en produkt genom våra

sinnen: hörsel, doft, smak, syn och känsel. Sensorisk analys inkluderar en rad olika metoder och tillvägagångssätt (Albinsson et al., 2017) och är ett viktigt verktyg i produktutvecklingsprocessen (de Souza Neves Ellendersen et al., 2012). Sensorisk analys används för att identifiera skillnader mellan produkter, ta fram beskrivning av produkten genom att bedöma intensiteten av olika attribut associerade med produkten eller acceptans av produkten (Lawless & Heymann, 2016). Sensorisk analys kan även fungera som kvalitetskontroll (de Souza Neves Ellendersen et al., 2012).

Enligt Albinsson et al. (2017) skiljer man inom sensorisk analys på analytiska paneler och konsumentpaneler. Den analytiska panelen används för att ta reda på om det finns någon skillnad mellan snarlika produkter och för att beskriva attribut karaktäristiska för en produkt. Konsumentpanelen används för att undersöka graden av acceptans av en produkt eller ett attribut (Lawless & Heymann, 2016). Medlemmarna i en analytisk panel genomgår flera olika tester (smak, doft, färgseende etc) samt tränas inför det aktuella testet. Albinsson et al. (2017) menar att det bör ingå 20–40 medlemmar vid skillnadstest och 6–12 medlemmar vid beskrivande test. Konsumentpanelen genomgår aldrig träning inför test och bör utgöras av 50–300 personer (Albinsson et al., 2017).

Ur en strikt vetenskaplig synpunkt menar både Albinsson et al. (2017) och Lawless & Heymann (2016) att de olika testen ej bör blandas. Dock förekommer det att forskare ändå väljer att blanda de olika testerna och testet som utformades i detta examensarbete inspirerades av Ye et al. (2014) sensoriska test.

Material och metod

Litteraturinsamling och informationssökning

Den litteratur som använts i studien har inhämtats via Högskolan Kristianstads sökverktyg Summon (med avgränsning för peer-review artiklar), Google Scholar och Sveriges Lantbruksuniversitetets (SLU) öppna publikations databas Epsilon. Sökord som använts är: Fermentering, äpple, äppeljuice, sensorisk analys, äppelcider, aromgivande ämnen, fermentation, apple, apple juice, sensory analysis, indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae*, aroma compounds, apple cider. Även faktaböcker och populärvetenskapliga böcker har ingått i materialet.

Urval av mikroorganismer

Nedan beskrivs, i korthet, de inledande försöken som ledde fram till att stammarna A16:20, A3 och A6:10 valdes ut för examensarbetet. En initial snabbscreening, avseende tillväxthastighet och aromutveckling, omfattade 20 olika isolat från lokala äppelsorter som utan föregående koncentrationsbestämning fermenterats i äppeljuice tillverkad av 'Aroma'. 'Aroma' är den näst vanligaste odlade äppelsorten i Sverige, och dess juice har i tidigare fermenteringar uppvisat gott resultat avseende smak- och aromutveckling.

Den potentiella fermenteringsförmågan bedömdes genom okulärgranskning av pelletens storlek före och efter inkubation vid 30°C under 24h samt genom att pysa provrören (för att identifiera grad av kolsyrabildning).

Fermenteringsförloppet studerades genom att mäta pH-värde och °Brix under totalt sju dagar. Antalsbestämning gjordes med hjälp av levanderäkning av isolaten från plattor med MRS-agar (Becton Dickson AB, de Man, Rogosa &

Sharpe) (Adams et al, 2016). Plattorna granskades okulärt för att säkerställa att de var rena, det vill säga att endast en typ av mikroorganism växte fram (*Figur 1*). Aromutveckling utvärderades sensoriskt av författaren och handledare (Kimmo Rumpunen) genom doftanalys och provsmakning samt beskrevs utifrån följande attribut: fruktighet, total äppelsmak, munkänsla, balans i sötma/syra, beska och totalt gillande. De utvalda isolaten A16:20, A3 och A6:10 befanns särskilt intressanta därför att dessa gav upphov till god äppelarom och en fruktig smak, och gav inga oönskade aromer.



Figur 1. Fermenterande äppeljuice i provrör med de olika isolaten (A16:20, A3 och A6:10) som inkuberats vid 30°C under 24h och framodlats på MRS-agarplattor. Fotograf: Philip Lavin

Artbestämning av mikroorganismer

För att artbestämma de utvalda mikroorganismerna användes MALDI-TOF. MALDI-TOF är en metod som med hjälp av laserteknik skapar ett masspektrum som jämförs mot masspektra i ett referensbibliotek för att identifiera olika mikroorganismer. Inför identifieringen förbereddes samtliga isolat enligt

tillverkarens manual (Bruker Daltonik GmbH, 2008). Dock med modifikationen att proverna fixerades med myrsyra innan tillsats av matrix. Enskilda kolonier plockades med en steril tandpetare från plattor med MRS-agar och applicerades på MALDI-TOF target plate. Därefter fixerades varje prov med 0,85 µL myrsyra (70%) och placerades i dragskåp för torkning i rumstemperatur innan 0,85 µL matrixlösning tillsattes. När samtliga prover hade torkat utfördes artbestämningen med MALDI-TOF spektrofotometer och tillhörande mjukvara (Bruker Daltonik GmbH, Microflex® LRF). Resultatets tillförlitlighet presenteras som ett scorevärde mellan 0 och 3. Enligt tillverkaren bedöms score större än 2 vara tillförlitligt men under 1,7 osäkert.

Artbestämning via Maldi-TOF visade att samtliga isolat troligen tillhörde arten *Saccharomyces cerevisiae* då de erhöll scorevärde över 1,7 men under 2,0. Således är släktes-tillhörigheten för alla prover med stor sannolikhet korrekt men att artidentiteten är osäker.

Preparering och uppförökning av jästceller

Isolaten odlades upp på MRS-agar vid 30°C under 48h (B. Collin, personlig kommunikation, 13 april 2021). En ren koloni överfördes till odlingsrör med 20 mL MRS-buljong (Becton Dickson AB) och inkuberades vid 30°C under 24h enligt Adams et al. (2016).

Cellerna koncentrerades genom centrifugering vid x2000g i fem minuter (OHAUS, Frontier™5706). Pelleten tvättades med 10 mL 0,85% NaCl (Merck), provröret vortexades och centrifugerades vid x2000g i fem minuter (OHAUS, Frontier™5706). Proceduren upprepades två gånger.

För enkel antalsbestämning av jästceller användes optisk densitetsmätning (OD). Den tvättade pelleten späddes med 0,85% NaCl (Merck), vortexades (IKA, MS2

Minishaker inställning 1400varv/min) och 200 µL prov tillsattes till kyvett och lästes av i Spektrofotometer (Eppendorf, BioPhotometer plus, OD₆₀₀). Proceduren upprepades tills OD_{1,0} uppnåts.

Därefter upprättades en spädningsserie i ett förhållande om 1:10 med sju upprepningar. Spädningen gjordes genom att tillföra 100 µL provlösning till 900 µL 0,85% NaCl (Merck) med ytterligare sex upprepningar. Slutligen tillsattes 100 µL prov från varje spädningsrör till plattor med MRS-agar (Becton Dickson AB, de Man, Rogosa & Sharpe). Plattorna inkuberades vid 30°C under 48h.

Levanderäkning av agarplattor med 20–200 kolonier användes för antalsbestämning.

För att förenkla antalsbestämningen användes Bürkerskammare för cellräkning i mikroskop (Olympus, CX43). Detta gav identiskt resultat som levanderäkning efter framodling på MRS-agarplattor. I mikroskop kontrollerades även att stammarna var rena. Detta användes för att standardisera cellantalet vid inokulering av fermenteringsflaskorna samt för antalsbestämning vid fermenteringsslut.

Substrat, inokulering och fermenteringsuppställning

Till glasflaskor (330 mL) fyllda med 300 mL äppeljuice tillsattes stammarna A16:20, A3 och A6:10 till en slutlig koncentration av 10⁴ CFU/mL. Ofiltrerad och pastöriserad äppeljuice av sorten 'Aroma' användes för försöken. Äpplena hade odlats och skördats i närområdet där studien genomfördes och äppeljuicen processades på Balsgård Foodtech där den förvarades kyld i bag-in-box inför studien.

Flaskorna vortexades (IKA, MS2 Minishaker inställning 1400varv/min) och förslöts med jäslock som fylldes med destillerat vatten. Flaskorna placerades därefter mörkt i rumstemperatur ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) för fermentering. Samtliga flaskor, inklusive kontrollprovet A0 (ofermenterad äppeljuice), sattes i biologiska duplikat ($n=2$).



Figur 2. Fermenteringsuppställning. Fotograf: Philip Lavin.

Studiedesign

I detta arbete används en experimentell design där samtliga prov och mätningar genomförs i duplikat ($n=2$) eller triplikat ($n=3$) med ändamålsenlig utrustning. Om variationskoefficienten (CV) översteg 10% mellan tekniska replikat upprepades analysen.

Övervakning av fermenteringsprocessen

Fyra kemiska parametrar mättes enligt upprättat provtagningschema (*Bilaga 3*). Mätning av pH-värde och °Brix gjordes omedelbart i anslutning till att prover togs ut för analys. Prover till de övriga analyserna frystes in och analyserades vid ett senare tillfälle.

pH-värde

Koncentrationen vätejoner mättes med pH-mätare (Bergman & Beving, PHM 92 LAB pH meter) som kalibrerades med känd buffert inför varje analys.

Provstorleken var 5 mL och samtliga mätningar utfördes i triplikat.

Totalsyrahalt

Totalsyrahalten analyserades genom automatisk titrering (SI Analytics, Titroline 7000), 0,5 mL prov tillsattes till bägare med 25 mL destillerat vatten och placerades i titreringsutrustningen. Därefter tillsattes 0,1M NaOH till dess att pH 8,1 uppnått enligt OECD:s riktlinjer för kvalitetstest av frukt och grönsaker. Resultatet redovisas som procent äppelsyra. Mätningarna utfördes i triplikat.

Löslig torrsubstans

Den lösliga torrsubstansen mättes med refraktometer (HANNA, HI96801 Refractometer) och presenteras som °Brix-värde. Refraktometern kalibrerades med destillerat vatten inför varje analys. Provstorleken var 1 mL och samtliga mätningar utfördes i triplikat.

Etanolhalt

Etanolhalten analyserades med gaskromatografi (GC). Provlösning tillreddes genom att 2,5 mL prov blandades med 0,2 mL 1-propanol och 2,3 mL destillerat vatten. Därefter injicerades ca 2 µL av provlösningen i gaskromatografen (Hewlett Packard, HP 6890 Series). Signalarean för etanol respektive propanol avlästes och kvoten beräknades enligt följande formel: $\text{signalarea etanol} / \text{signalarea propanol} = \text{kvot} * 2$. Kvoten multiplicerades med två eftersom proverna var spädda till hälften. Kvoter för referenslösningar med känd etanolhalt (1%, 2%, 4% och 6%) tillhandhålls av O. Persson (personlig kommunikation, 4

maj 2021). Kalibreringslösningarnas kvoter plottades i ett linjediagram till en kalibreringskurva. Trendlinjens ekvation användes därefter för att bestämma etanolhalten (volymprocent, %) i proverna. Samtliga mätningar utfördes i duplikat.

Aromämnen

Prover skickades till företaget e-Sense AB i Uppsala för analys av enskilda aromämnen med gaskromatograf, Micro 2xGC/FID (Alpha-Mos, Hercales 2). Ett antal arom-attribut analyserades varav fyra redovisas utifrån relevans gällande smak och arom. Mätningarna utfördes i triplikat.

Sensorisk analys

Den sensoriska analysen genomfördes med en expertpanel bestående av sex personer. Testet genomfördes på Högskolan Kristianstads sensoriska laboratorium. Tillvägagångssättet var inspirerat av det sensoriska test som presenterats i en studie av Ye et al. (2014). Urvalet av panelmedlemmar gjordes genom ett bekvämlighetsurval och bestod av lärare samt tidigare och nu studerande studenter vid Gastronomiprogrammet. Alla deltagare har tidigare erfarenhet från sensorisk analys, välutvecklade smaksinnen och god vana vid att uttrycka sig i skrift kring doft- och smakupplevelser. Testet utformades i datorprogrammet EyeQuestion. Testet genomfördes i lokaler utformade enligt ISO 8589:2007 *Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms* (SiS, 2021).

Deltagarna samlades för en kortare genomgång av vad de skulle testa, att produkterna var opastöriserad och innehöll alkohol, att allt deltagande var fritt och att deltagarna när som helst kunde välja att, utan att uppge skäl, avbryta testet. Att deras uppgifter (namn) kunde komma att sparas under tiden som studien pågick

och att deras svar skulle avidentifieras och sammanställas i en kandidatuppsats. Paneldeltagarna tilldelades varsitt bås med dator, blankett om informerat samtycke, skrivblock, penna, spottkopp, vattenglas, rån för att neutralisera smaksinnet och samtliga produkter de skulle testa. Produkterna var kodade med en tresiffrig sifferkombination i randomiserad ordning enligt de föreskrifter som beskrivs av såväl Albinsson et al. (2017) som Lawless & Heymann (2016), och hade lock. De signerade blanketterna om informerat samtycke samlades in före testet påbörjades. Panelen bedömde intensiteten av doft och smak på förutbestämda attribut samt totalt gillande av produkterna. Skalorna som användes vid intensitetsmätningen gick från 0–100 med markeringar vid 10 och 90. Enligt Lawless & Heymann (2016) medför dessa skalor att paneldeltagarna är mer benägna att utnyttja hela skalan vilket resulterar i mer adekvata bedömningar. Totalt gillande bedömdes på en hedonisk skala med nio steg från ”Tycker extremt illa om” till ”Tycker extremt bra om”. För att paneldeltagarna skulle kunna välja alternativet att tycka varken bra eller illa om sattes ”Tycker varken bra eller illa om” på mitten av skalan. Totalt bedömde panelen sju produkter i duplikat. På grund av ekonomiska förutsättningar begränsades den sensoriska och aromämnesanalysen till två provtagningsstillfällen, dag 3 och dag 7.

Statistisk analys

Rådata från de mikrobiologiska och kemiska mätningarna behandlades i programvaran Excel. Korrelationer (Pearsons korrelationskoefficient) mellan uppmätta egenskaper beräknades med Excel. För att analysera om det fanns signifikanta skillnader mellan de olika stammarna och den ofermenterade äppeljuicen med avseende på de olika egenskaperna genomfördes en envägs ANOVA (Analysis Of Variance).

Data från det sensoriska testet analyserades i verktyget EyeOpenR vilket är ett program integrerat med EyeQuestion. En tvåvägs ANOVA (Analysis Of

Variance) med Tukey's test användes för att identifiera eventuella signifikanta skillnader mellan medelvärdena för de olika attributen samt för det totala gillandet av produkterna. Felrisken (p-värde), dvs sannolikheten att ett resultat är slumpmässigt, sattes till 5% ($p < 0,05$).

Etiska överväganden

Studien är ett självständigt examensarbete utan någon koppling till uppdragsforskning och följer de riktlinjer om god forskningsetik, avseende öppenhet och objektivitet samt tillgänglighet av metod och resultat, enligt Vetenskapsrådet (2017). Dock finns det kopplingar till en privat uppdragsgivare som i ett pågående projekt isolerat de mikroorganismer som används i detta arbete samt bekostar aromanalyserna. Således finns ett visst kommersiellt intresse i arbetet. De resultat som framkommer kan medföra konkurrensfördelar för det privata företaget.

Den sensoriska analysen genomfördes med en expertpanel som togs ut genom ett bekvämlighetsurval där alla deltagare har koppling till Gastronomiprogrammet. Resultaten bör därför betraktas som indikationer och ej generaliserbara.

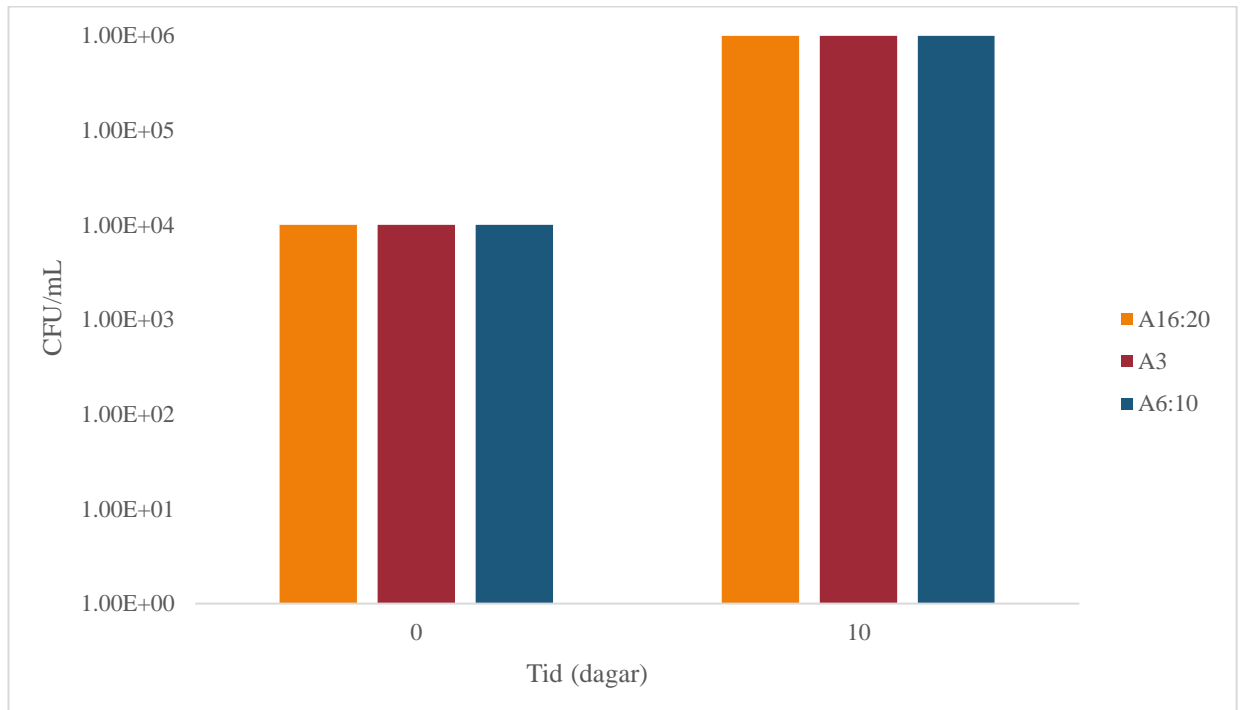
Deltagarna informerades när de tillfrågades om att vara med i testet att det var opastöriserade produkter och att de innehöll alkohol, således fick inte gravida eller personer under 18 år delta. Deltagarna informerades muntligt och skriftligt att de när som helst kunde välja att avbryta testet, utan att ange skäl samt att deras uppgifter så som insamlade data om kön, ålder med mera kan komma att sparas under projektets gång. Dessa sparas oidentifierade och utan någon koppling till personuppgifter. Det har inte samlats in några känsliga personuppgifter som kräver tillstånd enligt personuppgiftslagen (SFS 1998:204) eller identifierats några etiska komplikationer varken inför planering eller vid genomförande av studien.

Enligt Vetenskapsrådet (2017) kräver sådana komplikationer tillstånd i förhållande till etikprövningslagen (SFS 2003:460).

Resultat

Antalet jästceller

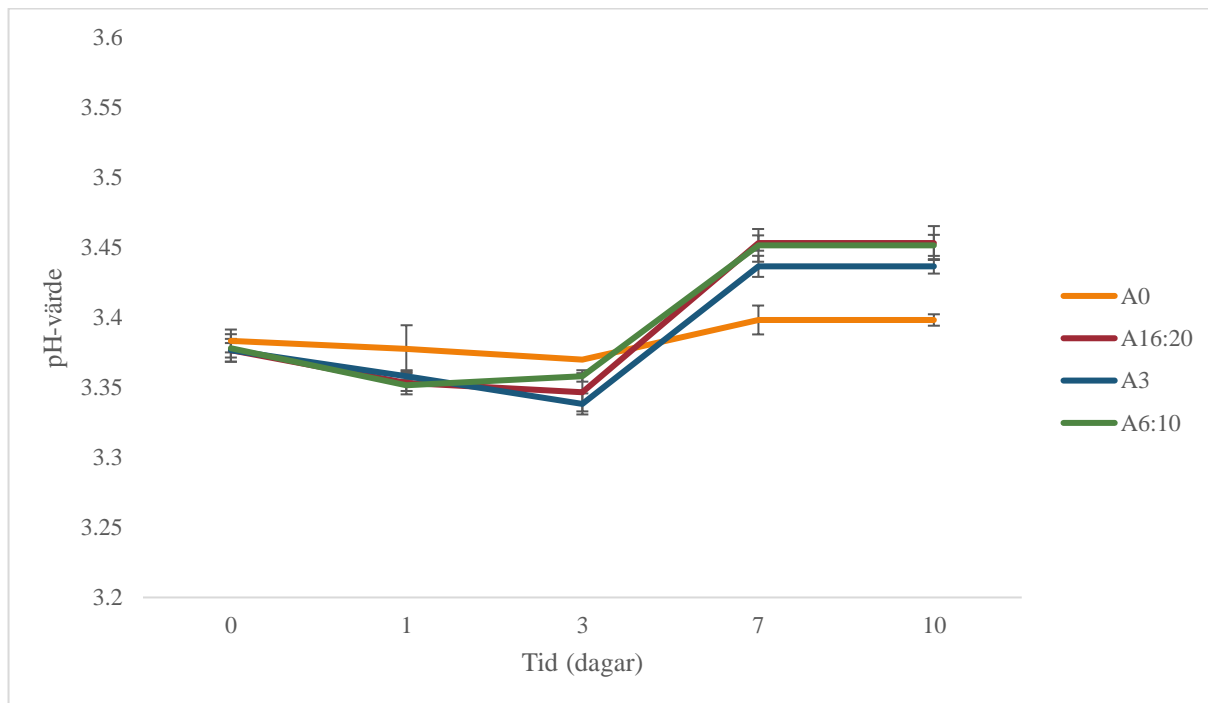
Figur 3 visar att mängden jästceller ökade efter fermentering under tio dagar. Från inokulering till dag tio ökade samtliga stammar med en faktor på 10^2 CFU/mL. Mängden jästceller bestämdes genom att räkna antalet celler i mikroskop (Bürkerskammare). I samband med antalsbestämning vid dag 10 kontrollerades även kontaminering. Vid dag 10 kunde stavformade bakterier ses i samtliga inokulerade prov.



Figur 3. Koncentrationen av jästceller vid inokulering av äppeljuice samt efter fermentering i tio dagar.

pH-värde

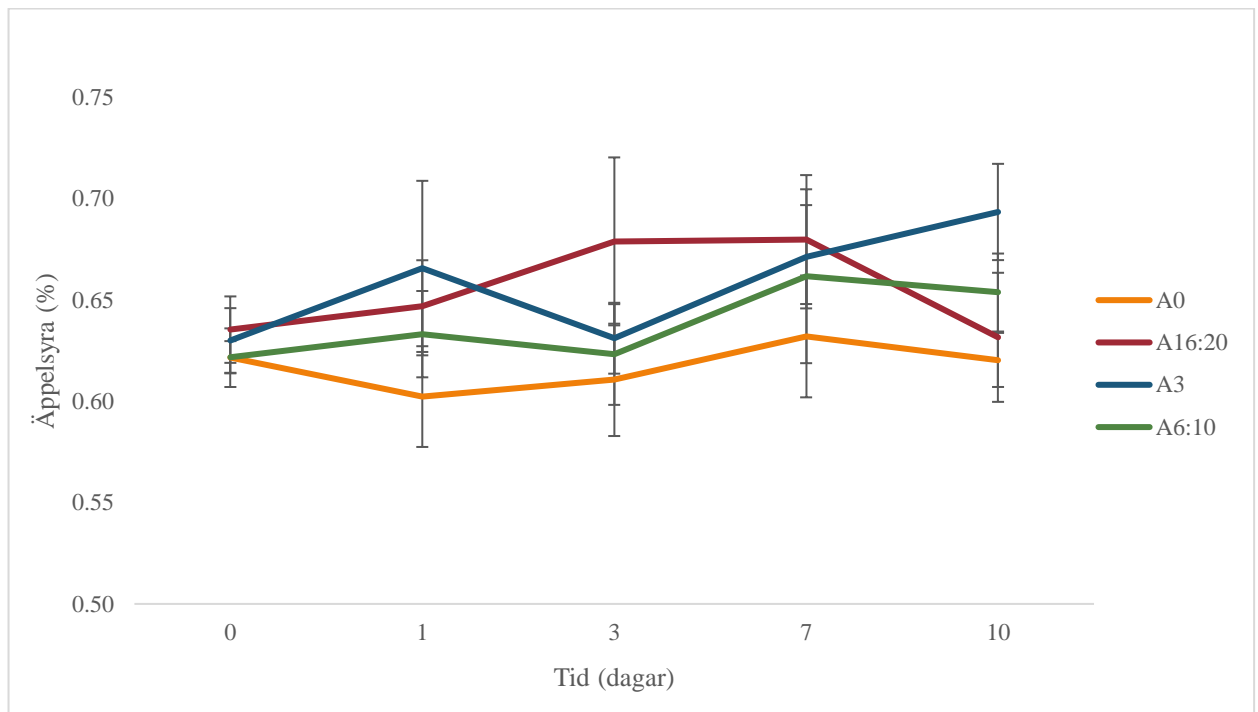
Vid dag 1 sjönk pH-värdet för samtliga stammar. Efter fermentering i tio dagar hade däremot pH-värdet höjts jämfört med den ursprungliga nivån (*Figur 4*) och den offermenterade äppeljuicen hade i princip oförändrat pH-värde under försöket.



Figur 4. Förändring av pH-värdet, presenterat som medelvärde och standardavvikelse för A0 (ofermenterad äppeljuice), A16:20, A3 och A6:10 (n=3).

Totalhalt syra

Totalhalten syra, presenterat som procent äppelsyra, varierade under fermenteringsprocessen (Figur 5). Analys med en envägs ANOVA visar att det finns en statistiskt säkerställd skillnad ($p=0,027$) mellan totalsyrahalten i fermenterad äppeljuice och ofermenterad äppeljuice. Däremot fanns det inte någon signifikant skillnad mellan stammarna. Det fanns inte heller någon korrelation mellan pH och totalhalt syra.

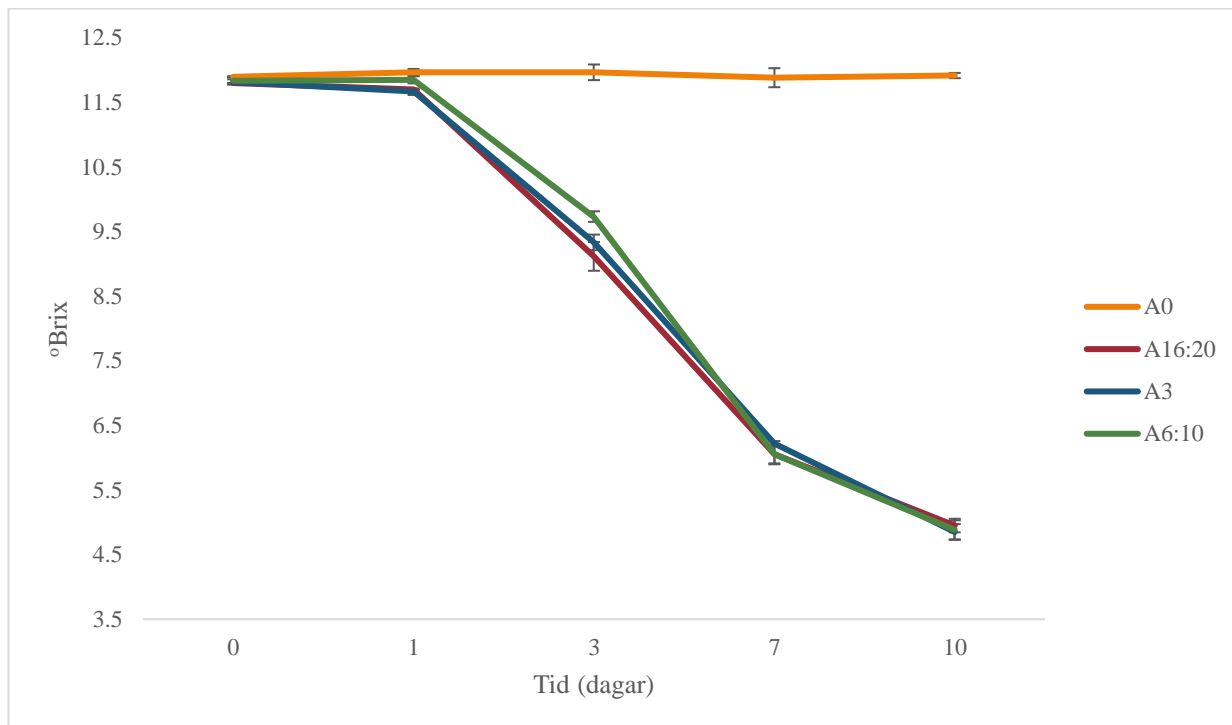


Figur 5. Förändringar i den totala syrahalten presenterat som procent äppelsyra. Data är presenterad som medelvärde och felstaplar representerar standardavvikelse för A0 (ofermenterad äppeljuice), A16:20, A3 och A6:10 (n=3).

Löslig torrsubstans

Löslig torrsubstans sjönk i alla inokulerade prover ju längre fermenteringen pågick (*Figur 6*). Förloppet var likartat för samtliga stammar efter en aklimatiseringsfas på ca en dag. Den ofermenterade äppeljuicen förändrades däremot ej.

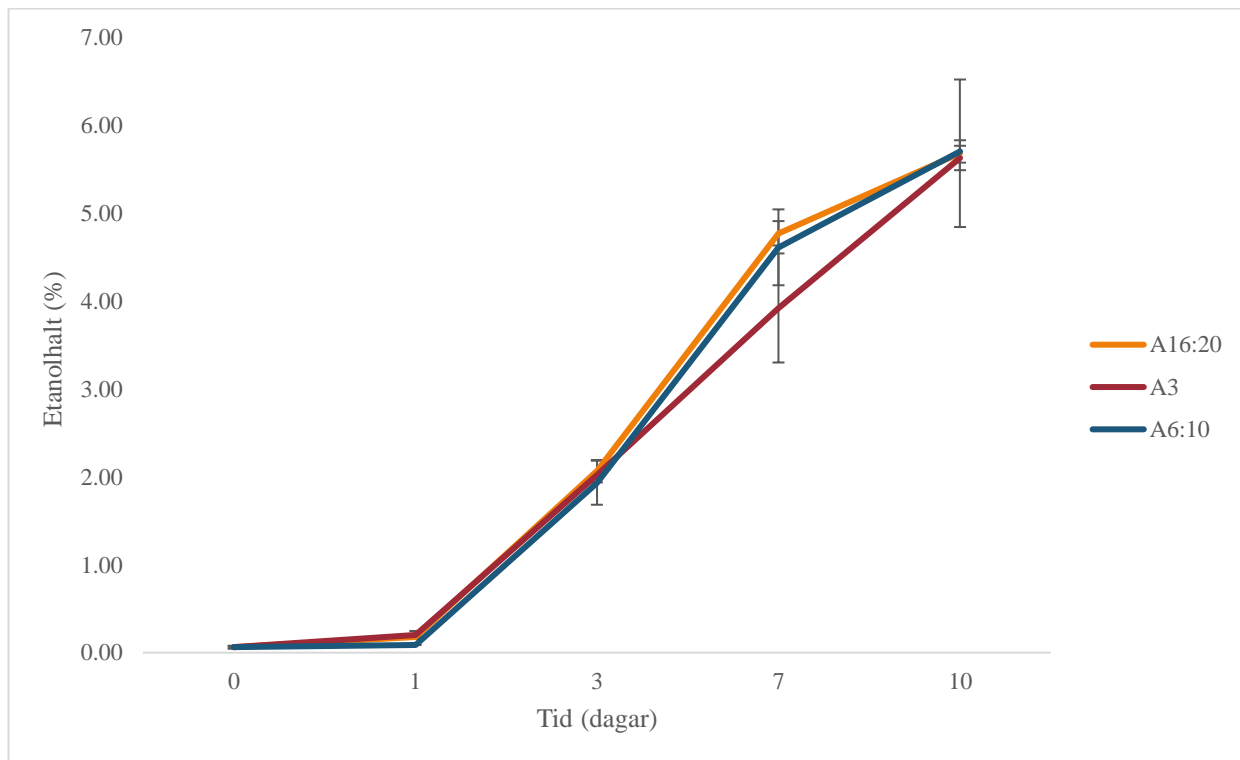
Korrelationsanalys (Pearsons korrelationskoefficient) visade ett starkt negativt samband mellan löslig torrsubstans och etanolhalt ($R^2=0,992$). Det vill säga i takt med att °Brix-värdet sjönk steg etanolhalten.



Figur 6. Förändring av löslig torrsubstans (°Brix-värde) redovisat som medelvärde och felstaplar representerar standardavvikelse för A0 (ofermenterad äppeljuice), A16:20, A3 och A6:10 (n=3).

Etanolhalt

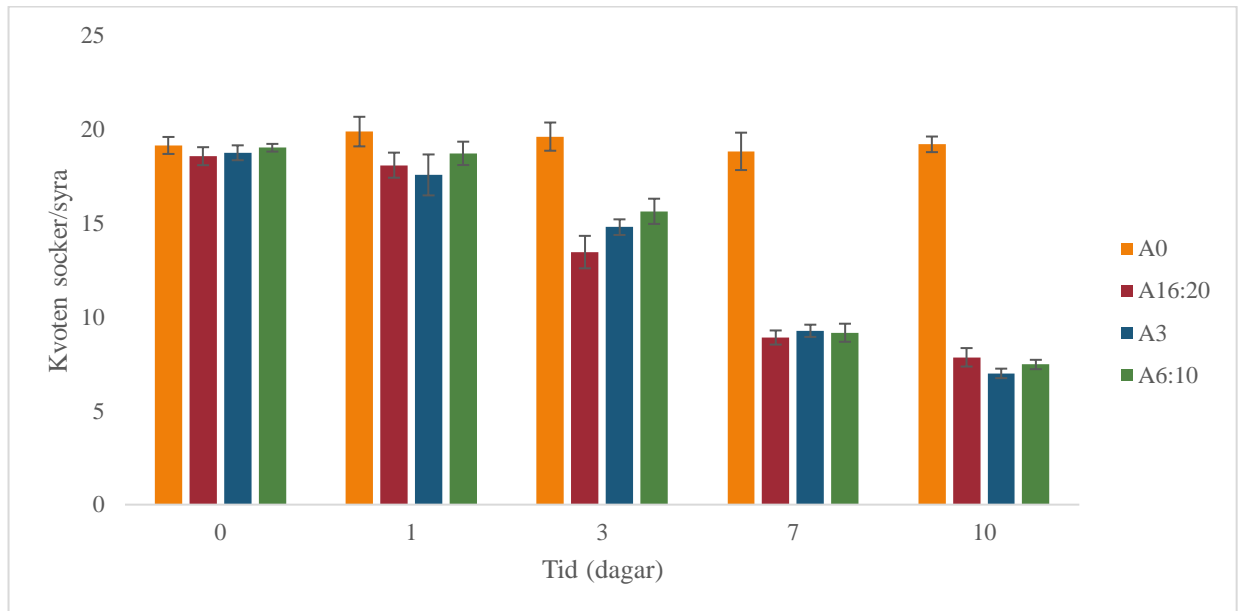
Analys med gaskromatografi visade att etanolhalten var som högst hos samtliga stammar dag tio, ca 5,7% (volymprocent). Av *Figur 7* framgår det att vid dag 7 hade A3 ett etanolinnehåll på 3,92% vilket skiljer sig från A16:20 (4,78%) och A6:10 (4,62%). Resultat från en envägs ANOVA visade att det inte fanns några signifikanta skillnader mellan stammarna med avseende på etanolutvecklingen sett över tio dagar.



Figur 7. Produktion av etanol (%) under tio dagar för stammarna A16:20, A3 och A6:10. Ofermenterad äppeljuice användes som nollprov. Mätningarna redovisas som medelvärde och felstaplarna visar standardavvikelse (n=2).

Kvoten socker/syra

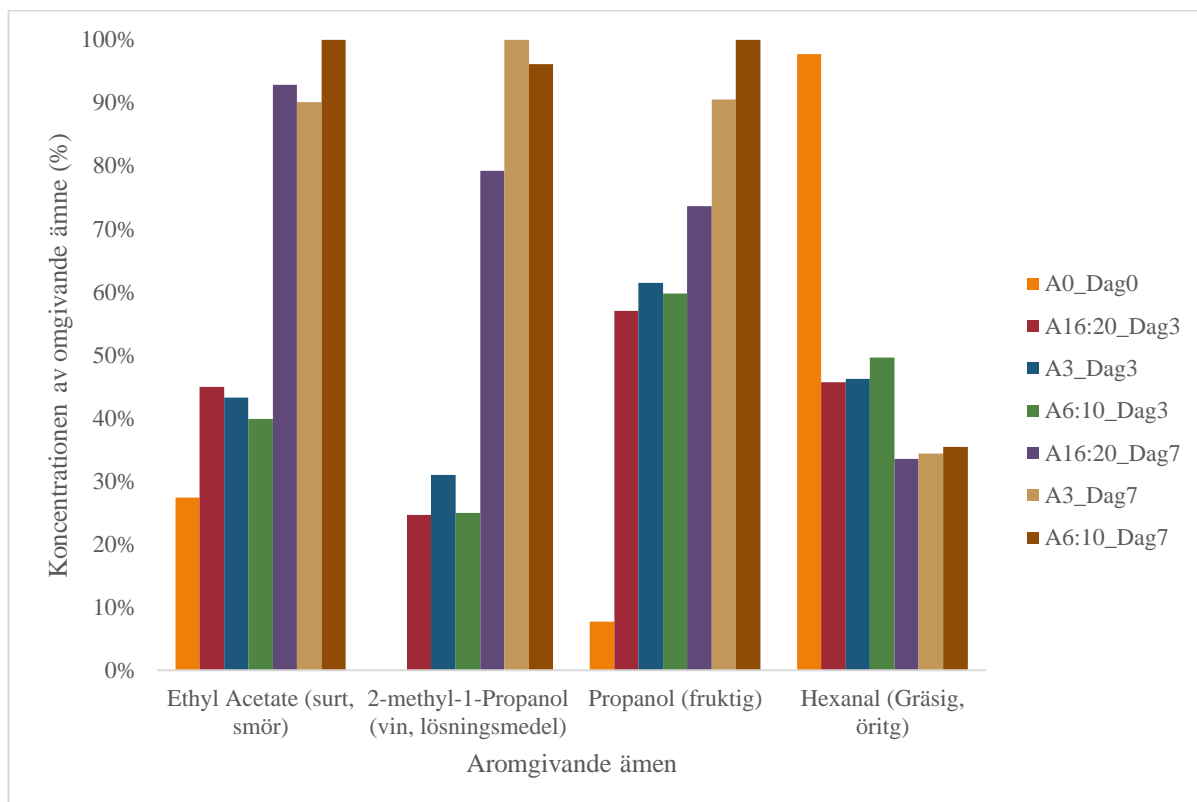
Kvoten socker/syra har betydelse för äppeldryckens upplevda smak. En hög kvot medför att drycken upplevs söt medan en låg kvot gör att drycken upplevs syrligare. Detta förklarar varför A0 (ofermenterad äppeljuice) upplevdes sötare än samtliga fermenterade prover i den sensoriska analysen (*Figur 11* och *Figur 12*). Vid jämförelse mellan de fermenterade proverna och de ofermenterade proverna kunde en markant skillnad i kvoten socker/syra ses efter dag tre (*Figur 8*). Resultatet från envägs ANOVA visade att det inte finns någon statistisk säkerställd skillnad mellan de olika jäststammarna.



Figur 8. Kvoten socker/syra presenterat som medelvärde med felstaplar (standardavvikelse) för A16:20, A3, A6:10 samt A0 (ofermenterad äppeljuice).

Aromämnen

Analys av fyra aromämnen visade att samtliga stammar följdes åt under fermenteringsförloppet och det kunde inte påvisas några signifikanta skillnader mellan stammarna (*Figur 9*). Propanol sticker ut med nästan 90%-ökning från ren äppeljuice (8%) och stammen A6:10 dag 7 (100%).

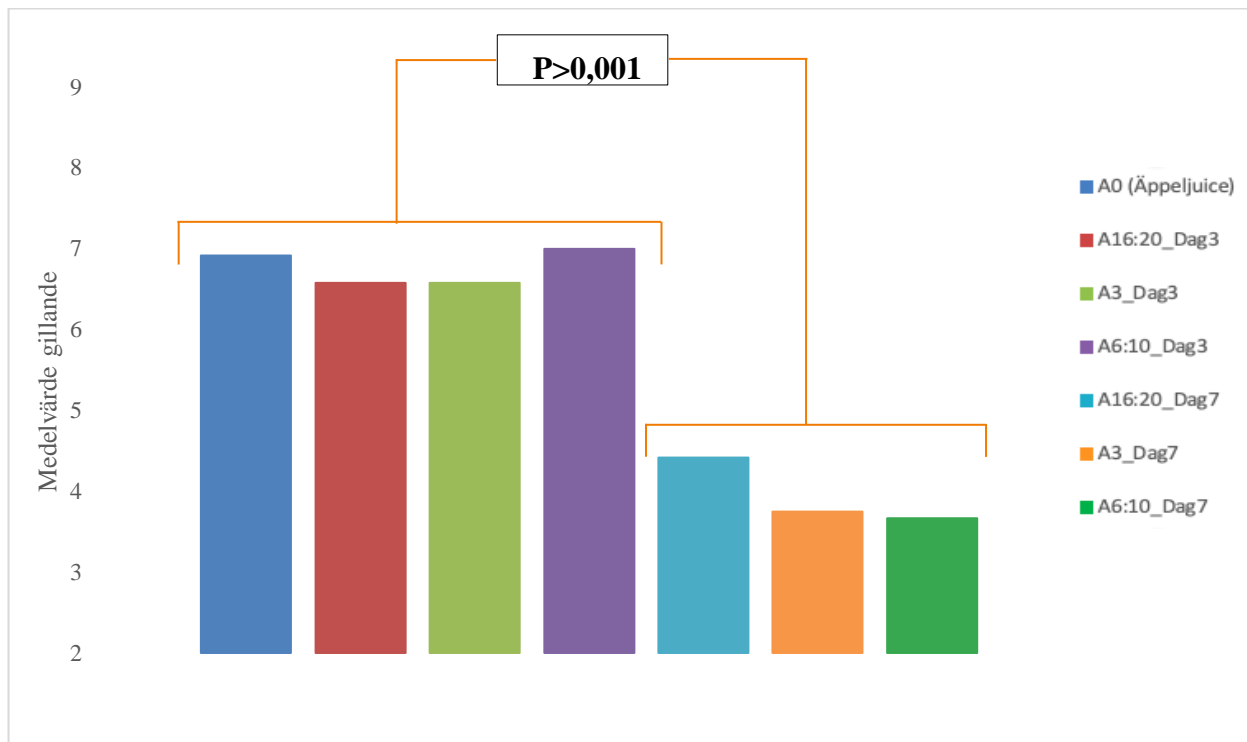


Figur 9. Utveckling av fyra aromämnen som förekom i högst koncentration i fermentat vid dag 3 och 7 jämfört med kontrollprovet dag 0 (A0).

Sensorisk analys

Totalt gillande

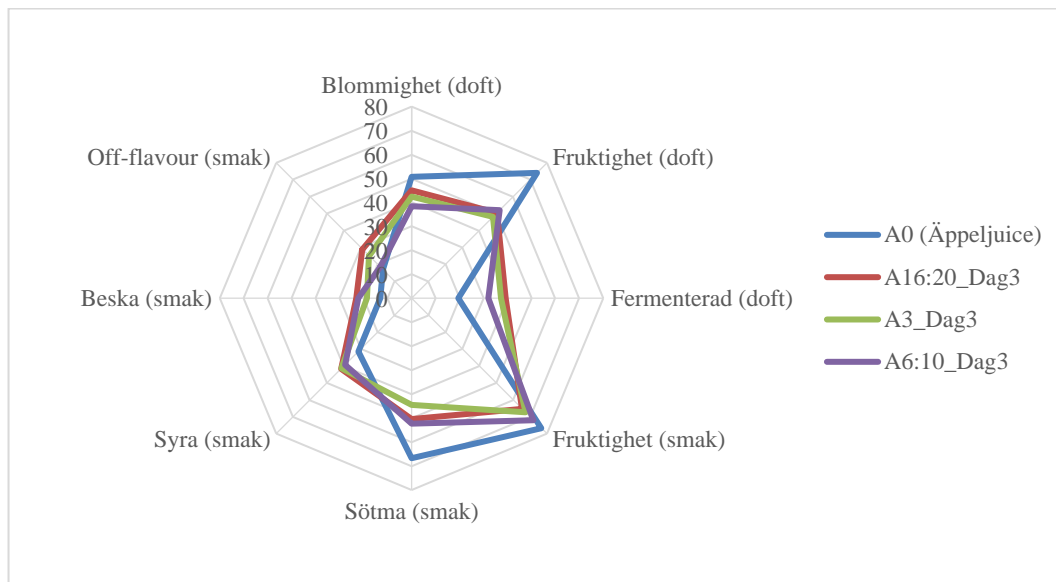
Resultatet visar att äppeljuice inokulerad med stam A6:10, fermenterad i tre dagar, gillades mest av expertpanelen medan A6:10, dag 7, erhöll lägst gillande (Figur 10). En tvåvägs ANOVA med Tukeys test visar att samtliga stammar vid dag 3, inklusive kontrollprovet A0, var signifikant skilda ($p > 0,001$) från samtliga stammar dag 7. Däremot var stammarna inbördes inte signifikant skilda ($p < 0,05$) ifrån varandra, varken vid dag 3 eller dag 7.



Figur 10. Jämförelse mellan kontrollprov och fermenteringar dag 3 och dag 7 för samtliga stammar. Redovisas som medelvärde och signifikans ($p < 0,01$) för totalt gillande mellan dag 3 och 7.

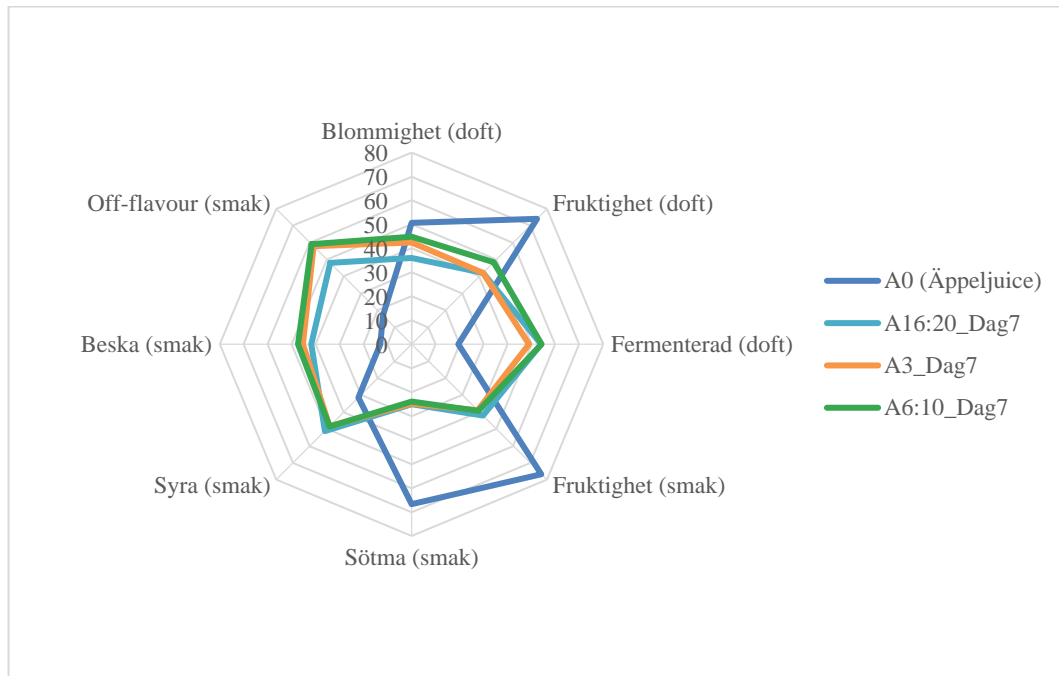
Enskilda sensoriska attribut

Av Figur 11 framgår det att samtliga stammar upplevdes något syrligare och mindre söta efter tre dagars fermentering. Samtliga stammar upplevdes då även dofta mindre fruktigt och mer fermenterat. Äppeljuice (A0) var signifikant skild ($p < 0,001$) från de tre stammarna avseende attributen fruktighet (doft) och beska (smak).



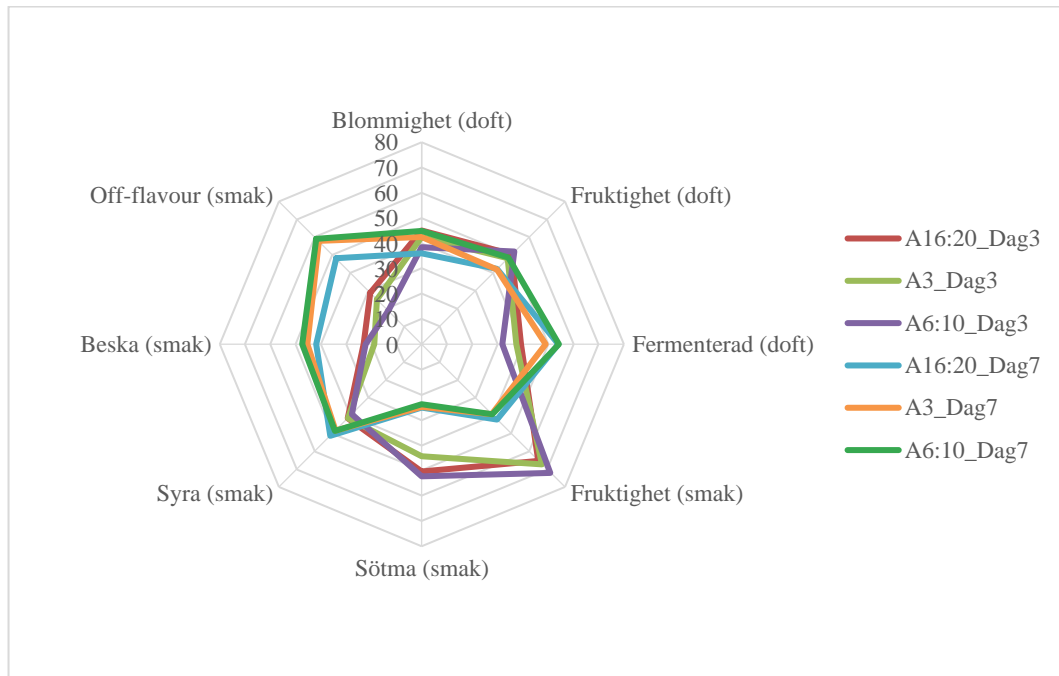
Figur 11. Medelvärde av intensiteten av respektive attribut för samtliga stammar vid dag 3 och A0 (ofermenterad äppeljuice).

Av *Figur 12* framgår det att efter sju dagars fermentering hade intensiteten av sötma minskat ytterligare och att drycken upplevdes allt syrligare. En kraftig höjning av den fermenterade doften och 'Off-flavour' kan också ses (*Figur 12*). Likaså ökade beskan och fruktigheten reducerades ytterligare i såväl doft som smak. Detta överensstämmer med resultatet av totala gillandet (*Figur 10*), som var låg för samtliga produkter vid dag 7.



Figur 12, visar medelvärden av intensiteten av attributen för samtliga stammar vid dag 7 och A0 (ofermenterad äppeljuice).

För att få en tydlig bild av hur de tre stammarna vid dag 3 skiljde sig från dag 7 med avseende på de sensoriska attributen sammanställdes de i ett spindeldiagram (*Figur 13*). Denna figur visar hur i princip samtliga attribut förändras likvärdigt under fermenteringsförloppet oavsett jäststam. Att en längre fermenteringstid ökar intensiteten av beska, 'Off-flavour' och fermenterad doft samt att fruktighet och sötma minskar framgår också.



Figur 13, intensiteten av smak- och doftattributen för samtliga stammar vid dag 3 och dag 7 redovisat som medelvärden.

I *Tabell 1* visas en sammanställning av resultaten för samtliga attribut och stammar vid dag 3 och dag 7 samt kontrollprovet (A0) jämförda mot varandra. Exempelvis framgår det att fruktighet (doft) i prov A0 skiljer sig signifikant från samtliga produkter inokulerade med olika jäststammar. Den fruktiga doften skiljer sig från alla stammar vid både dag 7 ($p < 0,001$) och dag 3 ($p < 0,05$). När det gäller fruktig smak är det också statistiskt säkerställt att A0 och samtliga stammar vid dag 3 skiljer sig åt från samtliga stammar vid dag 7. Däremot skiljer sig inte stammarna signifikant ifrån varandra, varken vid dag 3 eller vid dag 7 (*Tabell 1*).

Tabell 1. Medelvärde och standardavvikelse av expertpanelens bedömning av intensiteten per attribut. Varje produkt representeras av bokstäver (A-G). Signifikanta skillnader markeras med stor bokstav och efter signifikansnivå: A' (p<1%); A (p<5%). Intensitetsskala (0–100).

Attribut	A0 (Äppeljuice) (A)	A16:20ADag3 (B)	A3_Dag3 (C)	A6:10_Dag3 (D)	A16:20_Dag7 (E)	A3_Dag7 (F)	A6:10_Dag7 (G)
Blommighet (doft)	51±15	45±18	42±18	38±13	36±21	42±17	45±22
Fruktighet (doft)	74±14 BCDEF'G	50±15	48±23	52±10	42±10	42±14	49±16
Fermenterad (doft)	19±15	39±16	37±20	32±9	54±19 A	49±20	54±25 A
Fruktighet (smak)	77±15 E'F'G'	65±14 E'F'G'	67±13 E'F'G'	72±12 E'F'G'	42±14	39±10	39±9
Sötma (smak)	67±20 CE'F'G'	50±17 E'F'G'	44±18	52±15 E'F'G'	25±7	25±10	24±7
Syra (smak)	31±15	42±14	41±18	39±18	51±22 A	48±16 A	49±18 A
Beska (smak)	13±8	23±12	19±10	22±11	42±23 A'BC'D	45±20 A'BC'D'	47±21 A'B'C'D'
Off-flavour (smak)	17±12	29±12	25±12	19±10	48±18 A'CD'	58±21 A'B'C'D'	59±20 A'B'C'D'

Diskussion

Resultatdiskussion

Denna studie bevisar att vildjäst kan användas för att fermentera äppeljuice och visar att fermentering i tre dagar medförde högre gillande än fermentering i sju dagar för samtliga stammar. Efter fermentering i tre dagar erhöles likvärdig nivå för gillande som provet med enbart äppeljuice. På den hedoniska skalan med nio steg betyder detta värde (ca 7) att expertpanelen "Tycker bra om" samtliga stammar vid dag 3 medan de "Tycker något illa om" samtliga stammar vid dag 7. Vid dag 7 sågs en signifikant ($p < 0,001$) ökning av 'Off-flavours' för samtliga stammar. En tänkbar förklaring till detta, som styrks av aromanalysen (*Figur 9*) är att vid dag 7 hade samtliga stammar höga koncentrationer av estern etylacetat. Vid lägre koncentrationer menar Gutiérrez et al. (2018) att etylacetat kan bidra positivt till smakupplevelsen men vid höga koncentrationer, som vid dag 7, kan den ge upphov till en smak av lösningsmedel (acetone). Även alkoholen 2-metyl-1-Propanol (isobutanol) förekom i höga koncentrationer vid dag 7. Enligt Espino-Díaz et al. (2016) kan isobutanol ge upphov till angenäm smak men kan precis som etylacetat vid höga koncentrationer smaka lösningsmedel. Enligt Guiné et al. (2021) kan kvaliteten på cider höjas genom att tillsätta näring till äppeljuicen som gynnar jästtillväxten och minskar risk för bildandet av 'Off-flavours'.

Vid mikroskopering i fermenteringens slutskede kunde en kontaminering med stavformade bakterier noteras, som också skulle kunna ge upphov till 'Off-flavours' och därmed bidra till det erhållna resultatet. Enligt Hutkins (2019) är det främst bakterier som står för den mikrobiella förstörelsen av vin och cider. Det är i huvudsak två typer av bakterier som står för förstörelsen, ättiksyrabakterier och mjölksyrabakterier. Båda typerna kan tillväxa vid låga pH-värden (< 4) och vid

hög etanolhalt (Adams et al., 2016). De kan tillkomma via råvaran, hantering, utrustning eller insekter. Bra råvaror, goda hygienrutiner, adekvat utrustning är essentiellt för att minska risk för oönskad kontaminering men utgör inga garantier.

Vid tolkning av resultatet från den sensoriska analysen bör sammanhanget, till exempel rummet och atmosfären, också tas i beaktande (Stroebele och De Castro, 2004). Hade den sensoriska analysen i denna studie istället gjorts som vid ciderprovning där olika cider jämförs mot varandra hade produkterna kanske satts i ett mer adekvat sammanhang. De fermenterade produkterna jämfördes nu mot ofermenterad äppeljuice för att svara på frågan hur fermentering med de olika stammarna påverkar aromutvecklingen. Detta kan ha påverkat det erhållna resultatet beträffande produktens totala gillande. Enligt Lawless och Heymann (2016) spelar kontexten och miljön som produkterna testas i och förväntningarna hos paneldeltagarna in vid bedömning av gillande. Panelen informerades om att det var fermenterad äppeljuice de skulle testa.

Andra studier visar att vildjäst kan bidra till en mer komplex smakbild än komersiella jäststammar (Gutiérrez et al., 2018; Gamero et al., 2020; Ye et al., 2014). Paneldeltagarna i denna studie är vana vid beskrivande analys och inte acceptansbedömningar (Albinsson et al., 2017). Detta kan ha medfört att paneldeltagarna utgått ifrån äppeljuicen och deras uppfattningar om denna vilket applicerats på övriga bedömningar. Det kan innebära att produkterna givits ett lägre gillande än om det hade jämförts med en liknande produkt, exempelvis cider. I en fortsatt studie kan ett alternativ vara att jämföra de fermenterade produkterna mot produkter med likvärdigt alkoholinnehåll, till exempel köpt cider eller addera ett försöksled med en kommersiell stam. Utifrån dessa aspekter blir det tydligt att det finns en svårighet att jämföra med ofermenterad äppeljuice för att fånga gillandet av produkten. Det intressanta med att ha med den

ofermenterade äppeljuicen är dock att fermenteringsprocessen med avseende på förändringen i smak- och aromutveckling av råvara enkelt kan följas.

Då antalet bedömare i den sensoriska analysen var få (n=6) fördelade sig inte alla data normalt. Därför utfördes ett icke-parametriska test, R-index, i programvaran EyeOpenR för att undersöka förekomst av statistiskt säkerställda skillnader i resultaten. Society of Sensory Professionals (2021) menar att detta är en av de mest kraftfulla icke-parametriska testen. Resultatet överensstämde med den tvåvägs ANOVA med Tukeys test som utfördes i samma program och inkluderades därför inte i undersökningen.

Denna undersökning visar att de tre lokala jäststammarna av *S. cerevisiae* hade ett likartat fermenteringsförlopp med avseende på etanolhalten, pH- och °Brix-värdet. En viss fördröjning av fermenteringsprocessen kan finnas då uppodling utfördes i annat substrat, det vill säga att en viss lagfas säkert kan ses. Under denna fas repareras skadade celler, enzymsystem ställs om och cellerna ökar i storlek men antalet celldelningar är låg (Thourgaard et al., 2007). Hur lång lagfasen är beror på flera faktorer. Exempel på sådana faktorer är inneboende faktorer (intrinsic factors) som tillgänglig näring och pH-värde (Adams et al., 2016). Även om jästsvampar är syratoleranta trivs de bäst i pH-värde 4,5-6,0 (Adams et al., 2016). Enligt Cousins et al. (2017) har äppeljuice naturligt lågt pH-värde (3,0-3,5) vilket överensstämmer med denna undersökning. Den mindre ökning i pH-värde som noterats efter tre dagar kan möjligen bero på metabolisering av befintliga syror och bildandet av andra buffrande ämnen. Antalet tillsatta jästceller påverkar också fermenteringen. I den aktuella studien tillsattes jästceller i koncentrationer ca 10^2 färre/mL än vad som rekommenderas av Hutkins (2019). Det låga antalet jästceller kan förklara att fermenteringsprocessen kom igång först efter ett dygn.

Totalsyrhalten, presenterat som procent äppelsyra, varierade under fermenteringsförloppet. Prov inokulerat med stam-A3 uppvisade det högsta värdet

äppelsyra (0,695) efter fermentering i 10 dagar. Enligt Rumpunen (2015) är kvoten socker/syra viktig för dryckens smakprofil. Ye et al., (2014) beskriver hur en sänkning i totalsyran kan medföra en ökning av pH-värdet genom att jästen förbrukar syran. I denna studie skulle det förklara ökning i pH-värdet för stam A16:20. Däremot hade de andra stammarna en ökning i totalsyrahalt samtidigt som pH-värdet går upp. Detta skulle kunna tyda på en möjlig malolaktisk fermentering vilket behöver undersökas vidare.

Att använda lokala jäststammar kan medföra flera processmässiga och sensoriska fördelar såväl som utmaningar vid tillverkning av cider (Song et al., 2019; Gutiérrez et al., 2018). Exempelvis kan de ge upphov till ofullständig utjäsning vilket leder till alltför höga koncentrationer restsocker i produkten och för låg etanolhalt. Detta kan medföra sämre kvalitet och oönskade mikroorganismer kan tillväxa (Hutkins, 2019). Resultat från studien påvisar en konstant sänkning av °Brix-värdet från ca 12,0 vid Dag 0 till ca 5,0 vid sista mättillfället, dag 10 (*Figur 6*). Huruvida stammarna A16:20, A3 och A6:10 kan jäsa ut juicen till fullständig torrhet har inte studerats. Efter att fermentering startat har dock inga plåtår eller tecken på att fermentering avstannat påvisats. Hutkins (2019) menar att förmågan att jäsa ut substratet är en viktig faktor för att stammen ska kunna användas vid etanolverfermentering med endast en jäststam. Annars finns risk för efterjäsning eller att kontaminerande flora växer till vilket påverkar smak- och aromutveckling (Adams et al., 2016) . I en blandkultur kan stammen däremot fungera. Detta och stammarnas förmåga att jäsa ut substratet behöver studeras vidare.

En annan viktig egenskap vid bedömning av stammarnas fermenteringskapacitet är etanolproduktion. Etanolproduktion hämmar tillväxt av andra mikroorganismer och påverkar smakprofilen främst genom att förstärka andra aromämnen (Williams, 1974). Vid fermentering med *S. cerevisiae* förbrukas socker, och etanol och koldioxid bildas. Korrelationsanalys (Pearsons korrelationskoefficient)

visar ett starkt negativt samband ($R^2=0,992$) mellan variablerna °Brix och etanolhalt. När sockret minskade ökade etanolhalten vilket visade att stammarna som ingick i studien hade en mycket god fermenteringskapacitet.

Metoddiskussion

Studiedesign

Den studiedesign som låg till grund för det genomförda arbetet har arbetats ut med fokus på att undersöka om det fanns några skillnader mellan stammarna med avseende på fermenteringsförlopp och aromutveckling och smak, såväl sensoriskt som genom analys av aromämnen. För att undersöka eventuella skillnader stammarna emellan inokulerades de i juice av samma äppelsort med A0 (ofermenterad äppeljuice) som kontroll. Detta för att kontrollera och eliminera eventuella effekter av alternativa förklaringar till resultatet (Bryman, 2011).

Resultatet från studien indikerar att det ej var lämpligt att använda äppeljuice som kontroll i det sensoriska testet då äppeljuice och fermenterad äppeljuice är olika produkter. Däremot fungerade ren äppeljuice bra som kontroll för att tydligt se förändringar av produkten både kemiskt och sensoriskt.

Fermenteringsprocessen

Det visade sig vara svårt att föröka upp de isolerade stammarna till en koncentration som förespråkas av bland andra (Hutkins, 2019). Enligt Thermo Fischer Scientific (2021) kan cellsuspensionen koncentreras genom att centrifugera ner provet. Exempelvis hade 100 mL cellsuspension med OD 1,0 kunnat centrifugeras ned till 1 mL inokulum. På så vis hade den rekommenderade koncentrationen CFU/mL kunnat uppnås.

Allt arbete med mikroorganismer kräver god hygien. Vilket kontamineringen med bakterier visade. Här krävs förmodligen flera åtgärder, dels bättre kontroll på isolaten och dels på hantering av utrustning och prover. Kontamination under försökets gång och den låga inokuleringshalten kan ha bidragit till bakterietillväxt. I kommande studier bör också produktstabiliteten kontrolleras samt en renhetskontroll och artbestämning göras vid fermenteringens slut.

Sensorisk analys

Denna undersöknings definition av sensorik har utgått ifrån Lawless och Heymanns (2016) samt Albinsson et al. (2017). Hur produkterna upplevs genom hörsel, känsel och syn har dock exkluderats från testet då det anses sakna relevans för studiens syfte och omfattning. Således menas med sensorisk profilering hur produkterna upplevs och gillas genom doft och smak. Testet som använts i studien är ett beskrivande test med inslag av acceptanstest inspirerat från ett test presenterat i en studie av Ye et al. (2014). Testet utformades som en förenklad variant av hur ett beskrivande test bör utformas enligt Lawless & Heymann (2016). I ett kvantitativt beskrivande test genomgår panelen träning där de gemensamt tar fram de attribut som de anser karakteriserar produkten. Därefter kalibreras de för att kunna göra repeterbara bedömningar. För att passa studiens omfattning, budget och den rådande Covid-19 situationen samlades istället en expertpanel för att bedöma på förhand utvalda attribut, framtagna av författaren och handledare (Kimmo Rumpunen) med utgångspunkt i Agrosopes aromhjul för sensorisk bedömning av äppeljuice och cider (Agroscope, 2021). För att få så högkvalitativa data som möjligt inkluderades först och främst grundsmakerna i testet då dessa inte kan feltolkas i samma utsträckning som exempelvis attributet fruktighet eller blommighet. Testpanelen har således inte rekryterats och tränats enligt ISO 8586:2014 (SiS, 2021), vilket kan påverka resultatet.

Vid fortsatta studier med vildjäst bör det utföras ett beskrivande test med en tränad sensorisk panel för att ta fram en mer adekvat sensorisk profilering av de enskilda stammarna (Lawless & Heymann, 2016).

Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap

Resultatet från denna undersökning visar att det finns potential i de isolerade stammarna av *S. cerevisiae* och deras användning i syfte att ta fram produkter med unik, lokal, smakprofil. Produktutvecklare och entreprenörer letar ständigt efter nya sätt att skapa produkter med mervärde. Fermentering ger även upphov till produkter med lång hållbarhet. Ett sätt att tillvarata den frukt som inte anses hålla kvaliteten för att säljas i dagligvaruhandeln skulle kunna vara att ta fram fermenterade drycker baserade på stammarna i denna studie, t.ex. genom att bryta fermentering vid önskad smak och arom. Eventuellt svinn skulle på så sätt kunna förädlas till nya produkter utan tillsats av onödiga aromer. På så vis skulle ett nytt sortiment av lätt fermenterade fruktjuicer och mindre söta måltidsdrycker kunna tas fram.

Slutsats

Studien visar att 1) de tre undersökta jäststammarna påverkar fermenteringsförlopp, arom- och smakutveckling på ett likartat sätt, 2) en kort fermenteringstid ger högre gillande, 3) en längre fermenteringstid medför ämnen i höga koncentrationer som bidrar till ”Off-flavours”, 4) efter fermentering i tre dagar är gillandet på samma nivå som enbart äppeljuice vilket talar för att begränsad fermentering med viss sockerreducering kan ge intressanta alkoholsvaga måltidsdrycker. Resultatet från studien utfördes enbart på äppeljuice av sorten ’Aroma’ inokulerad med tre lokala jäststammar av *S.*

cerevisiae. Resultatet kan därför inte generaliseras till andra äppelsorter eller andra jäststammar av *S. cerevisiae* som använts i liknande undersökningar.

Litteraturförteckning

- Adams, M., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016). *Food microbiology* (Vol. 4). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Agroscope. (30 april 2021). *Flavour Wheel*.
<https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/en/home/topics/food/wine-distillate/extension-beverages-distillate/flavour-wheels.html>
- Al Daccache, M., Koubaa, M., Maroun , R., Salameh, D., Louka, N., & Vorobiev , E. (den 13 Agusti 2020). Impact of the Physicochemical Composition and Microbial Diversity in Apple Juice Fermentation Process: A Review. *Molecules*, 25(3698), ss. 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules25163698>
- Albinsson, B., Wendin, K., & Åström, A. (2017). *Handbook on Sensory Analysis*. (P. O'Malley, Övers.) Kristianstad: Kristianstad University Press 2017:9.
- Bruker Daltonics GmbH. (2008). *Microflex™ User Manual*. https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/sites.udel.edu/dist/b/702/files/2015/12/microflex-User-Manual-1-2_2008-08-29-1xim3le.pdf
- Bryman, A. (2011). *Samhällsvetenskapliga metoder*. Stockholm: Liber.
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, R., & Romano, P. (den 4 November 2014). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as a source of biodiversity for the selection of starters for specific fermentations. *BIO Web of Conferences*, 3, ss. 1-6.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302003>
- Carrau, F., Boido, E., & Dellacassa, E. (2017). Yeast Diversity and Flavor Compounds. i J.-M. Mérillon, & K. Ramawat, *Fungal Metabolites* (ss. 569-597). Yeast Diversity and Flavor Compounds: Springer, Cham.
- Chen, C., Lu, Y., Yu, H., Chen, Z., & Tian, H. (Februari 2019). Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice. *Food Bioscience*, 27, ss. 30-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_32.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.11.006>

- Clark, D., Wallace, R., & David, J. (November 1954). Factors Affecting the Fermentation of Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, ss. 344-348.
- Cousin, F. J., Le Guellec, R., Schlüsselhuber, M., Dalmaso, M., Laplace, J.-M., & Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms*, 5(4), s. 39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030039>
- de Souza Neves Ellendersen, L., Granato, D., Bigetti Guergoletto, K., & Wosiacki, G. (Augusti 2012). Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), ss. 475-485. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100136>
- dos Santos, E., Mongrue, C., Pietrowski, G., Braga, C., Rossi, M., Ninow, J., . . . Nogueira, A. (den 8 April 2015). Apple Aminoacid Profile and Yeast Strains in the Formation of Fusel Alcohols and Esters in Cider Production. *Journal of Food and Science*, 80(6), ss. C1170-C1177. <https://doi-org.ezproxy.hkr.se/10.1111/1750-3841.12879>
- Espino-Díaz, M., Sepúlveda, D., González-Aguilar, G., & Olivas, G. (December 2016). Biochemistry of Apple Aroma: A Review. *Food Technology & Biotechnology*, ss. 375-397. doi: 10.17113/ftb.54.04.16.4248
- Folkhälsomyndigheten. (23 maj 2021). *Nationella allmänna råd och rekommendationer för att minska spridningen av Covid-19*. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittydd-beredskap/utbrott/aktuella-utbrott/covid-19/skydda-dig-och-andra/rekommendationer-for-att-minska-spridningen-av-covid-19/>
- Gamero, A., Dijkstra, A., Smit, B., & de Jong, C. (den 11 Maj 2020). Aromatic Potential of Diverse Non-Conventional Yeast Species for Winemaking and Brewing. *Fermentation*, 6(2), s. 50. doi:10.3390/fermentation6020050

- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (den 29 April 2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *9*, ss. 292-302.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- Guiné, R., Barroca, M., Gonçalves, F., Alves, M., Oliveira, S., & Mendes, M. (den 25 Januari 2021). Apple Fermented Products: An Overview of Technology, Properties and Health Effects. *Processes*, *2*, s. 25.
<https://doi.org/10.3390/pr9020223>
- Guo, J., Yue, T., & Yuan, Y. (den 6 September 2018). Impact of polyphenols on the headspace concentration of aroma compounds in apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi-org.ezproxy.hkr.se/10.1002/jsfa.9345>
- Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., & Katz, M. (den 14 September 2018). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, *124*(4), ss. 389-402. <https://doi.org/10.1002/jib.512>
- Hutkins, R. W. (2019). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. IFT Press.
- Jordbruksverket. (22 maj 2021). *Frukt. Antal företag, areal, skördad mängd. År 1999, 2002–2019. Län/riket*.
http://statistik.sjv.se/PXWeb/pxweb/sv/Jordbruksverkets%20statistikdatabas/Jordbruksverkets%20statistikdatabas_Tradgardsodling_Odling_Atb_ara%20vaxter/JO0102P5.px/table/tableViewLayout1/?rxid=5adf4929-f548-4f27-9bc9-78e127837625
- Lagen om etikprovning av forskning som avser människor (2003:460). Utbildningsdepartementet. https://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/lag-2003460-om-etikprovning-av-forskning-som_sfs-2003-460

- Lawless, H., & Heymann, H. (2016). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (Vol. 2). Springer.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (September 2016). The contribution of indigenous non-Saccharomyces wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, ss. 356-363.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
- Livsmedelsföretagen. (2019). *Dryckesbranschrapporten 2019: Med passionen som drivkraft*. www.livsmedelsforetagen.se.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Zapparoli, G. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider T volatile compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 99, ss. 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.075>.
- NNR - Nordiska ministerrådet. (2012). *Nordic Nutrition Recommendations*. 88. (5, Red.) Copenhagen: Nordic Council of Ministers.
- Nsogning Dongmo, S., Procopio, S., Sacher, B., & Becker, T. (Augusti 2016). Flavor of lactic acid fermented malt based beverages: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 54, ss. 37-51.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.017>
- Nypelius, M., & Sjöström, K. (den 12 April 2019). *Cider Revolution! Din DIY-Guide till Cider och Pét-nat*. (H. Francke, Red.) Natur & Kultur.
- OECD, O. f.-o. (Oktober 2018). *OECD FRUIT AND VEGETABLES SCHEME. GUIDELINES ON OBJECTIVE TESTS TO DETERMINATE QUALITY OF FRUITS AND VEGETABLES, DRY AND DRIED PRODUCE*. Hämtat från [Oecd.org](https://www.oecd.org/agriculture/fruit-vegetables/publications/guidelines-on-objective-tests.pdf): <https://www.oecd.org/agriculture/fruit-vegetables/publications/guidelines-on-objective-tests.pdf> den 16 Maj 2021
- Personuppgiftslagen* (1998:204). Justitiedepartementet.
https://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/personuppgiftslag-1998204_sfs-1998-204

- Rumpunen, K. (2015). *Fakta om musttillverkning: Om enkla analyser för kvalitetssäkring av äppelråvara och äppelmust*. Centrum för innovativa drycker.
- Rumpunen, K., Nybom, H., & Wendin, K. (2015). *Den skånska äppelmustens terroir*. LTV-fakultetens Institution för Växtförädling, SLU Alnarp.
- Sharma, P., Pushpa, D., & Pandey, P. (December 2014). Flavors of Apple Fruit—A Review. *Journal of Nutritional Ecology and Food Research*, 2(4), ss. 288-291. [https://doi: 10.1166/jnef.2014.1102](https://doi.org/10.1166/jnef.2014.1102)
- SiS - Svenska Institutet för Standarder, S. (den 16 Maj 2021a). www.sis.se. Hämtat från <https://www.sis.se/produkter/foretagsorganisation/foretagsorganisation-och-foretagsledning-ledningssystem/personaladministration/sseniso858622008/>
- SiS - Svenska Institutet för Standarder, S. (den 16 Maj 2021b). www.sis.se. Hämtat från <https://www.sis.se/api/document/preview/909357/>
- Society of Sensory Professionals. (den 19 maj 2021). www.sensorysociety.org. Hämtat från R-index in Sensory Evaluation: <https://www.sensorysociety.org/knowledge/sspwiki/Pages/R-index%20in%20Sensory%20Evaluation.aspx> den 19 maj 2021
- Song, N.-E., Jeong, D.-Y., & Baik, S.-H. (den 8 Oktober 2019). Application of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* to improve the black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) vinegar fermentation process and its microbiological and physicochemical analysis. *Food Science and Biotechnology*, 28(2), ss. 481-489. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0489-8>
- Stroebele, N., & De Castro, J. M. (September 2004). Effect of ambience on food intake and food choice. *Nutrition*, 20(9), 22. 821-838. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.05.012>

- Suárez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Lastra Queipo, A., & Mangas Alonso, J. (den 25 Augusti 2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). *Food Microbiology*, ss. 690-697.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.03.004>
- Suranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (Februari 2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), ss. 181-190.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>
- Svenska Insitutet för Standarder. (den 16 Maj 2021). www.sis.se. Hämtat från
<https://www.sis.se/api/document/preview/909357/>
- Sveriges Lantbruksuniversitet. (27 maj 2021). Härdiga must- och cideräpplesorter.
<https://www.slu.se/centrumbildningar-och-projekt/grogrund/projekt/framtidens-apple/>
- Szutowska, J. (den 1 Januari 2020). Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *European Food Research and Technology*, 246, ss. 357–372.
<https://doi:10.1007/s00217-019-03425-7>
- Thermo Fischer Scientific. (24 Maj 2021). *Concentrating cells. Protocol.*
<https://www.thermofisher.com/se/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/concentrating-cells.html>
- Thourgaard, H., Varlund, V., & Møller Madsen, R. (2007). *Grundläggande mikrobiologi med livsmedelsapplikationer.* (A. Blücher, Övers.) Studentlitteratur.
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (den 17 November 2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), ss. 1-12. <https://doi:10.3390/beverages2040030>
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J., & Zhao, G. (2004). Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF*

THE INSTITUTE OF BREWING, 110, ss. 340-346.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00630.x>

Vetenskapsrådet. (2017). *God Forskningssed*. Vetenskapsrådet.

Williams, A. A. (September-Oktober 1974). FLAVOUR RESEARCH AND THE CIDER INDUSTRY. *Journal of The Institute of Brewing*, 80, ss. 455-470.

<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb06795.x>

Ye, M., Yue, T., & Yuan, Y. (den 1 September 2014). Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation. *FEMS Yeast Research*, 14, ss. 873–882.

<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12175>

Bilagor

Bilaga 1. Informerat samtyckesblankett

Informerat samtycke

Att delta i detta sensoriska test innebär att du helt frivilligt deltar i undersökningen som görs, att du blivit muntligt informerad om eventuella risker med produkterna och dess ingredienser, att du när som helst och utan vidare förklaring kan avbryta din medverkan i undersökningen.

Jag har fått tillräckligt information om eventuella risker med produkterna som testas nedanstående datum och deltar i undersökningen av egen fri vilja.

DATUM: _____

Jag samtycker till delta i den sensoriska undersökningen enligt ovanstående:

JA NEJ

Datum och

underskrift

Nmnförttydligande

Bilaga 2. Sensoriskt test av fermenterad äppeljuice

Start Questions

Välkommen!

I detta test kommer du att dofta och smaka på sju olika fermenterade äppeljuicer. Produkterna är opastöriserade och innehåller alkohol. Är du gravid ska du avstå från att delta. Jag rekommenderar även att du spottar ut och inte sväljer provet efter att du smakat!

Du kommer att bedöma intensiteten i doft och smak på förutbestämda attribut framtagna med hjälp av Aroma Wheel för äppelmust och cider samt bedöma gillandet av produkten i sin helhet.

Ta god tid på dig och kom ihåg att skölja med vatten och neutralisera smaklökarna med rån mellan proverna.

Allt deltagande är frivilligt och du kan när som helst, utan att ange skäl, avbryta testet. Du som testar kommer vara helt anonym och de svar du ger kommer att avidentifieras. Resultatet kommer att användas i mitt examensarbete och sammanställas i en kandidatuppsats.

Än en gång **STORT** tack för att du vill delta och hjälpa mig i mitt arbete!

Med vänlig hälsning,

Philip Lavin

Gastronomiprogrammet, Högskolan Kristianstad

1: **Kön:**

- Man
- Kvinna
- Annat

2: **Ålder:**

Design Questions

Du kommer nu att få produkt **\$\$code:product\$\$**. Innan du får nästa produkt ska du dofta och smaka. Neutralisera med rån och vatten.

Du ska nu börja **dofta** på produkten **\$\$code:product\$\$**

Placera sedan på skalan hur intensivt du känner doften av följande attribut.

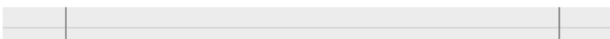
0 = du känner inte attributet alls.

100 = det doftar extremt mycket av attributet.

3: **Beskriv fritt vad du känner när du doftar på produkten:**

4: **Hur intensiv är doften av blommighet?**

Lite - Mycket



5: **Hur intensiv är doften av fruktighet?**

-

Lite Mycket

--	--	--

6: Hur intensiv är den fermenterade doften?

-

Lite Mycket

--	--	--

Du ska nu **smaka** på produkten.

Placera sedan på skalan hur intensivt du känner smaken av följande attribut.

0 = du känner inte attributet alls.

100 = det smakar extremt mycket av attributet.

7: Hur intensiv är smaken av fruktighet (äpple)?

-

Lite Mycket

--	--	--

8: Hur intensiv är smaken av sötma?

-

Lite Mycket

--	--	--

9: Hur intensiv är smaken av syra?

-

Lite Mycket

--	--	--

10: Hur intensiv är smaken av beska?

-

Lite Mycket

--	--	--

11: Hur intensiv är smaken av "Off-flavour"?

Lite - Mycket

--	--	--

12: Var god och ange vad du tycker om produkten i sin HELHET.

Tycker extremt illa om	Tycker mycket illa om	Tycker illa om	Tycker något illa om	Tycker varken bra eller illa om	Tycker något bra om	Tycker bra om	Tycker mycket bra om	Tycker extremt bra om
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

End Questions

Då var du färdig! OBS Glöm inte att trycka på **skicka!**

Stort tack för ditt deltagande!

Med vänlig hälsning,

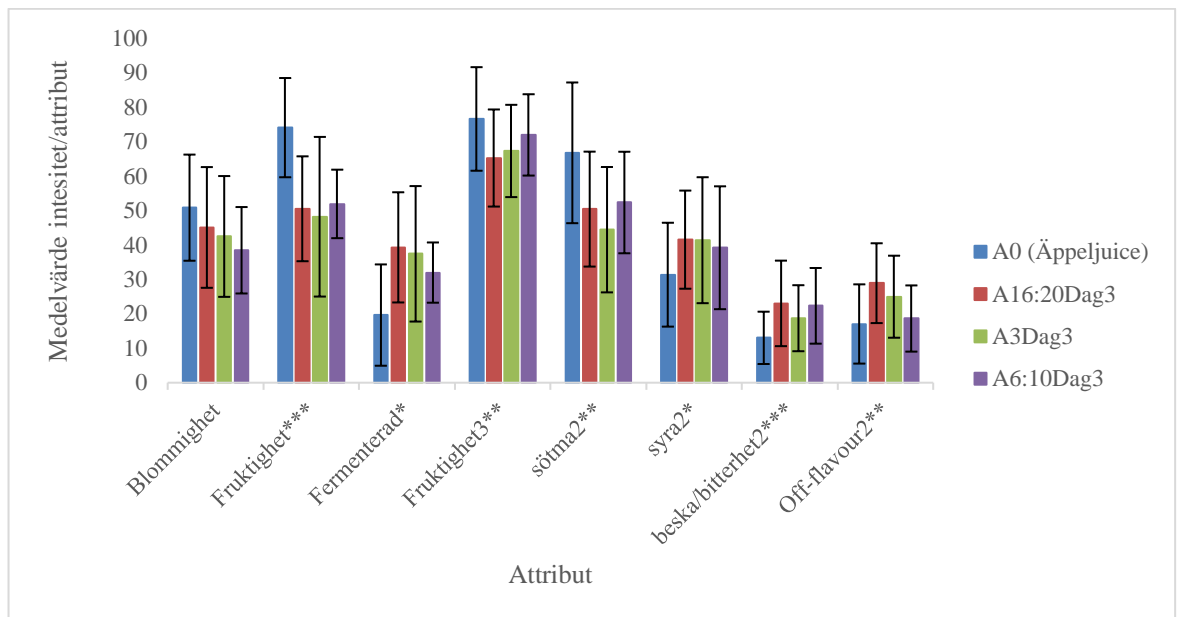
Philip

Bilaga 3. Provtagningschema

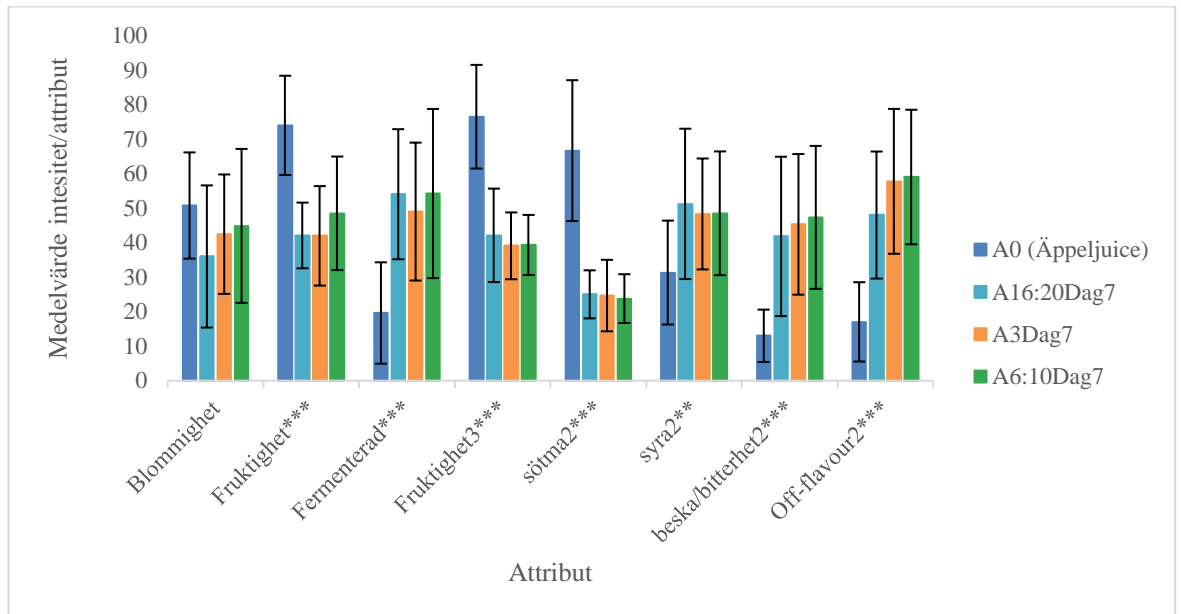
Tabell 1. Provtagningschema för kemiska-, mikrobiologiska och sensoriska analyser.

Mätningar	Dag 0	Dag 1	Dag 3	Dag 7	Dag 10
pH-värde	x	x	x	x	x
Brix	x	x	x	x	x
Titrerbar syra (TA)	x	x	x	x	x
CFU/mL	x				x
Etanolhalt	x	x	x	x	x
Aromgivande ämnen	x	x	x	x	x
Sensorisk analys	x		x	x	

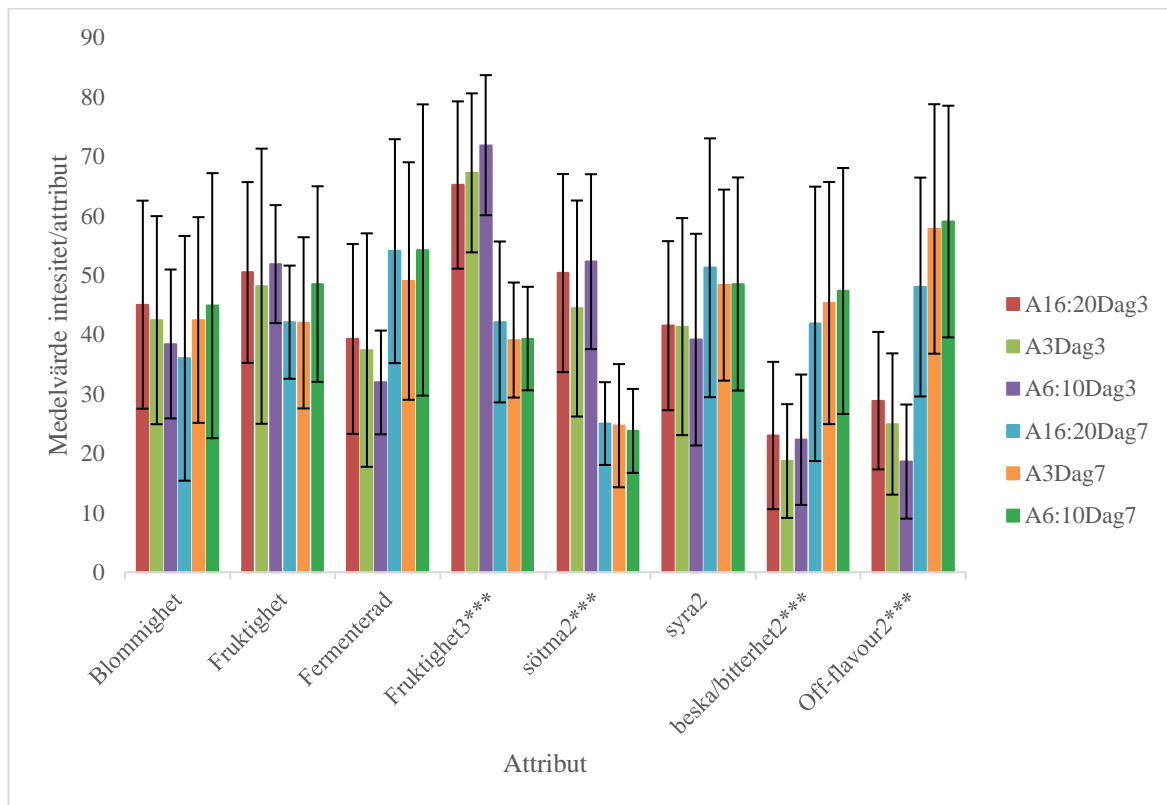
Bilaga 4. Enskilda sensoriska attribut



Figur 1. Medelvärdet av intensiteten av attributen för samtliga stammar vid dag 3 och A0 (ren äppeljuice). Felstaplarna visar standardavvikelsen.



Figur 2. Medelvärde av intensiteten av attributen för samtliga stammar vid dag 7 och A0 (ren äppeljuice). Felstaplarna visar standardavvikelsen.



Figur 3. Medelvärdet av intensiteten av attributen för samtliga stammar vid dag 3 och dag 7. Felstaplarna visar standardavvikelsen.