



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 2022
Fakulteten för naturvetenskap

Äppeljuice fermenterad med *Lactobacillus plantarum* 299v Temperaturens påverkan på utvecklandet av en drycks egenskaper

Nanna Nilsson

Författare

Nanna Nilsson

Titel

Äppeljuice fermenterad med *Lactobacillus plantarum* 299v

- Temperaturens påverkan på utvecklandet av en drycks egenskaper.

Engelsk titel

Apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* 299v

- The effect of temperature on the development of characteristics in beverage.

Handledare

Betty Collin lektor i Mikrobiologi vid Högskolan Kristianstad

Kimmo Rumpunen

Examinator

Stina-Mina Ehn Börjesson

Sammanfattning

Intresset för fermenterade produkter ökar hela tiden, både när det kommer till drycker och annan mat. Drycker kan fermenteras med olika mikroorganismer, som jäst och mjölksyrabakterier och väljs utifrån det medium som ska fermenteras och vilket slutresultat som eftersträvas. I denna studie har äppeljuice gjord på Ingrid-Marie äpple, fermenterats med mjölksyrabakterien *Lactobacillus plantarum* 299v under fem dagar i 20°C men vid två olika initiala fermenteringstemperaturer. Detta för att undersöka eventuella skillnader mellan kemiska, mikrobiologiska, sensoriska och aromutvecklande egenskaper som kan kopplas till starttemperaturen. Kemiska undersökningar och mätning av mikrobiologisk tillväxt gjordes på den ofermenterade äppeljuicen och de två fermenterade juicerna (två olika initiala temperaturer) och resultatet i studien visar icke signifikanta skillnader mellan kemiska egenskaper och koncentration av cellantal på de två initiala temperaturerna. I den sensoriska studien undersöktes endast den ofermenterade juicen och den juice som fermenterats vid initialtemperatur 30°C och resultaten visade på signifikant skillnad mellan dessa. Gällande aromutvecklande

egenskaper testades samtliga produkter och kunde påvisa signifikanta skillnader mellan de olika fermenteringstemperaturerna, samt den ofermenterade juicen.

Ämnesord

Fermentering, temperatur, *Lactobacillus plantarum*, äppeljuice, aromer.

Author

Nanna Nilsson

Title

Apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* 299v

- The effect of temperature on the development of characteristics in beverage.

Supervisor

Betty Collin Associate Professor in Microbiology at University of Kristianstad

Kimmo Rumpunen

Examiner

Stina-Mina Ehn Börjesson

Abstract

The interest in fermented products is growing, both drinks and other foods. Drinks can be fermented with different types of microorganism, such as yeast and lactic acid bacteria. The fermentation medium is strongly depended on the chosen type of microorganism and the wanted end result. In this study, apple juice from Ingrid-Marie apples was fermented with the lactic acid bacterial strain *Lactobacillus plantarum* 299v during five days at 20°C but at two different initial temperature of fermentation. Aiming to ensure possible differences of significant between chemical, microbiology, sensory and aroma development attributes that can be connected to the two different initial temperature. Analysis on differences in chemical attributes and microbiological growth between the non-fermented and fermented juice in two initial temperatures was done. The results showed non-significant differences between chemicals attributes and concentration of cell numbers. Sensory attributes show significant differences between non-fermented and fermented juice at initial temperature 30°C. Differences in aroma development attributes were tested in all the products and shows significant differences between the different temperatures of fermentation and non-fermented juice.

Keywords

Fermentation, *Lactobacillus plantarum*, apple juice, aromas, temperature.

Förkortningar och ordförklaringar

Aerob tillväxt: Tillväxt i miljö med syre närvarande.

Aerotolerant: Har skydd mot reaktiva syremolekyler.

Anaerob tillväxt: Tillväxt i miljö utan syre närvarande.

Brix: Enheten för löslig torrs substans och beskriver oftast mängden sockerarter. Mäts med refraktormeter.

GC: Gaskromatografi. Kemisk metod för att mäta flyktiga ämnen.

Fermentering: En metabol process där en organisk förening omvandlas till fermenteringsprodukt, exempelvis alkohol och syror. Organiska materialet fungerar både som elektrondonator och elektronmottagare

OD: Optisk densitet. Används för att mäta hur mycket ljus ett ämne absorberar och därmed mängden celler i ett prov.

Off-flavor: Smaker och aromer som bidrar negativt till en produkt.

pH: Logaritmisk mått på surhet som ger koncentrationen av vätejoner i en lösning.

Titring: Kemiskt metod för att mäta koncentrationer av ämne. Exempelvis koncentrationen syra.

Förord

Intresset för fermenterade produkter ökar bland konsumenter, både gällande mat och dryck. Fermenterade drycker har olika karaktäristiska drag vilka till viss del beror på vilka mikroorganismer som låtit fermentera drycken, exempelvis om det är bakterier eller jästsvampar. Som en följd av fermentering kan drycken bära på möjliga hälsofrämjande egenskaper men även tilltalande attribut i form av smak, doft, munkänsla samt angenäma aromämnen.

I denna experimentella studie jämfördes utvecklingen av aromer hos äppeljuice som fermenterats med *Lactobacillus plantarum* stammen 299v. Studien undersökte fermenteringen i två olika initiala temperaturer; den ena 30°C de första 12h för att sedan fermenteras i 20°C under resterande fem dagar, och den andra fermenteras under 20°C under de fem dagarna. Den kemiska, mikrobiologiska och sensorisk utvecklingen analyserades i juicerna.

Skrivandet av examensarbetet har varit extremt utmanande men även extremt roligt. Jag har utvecklats mycket genom att skriva ett individuellt arbete och insett hur mycket jag trivs med att arbeta med den naturvetenskapliga delen av mat. Tack Betty för all hjälp i laboratoriet och i skrivprocessen, utan din hjälp hade det varit svårt för mig att komma fram till ett fullständigt examensarbete. Tack Viktoria för stöttning när arbetet inte riktigt gick som jag hade tänkt mig i början, tack Marcus för all hjälp i sensoriklaboratoriet och tack Kimmo för den initiala idén, bekostnad av aromanalysen samt materialet som varit huvuddelen i hela arbetet.

Jag har mycket att tacka Gastronomiprogrammet, för all kunskap jag tar med mig till framtida studier och jobb, lärarna som gjort varje kurs rolig och utmanande samt klasskamrater som gjort dessa tre åren extremt roliga. Lite extra speciella är de vännerna jag lärt känna och som jag vet kommer vara mina vänner för resten av livet.

Nanna Nilsson, vårterminen 2022

Innehållsförteckning

Förord	7
Inledning	9
Syfte	10
Frågeställningar	10
Litteraturgenomgång	12
Äpple som råvara	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v.....	13
Fermentering	13
Aromer innan och efter fermentering.....	15
Sensorisk analys	16
Material och metod	17
Litteratursökning	17
Studiedesign och upplägg.....	17
Bakteriestam och preparering av fermenteringsflaskor.....	18
Kemiska analyser	19
pH-värde	19
Titrerbar syrahalt	19
Etanolmätning.....	19
Aromanalys	19
Sensorisk analys	20
Statistisk analys	20
Etiska övervägande	21
Resultat	22
Fermenteringsprocess.....	22
pH.....	22
Brix.....	23
Titrerbar syra	23
Etanolmätning	23
Aromanalys	24
Sensorisk analys	24
Diskussion	25
Resultatdiskussion.....	25
Metoddiskussion.....	29
Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap.....	31
Slutsats	31
Referenser	32

Inledning

Äpple odlas globalt och är en uppskattad frukt i hela världen, inkluderat Sverige och 2020 skördades nästan 30 000 ton äpple av olika sorter i Sverige (Jordbruksverket, 2021). Det är en allsidig råvara som kan användas i allt från bakning till dryckestillverkning. Dryckestillverkningen ökar i samhället då efterfrågan efter alternativa drycker till måltiden ökar och inte minst intresset för alkoholfria drycker. Alternativa drycker som ska fungera som ett substitut för både alkoholhaltiga drycker så som vin, öl och cider, men också alkoholfria drycker vid en måltid (Gernat, et al. 2020).

Intresset bland konsumenter för mjölksyrafermenterade drycker ökar hela tiden, både på grund av dess karakteristiska smak och även till viss del på grund av de hälsofrämjande egenskaperna mjölksyrabakterier bär på (Mathur, et al. 2020). Fermentering av juicer sker med både jästsvampar och mjölksyrebakterier, beroende på vilket resultat som eftersträvas på drycken. Vin, öl, cider och kvass fermenteras med jästsvampar och exempelvis kombucha fermenteras med olika typer av mjölksyrabakterier (Baschal, et al. 2017). Fermenterade drycker som har äppeljuice som grund är exempelvis olika spritdrycker, äppelvin, cider samt juicer (Cousin, et al. 2017). Fermentering med mjölksyrabakterier är starkt beroende på hur väl bakterierna trivs i mediet som ska fermenteras, bakterierna måste exempelvis klara av det låga pH-värde som finns i äppeljuice.

Vid fermentering är temperatur en avgörande faktor. Både för låga och för höga temperaturer är dåligt för fermenteringsprocessen. Hastigheten av kemiska reaktioner förändras med förändrad temperatur. Vid högre temperaturer sker en ökning i reaktionshastigheten, vilket även gäller de reaktioner som sker vid en fermentering (Adams et al, 2016). Inom ett temperaturintervall finns ett optimum för där den fermenterande mikroorganismen trivs bäst. Detta gör temperatur till en viktig faktor vid fermentering och den påverkan den gör på det slutgiltiga resultatet (de Vries et al, 2006).

Äppelsorten som juicen görs på är viktig för fermenteringen och den slutgiltiga produkten (Rumpunen, 2015). I Sverige odlas många olika äppelsorter och i denna

studie används pastöriserad och sedimenterad juice från äpplesorten Ingrid-Marie. Juicen är pressad på Balsgård, där många andra kommersiella äpplesorter i samarbete med SLU har utvecklats och som finns ute i handeln, exempelvis den populära äpplesorten Aroma.

Lactobacillus plantarum 299v som användes som fermenterande bakterier i denna studie klarar enligt de Vries, et al (2006) av de förutsättningar som äppeljuice har. Utöver tolerant mot låga pH-värden anses *L. plantarum 299v* vara en säker bakterie att använda i livsmedel samt probiotisk och hälsofrämjande för människor (Nordström et al, 2021). Äpplesorten Ingrid-Marie valdes till denna studie då tidigare studie visat goda sensoriska egenskaper vid ofermenterad juice (Martinez Vega et al, 2014).

Denna studie undersöker fermentering av äppeljuice med den mjölksyraproducerande bakteriearten *Lactobacillus plantarum* stam 299v. Experimentella metoder användes för att genomföra och kontrollera fermenteringsprocessen, därefter genomfördes sensoriskt skillnadstest i form av triangeltest mellan fermenterad och ofermenterad juice, samt analys av aromämnen av externt företag.

Syfte

Syftet med denna studie är att undersöka om fermentering av äppeljuice, Ingrid-Marie, med *Lactobacillus plantarum 299v* leder till förändrade kemiska och sensoriska egenskaper samt utveckling av aromskillnader. Skillnader mellan ofermenterad och två olika temperaturvarianter av fermenterad äppeljuice undersöks, vilket utmynnar i följande frågeställningar;

Frågeställningar

- Bidrar fermentering till signifikant skillnad mellan kemiska parametrar?
- Bidrar fermentering till en sensorisk skillnad mellan ofermenterad och fermenterad äppeljuice?
- Påverkar den initiala fermenterings temperaturen arombildningen?

Litteraturgenomgång

Äpple som råvara

Äpple odlas och är en uppskattad frukt i hela världen, detta gäller även i Sverige. 2020 skördades nästan 30 000 ton äpple bara i Sverige (Jordbruksverket, 2021). Det är en allsidig råvara som huvudsakligen delas upp i fyra huvudgrupper; cideräpple (1), dessert (2) och äpple för direkt ätning samt tillagningsäpple (3) och tvåfaldighetsäpple (4) (McGee, 2004). Detta gör att äpple kan användas i allt från bakning till dryckestillverkning. Innehållet i äpple domineras utav vatten som står för 87% (Livsmedelsverket, 2021) av det totala innehållet. Övriga näringsämne i äpple är fibrer, vitaminer, mineraler och kolhydrater (Abrahamsson, 2013).

Äpple innehåller olika sockerarter och dess sockerhalt kan uppmätas till 10,3 % (Livsmedelverket, 2021). Den främsta sockerarten är fruktos, vilken klassas som en monosackarid. Glukos och sackaros är andra sockerarter som kan återfinnas i äpple. Socker är en viktig komponent i fermentering, vilket gör äppeljuice till en bra grund som ett fermenteringsmedium (Szutowska, 2020).

Kvaliteten på äpplet har även stor inverkan på resultatet på juicen samt förmågan att ge rätt förutsättningar för fermenteringsprocessen. Smak, fasthet, utseende samt saknad av skador och sjukdomar är de huvudsakliga faktorerna som kvaliteten klassas efter (Espino-Diaz et al, 2016). Att ha en bra grundprodukt redan innan fermenteringen är viktig för att skapa de allra bästa förutsättningarna för fermentering och för bästa möjliga slutprodukt. Förhållandet mellan socker och syra påverkar det slutgiltiga smaken och det som ger äppeljuicen dess karaktäristiska smaker och aromer. Förutom förhållandet mellan socker och syra påverkar också äpplesort och mognadstadium av äpplet juicens smaker och aromer. Förhållandet mellan socker och syra ändras under mognaden av frukten men också under lagringen när frukten är skördad. För att bestämma mognadsgraden på ett äpple kontrolleras fastheten av fruktköttet, stärkelse- samt sockerinnehållet (Rumpunen, 2015).

Enligt Cousin et al. (2017) har äppeljuice ett pH som generellt varierar mellan 3,0–3,5, vilket är av vikt att veta innan fermentering. I äpple är det den mest dominerande syran äppelsyra, även kallad malinsyra, som bidrar till det låga pH-värdet i juicen. Äppelsyra är en viktig syra inom dryckestillverkning och fermenterade steg för dryckens utveckling av sensoriska egenskaper (du Toit et al, 2011).

Lactobacillus plantarum 299v

Lactobacillus plantarum 299v isolerades för första gången för tre decennier sen på Lunds universitet. Sedan dess har den blivit den mest dokumenterade stammen av bakteriearten *Lactobacillus plantarum*. Stammen är säker för konsumtion och anses vara hälsofrämjande genom probiotiska egenskaper. Dess hälsofördelar är främst inriktade till mag-och tarmkanalen där det visat i studier (Nordström et al, 2021). att stammen minskar svullnad vid IBS (Irritable Bowel Syndrome) samt ökar upptaget av järn.

Den grampositiva bakteriearten *Lactobacillus plantarum 299v* (*L. plantarum*) är strikt fermentativ, heterofermentativ, aerotolerant, icke-sporbildande och (Prückler et al, 2016). Arten återfinns i mikrofloran hos bland annat fisk, mejerier och fermenterade vegetabilier. *L. plantarum* är flexibel och kan växa till i temperaturförhållande mellan 15°C till 45°C samt i upp till 4% NaCl-lösning (de Vries, et al, 2006).

L. plantarum 299v återfinns i många kommersiella produkter ute i handeln, några exempel är surdeg gjord på korn, fruktjuicer, choklad och charkuterier. I probiotiska produkter är fruktjuicen ProViva en av de mest kända och som har dess ursprung ur Lunds universitet (Nordström et al, 2021).

Fermentering

Fermentering av livsmedel görs för att förlänga hållbarheten och skapa en säker produkt utifrån ett livsmedels säkerhetsperspektiv (Adams et al, 2016). Vidare görs fermentering för att bidra till en bredare smakbild i produkten, där inkluderat aromer och sensoriska egenskaper (McGee, 2004).

Fermentering är en anaerob process där det inte finns någon yttre väteacceptor vid bildningen av energiformen ATP från glukos. Som tidigare nämnt är glukos den dominerande sockerarten i äpple och klassificerats som ett organiskt ämne. Organiska ämne agerar både som vätedonator och väteacceptor i denna process. I det inledande steget i nedbrytningen av glukos bildas pyrodruvsyra, för att sedan reduceras med 2H^+ (vätejoner) till mjölksyra (Thougaard et al, 2007). *L. plantarum 299v* är heterofermentativ vilket betyder att förutom mjölksyra som nedbrytningsprodukt kommer även alkoholer, ättiksyra och koldioxid kunna bildas. Alkoholerna och syrorna kan tillsammans bilda estrar som bidrar till de karaktäristiska smakerna, dofterna och aromerna hos fermenterade produkter (Adams et al, 2016).

Vid fermentering med *L. plantarum 299v* kan malolaktisk jäsning ske som en andra fermentering till följd av enzymaktivitet. Den jäsningen karaktäriseras av att äppelsyra omvandlas till mjölksyra, koldioxid avges och en ökning i pH-värdet sker. Malolaktisk jäsning är ett viktigt steg inom dryckestillverkning. Den hårdare äppelsyran sett ur ett aromperspektiv omvandlas till den mjukare mjölksyran och drycken blir mer angenäm att dricka och mer tilltalande ur ett sensoriskt perspektiv (du Toit et al, 2011).

Temperaturen vid fermentering är en avgörande faktor, som antingen kan påverka fermenteringen negativt och positivt, beroende på det önskade slutgiltiga resultatet. Reaktionshastigheten beror av rörelse-och vibrationsenergi hos reaktanterna som ökar vid högre temperatur och minskar vid lägre temperatur, alltså växer bakterier snabbare vid högre temperaturer och långsammare vid lägre temperaturer (Adams et al, 2016). Som tidigare nämnts tolererar *L. plantarum 299v* temperaturer inom intervallet 15–45 °C (de Vries et al, 2006) och på grund av det breda temperaturintervallet finns det möjlighet att påverka fermenteringsprocessen med hjälp av temperaturen. Utöver temperatur påverkar också mediets pH-värde samt sockerinnehållet i råvaran fermenteringsprocessen för *L. plantarum 299v*.

Enligt ovan görs fermentering för att bidra till längre hållbarhet och för livsmedelsäkerhet genom att tillväxten av oönskade mikroorganismer hämmas i det låga pH-värdet som bildas som en följd utav fermenteringsprocessen. Därför bör

alltid fermenterade produkter har ett pH-värde under 4,6 för att utesluta risken för tillväxt av toxinbildande mikroorganismer såsom *Clostridium botulinum*. (Adams et al., 2016).

Aromer innan och efter fermentering

Karakteristiska aromer för enskilda livsmedel bildas genom specifika flyktiga kemiska förening och kombinationer av många olika flyktiga molekyler. Några få utgör de dominerade aromerna för just ett livsmedel med andra som finns i bakgrunden, detta är grunden till att vissa livsmedel passar med varandra och andra inte (McGee, 2004).

Aromerna som finns i äpplet varierar för olika sorter samt i vilket mognadsstadium äpplet befinner sig i. Hanteringen av äpplet, både under tillväxt och efter skörd, kan påverka aromämnen, detta gäller både sammansättningen samt koncentrationen. Aromföreningar som finns i äpple är alkoholer, etrar, ketoner, aldehyder och estrar som skapar aromer och kan kopplas till exempelvis blommighet, smörighet och rostade toner (Espino-Diaz et al., 2016). Vilka karaktäristiska aromer som är dominerade i fermenterade produkter är starkt kopplad till temperatur och vilka mikroorganismer som är dominerande (McGee, 2004). Andra kemiska föreningar som påverkar upplevelsen av ett livsmedel är de icke-flyktiga föreningar som fenoler, vilka bidrar med beska och strävhet. Fenoler finns naturligt i växter och fungerar som en skyddsmekanism mot yttre faktorer, exempelvis insekter och temperaturskiftningar (McGee, 2004).

Under fermentering kan även ämnen som bidrar till en negativ smakbild bildas, dessa kallas för off-flavors. Detta sker främst när fermenteringsförhållandena är felaktiga eller vid kontaminering (Adams et al., 2016).

Smaker, dofter och aromer är ett oerhört komplext ämnesområde där många olika faktorer spelar in. Icke-flyktiga föreningar bidrar främst till grundsmakerna beska, syra, salta, sötna, umami samt den upplevda munkänslan. Flyktiga föreningar bidrar till de komplexa smakerna och dofterna som inte vid första början kan kopplas till grundsmakerna. Enligt Williams (1974) påverkar flyktiga och icke-

flyktiga föreningar varandra på många olika plan och på så sätt skapas den slutgiltiga upplevelsen av smak och doft och ens produkts smakprofil.

Mängden aromer som bidrar till den hela smakupplevelsen är därmed svår att bestämma utan varier från livsmedel till livsmedel och hur livsmedlet har blivit behandlat. Espino-Diaz et al, (2011) beskriver att en endast i äpple har 35 olika aromämnen hittats och varierar i koncentration från omoget, till moget och till sist ruttet äpple. Vid fermentering ökar antalet aromämnen ytterligare i produkter och ändrar dess smakbild (du Toit et al, 2011).

Sensorisk analys

Sensorisk analys görs på produkter för att ge en bild över hur den upplevs utifrån människans fem sinnen; känsel, doft, smak, hörsel och syn. Inom ramen för sensorisk analys finns många olika tillvägagångssätt som är olika tillförlitliga beroende på vilken produkt som ska utvärderas. Detta gör sensorisk analys till ett viktigt steg i produktutvecklingsprocessen inom livsmedelssektorn. Det kan vara att hitta skillnader mellan två produkter, hur väl en produkt tas emot hos konsumenten eller hur hög intensiteten av en viss grundsmak kan smakas hos en produkt (Albinsson et al., 2017).

Sensoriska tester delas huvudsakligen in i två grupper, analytiska paneler och konsumentpaneler. Personer i analytiska paneler genomgår alltid träning innan test för att säkerställa kvalitén på medlemmarnas sensoriska förmåga. Detta inkluderar tester kring exempelvis smak och doft. När skillnader mellan olika produkter och karaktäristiska drag hos produkten ska hittas görs testet utav analytiska paneler. Ett exempel på test som genomförs an analytiska paneler är skillnadstest i form av ett triangeltest. Vid ett triangeltest testas olika prover mot varandra i tringlar där två prover är från samma produkt medan den tredje är en annan produkt. Panelens jobb är att efter testsmakning urskilja det provet som urskiljer sig från de andra två. Tester som undersöker hur väl en produkt tas emot görs utav konsumentpaneler (Albinsson et al., 2017).

Material och metod

Litteratursökning

Litteratur för studien kommer främst från sökverket Summon via Högskolan Kristianstad i form av peer-review artiklar. Kurslitteratur från tidigare kurser lästa på Gastronomiprogrammet samt olika myndighetssidor har använts. Sökord som använts för studien är äpple, apple, fermentering, fermentation, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum 299v*, mjölksyrabakterier, lactic acid bacteria, malolactic fermentation, aromer, heterofermentativ off-flavor och temperatur.

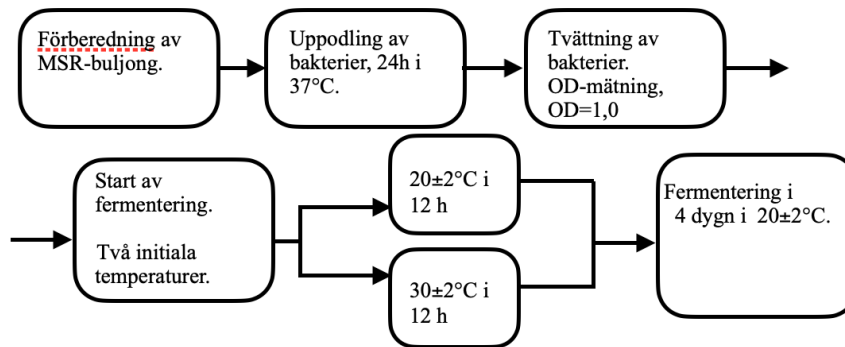
Studiedesign och upplägg

Studiedesignen för studien är experimentell och kvantitativ. Analyserna har utförts i triplikat (n=3) med utrustning avsedd för detsamma. Data från experimentet analyserades i datahanteringsprogrammet Excel och statistiska tester har utförts för att säkerställa möjlig signifikant skillnad.

I denna studie användes juice från äppelsorten Ingrid-Marie. Juicen är pressad på Balsgård utanför Kristianstad där den även är pastöriserad och sedimenterad (Rumpunen, 2022). Stammen *Lactobacillus plantarum 299v* (isolerat från ProViva juice, 2022) användes som fermenterande mikroorganism. 12 flaskor med volymen 300 ml preparerades, sex flaskor till varje initial fermenteringstemperatur. Till varje flaska tillsattes 1 ml *L. plantarum 299v* med en koncentration motsvarande 10^6 celler/ml (OD=1,0).

Fermenteringen ägde rum i rumstemperatur, $20\pm 2^\circ\text{C}$. Hälften av flaskorna placerades i $30\pm 2^\circ\text{C}$ under 12h för att starta i gång fermenteringen, se *figur 1*. Temperaturkontroller skedde en gång dagligen med kalibrerad termometer och fermenteringen pågick i fem dygn.

Prover för mätning av pH-värde och Brix-värde togs ut vid start, och en gång var 24h under 5 dygn. Proverna frystes in för att mätas vid senare tillfälle. Mätning av etanol, titrering, sensoriskt test samt aromanalys gjordes endast på offerterad eller slutlig fermenterad juice.



Figur 1: Flödesschema över förberedelse inför fermentering.

Bakteriestam och preparering av fermenteringsflaskor

Stammen *L. plantarum* 299v odlades upp i MSR (De Man, Rogosa and Sharpe) - buljong i 37°C under 24 h, se *figur 1*. Därefter tvättades bakterierna i 10 ml juice i provrör som sedan vortexades och centrifugerades x7000g i sju minuter.

Kalibrering gjordes mellan levanderäkning och OD-mätning för koncentrationmätning. För konventionsbestämning av *L. plantarum* 299v användes optisk densitetmätning (OD). 200µl pipetterades upp och tillsattes i kuvett tillhörande spektrofotometer (Eppendorf, BioPhotometer plus, OD₆₀₀). OD ställdes till 1,0 med den äppeljuicen som skulle användas i studien, vilket motsvarar 10⁸–10⁹ celler/ml juice. En spädningsserie i förhållandet 1:10 upprättades för att möjliggöra genomförande av levanderäkning. 100µl av provlösning tillfördes till 900µl 0,85% NaCl-lösning, varpå sju replikat gjordes. 100µl från varje steg i spädningsserien racklades på MRS-agar plattor. Plattorna inkuberades under 48h i 30°C. Kolonier räknades och plattor med 20–200 kolonier användes till levanderäkningen.

Kemiska analyser

pH-värde

pH-mätare (Metro Toledo) användes för att mäta pH-värde fem gånger under fermenteringsprocessen, fem prover. Kalibrering gjordes med känd buffert innan analys på proverna. Mätningarna utfördes i triplikat.

Refraktometer (Hanna Instruments HI96801) användes för att mäta sockerhalten kontinuerligt under fermenteringsprocessen, angivet i Brix. Kalibrering gjordes med avjonat-vatten innan analys på proverna. Mätningarna utfördes i triplikat.

Titrerbar syrahalt

Mätning av den svaga syran (äppelsyra) analyserades med metoden titrering. 25 ml destillerat vatten tillsattes i bägare med 0,5 ml av provlösningen samt 5 droppar av fenoftalin. 0,1M NaOH tillsattes droppvis tills färgomslag observerades, från dryckens originalfärg till lätt rosa. Mätningarna utfördes i triplikat.

Etanolvättning

Gaskromatografi (GC) användes för att analysera etanolhalten i den slutgiltiga produkten. 2,5 ml prov blandades med 0,2 ml 1-propanol och 2,3 ml destillerat vatten för att göra provlösningen. 2 μ l av provlösningen injicerades i gaskromatografen (Hewlett Packard, HP 6890 Series). Signalarean för propanol respektive etanol avlästes och kvoten mellan beräknades. Kalibreringslösningar med känd etanolkoncentration injicerades för att plotta kalibreringskurva, vilket utifrån trendlinje plottades. Med hjälp av trendlinjens ekvation kunde den okända etanolhalten (%) på provlösningen utläsas.

Aromanalys

Prover på ofermenterad och de två fermenterade dryckerna skickades i väg för aromanalys till det externa företaget e-Sense i Uppsala. Där genomfördes analys av enskilda aromämne med gaskromatografi. Mätningarna utfördes i triplikat. Urval av presenterade aromämne gjordes utifrån de aromämnena med dominerande koncentration.

Sensorisk analys

Ett triangel-test utfördes mellan den ofermenterade och fermenterade juicen (initial temperatur 30°C). Det sensoriska testet utfördes på Högskolan i Kristianstads sensoriska laboratorium. Testet gjordes med hjälp av programvaran EyeQuestion.

Triangel-testet genomfördes under nätverksdagen, 7 april 2022, för gastronomer som en del av lunchen för att testa och ge en bild av sensoriken som Gastronomiprogrammet lär ut. Personer som var intresserade av att vara med under sensoriska testet blev informerade om att produkten klassas som en lättdryck (Folkhälsomyndigheten, 2022). Drycken innehåller alkohol, vilket gjorde det möjligt för personer som inte dricker alkohol att helt avstå från testet. Alla som var med och testade produkterna var studenter vid Gastronomiprogrammet och hade alla genomgått en universitetskurs i sensorisk, vilket gjorde alla bekanta till metoderna och begreppen som triangel-testet medförde.

Varje deltagare visades till i ett bås med stationär dator. På plats fanns vattenglas, spottkopp, servett samt smörgåsrån för neutralisering mellan testsmakningen. Tresiffriga nummerkombination märktes på produkterna enligt en randomiserad ordning given av EyeQuestion.

Statistisk analys

Datavärden från mikrobiologisk analys samt kemisk analys analyserades i programmet Excel med korrekt statistiskt test beroende på faktorer. Ett oberoende t-test användes för att analysera möjliga signifikanta skillnader mellan ofermenterad äppeljuice och äppeljuice fermenterade med *L. plantarum* 299v. Ett t-test användes då det var två grupper som jämfördes mot varande beroende på en faktor, i detta fall fermentering (Ejlertsson, 2019). P-värde bestämdes till 5% ($p < 0,05$).

Etiska övervägande

Studien och examensarbetet har gjorts självständigt och enligt vad som anses som god forskningsed, inkluderande öppenhet och objektivitet kring material och metod samt resultat (Vetenskapsrådet, 2017).

Till sensoriska testet samlades en panel, med kopplingar till Gastronomiprogrammet då det genomfördes under nätverksdagen, 7 april 2022 för gastronomer. Personer tillfrågades om deltagande i test och fick därefter information kring upplägget. Deltagarna fick muntlig information om att de fick avbryta testet och att det var helt anonymt.

Examensarbetet är till vis del kopplat till uppdragsgivare, Balsgård Foodtech som utöver bidragande med material även bekostat aromanalys. På så vis finns visst kommersiellt intresse kring resultatet och hur det kan påverka uppdragsgivarens vidare arbeten.

L. plantarum 299v valdes också för att det är en känd organism som är säker vid konsumtion (Nordström et al, 2021). Okulär besiktning gjordes för att bedöma att fermenteringen fungerat korrekt, dels genom att se hur innehållet i flaskan såg ut och med mikroskopering. Vid mikroskopering kontrollerades att ingen kontaminering av jäst skett då etanoljäsning inte eftersträvades i studien samt att juicen inte innehöll några endosporer som kan påverka livsmedelssäkerheten i produkten.

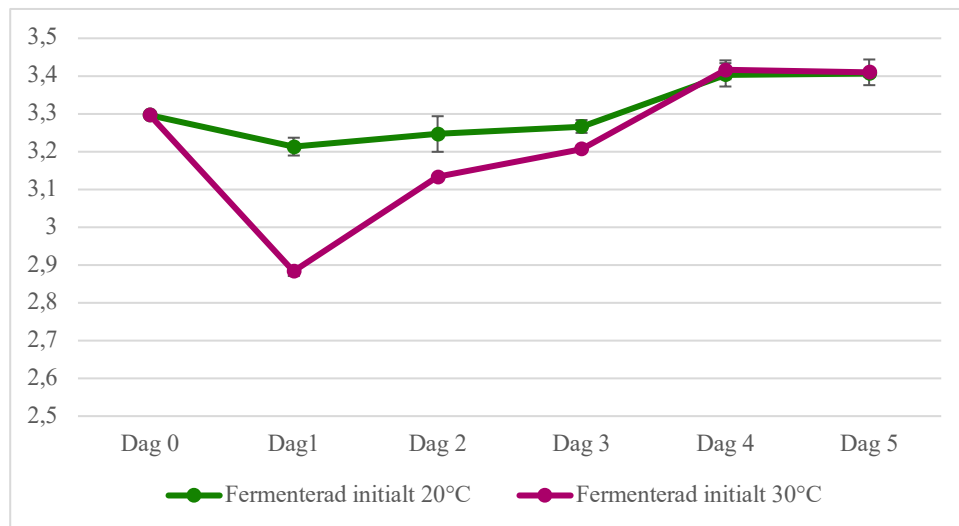
Resultat

Fermenteringsprocess

OD-mätning av slutprodukter kunde uppmätas till OD=2,3 för juice fermenterad i 20°C samt OD=1,9 för juice fermenterad initial i 30°C efter fem dagars fermentering. Ingen signifikant skillnad ($P>0,05$) med avseende på slutgiltig OD-koncentration kunde påvisas mellan produkterna.

Mikroskopering av slutgiltig produkt visade aktiva mjölksyrabakterier samt dryck som ej var kontaminerad av oönskade mikroorganismer.

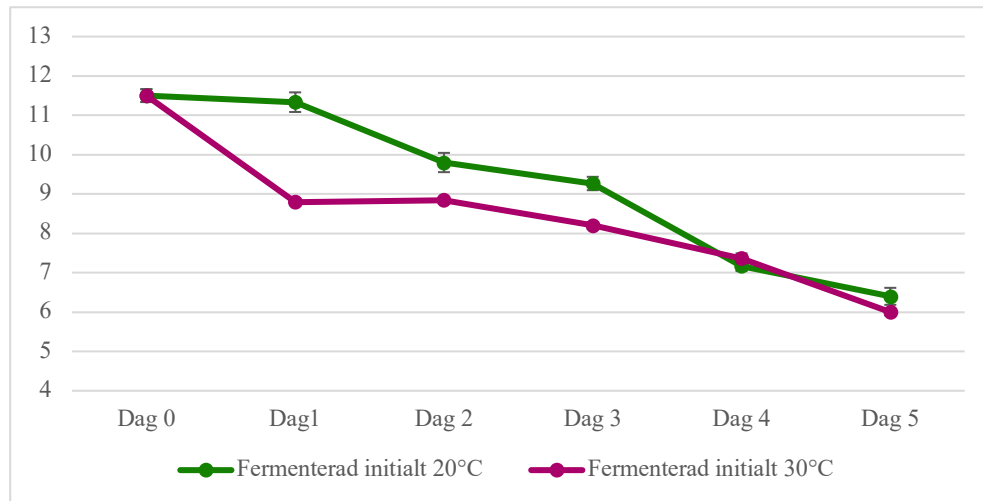
pH



Figur 2: Förändring av pH-medelvärdet i fermenterade drycker under fem dagar med standardavvikelse(n=3).

Mätning av pH-värde under fem dygn visade stor skillnad mellan de initiala fermenteringstemperaturerna under första dygnet, se *figur 2*. I båda dryckerna skedde en pH-minskning under första dygnet för att sedan öka under resterande fyra dagar av fermentering. Ett slutgiltigt pH-värde mättes till högre än det ursprungliga pH-värde för båda dryckerna. Statistiskt test visade på icke signifikant skillnad, $p>0,05$.

Brix



Figur 3: Förändring av Brix-medelvärde i fermenterade drycker under fem dagar med standardavvikelse (n=3).

Mätning av Brix under fem dygn visade ett högre värde i ofermenterad dryck än i fermenterad dryck, gäller för båda dryckerna, se *figur 3*. Störst skillnad skedde under första dygnet i drycken med den initiala temperaturen 30°C då värdet sjönk snabbare än i initiala temperaturen 20°C. Vid vidare fermentering i fyra dygn skedde en minskning i Brix-värdet för de båda dryckerna. Statistiskt test visade på icke signifikant skillnad, $p > 0,05$.

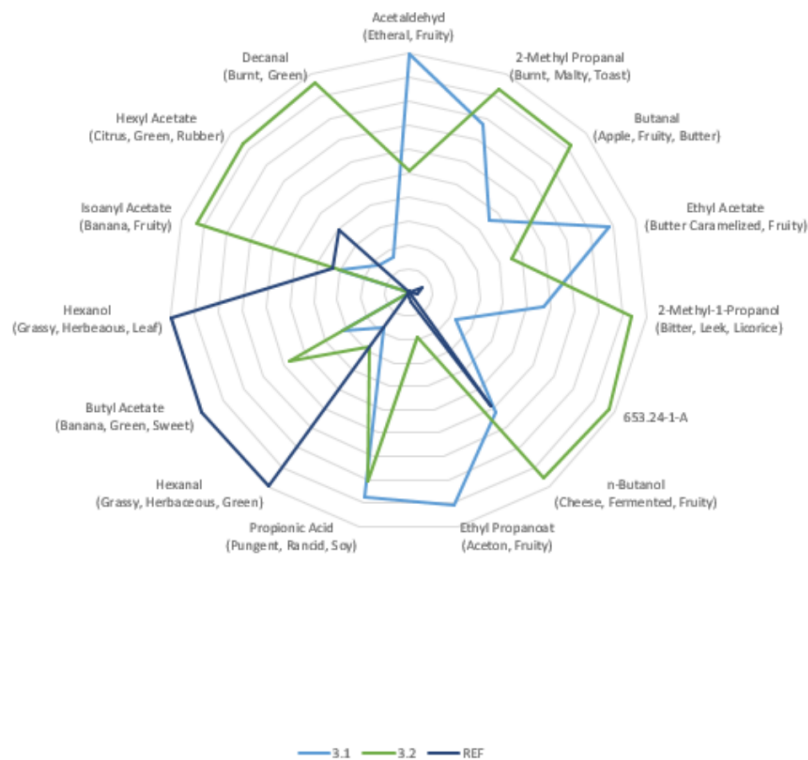
Titrerbar syra

Titring med 0,1 M NaOH gav en medelvolym på 11,3 ml (initialt 20°C) respektive 11,5 ml (initialt 30°C), vilket resulterar i en total syrahalt i den fermenterade drycken på 0,75 % respektive 0,77% beräknad med konstanten för äppelsyra, 0,067. Statistiskt test visade på icke signifikant skillnad, $p > 0,05$.

Etanolmätning

Mätning med gaskromatograf och beräkning med trendlinjens ekvation visade en etanolhalt på 1,1% efter fem dagars fermentering i de två slutgiltiga produkterna. Statistiskt test visade på icke signifikant skillnad, $p > 0,05$.

Aromanalys



Figur 4: Spindeldiagram över aromämne i slutgiltigt fermenterad 20°C (3.1), fermenterad initialt 30°C (3.2) och ofermenterad äppeljuice som referensprov (REF), skapat av e-Sense 20 april 2022.

Vid mätning av aromämnen kunde olika aromämnen i de olika dryckerna hittas, se *figur 4*. I ofermenterad juice (REF) hittades aromämnen hexanol, hexanal och butyl acetate. I juice fermenterad initialt i 20°C (3.1) hittades aromämnen som n-butanol, decanal och isoamyl acetate. I juice fermenterad initialt i 30°C (3.2) hittades aromämnen som acetaldehyd, etyl acetate och etyl propanoat. Skillnader i utvecklandet av olika aromämnen kan tydligt ses i *figur 4*.

Sensorisk analys

Resultat från sensoriskt triangel-test och bearbetning av data med t-test visade en signifikant skillnad mellan ofermenterad och fermenterad äppeljuice i initiala temperaturen $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $p < 0,05$. Kritiskt värde för antal rätt svar vid triangeltest med $n=30$ provtagare var 15 antal rätt. Triangel-testet resulterade i 17 rätt valda prov utifrån 30 bedömda prover.

Diskussion

Resultatdiskussion

Tidigare studier har visat att *L. plantarum* 299v är användbar för fermentering av äppeljuice (Martinez Vega et al, 2014; de Vries et al, 2006; Cousin et al, 2017), vilket även denna studie visade. Processen följdes med Brix- och pH-mätning vilket visade att den initiala temperaturen påverkade snabbt. Brix-värdet sjönk vilket kan förklaras med att tillväxthastigheten ökar men att skillnaderna jämnade ut sig vid fortsatt fermentering.

Stammen 299v av *L. plantarum* som användes som fermenterande bakterie visade enligt de faktorer som användes för att kontrollera fermenteringsförloppet att ge ett bra resultat. Exempelvis visar ökningen av OD-värdet ökad koncentration av bakterier och Brix-sänkning på ett lyckat fermenteringsförlopp.

Socketarter har brutits ned av bakterierna och har resulterat i sjunkande Brix-värdet och något höjda pH-värdet. Drycken som inkuberades i $30\pm 2^\circ\text{C}$ i 12h för att sedan fermenteras ytterligare fyra dagar i $20\pm 2^\circ\text{C}$ visade en snabbare sänkning i pH-värdet under det första dygnet än den som endast fermenterats i $20\pm 2^\circ\text{C}$, vilket uppfyller sambandet mellan temperatur och *L. plantarum* 299v tillväxthastighet vid temperaturoptimum (Adams et al., 2016). Detta gör att sambandet mellan ett sjunkande Brix-värde och ett sjunkande pH-värde stämmer. Socketarterna i juicen minskar till följd av att mjölksyrabakterierna bryter ner dem och bildar mjölksyra (Adams et al., 2016). I denna studie skedde en pH-höjning i dryckerna, vilket kan kopplas till att malolaktisk jäsning har skett. Äppelsyran i juicen har omvandlats till mjölksyra och kolsyra har bildats som en biprodukt vid fermentering (du Toit et al, 2011). Att malolaktisk jäsning har skett i dryckerna är positivt då den typen av jäsning är att föredra vid dryckestillverkning då ur ett sensoriskt perspektiv den hårdare äppelsyran omvandlas till den mjukare och mer angenäma mjölksyran (du Toit et al, 2011).

Efter fem dagars fermentering visade Brix- och pH-värde på liknande värden mellan de två fermenterade dryckerna, icke signifikant skillnad. Därmed bör högre temperatur användas vid kortare fermentering och lägre temperaturer vid längre fermentering. Avbrytandet av fermenteringsprocess skedde utifrån satt tidsram. Resultatkurva för pH-förändring (*figur 1*) visar på utplanad kurva och kan kopplas till stationär-fas för bakterietillväxt (Adams et al., 2016). Resultatkurva för Brix-förändring visar på fortsatt negativ lutning på kurvan (*figur 2*). Möjligen skulle fortsatt fermentering ge utplanad kurva på även Brix-förändring.

Resultat från mätning av titrerbar syra och etanolhalt i de två slutgiltiga fermenterade juicerna visade inte på någon signifikant skillnad mellan dryckerna fermenterade vid två olika initiala temperaturer. För att ha gett en bättre överblick över primärfermentering och den malolaktiska jäsning bör prover från produkterna analyserats vid varje 24h intervall.

Fermenteringen skapade en sensorisk skillnad som var möjlig att finna med ett sensoriskt skillnadstest. Den otränade panelen hittade dock skillnad mellan produkterna och en signifikant skillnad kunde säkerställas, vilket enligt Adams et al. (2016) stämmer överens med de sensoriska skillnader som en fermentering ska ge en produkt.

Sensoriska skillnadstestet i form av ett triangeltest endast utfördes mellan offermenterad juice samt juice fermenterad vid $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ i 12h, för att visa undersöka om det fanns en signifikant skillnad mellan offermenterad och fermenterad juice. Vidare utveckling av denna studie skulle därmed vara att utföra sensoriska skillnadstester mellan de två olika fermenterade juicerna samt med en analytisk panel för att minimera risken för felkällor i resultatet.

Skillnad på de initiala fermenteringstemperaturerna visade på signifikant skillnad i aromutveckling i de två fermenterade dryckerna. De dominerade aromämnen i dryckerna koncentrerades till de 15 som kan ses i *figur 4*. Det visar på en tydlig skillnad i aromutvecklingen beroende på den initiala temperaturen och i jämförelse med referensprovet i form av offermenterad juice.

Vid initiala fermenteringstemperaturen $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ kunde aromämne som sensoriskt kopplas till äpple, fruktighet, karamellisering, smörighet och eteriska oljor återfinnas. I juice fermenterad med den initiala temperaturen $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ kunde också aromer med koppling till äpple återfinnas, men även andra aromämne som sensoriskt kopplas till citrus, fruktighet, rostade toner och fermenterat kunde noteras. Högre temperatur bidrar till aromer kopplade till rostning, bränt och malt. Detta visar att *L. plantarum 299v* bidrar till olika typer av aromutveckling beroende på fermenteringstemperatur. Aromer som kopplas till rostning, brändhet och malt kan kopplas till de icke-flykta föreningarna fenoler enligt McGee (2004) som agerar skydd genom beskhet och strävhet mot utomstående påfrestningar och som blir till följd av den något högre initiala fermenteringstemperaturen.

Aromer kopplade till äpple var högre i de fermenterade dryckerna än i den offermenterade juice, alltså referensprovet. I referensprovet kunde i stället aromer kopplade till bland annat gräs, örter och andra gröna växter, alltså inte toner som kopplas till äpple, vilket är anmärkningsvärt med tanke på att produkten är äppeljuice. Generellt bidrog en lägre initial fermenteringstemperatur till aromer som klassas som lätta (fruktighet, smörigt och eteriska oljor) medan högre initial fermenteringstemperatur bidrog till något tyngre aromer (rostning, brändhet och fermenterad) (Espino-Diaz et al., 2016). Ur ett aromperspektiv är det anmärkningsvärt att de kemiska parametrarna inte skilde sig signifikant när skillnaden i aromutvecklingen blev så markant mellan de två fermenterade juicerna. Även om det sensoriska skillnadstestet endast genomfördes mellan offermenterad och fermenterad i initialt 30°C visade aromanalysen på stora skillnader mellan vilka aromer som utvecklades. För att utveckla studien bör därmed temperatur och aromanalys korrelera med sensoriska tester för att utveckla dryckernas smakbild.

För att koppla samman sensoriska tester med aromämnen skulle ett beskrivande test vara en möjlig vidareutveckling. Genom ett beskrivande test ta fram en sensorisk smak-och doftprofil för dryckerna med de mest dominerande aromämnen som utgångspunkt för den analytiska panelen. Både beskrivning av aromämnen som klassas som angenäma för drycken och aromämnen som anses negativa och som

klassas som ”off-flavors”. På så sätt finna vilka aromer kopplade till smakprofil är den dryck som är mest kompatibel till en viss maträtt och vara ett substitut till exempelvis vin.

Vid ankomst till externa företaget e-Sense för aromanalys hade ett av proverna läckt samt hade proverna tinat helt från helt fryst. Detta kan ha bidragit till kontaminering av det provet i de andra proverna och på så sätt påverkat resultatet. Hur och om det har påverkat resultatet är svårt att säkerställa. Att proverna tinat kan ha påverkat resultatet på så sätt att fermenteringsprocess startat igen. Dock var temperaturen fortfarande låg och uppskattades till att vara under 10°C (Mathias Lundgren, e-Sense Sweden AB, personlig kommunikation, 20 april 2022), vilket är enligt de Vries et al, (2006) under temperaturen *L. plantarum 299v* trivs och därmed bör ingen ny fermenteringsprocess ha startat. Resultatet visar tillika på stora skillnader i utvecklandet av aromer vilket indikerar att ingen större kontamineringen har skett.

Metoddiskussion

Den valda studiedesignen för arbetet gav rätt förutsättningar för att analysera hur aromutvecklingen i juice berodde på fermenteringstemperaturen. Likaså var det valda materialet, äppeljuice, och metoderna anpassade för att uppnå det slutgiltiga resultatet på studien, med något undantag som tas upp nedan. Metoden för studien har varit experimentell och kvantitativ vilket visat varit bra utifrån de steg som behövdes genomföras för att utveckla en fermenterad äppeljuice.

Val av material och metod till denna studie grundades på en projektidé från Balsgård Foodtech, fermentering av äppeljuice med *Lactobacillus plantarum 299v*, samt kunskaper om vilka experimentella metoder som bäst kontrollerar ett fermenteringsförlopp (Adams et al, 2016). Utifrån de valda metoderna kunde kemiska, mikrobiologiska och sensoriska skillnader i de fermenterade dryckerna beroende på fermenteringstemperatur analyseras.

Kemiska och mikrobiologiska skillnader undersöktes med hjälp av pH-värde, Brix-värde, titrerbar syra samt etanolhalt. Mätningar av titrerbar syra och etanol gjordes endast i slutgiltig produkt, något som kan ha givit en ofullständig jämförelse kring utveckling under fem dagars fermentering. Önskvärd metodutveckling hade varit att mäta titrerbar syra halt och etanolhalt vid samma tidpunkter som mätning av pH och Brix, vilket skulle ge bättre möjligheter att följa fermenteringsprocessen och jämföra skillnader mellan primärfermentering och malolaktisk jäsning (du Toit et al, 2011). Vid mätning av titrerbar syra gjordes okulär bedömning kring när färgskiftning i produkten skedde. Detta är något som ska betraktas som en felkälla, på grund av den mänskliga faktorn och personens förmåga att uppfatta färgförändringar. Titring med pH-meter hade därför givit ett mer tillförlitligt resultat.

Förberedelse inför fermentering samt kemiska och mikrobiologiska faktorer mättes i laborationer där hygien och säkerhet är viktig (Adams et al, 2016). Därför bör det vara något att betrakta gentemot vanan som personen haft som laborerat och vilka möjliga felkällor det kan leda till. Exempel på sådana felkällor kan vara kontaminering och mätfel.

Sensoriska testet genomfördes inte med en helt tränad panel, vilket det enligt Albinsson et al, (2017) ska göras för att ge rätt förutsättningar för ett säkert resultat. Urval av deltagare vid sensoriskt skillnadstest gjordes utifrån att det fanns tidsbrist och vilket som var möjligt att genomföra inom projektets tidsram. Därmed valdes deltagare vid nätverksdagen för gastronomer. Panelen var delvis tränad och gav en någon fördel då de kände till metoder och begrepp från universitetskurs i sensorisk. Panelen hittade skillnad mellan proverna och därför hade en utveckling av metoden kring sensoriskt test vara att genomföra ett test med en helt tränad panel. Detta för att säkerställa att metodvalet till denna del av studien är helt korrekt. Skillnadstestet genomfördes endast mellan ofermenterad och fermenterad initialt i 30°C. Skillnads testet bör även utföras på den fermenterade dryck, 20°C, för att kunna se en eventuell skillnad mellan de två fermenterade dryckerna. Detta bör ses som en utveckling utav studien.

Koncentrationen av aromämnen är standardiserade, vilket innebär att varje aromämne kan jämföras mot varandra i dryckerna. Dock går det ej att jämföra koncentrationen utav olika aromämnen mot varandra, detta berodde på analysverktyget. (Mathias Lundgren, e-Sense Sweden AB, personlig kommunikation, 20 april 2022). Detta påverkade studien på det sätt att där inte kunde göras något statistiskt test för att se om där fanns signifikanta skillnader mellan de aromämnen som fanns i de båda fermenterade dryckerna. I stället blev det en tolkning av *figur 4* och dess grafer för att hitta skillnader mellan de olika dryckerna.

Relevans för huvudområdet mat- och måltidsvetenskap

Denna studie visar att där finns utvecklingspotential i produkten fermenterad äppeljuice, både gällande valet av mjölkosyrabakterier och val av äppelsort. Då det finns ett intresse av fermenterade drycker hos konsumenter finns det även en stor möjlighet att skapa produkter med olika aromer beroende på ändamålet och användningsområdet, exempelvis maträtten drycken ska komponeras ihop med.

Det finns även ett mervärde i användandet av fermenterande bakterier och som i detta fall även är probiotiska. Både för hälsofrämjande egenskaper samt utvecklandet av alkoholfria drycker som är goda och som kan ses som en ny dryck på dryckeslistan snarare än ett substitut.

Ämnet blir därmed både relevant och aktuellt utifrån ett mat- och måltidsvetenskapligt perspektiv.

Slutsats

Studien visar att det sker en förändring i äppeljuicen under fermentering med *Lactobacillus plantarum* 299v, vilket visar att bakterien är lämplig för fermentering i äppeljuice. Denna förändring går att återfinna med ett sensoriskt skillnadstest i mellan ofermenterad och fermenterad juice. Studien visar även att temperatur har en påverkan på dryckens egenskaper under fermenteringsprocessen, främst gällande aromutvecklande egenskaper och vidare dryckens smakprofil. Olika temperaturer ger olika smakprofiler. Utvecklandet av aromegenskaper är direkt kopplade till kemiska och mikrobiologiska egenskaper, detta i form av vald mikroorganism, fermenteringsmedium och fermenteringstemperatur.

Referenser

Abrahamsson, L. (red.) (2013). *Näringslära för högskolan: från grundläggande till avancerad nutrition*. (6., utök. och uppdaterade uppl.) Stockholm: Liber.

Adams, M.R., Moss, M.O. & McClure, P.J. (2016). *Food microbiology*. (4th edition). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Albinsson, B., Wendin, K., & Åström, A. (2017). *Handbook on Sensory Analysis*. (P. O'Malley, Övers.) Kristianstad: Kristianstad University Press 2017:9.

Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloglou, N., & Matalas, A. L. (2017). Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition research reviews*, 30(1), 1–24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>

Cousin, F. J., Le Guellec, R., Schlüsselhuber, M., Dalmasso, 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 Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018–1028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>

du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. *et al.* (2011). *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food Bioprocess Technol* 4, 876–906. <https://doi-org.ezproxy.hkr.se/10.1007/s11947-010-0448-8>

Ejlertsson, G. (2019). *Statistik för hälsovetenskaperna*. (Tredje upplagan). Lund: Studentlitteratur.

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

Folkhälsomyndigheterna. (14 februari 2022). *Alkohol*. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/livsvillkor-levnadsvanor/andts/regler-for-tillverkning-handel-och-hantering/alkohol/>

Gernat, D. C., Brouwer, E., & Ottens, M. (2019;2020;). Aldehydes as wort off-flavours in alcohol-free Beers—Origin and control. *Food and Bioprocess Technology*, 13(2), 195-216. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02374-z>

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__Atbara%20vaxter/JO0102P5.px/table/tableViewLayout1/?rxid=5adf4929-f548-4f27-9bc9-78e127837625

Livsmedelsverket. (3 maj 2021). *Livsmedelsdatabasen.*
<https://www7.slv.se/SokNaringsinnehall/Home/FoodDetails/5870?sokord=Äpple%20Ingrid%20Marie%20rött&soktyp=1&kategoriId=> .

Martínez Vega, M., Varming, C., Skov, T., & Toldam-Andersen, T. B. (2014). Post-harvest ripening increase cultivar specific sensory and analytical aroma profile in apple juice: A study of four commercial cultivars in denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B, Soil and Plant Science*, 64(3), 244-251. <https://doi.org/10.1080/09064710.2014.905622>

Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients*, 12(6), 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>

McGee, H. (2004). *McGee on food & cooking: an encyclopedia of kitchen science, history and culture.* ([New, completely rev. and updated ed.]). London: Hodder & Stoughton.

Nordström, E. A., Teixeira, C., Montelius, C., Jeppsson, B., & Larsson, N. (2021). *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V®): three decades of research. *Beneficial microbes*, 12(5), 441–465. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0191>

Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., Soares da Silva, F., Auterith, E., Kneifel, W., & Michlmayr, H. (2015). Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiology*, 49, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.014>

Rumpunen, K., Nybom, H., & Wendin, K. (2015). *Den skånska äpplemustens terroir.* LTV-fakultetens Institution för Växtförädling, SLU Alnarp.

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>

Thougaard, H., Varlund, V. & Møller Madsen, R. (2007). *Grundläggande mikrobiologi med livsmedelsapplikationer*. (2., uppdaterade och utök. uppl.) Lund: Studentlitteratur.

Vetenskapsrådet. (2017). *God Forskningssed*. Vetenskapsrådet. <https://www.vr.se/analys/rapporter/vara-rapporter/2017-08-29-god-forskningssed.html>

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>