

Sokeriruokomelassin käymisprosessin optimointi



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka, Hämeenlinnan korkeakoulukeskus

syksy 2021

lida Stylman

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyön tavoitteena oli sokeriruokomelassista valmistettavan rommin käymisprosessin optimointi. Työn tilaajana oli Oy Authors' Distillery Ltd. Käymisprosessiin vaikuttavia tekijöitä on useita, joista keskityttiin käymislämpötilan ja vesi-melassiseoksen sokeripitoisuuden optimointiin sekä oikean hiivakannan löytämiseen. Työ toteutettiin käymiskoe-erillä, joiden tuloksina saatiin eri käymishiivojen alkoholituotot erilaisissa käymisolosuhteissa. Käymiskokeet suoritettiin käyttäen central composite -mallinnusta, jonka ennako-oletuksen mukaan prosessin optimi asettuu testattavien muuttujien (käymislämpötila, vesi-melassiseoksen sokeripitoisuus) vaihteluvälin keskelle.

Käymiskokeissa todettiin käymishiivalla olevan suurempi merkitys alkoholituottoon kuin käymislämpötilalla tai vesi-melassiseoksen sokeripitoisuudella, sillä eri hiivakantojen välisissä tuloksissa oli suuria eroja. Ennako-oletuksen mukaan prosessin optimi asettui vaihteluvälin keskelle ja tulokset tukivat melko hyvin ennako-oletusta, vaikkakin keskipistetestauksessa saatiin melko vaihtelevia alkoholituottoja. Suurta vaihtelua voidaan kuitenkin selittää sillä, että prosessin muuttujien vaihteluvälin keskipistettä testattiin eniten, jolloin tuloksiakin on enemmän keskipisteestä kuin muista muuttujien yhdistelmistä.

Author	Iida Stylman	Year 2021
Subject	Optimization of Fermentation to Produce Rum from Sugarcane Molasses	
Supervisor	Susanna Peltonen	

ABSTRACT

The aim of the thesis was the optimization of rum fermentation. Commissioner of the thesis was Authors' Distillery Ltd. Variables of optimization included the temperature of fermentation and the sugar content of a solution made of molasses and water. The thesis also focused on finding out the most suitable yeast strains. The method used were fermentation tests, which resulted in discovering alcohol yields of selected yeast strains in different fermentation circumstances. The tests were executed using central composite method and the hypothesis was that the optimum of the process sets in the middle of the variables' range.

The outcome of the research work was that the yeast strain has more impact on the alcohol yield than the temperature or the sugar content of the water and molasses compound. The results supported the hypothesis, even though alcohol yields varied in the middle point testing. The variation can be explained by repeated testing – the middle point was tested the most among the variables, and therefore there were more results of the middle point than of other combinations of the variables.

Keywords Fermentation, rum, optimization

Pages 37 pages

Sisälllys

1	Johdanto	1
2	Rommi	2
2.1	Rommien luokittelu	2
2.2	Rommin flavori.....	4
3	Sokeriruoko	4
3.1	Sokeriruo´on koostumus	5
3.2	Sokerin valmistusprosessi sokeriruo´osta.....	6
3.3	Sokeriruokomelassi	6
4	Rommin valmistusprosessi sokeriruokomelassista	8
4.1	Tarvittavat esikäsittelyt.....	8
4.2	Käyminen.....	8
4.3	Tislaus.....	9
4.4	Ikäännyttäminen	11
5	Hiiva ja käymisprosessi	12
5.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
5.2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14
5.3	Hiivan aineenvaihduntatuotteet.....	14
5.3.1	Alkoholit	15
5.3.2	Esterit	16
5.3.3	Rasvahapot.....	17
6	Rommin käymisprosessin haasteita	18
6.1	Rommin käymisprosessin kontaminatit.....	18
6.2	Hiivan toiminnan lakkaaminen	18
7	Käymisprosessin optimointi	19
7.1	Käymiskokeiden suunnittelu ja toteutus	19
7.2	Käymiskoe lämpötilassa a	21
7.3	Käymiskoe lämpötilassa b	22
7.4	Käymiskoe lämpötilassa c	22
7.5	Keskipistetestaus.....	23
7.6	Tulokset.....	23
7.7	Kokeen luotettavuuden ja mallin sopivuuden arviointi.....	27
7.8	Johtopäätökset.....	31
	Lähteet.....	34

Kuvat, taulukot ja kaavat

Kuva 1. Aistinvaraisesti havaittavia rommille tyypillisiä piirteitä ovat esimerkiksi mausteinen, heinämäinen, kukkainen, ja rikkimäinen (Piggott, 2012, s. 356).	4
Kuva 2. Sokeriruo' on koostumus (Canilha ym., 2012, s. 4).	5
Kuva 3. Rasvahappojen ja esterien muodostuminen rasvahapposynteesissä (Enari & Mäkinen, 2014, s. 139).	17
Kuva 4. Käymistelttä ja -astiat.	21
Kuva 5. Kontaminoitunut näyte.....	23
Kuva 6. Hiivan 1 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.	24
Kuva 7. Hiivan 2 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.	25
Kuva 8. Hiivan 4 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.	26
Kuva 9. Yhteenveto hiivan 1 kokeen mallin tunnusluvuista.....	28
Kuva 10. Yhteenveto hiivan 2 kokeen mallin tunnusluvuista.....	29
Kuva 11. Yhteenveto hiivan 4 kokeen mallin tunnusluvuista.....	29
Kuva 12. Kuvaajat muuttujien ja niiden ristikkäisvaikutusten merkityksestä vasteisiin.	31
Taulukko 1. Rommien luokittelutapa. (Karlstén, 2007, s. 70)	3
Taulukko 2. Melassin koostumus (OECD, 2015, s. 170).	7
Taulukko 3. Headin, heartin ja tailin mahdollisia komponentteja (Gibson & Newsham, 2018, s. 402).	10
Taulukko 4. Koesuunnitelma.	20
Taulukko 5. Käymiskokeiden tulosten yhteenveto.	26

1 Johdanto

Opinnäytetyö perustui työn tilaajan tarpeeseen optimoida sokeriruokomelassista valmistettavan rommin käymisprosessia. Rommia on tähän mennessä valmistettu vain koe-eriä, joilla ei ole esimerkiksi saavutettu toivotun mukaista alkoholituottoa. Prosessin optimointi ennen varsinaisen tuotannon alkua mahdollistaa tehokkaamman valmistusprosessin ja resurssien keskittämisen muihin uuden tuotelanseerauksen tuomiin haasteisiin.

Käymislämpötila vaikuttaa hiivan toimintaan, aineenvaihduntaan ja näin ollen lämpötilan optimointi on tärkeää lopputuotteen aistinvaraisten ominaisuuksien kannalta. Lisäksi verrattaessa monien viljapohjaisten alkoholijuomien käymisprosesseihin vaatii melassipohjaisen rommin käyminen korkeahkoja lämpötiloja. Rommia on perinteisesti valmistettu lämpimissä maissa, joissa korkeiden lämpötilojen saavuttaminen ei ole yhtä haastavaa kuin Suomessa. Optimoimalla käymisprosessin lämpötilaa voidaan vaikuttaa tislauksen energiakulutukseen.

Työn tilaaja käyttää rommin valmistukseen sokeriruokosta valmistettua melassia. Koska melassi sisältää runsaasti sokereita, on laimentaminen vedellä välttämätöntä hiivan toiminnalle sopivan sokeripitoisuuden saavuttamiseksi. Optimaalisen vesi-melassisuhteen löytäminen edesauttaa hiivan toimintaa, tavoitteen mukaisen lopputuotteen makuprofiilin saavuttamista ja säästää raaka-ainekustannuksissa.

Koska rommi on väkevä alkoholijuoma vaaditaan käymishiivalta riittävän korkeaa alkoholituottoa. Hyvän alkoholituoton lisäksi hiivan aineenvaihduntatuotteiden on oltava rommin makuprofiiliin sopivia. Kuten edellä todettiin käymislämpötila ja vesi-melassiseoksen sokeripitoisuus vaikuttavat hiivan toimintaan. Näin ollen käymisprosessin optimoinnissa keskitytään käymislämpötilaan, vesi-melassiseoksen sokeripitoisuuteen ja sopivan käymishiivan löytämiseen. Lisäksi seurataan, kuinka muuttujat vaikuttavat käymisaikaan. On huomioitava, että käymisprosessiin vaikuttavat myös muut opinnäytetyön rajauksen ulkopuolelle jäävät asiat. Tutkimuskysymyksiksi valikoituivat edellä perustelluista syistä:

1. Kuinka käymishiiva vaikuttaa alkoholituottoon?
2. Mitkä ovat optimaalisimmat käymislämpötila ja vesi-melassiseoksen sokeripitoisuus?

Vastaukset tutkimuskysymyksiin selvitetään käymiskokeiden avulla.

2 Rommi

Rommi on sokeriruo'osta (*Saccharum officinarum*) valmistettu väkevä alkoholijuoma, joka on saanut alkunsa Karibialta. Pääraaka-aineena rommissa on sokeriruo'on mehu, siirappi tai melassi. Pääsääntöisesti rommin valmistukseen käytetään melassia, sillä se on sokerin valmistuksen sivuvirta ja näin ollen edullista. EU:n lainsäädännön mukaan rommin valmistuksessa tisleen alkoholipitoisuus on alle 96 tilavuusprosenttia, ja lopputuotteen alkoholipitoisuus vähintään 37,5 tilavuusprosenttia. (Asetus tislattujen alkoholijuomien määritelmistä 787/2019; Bamforth & Cook, 2019, s. 140; Hutkins, 2018, s. 507; Piggott, 2012, s. 348)

2.1 Rommien luokittelu

Rommeille ei ole virallista kansainvälistä luokittelua, joten ne voidaan luokitella monella eri tapaa. Tyypillisiä luokitteluperusteita ovat alkuperä, flavori, väri ja maku. Rhum agricole on yksinomaan sokeriruo'on mehusta tehtyä rommia, jolla on ranskalaiset juuret. Sokeriruo'on mehusta tehdyssä rommissa esiintyviä flavoreja ovat multainen, heinämäinen ja mineraalinen. Sokeriruo'on melassista tehtyä rommia voidaan kuvailla kukkaiseksi, mausteiseksi ja hieman makeaksi. Brasilialaisen luokittelun mukaan vaaleat rommit sisältävät makuun vaikuttavia yhdisteitä eli kongeneereja alle 200 mg/l alkoholia ja tummat rommit 200–500 mg/l, jonka lisäksi tummat rommit ovat yksinomaan melassista valmistettuja. Pitkään kypsytyt rommit ovat kaikki rommit, joiden kypsytyks on kestänyt vähintään kaksi vuotta. (Mangwanda ym., 2021, s. 2; Pandey ym., 2017, s. 462; Piggott, 2012, s. 53)

Vaaleiden rommien fermentointi kuten myös ikäännyttäminen vie vähemmän aikaa kuin tummien rommien. Vaaleat rommit voidaan ikäännyttää ruostumattomasta teräksestä

tehdyissä astioissa, sillä niiden ei haluta saavan yhtä paljon makua tai väriä puisista tynnyreistä kuin tummien rommien. Pitkään kypsytettävät rommit kypsytetään usein puisissa tynnyreissä. Vaaleiden rommien tislaukseen käytetään pääsääntöisesti jatkuvaa tislausta ja tummien rommien tislaukseen pannutislausta. Jari Karlsténin kirjassa Juomista jaloimmat (2007) on esitelty eräs rommien luokittelutapa (0). (Hutkins, 2018, s. 508; Pandey ym., 2017, s. 464; Piggott, 2012, s. 53)

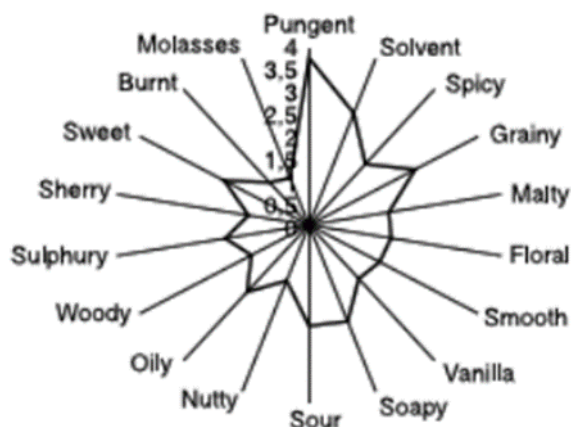
Taulukko 1. Rommien luokittelutapa. (Karlstén, 2007, s. 70)

White/light/silver	- Kirkkaita, keveitä ja kuivia rommeja. - Pääsääntöisesti valmistetaan kolonnitislauksimenetelmällä. - Suurin osa ei-ikäännytettyjä.
Golden/oro/ambre	- Keskitäyteläisiä ja hieman makeahkoja rommeja. - Voidaan valmistaa pannu- tai kolonnitislauksella. Tislauksimenetelmät on esitelty kappaleessa 4.3. - Ikäännyttäminen lyhytkestoinen ja tapahtuu tammitynnyreissä.
Dark/black	- Väritään tummia ja voimakkaan melassisia rommeja. - Valmistetaan pääsääntöisesti pannutislauksimenetelmällä.
Premium aged/añejo/rhum vieux	- Meripihkan ja kullanuskean värisiä rommeja. - Pitkiä aikoja tammitynnyreissä ikäännytettyjä.
Single marks/yksittäistisleet	Sekoittamattomia yksittäiseriä rommia, joten jokainen erä on erilainen.
Overproof/korkeaprosenttiset rommit	- Pääosin vaaleita ja vain hieman ikäännytettyjä rommeja. - Alkoholiprosentti korkea, esimerkiksi 75,5 %.
Spiced/maustetut rommit	Maustetut rommit luokitellaan maustetuksi viinaksi, sillä EU:n lainsäädännön mukaan rommia ei saa maustaa (Asetus tislattujen alkoholijuomien määritelmistä 2019/787).
Wedderburn/plummer	- Vahvoja ja voimakkaan makuisia pannutislattuja rommeja Jamaikalta. - Käymisprosessissa lisätään edellisen tislauksen jäänteitä (dunder).

2.2 Rommin flavori

Tyypillisiä termejä juuri tislatus rommin aistinvaraisessa arvioinnissa ovat esimerkiksi heinämäinen, öljyinen ja rikkimäinen, kun taas ikäännyttämisen jälkeen termistöön tulevat esimerkiksi vaniljainen, mausteinen ja kukkainen. Kuva 1 on rommille laadittu aistinvaraisen arvioinnin termistö, joka sisältää esimerkiksi termit pistävä, mausteinen, heinämäinen, kukkainen, pehmeä, vaniljainen, hapan, rikkimäinen ja makea. Tähtikuvaaja esittää rommille tyypillisten piirteiden esiintyvyyttä aistinvaraisessa arvioinnissa erään kaupallisen rommin osalta. Kuvaajassa lähellä keskipistettä ovat heikoimmin havaittavat ominaisuudet ja kauimpana keskipisteestä vahvimmin havaittavat ominaisuudet. Vahvimmin kyseisestä rommista havaittuja ominaisuuksia ovat pistävä, heinämäinen, saippuainen ja hapan, kun taas heikommin havaittavia ominaisuuksia mausteinen, kukkainen, vaniljainen ja pähkinäinen. Tästä voidaan päätellä rommin olevan hiljattain tislattua ja ikäännyttämiskauden olleen lyhyt, tai sitä ei ole ollut ollenkaan. Heikosti havaittava kukkaisuus kertoo käymishiivasta, jonka esterituotto on alhainen. (de Souza ym., 2006, ss. 485–488; Piggott, 2012, s. 355; Suomalainen & Lehtonen, 1979, s. 150; Piggott, 2012, s. 356)

Kuva 1. Aistinvaraisesti havaittavia rommille tyypillisiä piirteitä ovat esimerkiksi mausteinen, heinämäinen, kukkainen, ja rikkimäinen (Piggott, 2012, s. 356).



3 Sokeriruoko

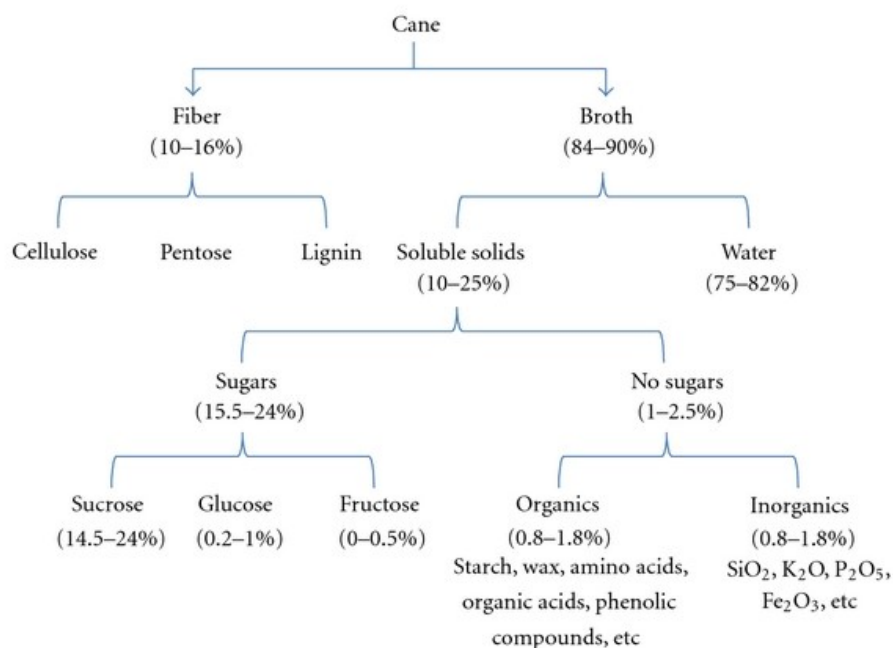
Sokeriruoko (*Saccharum officinarum*) on viljelykasvi, jota käytetään erityisesti sokerin, etanolin ja alkoholijuomien tuotannossa. Sokerin valmistuksen pääraaka-aineena voidaan

käyttää sokeriruokoa tai sokerijuurikasta. Sokeriruoko on huomattavasti yleisemmin käytetty, sillä 80 % tuotetusta sokerista on valmistettu sokeriruo'osta. Sokerijuurikkaasta sokeria tuotetaan pääosin alueilla, joissa ilmasto on liian kylmä sokeriruo'on viljelyyn. Sokeri on tärkeä vientituote esimerkiksi Brasilialle, joka oli vuonna 2014 suurin sokeriruo'on tuottaja maailmassa Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö FAOn mukaan. (Santos ym., 2015, s. xxiii)

3.1 Sokeriruo'on koostumus

Sokeriruoko koostuu kuiduista ja nestejakeesta, joka sisältää liukoisia ja liukenemattomia aineita sekä vettä. Kuidut muodostavat sokeriruo'on kiintojakeen, ja sijaitsevat pääosin kasvin varressa. Liukenematon aines koostuu pääosin epäorgaanisista aineista ja on esimerkiksi asiaankuulumatonta maaperästä peräisin olevaa ainesta. Liukenemattomien aineiden pitoisuuksiin voidaan vaikuttaa kasvatus- ja sadonkorjuumenetelmillä. Liukoiset aineet ovat pääosin sokereita, mutta myös pieniä pitoisuuksia esimerkiksi aminohappoja voi esiintyä sokeriruo'ossa. Kuva 2 on kuvattu sokeriruo'on koostumus pääpiirteittäin. Kuitenkin eri yhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttavat esimerkiksi viljelyolosuhteet. (Canilha ym., 2012, s. 4)

Kuva 2. Sokeriruo'on koostumus (Canilha ym., 2012, s. 4).



3.2 Sokerin valmistusprosessi sokeriruo'osta

Leikattu sokeriruoko toimitetaan sokeriruokomylylle, jossa pyörivät veitset ja vasaramyllyt hienontavat sen. Leikattu sokeriruoko tulisi toimittaa jauhatukseen 24 tunnin sisällä, jotta välttyään kontaminaatioilta. Jauhetusta sokeriruo'osta voidaan uuttaa sokeriruokomehu joko usealla valssimyllyllä tai diffuusiolla. Käytettäessä valssimyllyjä kuumaa vettä syötetään vastavirtaan sokeriruokoon nähden, jolloin saadaan uutettua raaka mehu ja kiinteä jäännös erilleen. Diffuusioon perustuvassa nesteen ja kiintojakeen erotuksessa molekyylit pyrkivät väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan pitoisuuteen, joten lisäämällä vettä sokeriruo'on molekyylit pyrkivät veteen, jolloin saadaan erotettua sokeriruokomehu kiintoaineesta. Kiintoainetta voidaan käyttää tehtaan energiantuotantoon. (Bamforth & Cook, 2019, s. 140; Cassano & Drioli, 2014, s. 175)

Sokeriruokomehu puhdistetaan ja selkeytetään kalkitsemalla. Raaka sokeriruokomehu on tummanvihreää ja sisältää ei-sokeripitoisia epäpuhtauksia. Kuumennuksen ja kalkituksen avulla nostetaan mehun pH:ta ja tuhotaan sokeriruo'on sisältämiä entsyymejä. Kalkki myös reagoi sokeriruokomehuun liuenneiden aineiden kanssa muodostaen liukenemattomia suoloja. Kuumennuksen ja kalkitsemisen ansiosta saadaan lopulta erotettua raa'asta sokeriruokomehusta kiinteä osa (lieju, suodinkakku) ja nestemäinen osa eli sokeriruokomehu. Sokeriruokomehua konsentroidaan haihduttamalla, kunnes nesteen Brix-arvo on 60–75 Bx°. Haihdutuksen jälkeen sokeriruokomehua kutsutaan siirapiksi. Siirappi keitetään ja kiteytetään monivaiheisella prosessilla, jonka lopputuotteena saadaan valkoinen sokeri ja sivutuotteena sokeriruokomelassi. Sadasta tonnista sokeriruokoa saadaan keskimäärin neljästä viiteen tonnia sokeriruokomelassia. (Bamforth & Cook, 2019 s. 140; Cassano & Drioli, 2014, s. 175; Oates, 2008, s. 347)

3.3 Sokeriruokomelassi

Sokeriruokomelassi on rommin valmistuksen pääraaka-aine. Sokeriruokomelassi on tumma viskoosinen neste, jonka fysikaalisiin ominaisuuksiin vaikuttavat melassin koostumus ja fysikaaliset olosuhteet. Melassiin vaikuttavat myös esimerkiksi sokeriruo'on viljelyolosuhteet ja sadonkorjuumenetelmät. Viskositeetti voi vaihdella paljon riippuen epäorgaanisen aineen ja polysakkaridien määrästä sekä lämpötilasta. Teollisessa mittakaavassa melassi toimitetaan

tislaamoille kuumana ja sen säilytyslämpötila on 45 °C. Lämpötila ei saisi ylittää 45 °C:ta, jotta vältetään Maillard-reaktioita ja tilapäisiltä palamisreaktioilta. Melassin pH on tyypillisesti 5–7. Melassin sisältämät suolat voivat myötävaikuttaa liuoksen puskurikykyyn, joka esimerkiksi edistää flavorin tasapainoisuutta. (Clarke, 2003, ss. 5711–5717; Piggott, 2012, s. 349)

Sokerin lisäksi sokeriruokomelassi sisältää mineraaleja, ja on esimerkiksi hyvä kalsiumin ja kaliumin lähde. Sokeriruokomelassi sisältää myös hyödyllisiä vitamiineja, mutta pitoisuudet ovat pieniä. Taulukko 2 on kuvattu tiivistetysti sokeriruokomelassin keskimääräinen kemiallinen koostumus. Sokeriruokomelassin tärkein ominaisuus rommin valmistuksen kannalta on sen korkea sokeripitoisuus. Melassin sokeripitoisuus määrittää rommin vesimelassiseoksen suhdeluvun, ja näin vaikuttaa oleellisesti optimaalisen käymisprosessin löytämiseen. Melassin proteiinipitoisuus on melko alhainen, jonka vuoksi käymisprosessi voi vaatia typen lähteen lisäyksen hiivalle. Melassin käyttöä elintarviketeollisuudessa tukevat sen väri ja moninainen flavori. Melassista tunnistettuja flavoreita ovat esimerkiksi karamellinen, karvas ja lakritsainen. Rommin kaltaisten väkevien alkoholituotteiden valmistuksen lisäksi sokeriruokomelassia käytetään esimerkiksi leivinhiivan tuotannossa ja väriaineena leipomoteollisuudessa. (Anal, 2017, s. 124; Clarke, 2003, ss. 5711–5717; OECD, 2015, s. 170)

Taulukko 2. Melassin koostumus (OECD, 2015, s. 170).

Rakenneosat	Vaihteluväli
Vesi %	16.5–31.1 %
Raaka proteiini % kuiva-aineesta	3.0–5.8 %
Tuhka % kuiva-aineesta	8.1–18.4 %
Sakkaroosi % kuiva-aineesta	34.8–45.8 %
Kaikki sokerit % kuiva-aineesta	48–65.3 %

4 Rommin valmistusprosessi sokeriruokomelassista

4.1 Tarvittavat esikäsittelyt

Sokeriruokomelassin sokeripitoisuus vaihtelee välillä 48–65.3 %, ja sen esikäsittelyyn kuuluu laimentaminen vedellä. Laimennosvesi voi olla esimerkiksi tislauksprosessissa käytettyä käsiteltyä lämmitysvettä. Liuoksen haluttu sokeripitoisuus on 45 °Bx, jolloin laimennossuhde olisi 1:4–5 ja sokeripitoisuus 15 %. Lämpötila nostetaan 70–80 °C:een ja pH säädetään tarvittaessa kemikaaleilla, esimerkiksi rikkihapolla arvoon 4.8–5.5. Näiden toimenpiteiden tarkoituksena on minimoida kontaminaatioiden riski ja saostaa melassista mahdollisia ei-toivottuja kiintoaineita pois. Laimennetusta ja saostetusta seoksesta selkeytetään neste (puhdistettu melassi), jonka sokeripitoisuus laimennetaan 15–24 °Bx:iin ja siirretään käymisastiaan. (Bamforth & Cook, 2019, s. 140; Green, 2015, s. 21; Hutkins, 2018, s. 507; Pandey ym., 2017, s. 463; Piggott, 2012, s. 349)

Laimennettuun melassiin voidaan lisätä dunder, joka on tislauksesta saatu nestemäinen jäännös. Dunderin lisäyksellä voidaan edistää makuun positiivisesti vaikuttavien mikrobien kasvua fermentoinnissa, laskea melassin pH:ta ja kierrättää osa tislaamossa muodostuvasta jätevedestä. Dunderin lisäyksen määrä riippuu täysin tislaamosta, mutta tyypillisesti määrä on 0–10 %. Dunderia voidaan myös lisätä rommin valmistuksen muissa vaiheissa. (Green, 2015, s. 23)

4.2 Käyminen

Käymisen tarkoituksena on saada hiiva tuottamaan sokerista alkoholia ja kongeneereja, eli juoman flavoriin vaikuttavia haihtuvia tai haihtumattomia yhdisteitä. Käymisastiaan lisätään hiiva ja mahdollisesti hiivan tarvitsemia ravinteita. Käymisastia on tyypillisesti sylinterimäinen kartiomallinen ruostumattomasta teräksestä valmistettu fermentori, joka on ylhäältä joko kupumainen tai avoin ja pohjasta kartiomainen. Kartiomainen pohja helpottaa käymisessä muodostuvan sakan talteenottoa. Sakka sisältää esimerkiksi hiivasoluja, jotka on mahdollista käyttää uudelleen. Rommin käymistä ja käymishiivoja on käsitelty tarkemmin

kappaleissa viisi ja kuusi. (Bamforth & Cook, 2019, s. 140; Gibson & Newsham, 2018, s. 401; Karlstén, 2007, s. 66; Pandey ym., 2017, s. 464; Piggott, 2012, s. 350)

4.3 Tislaus

Pelkällä hiivan toiminnalla ei saada aikaan väkeville alkoholijuomille ominaista korkeaa alkoholipitoisuutta. Hiivasolut eivät kestä liian korkeita alkoholipitoisuuksia, vaan lakkaavat toimimasta tai kuolevat tuotettuaan tietyn määrän alkoholia aineenvaihdunnassaan. Tislauksen tarkoituksena onkin konsentroida tisleen alkoholipitoisuus, flavori ja maku. Tislauksessa toisiinsa liuenneet aineet erotetaan kuumentamalla seosta, jolloin alhaisemman kiehumispisteen omaava liuos haihtuu. Haihtunut tisle tiivistetään takaisin nestemäiseen muotoon. Alkoholijuomia tislattaessa alkoholin kiehumispiste on alhaisempi kuin veden. Tislauslaitteisto on perinteisesti kuparista tai puusta, mutta ruostumattoman teräksen käyttö laitteistossa on yleistynyt. Rommi voidaan tislata pannu- eli panostoisimisella tislauksella tai kolonni- eli jatkuvatoimisella tislauksella. Yleensä tummat rommit tislataan pannumenetelmällä ja vaaleat rommit jatkuvatoimisella menetelmällä. Nykyisin tislaamoilla on myös käytössään erilaisia hybridimalleja näistä kahdesta tislauslaitteistosta. (Bamforth, 2008, s. 131; Gibson & Newsham, 2018, s. 400; Hutkins, 2018, s. 508)

Etanoli on merkittävin alkoholi alkoholijuomissa, mutta sen lisäksi voi esiintyä esimerkiksi metanolia, propanolia ja butanolia. Alkoholien kiehumispisteet eroavat toisistaan, joka vaikeuttaa tislautusta. Lisäksi kaikki alkoholit eivät ole yhtä toivottuja lopputuotteeseen. Alkoholien lisäksi tislattava tuote sisältää kongeneereja, joista toiset ovat haihtuvia ja toiset eivät. Kuten alkoholien myös kongeneerejen kiehumispisteet eroavat toisistaan, eivätkä kaikki kongeneerit ole toivottuja lopputuotteeseen. Väkeviä juomia valmistettaessa tislaus voidaan toistaa useita kertoja, ja näin haihduttaa ensin alhaisemman kiehumispisteen alkoholit ja seuraavaksi korkeamman kiehumispisteen omaavat alkoholit. Alla on kuvattuna eri alkoholien keskimääräisiä kiehumispisteitä:

- Metanoli 64,7 °C
- Etanoli 78,4 °C
- Propanoli 97 °C
- Butanoli 117,7 °C

(Gibson & Newsham, 2018, s. 400)

Ensimmäiseksi haihtuvat yhdisteet kiehuvat alhaisimmassa lämpötilassa, ja niitä kutsutaan headiksi. Seuraavaksi haihtuvaa osaa eli etanolia kutsutaan heartiksi ja vähiten toivottuja alkoholeja, hiilihydraatteja ja muita komponentteja, jotka viimeisenä haihtuvat kutsutaan tailiksi. Ensimmäisessä tislauksessa jotkut kongeneerit eivät haihdu kunnolla alhaisen alkoholipitoisuuden takia, vaan jäävät headiin tai tailiin. Uudelleen tislattaessa, kun tuotteen alkoholipitoisuus on korkeampi, voidaan edellisestä tislauksesta saadut head ja tail lisätä erään. Silloin korkeamman alkoholipitoisuuden vuoksi toivotut kongeneerit saadaan heartin joukkoon. Taulukko 3 on kuvattu, mitä yhdisteitä head, heart ja tail voivat sisältää. (Gibson & Newsham, 2018, s. 401)

Taulukko 3. Headin, heartin ja tailin mahdollisia komponentteja (Gibson & Newsham, 2018, s. 402).

Head		
	Aldehydit, kuten asetaldehydi	• Usein kasvien aineenvaihdunnan tuottamia. • Pistävä, metallinen, hedelmäinen haju. • Asetaldehydin kiehumispiste 21 °C.
	Asetoni	• Väritön neste. • Kiehumispiste 56 °C.
	Esterit, väkevissä alkoholituotteissa yleisin on etyyliasetaatti.	• Makeat, hedelmäiset vivahteet. • Etyyliasetaatin kiehumispiste 77 °C.
	Metanoli	• Kiehumispiste 64,7 °C. • Myrkyllinen.
Heart		
	Etanoli, keskeiset aromiin ja <u>flavoriin</u> vaikuttavat komponentit.	• Etanolin kiehumispiste 78,4 °C.
Tail		
	Propanolia, butanolia, <u>pentanolia</u> , proteiineja, hiilihydraatteja, sikunaöljy.	• 1-Propanolin kiehumispiste 97,2 °C. • Butanolin kiehumispiste 118 °C.

Pannutislauksessa erä uutta rommia ja aiemmista tislauksista saatua rommia kuumennetaan siihen pisteeseen, että alhaisemman kiehumispisteen omaava neste haihtuu ja nousee tislausastian yläosaan. Höyry ohjautuu astian yläosaan liitettyyn putkeen, joka jatkuu kierteisenä kylmävesiastiaan. Kylmässä vedessä olevassa putkessa höyry tiivistyy takaisin nesteeksi ja menee keräysastiaan. Tislauksen alussa kerätään head, seuraavaksi heart ja viimeisenä tail. Tislaus voidaan toistaa useita kertoja, yleensä kuitenkin vain kaksi kertaa. Pannutislauksen haittana on, että laitteisto pitää pestä jokaisen erän välissä. (Bamforth & Cook, 2019, s. 141; Gibson & Newsham, 2018, s. 404)

Jatkuvatoimisessa tislauksessa yleisin metodi on Coffey Still -tislauslaite, joka koostuu kahdesta rinnakkaisesta kolonnista. Toista kolonnia (väkevöintikolonne) kiertää putki, jonne neste syötetään ja näin lämmitetään väkevöintikolonnin johtaman lämmön avulla. Lämmitetty neste syötetään ensimmäiseen kolonniin (erittelykolonne) sen yläosasta ja alaosasta syötetään höyryä. Nesteen valuessa alaspäin haihtuvat aineet erottuvat siitä ja nousevat erittelykolonnin yläosaan jatkaen matkaansa väkevöintikolonnein. Heart poistetaan sen noustessa väkevöintikolonnin yläosaan. Tail (kolonnin alaosassa) ja head (kolonnin yläosassa) voidaan syöttää erittelykolonnein ja uudelleen käyttää. (Bamforth & Cook, 2019, s. 134)

4.4 Ikäännyttäminen

Ikäännyttäminen tammitynnyreissä on suosittua, sillä rommi saa tammesta hyviä väri- ja makuaineista. Samalla tammi häivyttää tuoreelle tisleelle tyypillistä kitkerää makua. Ikäännyttämisen kesto, tynnyreiden koko, juoman alkoholipitoisuus ja se onko tynnyri uusi vai kertaalleen käytetty vaikuttavat kaikki siihen, kuinka paljon kypsyttäminen muokkaa lopputuotteen makua. Esimerkiksi pienemmässä tynnyrissä rommin tilavuus on pienempi, jolloin myös tynnyri vaikuttaa enemmän makuun. Tynnyreitä voidaan polttaa ennen rommin lisäämistä tynnyriin, jolloin vaikutetaan makujen muodostumiseen. Puu on huokoinen materiaali, joten kypsytyksen aikana rommista haihtuu erilaisia komponentteja. Lämpimissä olosuhteissa rommi ikääntyy nopeammin, mutta siitä myös haihtuu enemmän komponentteja. Eri ikäisiä ja eri laatuista rommeja sekoitetaan usein keskenään halutun flavorin ja värin aikaansaamiseksi. (Karlstén, 2007, s. 68; Pandey ym., 2016, s. 465; Piggott, 2012, s. 36, s. 353)

5 Hiiva ja käymisprosessi

Hiivan käymisreaktiota on pitkään hyödynnetty alkoholipitoisten juomien valmistuksessa. Käyminen on biokemiallinen reaktio, jossa hiivan aineenvaihdunnassa sokeri muuttuu alkoholiksi. Alkoholin lisäksi hiivan aineenvaihdunnassa muodostuu hiilidioksidia sekä toivottuja ja ei-toivottuja flavoriin vaikuttavia yhdisteitä, joten hiivakannalla on merkittävä vaikutus lopputuotteen makuprofiiliin. Optimaalinen käymislämpötila vaihtelee hiivakannan mukaan 28 °C:sta 35 °C:een. Käymisaika on noin 20–26 tuntia, mutta tummilla rommeilla käyminen voi viedä muutamasta päivästä 1–3 viikkoon. Käymisen lopussa nesteen alkoholipitoisuus on noin 5–9 %. Saantoon vaikuttavia tekijöitä ovat hiivakanta, sokeripitoisuus, lämpötila ja aika. Alkoholipitoisten juomien valmistuksessa yleisimmin käytettyjä hiivoja ovat *Saccharomyces*-suvun hiivat, erityisesti *Saccharomyces cerevisiae*. Perinteisessä rommin valmistuksessa on luotettu ilmassa ja raaka-aineissa olevien villihiivojen ja bakteerien aikaansaamaan spontaaniin käymisreaktioon, mutta nykyään luotetaan pääosin laboratoriossa tuotettuihin tasalaatuisiin hiivoihin. (Bamforth & Cook, 2019, s. 140; Gibson & Newsham, 2018, s. 374; Karlstén, 2007, s. 65; Pandey ym., 2017, s. 464; Piggott, 2012, s. 350; Smith, 2009, s. 166)

Rommin käymisprosessissa hiivan pääasiallinen hiilen lähde on melassin sisältämä sakkaroosi. Hiivan typen tarve ei välttämättä täyty melassin sisältämästä typen määrästä, joten käyminen voi vaatia jonkin typpilähteen lisäyksen. Toisaalta korkea vapaiden aminohappojen pitoisuus voi olla hiivan kasvua rajoittava tekijä: Hiivan käyttäessä runsaasti vapaita aminohappoja lopputuotteen aistinvaraiset ominaisuudet voivat kärsiä, sillä vapaiden aminohappojen määrä ja koostumus vaikuttavat aminohapposynteesin myötä sikunaöljyn, esterien, visinaalisten diketonien ja rikkiyhdisteiden muodostumiseen. Hiivan hyödyntää vapaita aminohappoja enemmän lämpötilan ja liukoisen hapen pitoisuuden ollessa korkeita. Kasvaakseen hiiva tarvitsee myös mineraaleja ja vitamiineja, joista osa kuten fosfori on saatavilla melassista. (Mangwanda ym., 2021, s. 16; Walker & Stewart, 2016, s. 5)

5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces-suvun hiivat kuuluvat kotelosienien sienilajiin. *S. cerevisiae* on parhaiten tutkittu ja tunnettu hiivalaji, jota on hyödynnetty kauan aikaa niin alkoholijuomien kuin muidenkin elintarvikkeiden valmistuksessa. *S. cerevisiae* pystyy fermentoimaan heksooseja (kuusi hiiliatomia sisältäviä monosakkarideja), sakkaroosia, maltoosia, maltotriooseja ja D-galaktoosia. Tietyt kannat pystyvät käyttämään myös muita hiilen lähteitä, mutta sakkaroosia käyttävä hiivakanta on keskeistä rommin valmistuksessa sokeriruokomelassin koostumuksen vuoksi (Taulukko 2). *S. cerevisiae* ei voi hyödyntää ilmakehän typpeä, vaan vaatii typen lähteekseen orgaanista typpeä kuten aminohappoja, epäorgaanista typpeä kuten ammoniumsuoloja tai ureaa. Kantojen kyvyssä hyödyntää typen eri muotoja on eroavaisuuksia. Hiilen ja typen lisäksi hiiva vaatii pieniä pitoisuuksia joitakin mineraaleja, esimerkiksi fosforia ja magnesiumia, sekä vitamiineja kuten biotiinia. Vaikka mineraalien ynnä muiden pitoisuudet ovat pieniä, voi niiden merkitys hiivan aineenvaihdunnan toiminnan kannalta olla suuri. Esimerkiksi sinkin puutteellinen läsnäolo voi hidastaa käymisprosessia. (Bamforth & Cook, 2019, s. 32; Batt & Tortorello, 2014, s. 309; Walker & Stewart, 2016, s. 4)

S. cerevisiae vaatimat kasvuolosuhteet vaihtelevat kannan mukaan. Useimmat kannat pystyvät kasvamaan alkoholipitoisuuden ollessa 8–12 %, ja selviytymään alkoholipitoisuuden ollessa jopa 15 %. Useimmat kannat pystyvät kasvamaan 5–40 °C:ssa, mutta optimaalisen kasvilämpötila on pääsääntöisesti 25–35 °C. *S. cerevisiae* pystyy kasvamaan vähähappisissa olosuhteissa, mutta täysin anaerobisessa ympäristössä keskeisten solun rakenneosasten muodostuminen pysähtyy ja hiivasolujen kasvu lakkaa. Optimaalinen pH *S. cerevisialle* on 4,5–6,5. Veden aktiivisuus (a_w) kertoo tuotteessa olevan vapaan veden määrän, eikä ole sidoksissa tuotteen kokonaisvesipitoisuuteen. Vapaan veden määrän ollessa suuri, on mikrobien helpompi hyödyntää vettä, ja näin niiden kasvaminen helpottuu. *S. cerevisiae* vaatima a_w -pitoisuus on noin 0,9. Veden läsnäolo käymisessä on tärkeää, sillä liian korkea sokeripitoisuus voi aiheuttaa osmoottista stressiä hiivasoluille ja vaikuttaa solun toimintaan. (Batt & Tortorello, 2014, s. 310; Roos, 2003, ss. 6094–6101; Ruokavirasto, 2020; Walker & Stewart, 2016, s. 4)

Fernándezin ym. tutkimuksessa (2008, ss. 64–70) *S. cerevisiae* termofiilejä kantoja eristettiin teollisessa käytössä olleesta jäännöshiivasta. Valitun hiivakannan lämmönkestävyys toiminta-alueeksi vahvistettiin laboratoriomittakaavan käymiskokeilla 30–45 °C, ja hiivan alkoholituotto oli 0,41 g/g 40 °C lämpötilassa. Kuudessa teollisuusmittakaavan koe-erässä hiivakannalla saatiin keskimäärin 5,2 til-%, joka on korkeampi kuin vertailukohteina olleiden teollisten hiivakantojen tuotto (4,8 til-%). Valittua hiivakantaa käyttämällä käymisaika lyhentyi 16 tunnista 12 tuntiin, ja hiiva tuotti toivottuja yhdisteitä rommiin.

5.2 *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces-sukuun kuuluvia lajeja ovat *S. octosporus*, *S. japonicus* ja *S. pombe*.

Schizosaccharomyces-suvun hiivat selviävät korkeissa sokeripitoisuuksissa, mutta eivät kestä korkeaa suolapitoisuutta. Elintarviketeollisuudessa yleisimmin käytetty

Schizosaccharomyces-suvun hiiva on *S. pombe*, joka pystyy käyttämään hiilen lähteenään glukoosia, glyserolia, sakkaroosia, raffinoosia ja maltoosia. Kuten alaluvussa 5.1 todettiin, on rommin valmistuksen kannalta keskeisintä hiivakannan kykyä käyttää sakkaroosia hiilen lähteenään. Toleranssi korkeille sokeripitoisuuksille lisää *S. pomben* sopivuutta melassipohjaisen rommin valmistukseen. Se pystyy kasvamaan 18–37 °C:ssa.

Schizosaccharomyces-suvun hiivojen pH-alueesta löytyy melko ristiriitaista tietoa. Joidenkin tutkimusten mukaan hiiva voi selvitä melko samankaltaisissa pH-arvoissa kuin

Saccharomyces-suvun hiivat (≈ 5.5), kun taas osassa tutkimuksissa *Schizosaccharomycesin* toiminta lakkaa näin korkeassa pH:ssa. *Schizosaccharomycesia* on eristetty esimerkiksi hedelmämehuista, joiden pH-arvo on 3.0–3.5. (Batt & Tortorello, 2014, s. 365; Grumezescu & Holban, 2019, s. 393; Mangwanda ym., 2021, s. 6; Petersen & Russell, 2016; de Queiroz & Pareilleux, 1990, ss. 578–581)

5.3 Hiivan aineenvaihduntatuotteet

Opinnäytetyössä tutkittiin hiivakannan vaikutusta muodostuvan alkoholin määrään. Hyvällä hiivan alkoholituotolla on myös vaikutus rommin flavoriin, sillä alkoholin muodostuminen mahdollistaa tiettyjen aistinvaraisiin ominaisuuksiin vaikuttavien yhdisteiden kuten esterien

ja rasvahappojen muodostumisen. Etanolin lisäksi muodostuu pieniä määriä korkeampia alkoholeja, jotka myös vaikuttavat tuotteen alkoholipitoisuuteen ja flavoriin. Käymishiivan aineenvaihduntatuotteiden lisäksi aistinvaraisiin ominaisuuksiin vaikuttavat esimerkiksi rommin raaka-aineet, ikäännyttäminen ja tislaus. (Nykänen & Suomalainen, 1983, s. 3; Piggott, 2012, s. 355; Pino ym., 2012, ss. 1436–1441)

5.3.1 Alkoholit

Etanolin lisäksi alkoholijuomissa esiintyy korkeampia alkoholeja eli sikuna-alkoholeja/sikunaöljyä, jotka muodostuvat alkoholikäymisen sivutuotteena. Vaikka niiden pitoisuudet ovat pieniä etanoliin verrattuna sikuna-alkoholeilla suuri vaikutus alkoholituotteiden aistinvaraisiin ominaisuuksiin, sillä ne ovat voimakkaan makuisia ja hajuisia. Pieninä pitoisuuksina korkeammat alkoholit ovat edullisia lopputuotteen aistinvaraisten ominaisuuksien kannalta, mutta suurina pitoisuuksina ne aiheuttavat virhemakuja. Isoamyylialkoholi on merkittävin sikuna-alkoholeista, ja alkoholijuoman tyyppin mukaan isoamyylialkoholi muodostaa 40–70 % kaikista esiintyvistä sikuna-alkoholeista. Isoamyylialkoholia muodostuu käymisessä hiivan aineenvaihdunnan ansiosta, ja se aiheuttaa lopputuotteeseen banaanimaisten flavorin. Isoamyylin ohella esiintyviä sikuna-alkoholeja ovat 1-propanoli, isobutanoli ja pentanoli. (Enari & Mäkinen, 2014, s. 136; Hazelwood ym., 2008, ss. 2259–2266; Holt ym., 2019, ss. 193–222; Suomalainen & Lehtonen, 1979, s. 151)

Korkeampia alkoholeja muodostuu transaminaatiossa eli aminohappojen katabolisessa reaktiossa. Transaminaatiossa aminoryhmä siirtyy aminohaposta vastaanottavalle α -ketokarboksyylihapolle, ja reaktion seurauksena muodostuu uusi α -ketokarboksyylihappo ja aminohappo. Käymisessä hiivan aineenvaihdunnassa tapahtuu transaminaatiota. Pääasiallinen typen lähde hiivalle on aminohapot, joista merkittävimminä sikunaöljyn muodostumisen kannalta ovat valiini, leusiini ja isoleusiini. Kun hiivan aineenvaihdunnassa aminohapon aminoryhmä on siirtynyt α -ketokarboksyylihapolle (transaminaatio), muodostunut uusi α -ketokarboksyylihappo ei pysty ohjautumaan keskeiseen hiilen aineenvaihduntareittiin (carbon pathway). Tämän vuoksi hiivasolut muuttavat α -ketokarboksyylihapon korkeammiksi alkoholeiksi tai hapoiksi Ehrlichin aineenvaihduntareitin kautta, ja erittävät ne kasvuliukoiseensa. Rommin valmistuksessa pääraaka-aineena on sokeriruokomelassi, joka ei sisällä juurikaan typpeä. Tämä todennäköisesti rajoittaa

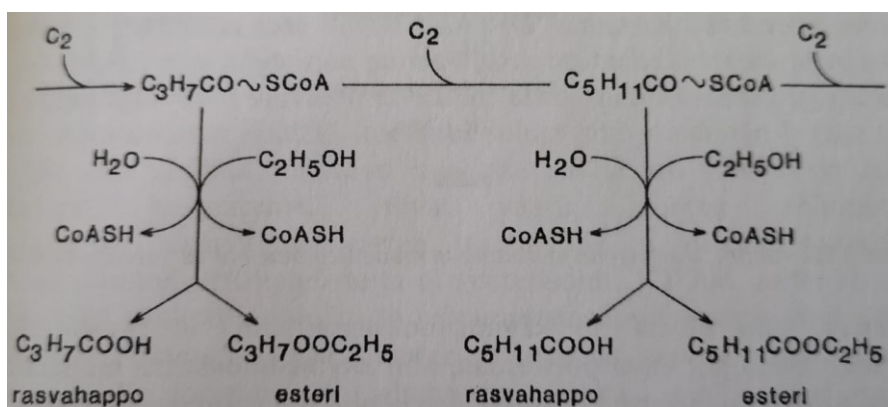
korkeampien alkoholien muodostumista. (Hazelwood ym., 2008, ss. 2259–2266; Litwack, 2018, s. 359; Suomalainen & Lehtonen, 1979, s. 152; Walker & Stewart, 2016)

Fahrasmanen ym. (1985) artikkelissa Production of higher alcohols and short chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations *Saccharomyces*-suvun hiivakannat tuottivat korkeampia pitoisuuksia sikunaöljyä kuin *Schizosaccharomyces*-suvun kannat, tosin *Schizosaccharomycesin* tuottama propanolin määrä oli korkeampia kuin *Saccharomycesillä*. Käymiskoe oli suoritettu synteettisellä kasvualustalla, johon lisättiin sokeriruokomehua. Sokeriruokomehun lisäys nosti propanolin, isobutanolin ja isopentanolin pitoisuuksia tuotteessa, mutta kasvualustan merkitys hiivan tuottaman sikunaöljyn määrään oli kuitenkin toissijainen. Samassa tutkimuksessa havaittiin *Saccharomycesin* tuottavan enemmän rasvahappoja kuin *Schizosaccharomycesin*. (Fahrasmane ym., 1985, ss. 1427–1436)

5.3.2 Esterit

Estereillä on suuri vaikutus alkoholijuomien flavoriin, ja niille tyypillinen ominaisuus on miellyttävän hedelmäinen tuoksu. Estereitä muodostuu hapon ja alkoholin reagoidessa keskenään, ja tähän perustuu hiivasolunkin sisällä tapahtuva kaksivaiheinen esterisynteesi. Ensimmäisessä vaiheessa muodostuvan esterin rasvahappo-osa aktivoituu asyyli-CoA-yhdisteeksi eli rasvahappo-CoA:ksi. Toisessa vaiheessa tapahtuu asyyli-CoA:n alkoholyysi, eli asyyli-CoA reagoi alkoholin kanssa, jolloin vapautuu CoA eli esteri tai rasvahappo. Esterien muodostuminen on sidoksissa rasvahappojen aineenvaihduntaan. Kuva 3 on esitetty rasvahappojen ja niiden estereiden muodostuminen. Rasvahappoja käsitellään alaluvussa 2.2.3. (Enari & Mäkinen, 2014, s. 138; Lehtiniemi & Turpeenoja, 2009, s. 123)

Kuva 3. Rasvahappojen ja esterien muodostuminen rasvahapposynteesissä (Enari & Mäkinen, 2014, s. 139).



Rommin esteripitoisuuteen vaikuttavat monet tekijät kuten melassin koostumus, käymislämpötila, hiivakanta sekä alkoholi- ja happipitoisuus käymisen aikana. Esimerkiksi *S. cerevisiae*n isoamyyliasetaatin (banaanimainen tuoksu) ja etyyliheksanaatin (ananasmainen tuoksu) muodostaminen ovat rajallisia hapellisissa olosuhteissa. Korkeampien alkoholien määrän ollessa korkeampi fermentoinnin aikana on myös muodostuneiden esterien määrä suurempi. Liian korkeaa alkoholipitoisuutta on kuitenkin vältettävä, sillä se inhiboi hiivan toimintaa. Tutkittaessa ikäännytetyn rommin kongeneereja merkittäviä estereitä olivat esimerkiksi etyyliasetaatti (hedelmäinen), dietyylisukkinaatti (mieto miellyttävä tuoksu) ja etyyliaktaatti (eteerinen, voimainen aromi), jonka läsnäolo tosin tarkoittanee *Lactobacilluksen* aiheuttamaa kontaminaatiota. (Burdock & Fenaroli, 2010; Maarse, 2017, s. 558; Pino ym., 2012, ss. 1436–1441; Suomalainen & Lehtonen, 1979, s. 149)

5.3.3 Rasvahapot

Rasvahappojen määrä vaihtelee suuresti eri alkoholijuomien ja jopa eri tislattujen alkoholijuomien välillä. Esimerkiksi kaasukromatografisella kuvauksella skottilaisen viskin rasvahappopitoisuus oli noin 100 mg/l, konjakin 200 mg/l ja tumman rommin 600 mg/l. Edellä mainittujen juomien keskinäinen rasvahappokoostumus on hyvin samanlainen, josta voidaan päätellä hiivan syntetisoivan pääasiallisesti samoja rasvahappoja riippumatta raaka-aineen koostumuksesta. Huomattavin ero on propioni-, butaani- ja valerianihapon pitoisuuksissa, jotka rommilla ovat korkeammat kuin viskillä ja konjakilla. Suomalaisen ja Lehtosen artikkelissa The production of aroma compounds by yeast havaittiin hiivan

tuottavan 10 °C:ssa enemmän happoja kuin 30 °C:ssa. (Suomalainen & Lehtonen, 1978, ss. 149–156)

6 Rommin käymisprosessin haasteita

6.1 Rommin käymisprosessin kontaminatit

Käytettäessä melassia käymisreaktion raaka-aineena käymiskelpoiset sokerit ovat hiivan ja muiden mahdollisten mikrobien saatavilla heti prosessin alussa, kun viljapohjaisia raaka-aineita käytettäessä osa tärkkelyksestä pilkkoutuu käymiskelpoisiksi sokereiksi vasta käymisprosessin aikana. Käymishiivan on pystyttävä toimimaan mahdollisimman pian käymisen aloituksen jälkeen, jotta ei-toivotut mikrobit eivät pääse dominoiviksi kasvatusalustassa eli melassissa. Rommin käymisprosessissa kontaminaatiota aiheuttavina bakteereina esiintyy sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia bakteereita. Tyypillinen kontaminantti melassin käymisessä on maitohappobakteereihin kuuluva *Leuconostoc mesenteroides*. *L. mesenteroides* aiheuttaa sakkaroosin polymeroitumisen käymiskelvottomiksi dekstraaneiksi. Muita melassin yleisiä kontaminantteja ovat *Zymomonas mobilis* ja *Lactobacillus fermentis*. Alkoholikäymiseen pystyvä *Z. mobilis* kykenee pelkistämään rikkiyhdisteitä tuottaen rommiin epämiellyttäviä aromeita. *L. fermentiksen* aiheuttaman kontaminaation myötä hiivan alkoholituotto laskee, sillä hiivan mahdollisuus hyödyntää hiilihydraatteja pienenee ja pH laskee optimaalisesta toiminta-alueesta *L. fermentiksen* tuottaman maitohapon myötä. (BeMiller, 2003, ss. 1772–1773; Mangwanda ym., 2021, s. 9; Jacques ym., 2003, s. 83)

6.2 Hiivan toiminnan lakkaaminen

Kesken jäänyt tai hidastunut käyminen ovat yleisiä rommin käymisprosessin haasteita, jotka johtuvat hiivan toiminnan lakkaamisesta ennen käymisprosessin valmistumista. Kesken jääneessä käymisessä riittävä määrä sokeria ei käy alkoholiksi, ja hidastunut käyminen vie oletettua enemmän aikaa. Hiivan toiminnan lakkaamiseen vaikuttavia tekijöitä voivat olla liian korkea käymislämpötila tai jonkin ravinteen, esimerkiksi typen puute kasvatusalustassa. Vaikka pysähtymisen syy, esimerkiksi liian korkea käymislämpötila poistettaisiin, on

pysähtyneen käymisen elvytys hankalaa johtuen kuolleiden hiivasolujen kasvatusliuokseen vapauttamista komponenteista. Käymisen pysähtymistä voidaan ehkäistä käyttämällä korkeita alkoholipitoisuuksia ja lämpötiloja kestäviä hiivakantoja sekä lämpötilan ja ravinnepitoisuuksien seurannalla. (Mangwanda ym., 2021, s. 15)

Käymisen onnistumiseen vaikuttaa merkittävästi hiivan toiminta, jota käymisolosuhteet säätelevät paljon. Esimerkiksi liian korkeassa sokeripitoisuudessa hiivan aineenvaihdunnassa alkaa muodostua enemmän ei-toivottuja yhdisteitä esimerkiksi osmolyttistä trehaloosia, jonka avulla hiivasolut yrittävät suojata itseään kuivumiselta. Näiden yhdisteiden tuotto vähentää alkoholituottoa ja vaikuttaa rommin aistinvaraisiin ominaisuuksiin ei-toivotulla tavalla. (Mangwanda ym., 2021, s. 15)

7 Käymisprosessin optimointi

7.1 Käymiskokeiden suunnittelu ja toteutus

Käymiskokeilla haluttiin vastata tutkimuskysymyksiin selvittämällä, millä käymishiivalla, -lämpötilalla ja sokeripitoisuudella saadaan optimaalinen käymisprosessi sekä tavoitteiden mukainen lopputuote. Testattavien käymishiivojen oli oltava saatavuudeltaan hyviä, jotta tislaamon olisi jatkossa mahdollista käyttää mitä tahansa kokeissa toimivaksi todettua hiivaa. Hiivoja valittiin neljä kappaletta. Kaikki hiivat eivät olleet varsinaisia tislehiivoja, mutta työn tilaajalla oli kokemusta eri käyttökohteeseen tarkoitetusta hiivasta rommin valmistuksessa. Vesi-melassiseoksen sokeripitoisuuden vaihteluväli määräytyi kirjallisuuden ja työn tilaajan aiempien kokemusten mukaan. Käymislämpötilan vaihteluvälin suunnittelussa hyödynnettiin myös kirjallisuutta. Suunnittelussa oli kuitenkin otettava huomioon, että tislaamon tiloissa ei ole mahdollista noudattaa kirjallisuudesta löydettyjä rommin valmistuksen korkeimpia lämpötiloja.

Kokeita suunniteltaessa huomioitiin, että yhtäaikaaisesti on monta tuloksiin vaikuttavaa tekijää, eikä ole tehokasta testata kaikkia mahdollisia muuttujia. Toimivalla koesuunnittelulla saadaan selville mitkä kokeet ovat kannattavia tehdä, ja kuinka muuttujat vaikuttavat vasteisiin. Käymiskokeet toteutettiin central composite -suunnitelmaa käyttäen, jolloin koepisteiksi tulivat muuttujien (lämpötila, sokeripitoisuus) vaihteluvälien suurin,

keskimmäinen ja pienin arvo (esimerkiksi 1, 0, -1). Näin ollen neljää eri käymishiivaa testattiin kolmessa eri lämpötilassa ja kolmessa eri sokeripitoisuudessa, ja jokainen hiiva tuli testatuksi jokaisella mahdollisella lämpötilan ja sokeripitoisuuden yhdistelmällä (Taulukko 4). Kuten Ulla Moilasan tilastollisen koesuunnittelun luennolla käytiin läpi (U. Moilanen, henkilökohtainen tiedonanto, 2.11.2020) central composite -mallinnuksen ennakkoletuksena on, että keskipiste asettuu prosessin optimin kohdalle. Tämän vuoksi keskipistettä testattiin omana koe-eränään. (Antony, 2003, s. 6; Lawson, 2010, s. 385; StatEase, n.d.; Yliruusi, 2018, s. 10)

Taulukko 4. Koesuunnitelma.

Lämpötila a (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)	Käymishiiva			
1	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
2	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
3	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
Lämpötila b (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)	Käymishiiva			
1	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
2	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
3	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
Keskipistetestaus b (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)	Käymishiiva			
1	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
2	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
3	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
Lämpötila c (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)	Käymishiiva			
1	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
2	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
3	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4

Käymiskokeet suoritettiin tislaamalla käymisteltassa, jossa lämpötilan säätely ja ylläpito onnistui hyvin (Kuva 4). Kokeen luotettavuuden kannalta satunnaistaminen, tässä tapauksessa eri lämpötilojen testaaminen yhtä aikaa olisi hyvä, mutta käymisteltassa pystyttiin testaamaan yhtä lämpötilaa kerrallaan. Käymisastiat olivat kannellisia vesilukoin varustettuja ämpäreitä. Käymisastiat putsattiin, jonka jälkeen ämpäreihin tehtiin halutun

Brix-arvon mukaiset vesi-melassiseokset. Brix-arvon määrittämiseen käytettiin refraktometriä. Melassi sisältää jonkin verran liukenemattomia aineita, jotka voivat vaikuttaa refraktometrin tulosten luotettavuuteen. Refraktometrin käyttö on kuitenkin yleinen menetelmä Brixin määrittämiseen esimerkiksi sokeriteollisuudessa (Jacques ym., 2003, s. 79). Melassin viskoosisuuden vuoksi seoksen voimakas sekoittaminen oli tärkeää. Vesi-melassiseokset hiivattiin ja siirrettiin käymisteltaan. Käymisen jälkeen näytteet tislattiin, josta laskennallisesti pystyttiin määrittämään alkuperäisen näytteen alkoholipitoisuus.

Kuva 4. Käymistelttä ja -astiat.



7.2 Käymiskoe lämpötilassa a

Ensimmäinen käymiskoe suoritettiin alhaisimmassa lämpötilassa (a). Lämpötila oli hieman alhaisempi kuin *S. cerevisiae*n yleisenä pidetty optimaalinen toiminta-alue. Ensimmäisessä käymiskokeessa refraktometriä ei käytetty vesi-melassiseoksen sokeripitoisuuden

määrittämiseen, vaan määrittäminen tehtiin laskemalla laimennossuhde melassin tuoteselosteen antaman sokeripitoisuuden perusteella. Laimennossuhteet oli laskettu etukäteen, ja tislamalla huomattiin, ettei niin tarkkoihin arvoihin ole mahdollista päästä saatavilla olevien mitta-astioiden avulla. Lukuarvoja pyöristettiin sellaisiksi, joiden mittaaminen tislamalla oli mahdollista. Kokeen aloituksista seuraavina päivinä havaittiin pyöristysten olleen virheellisiä ja vaikuttaneen sokeripitoisuuksiin, jotka poikkesivat merkittävästi tavoitteista. Päätettiin laimentaa liuoksia seitsemän vuorokautta kokeiden aloituksen jälkeen, tosin korkeimman sokeripitoisuuden näytteitä ei tarvinnut laimentaa. Hiivan elävyydestä ei voitu olla varmoja sen vietettyä viikon ei-toivotussa sokeripitoisuudessa, mutta aikataulujen vuoksi yritettiin suorittaa ensimmäinen käymiskoe loppuun saakka.

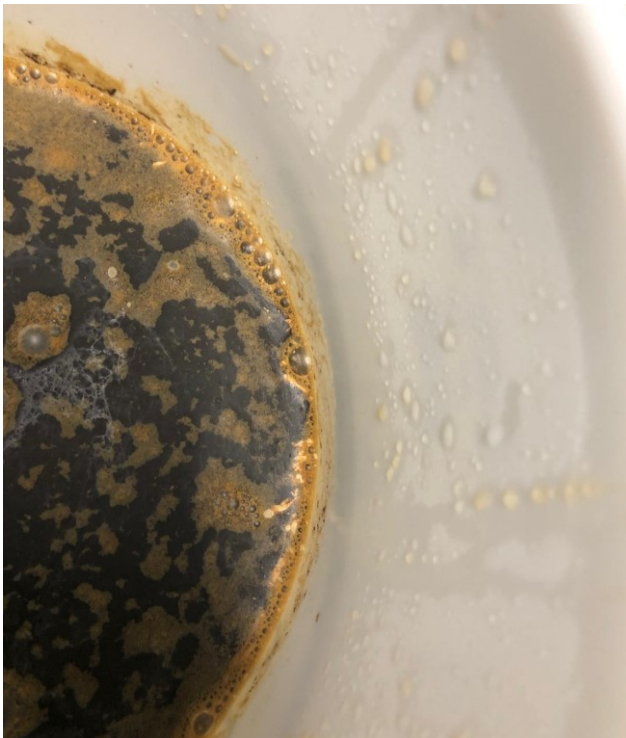
7.3 Käymiskoe lämpötilassa b

Lämpötilassa b käymisaika oli noin 14 vuorokautta ja käymistä tapahtui lähes kaikissa astioissa. Ainoastaan sokeripitoisuudessa 3 eli korkeimmassa sokeripitoisuudessa kolmessa ämpärissä ei tapahtunut käymistä. Mahdollisesti sokeripitoisuus 3 on ollut liian korkea kyseisille hiivoille, jolloin hiiva yrittää aineenvaihduntatuotteidensa avulla suojella itseään kuivumiselta ja alkoholituotto pienenee tai alkoholia ei muodostu ollenkaan (Mangwanda ym., 2021, s. 15).

7.4 Käymiskoe lämpötilassa c

Lämpötilassa c käymisaika oli noin 10 vuorokautta. Hiivan 3 käymisastia sokeripitoisuudessa 3 oli kontaminoitunut toisesta mikrobista tai hiiva oli pilaantunut (Kuva 5), mutta kaikissa muissa näytteissä käyminen oli edennyt onnistuneesti loppuun asti. Pilaantunutta näytettä ei tislattu, jotta minimoitaisiin tislauslaitteiston ja muun tuotantotilan kontaminaation riski. Koska vaarana oli kyseisen hiivan olleen pilaantunut, jätettiin hiiva seuraavasta koe-erästä (keskipistetestaus) pois. Ei koettu järkeväksi hankkia kyseistä hiivaa vain yhden koe-erän takia myynnissä olevan pakkauskoon ollessa suuri, ja tähän mennessä olleilla kokeilla oli havaittu alkoholituoton olevan melko alhainen. Koska hiiva 3 jäi viimeisestä koe-erästä pois, ei kyseisen hiivan tuloksia huomioitu tulosten vertailussa ja kokeen luotettavuuden arvioinnissa.

Kuva 5. Kontaminoitunut näyte.



7.5 Keskipistetestaus

Käymiserän tarkoituksena oli testata kaikki näytteet lämpötilassa b ja sokeripitoisuudessa 2, sillä central composite -mallinnuksen ennakko-oletuksen mukaisesti prosessin optimi asettuu vaihteluvälin keskelle. Käymisaika oli noin seitsemän vuorokautta, mikä on huomattavasti vähemmän kuin aiemmassa kyseisen lämpötilan koe-erässä. Kuitenkaan missään näytteessä ei käymislukkoa seuraamalla havaittu käymistä, josta pääteltiin käymisen päättyneen. Hiiva 3 ei ollut kontaminoitumisen vuoksi mukana testauksessa enää.

7.6 Tulokset

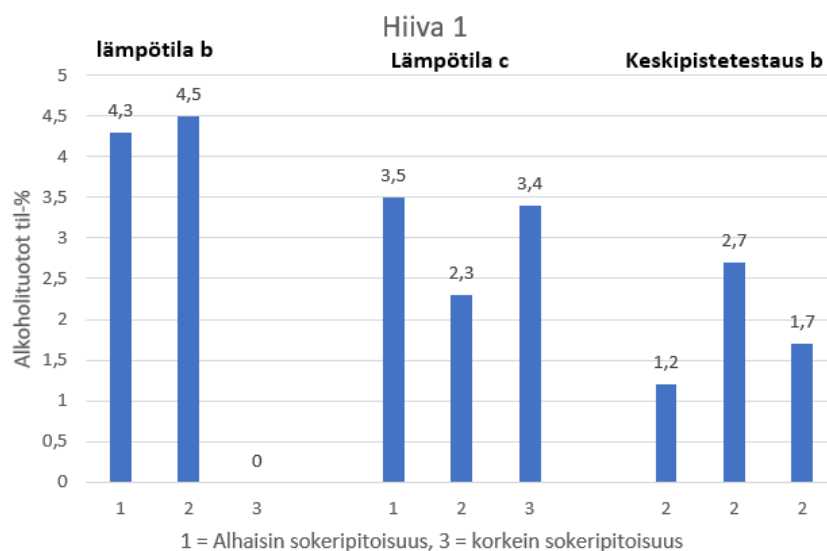
Lämpötilassa a vesilukkojen toimintaa seuraamalla havaittiin, että matalimmassa sokeripitoisuudessa (sokeripitoisuus 1) hiiva 1 ja hiiva 2 lähtivät käymään, mutta heikkoa käymistä havaittiin vesilukkojen toimintaa seuraamalla vain kolmen päivän ajan.

Käymisolosuhteita ylläpidettiin yhteensä 20 vuorokautta (seitsemän vuorokautta virheellinen Brix, 13 vuorokautta korjattu Brix), mutta muissa käymisastioissa ei havaittu käymistä. Vaikka näytteistä kahdessa havaittiin käymistä, ei koettu kannattavaksi ryhtyä

tislaamaan niitä. Heikko käyminen kertoo alhaisesta alkoholituotosta. Alaluvussa 4.3 esitetyn rommin tislauksen mukaisesti head ja etenkin sen sisältämä metanoli on tislattava ensin pois, sillä metanoli vaikuttaa epäedullisesti rommin aistinvaraisiin ominaisuuksiin. Näytteen ollessa pieni ja alkoholituoton ollessa alhainen, ei headin tislauksen jälkeen saataisi kelvollista heartia juuri ollenkaan. Lämpötilan a sokeripitoisuuden 1 ja 2 tuloksia ei otettu kokeen tulosten tai luotettavuuden tarkasteluun mukaan, sillä käymisaika väärässä sokeripitoisuudessa oli niin pitkä (seitsemän vuorokautta). Lämpötilan a sokeripitoisuuden 3 tulokset voitiin ottaa mukaan tulkintaan, sillä kyseisiä näytteitä ei tarvinnut laimentaa.

Tulosten yhteenvedosta nähdään, että hiivan 1 alkoholituotot ovat sokeripitoisuudesta ja lämpötilasta riippumatta alhaisimmat verrattuna muihin hiivoihin, ja kyseisen hiivan alkoholituottojen vaihtelu on melko pientä (Taulukko 5). Lämpötilassa a ja b sokeripitoisuudessa 3 kyseinen hiiva ei tuottanut ollenkaan alkoholia. Paras alkoholituotto kyseisellä hiivalla on 4,5 til-% (lämpötila b, sokeripitoisuus 2). Kuitenkaan keskipistetestauksen koe-erässä (lämpötila b, sokeripitoisuus 2) tuotot eivät ole yhtä korkeita alhaisimman tuoton ollessa 1,2 til-% ja korkeimman 2,7 til-% Kuva 6.

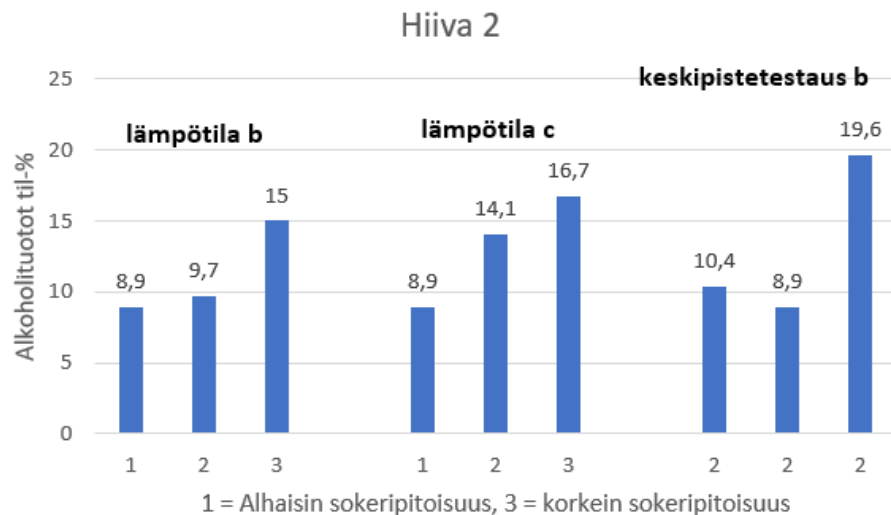
Kuva 6. Hiivan 1 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.



Hiiva 2 ei tuottanut lämpötilassa a sokeripitoisuudessa 3 alkoholia. Kyseinen hiiva oli kuitenkin selkeästi parhaiten menestynyt, alhaisimman tuoton ollessa 8,9 til-% (lämpötila b, sokeripitoisuus 1; lämpötila c, sokeripitoisuus 1; lämpötila b, sokeripitoisuus 2), ja

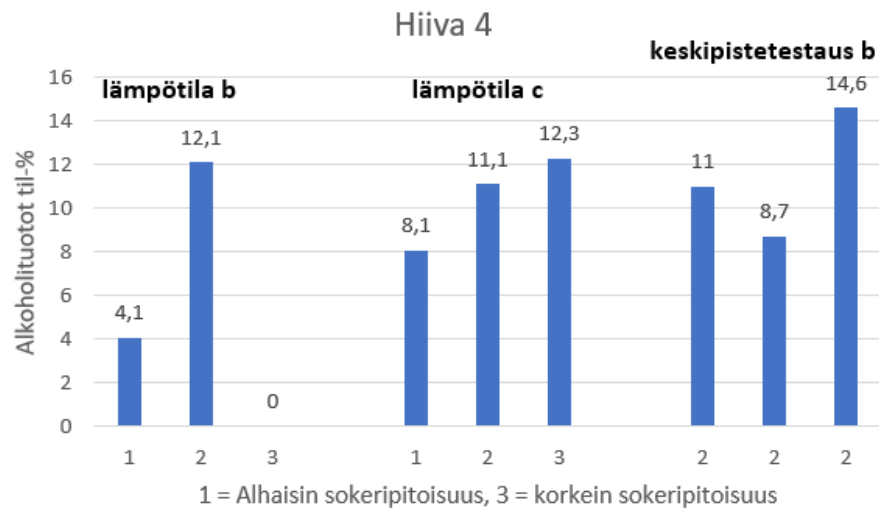
korkeimman 19,6 til-% (lämpötila b, sokeripitoisuus 2). Tulosten välinen vaihtelu on melko suuri, yli 10 til-%, mutta kyseisen hiivan alhaisinkin tuotto on hyvä tarkasteltaessa koko kokeen tuloksia. Vertailtaessa lämpötilan b ja lämpötilan c koe-erien tuloksia huomataan, että kyseisen hiivan alkoholituotto kasvaa sokeripitoisuuden kasvaessa (Kuva 7).

Kuva 7. Hiivan 2 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.



Hiiva 4 ei tuottanut lämpötilassa a ja lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 3 alkoholia. Alhaisin alkoholituotto oli 4,1 til-% lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 1, mikä on selkeästi alhaisempi verrattuna kyseisen hiivan muihin alkoholituottoihin (8,1 til-% ja 14,6 til-%). Korkein tuotto 14,6 til-% saavutettiin lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 2. Lämpötilassa c alkoholituotto kasvaa sokeripitoisuuden kasvaessa, mutta lämpötilassa b alkoholituottoa ei ole korkeimmassa sokeripitoisuudessa (Kuva 8).

Kuva 8. Hiivan 4 alkoholituotot eri koeolosuhteissa.



Taulukko 5. Käymiskokeiden tulosten yhteenveto.

	Alkoholituotot			
	Hiiva 1	Hiiva 2	Hiiva 3	Hiiva 4
Lämpötila a (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)				
1				
2				
3	0	0	0	0
Lämpötila b (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)				
1	4,3	8,9	7,3	4,1
2	4,5	9,7	8	12,1
3	0	15	0	0
Lämpötila c (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)				
1	3,5	8,9	7	8,1
2	2,3	14,1	2,4	11,1
3	3,4	16,7	kont.	12,3
keskipistetestaus b (°C)				
Sokeripitoisuus (°Bx)				
2	1,2	10,4	kont.	11
2	2,7	8,9	kont.	8,7
2	1,7	19,6	kont.	14,6

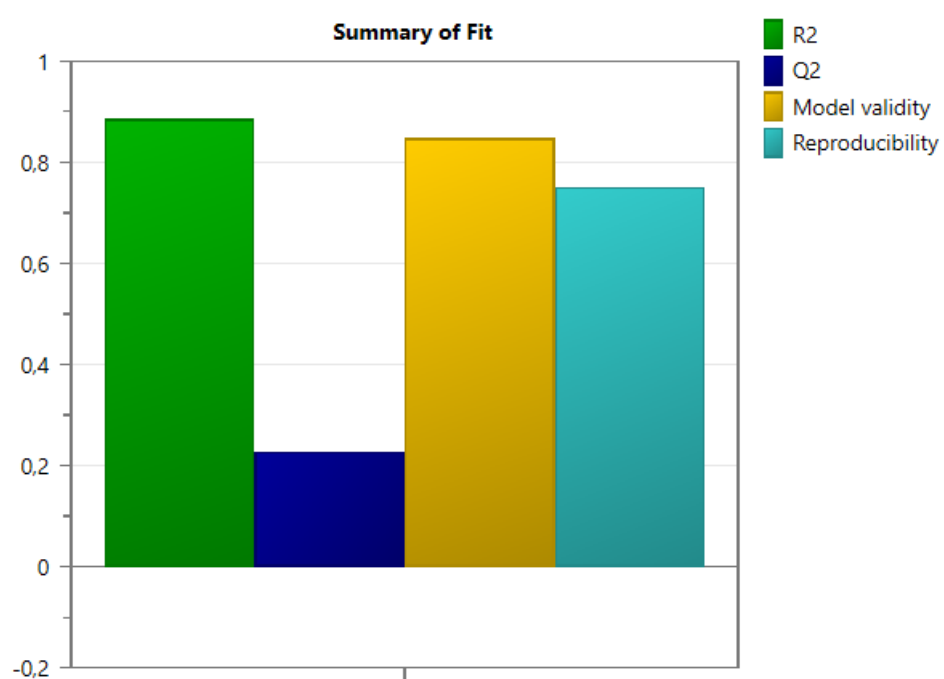
7.7 Kokeen luotettavuuden ja mallin sopivuuden arviointi

Mallin sopivuutta ja muuttujien (käymislämpötila, sokeripitoisuus) todellista merkitystä vasteeseen (alkoholituotto) arvioitiin Modde-koesuunnitteluohjelmalla. Modde arvioi vastetta matemaattisena mallina ja tätä kautta pystytään arvioimaan, kuinka luotettavina tuloksia voidaan pitää ja kuinka malli sopii vasteeseen. Kuva 9 on yhteenveto hiivan 1 kokeen tunnusluvusta. Mitä lähempänä arvoa 1 tunnusluvut ovat, sitä luotettavampana koetta voidaan pitää. R2 kuvaa koemenetelmän sopivuutta, ja sen ollessa alle 0,5 kokeen tulosten merkittävyys on alhainen. Hiivan 1 käymiskokeiden kannalta koemenetelmän valintaa voidaan pitää hyvänä, sillä R2 on yli 0,5 ($\approx 0,885$). (Sartorius Stedim Data Analytics, 2017)

Q2 arvioi kokeen ennustettavuutta uusissa koeolosuhteissa ja on tärkein mallin arvioinnin tunnusluku. Arvon ollessa yli 0,1 voidaan mallia pitää merkitseväenä, ja yli 0,5 mallia voidaan pitää hyvänä. Hiivan 1 kokeissa Q2 on yli 0,1 ($\approx 0,227$) joten mallia voidaan pitää merkittävänä, mutta ei hyvänä (Kuva 9). Hyvässä mallissa tulisi Q2:n ja R2:n välisen eron olla alle 0,3. Tuloksia tarkastelemalla voidaan huomata, että hiivan 1 alkoholituotoissa ei ole havaittavissa säännöllisyyttä, eli esimerkiksi lämpötilan noustessa alkoholituotto nousisi (Taulukko 5). Tämä vaikuttaa negatiivisesti kokeen ennustettavuuteen. (Sartorius Stedim Data Analytics, 2017)

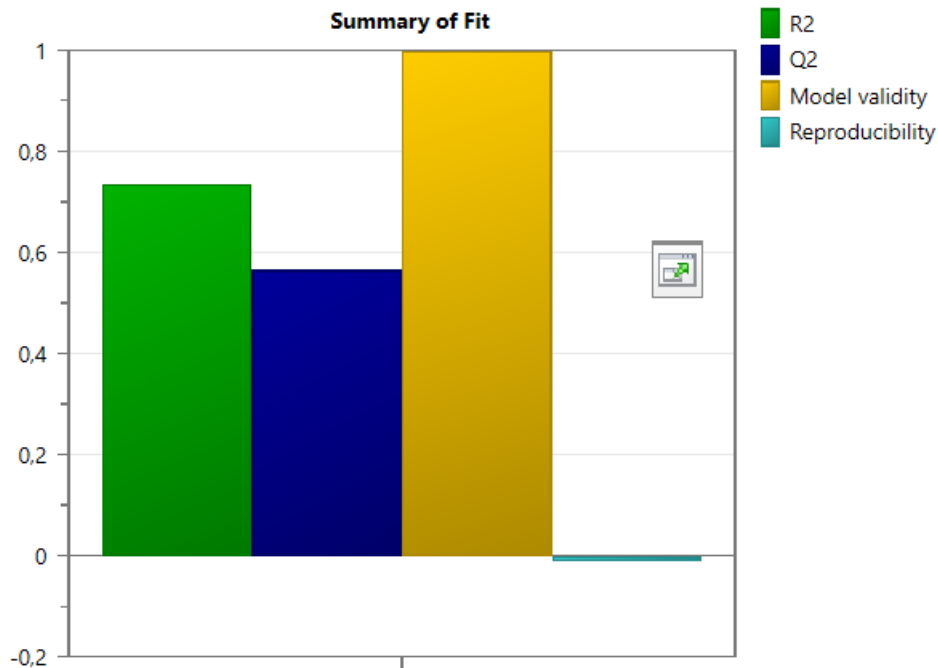
Mallin validiteetti (model validity) kertoo mallin virheellisyydestä. Arvon ollessa alle 0,25 on malli virheellinen, eli esimerkiksi poikkeavia havaintoja on runsaasti tai malli ei ole sopiva. Koska arvo on yli 0,25 ($\approx 0,848$), malli ei ole puutteellinen. Toistettavuus (reproducibility) kertoo toistettavien vasteiden vaihtelun (keskipistetestaus) verrattuna kokonaisvaihteluun. Arvon tulisi olla yli 0,5, ja hiivan 1 kokeissa arvo on $\approx 0,750$ (Kuva 9). (Sartorius Stedim Data Analytics, 2017)

Kuva 9. Yhteenveto hiivan 1 kokeen mallin tunnusluvuista.



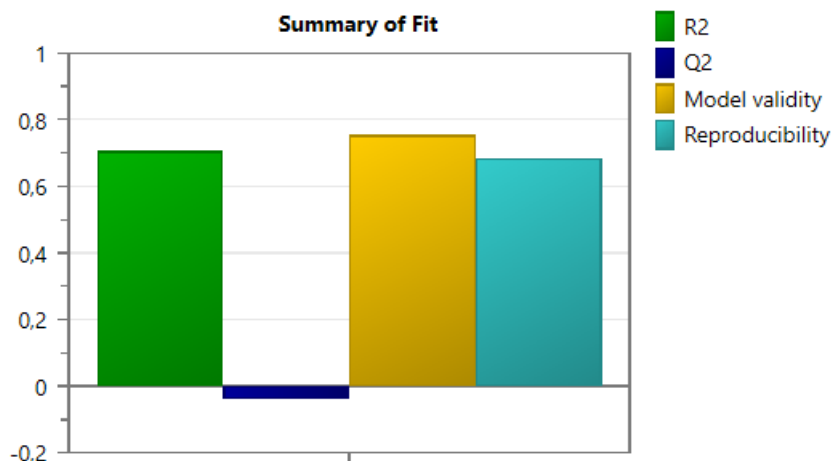
Hiivan 2 kokeiden R2 on yli 0,5 ($\approx 0,735$) ja Q2 yli 0,5 ($\approx 0,566$), jolloin niiden välinen ero on alle 0,3 ja mallia voidaan pitää hyvänä (Kuva 10). Q2 eli ennustettavuus on parempi kuin hiivalla 1 ja 4. Tähän vaikuttaa tulosten säännönmukaisuus, eli lämpötilassa b ja c sokeripitoisuuden kasvaessa alkoholituotto kasvaa. Malli ei ole virheellinen, sillä mallin validiteetti on yli 0,25 ($\approx 0,998$). Toistettavuus on huomattavasti alle halutun 0,5:en ($\approx -0,012$), joka johtuu keskipistetestauksessa saaduista runsaasti toisistaan eroavista tuloksista (Taulukko 5).

Kuva 10. Yhteenveto hiivan 2 kokeen mallin tunnusluvuista.



Hiivan 4 kokeissa R² on myös hyvä, $\approx 0,706$. Kuitenkin tärkein tunnusluku Q² on alhainen ($\approx 0,039$), joten ennustettavuuden osalta malli ei saavuta merkitsevyyden (yli 0,1) rajaa (Kuva 11). Kuten tulosten tarkastelussa ilmeni ei hiivan 4 alkoholituotoissa ole säännöllisyyttä: esimerkiksi lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 3 hiiva ei tuottanut alkoholia, mutta lämpötilassa c sokeripitoisuudessa 3 tuotto oli erän korkein (Taulukko 5). Mallin validiteetti on hiivan 4 kokeissa yli 0,25 ($\approx 0,754$) ja toistettavuus yli 0,5 ($\approx 0,684$). Hiivan 1 ja hiivan 4 kokeiden toistettavuus on huomattavasti korkeampi kuin hiivalla 2, sillä keskipistetestauksen tulosten keskinäinen vaihtelu on huomattavasti pienempää kuin hiivalla 2.

Kuva 11. Yhteenveto hiivan 4 kokeen mallin tunnusluvuista.



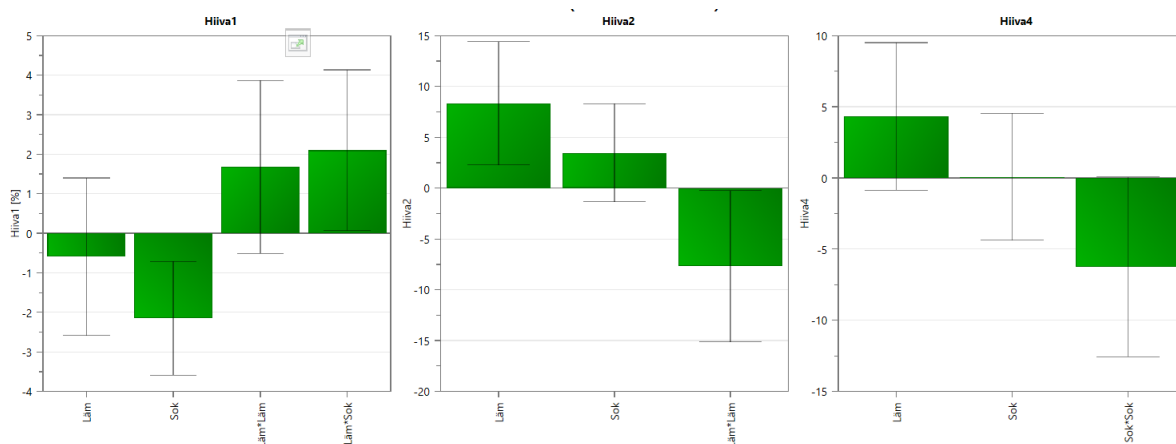
Kuva 12 kuvaajien avulla voidaan tutkia muuttujien ja niiden ristikkäisvaikutusten todellista merkitystä vasteisiin. Mitä korkeampi vihreä palkki on, sitä korkeampi muuttujan vaikutus on vasteeseen. Virhepalkkien tulisi olla mahdollisimman matalia. Kuvaajia on skaalattu, eli vähiten vasteeseen vaikuttavia muuttujien ristikkäisvaikutuksia on poistettu, jolloin myös Q2-arvo on noussut. Kuvaajien skaalaaminen tekee tuloksista verrattavissa olevia. (Sartorius Stedim Data Analytics, 2017)

Kuva 12 kuvaajista nähdään, kuinka muuttujien merkitykset vasteeseen vaihtelevat eri hiivojen välillä. Jokaisessa mallissa ongelmana ovat korkeat virhepalkit, joihin vaikuttavat edellä mainitut tulosten epäjohtamukaisuudet. Hiivan 1 kuvaajasta nähdään, että skaalauksen jälkeen merkittävät muuttujien ristikkäisvaikutukset muuttujien (sokeripitoisuus, lämpötila) lisäksi ovat lämpötila*lämpötila ja lämpötila*sokeripitoisuus. Sokeripitoisuuden merkitys vasteeseen on suurempi kuin lämpötilan, sillä sokeripitoisuuden palkki on korkeampi kuin lämpötilan. Lisäksi lämpötilan virhepalkki ylittää vihreän palkin molemmista päistä.

Hiivan 2 kuvaajan skaalauksen jälkeen voidaan todeta ainoan merkittävän ristikkäisvaikutuksen olevan lämpötila*lämpötila (Kuva 12). Tämän ristikkäisvaikutuksen ja pelkän lämpötilan vaikutus vasteeseen ovat merkittävämmät kuin sokeripitoisuuden vaikutus. Katsomalla tuloksia Taulukko 5 olisi voitu tulkitä sokeripitoisuuden vaikuttaneen enemmän, sillä lämpötilassa b ja lämpötilassa c alkoholituotto nousee sokeripitoisuuden kasvaessa.

Hiivan 4 kuvaajan mukaan skaalauksen jälkeen ainoa merkittävä ristikkäisvaikutus on sokeripitoisuus*sokeripitoisuus. Sokeripitoisuuden merkitys vasteeseen on todella pieni, mutta sokeripitoisuus*sokeripitoisuus ristikkäisvaikutuksen merkitys melko suuri (Kuva 12). Sokeripitoisuuden merkityksen pienuuteen ja virhepalkin suuruuteen vaikuttanee edellä mainittu tulosten epäjohtamukaisuus: lämpötilassa b korkeimmassa sokeripitoisuudessa hiiva ei tuottanut alkoholia, mutta lämpötilassa c alkoholituotto kasvoi sokeripitoisuuden noustessa (Taulukko 5).

Kuva 12. Kuvaajat muuttujien ja niiden ristikkäisvaikutusten merkityksestä vasteisiin.



7.8 Johtopäätökset

Ennakko-oletuksena oli, että alhaisimmassa lämpötilassa suoritettussa kokeessa käyminen olisi heikkoa. Ennakko-oletusta tuki, että heikkoa käymistä havaittiin vain kahdessa astiassa, ja lopuissa käymistä ei havaittu. Kuten alaluvussa 6.2 todettiin käymisprosessin pysähtyminen voi johtua käymislämpötiloista, mutta yleensä syynä on liian korkea lämpötila, eikä liian alhainen lämpötila kuten tässä tapauksessa. Rommin valmistus tapahtuu kuitenkin yleensä lämpimissä maissa, joten on loogista, ettei alhainen käymislämpötila ole yleinen ongelma rommin käymisessä. Tarkasteltaessa lämpötilan vaikutusta käymiseen tuloksen luotettavuuteen vaikuttaa kokeen alussa vallinneet liian korkeat sokeripitoisuudet. Jacquesin ym. (2003, s. 81) mukaan yli 25 °Bx:in sokeripitoisuus aiheuttaa liian korkean osmoottisen paineen hiivasoluille, jonka seurauksena käyminen ei etene toivotulla tavalla. Kuten alaluvussa 5.4 todettiin käymisen alussa vallinneet liian korkeat sokeripitoisuudet ovat voineet aiheuttaa hiivan aineenvaihdunnassa osmolyyttisten yhdisteiden muodostumisen, joka myös vaikuttaa alkoholituottoon, ja niiden vuoksi lopputuote ei todennäköisesti olisi ollut aistinvaraisilta ominaisuuksiltaan tavoitteiden mukainen.

Lämpötilan vaikutusta alkoholituottoon olisi pystytty arvioimaan paremmin, mikäli lämpötilassa a suoritettun käymiskokeen kaikki tulokset olisi saatu vertailuun mukaan. Modella toteutetun muuttujien vaikutusten arvioinnin perusteella voidaan todeta, että sokeripitoisuudella on suurempi merkitys vasteeseen (alkoholituotto) kuin lämpötilalla (Kuva 12). On kuitenkin hyvin yksilöllistä, kuinka sokeripitoisuus vaikuttaa milläkin hiivalla alkoholituottoon. Esimerkiksi hiivalla 1 alhaisimmassa sokeripitoisuudessa päästään

korkeisiin alkoholituottoihin, mutta hiivalla 2 ja 4 alhaisimmassa sokeripitoisuudessa ei päästä yhtä korkeisiin tuottoihin kuin sokeripitoisuuksissa 2 ja 3, kuten Taulukko 5 nähdään.

Mallin ennakko-oletuksena oli, että prosessin optimi sijoittuisi muuttujien vaihteluvälien keskelle. Ennakko-oletusta tukee, että kaikkien hiivojen paras alkoholituotto oli lämpötilassa b ja sokeripitoisuudessa 2. Kuitenkin tulosten vaihtelu olosuhteiden keskipisteessä (lämpötila b, sokeripitoisuus 2) oli runsasta, ja hyviä tuloksia saatiin muistakin olosuhteista. Runsaasta tulosten vaihtelusta olosuhteiden keskipisteessä voidaan selittää kyseisen olosuhteen (lämpötila b, sokeripitoisuus 2) suurimmalla koemäärällä, jolloin tuloksiakin on kyseisistä olosuhteista enemmän.

Selkeästi suurin merkitys alkoholituottoon on käymishiivalla. Hiivan 1 alkoholituotot olivat selkeästi alhaisimmat. Alkoholituotot alhaisimmassa sokeripitoisuudessa 1 olivat melko hyviä (4,3 til-% ja 3,5 til-%) verrattessa kyseisen hiivan muihin alkoholituottoihin (Kuva 6). Tämän perusteella voidaan päätellä kyseisen hiivan viihtyvän hyvin alhaisissakin sokeripitoisuuksissa, ja sokeriruokomelassin korkean sokeripitoisuuden aiheuttavan hiivasoluille ongelmia alkoholin tuotossa. Alhainen alkoholipitoisuus vaikuttaa negatiivisesti esimerkiksi estereiden muodostumiseen hiivan aineenvaihdunnassa, joten kyseisellä hiivalla ei välttämättä saataisi rommin makuprofiiliin sopivaa lopputuotetta.

Hiiva 2 menestyi kokeissa parhaiten, ja tuloksista (Kuva 7) nähdään sen viihtyvän hyvin myös korkeimmassa sokeripitoisuudessa 3. Tulosten perusteella hiiva 2 on sopiva käymishiiva rommin valmistukseen, sillä se kestää prosessin edellyttämiä korkeita sokeri- ja alkoholipitoisuuksia. Vaikka tulosten vaihtelu on melko suurta (alhaisin tuotto 8,9 til-%, korkein 19,6 til-%) on alhaisinkin tuotto hiivojen keskinäisessä vertailussa hyvä, joka lisää kyseisen hiivan luotettavuutta.

Hiivan 4 korkein alkoholituotto oli melko hyvä (14,6 til-%), mutta sillä oli myös kaksi verrattain huonoa tulosta (4,1 til-% lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 1 ja 0 til-% lämpötilassa b sokeripitoisuudessa 3). Hiivaa ei tämän vuoksi voi pitää luotettavana vaihtoehtona rommin tuotantoprosessiin. Kirjallisuudesta on vaikea löytää syytä, miksi lämpötilassa b korkeimman sokeripitoisuuden tuotto on 0 til-%, mutta lämpötilassa c tuotto on 12,3 til-%. Mahdollista on, että lämpötilan ollessa alhainen hiiva ei ole ehtinyt

käynnistymään kunnolla, ja solut ovat kuolleet korkean sokeripitoisuuden aiheuttaman osmolyyttisen stressin vuoksi.

Käymishiivoista hiiva 2 menestyi selkeästi parhaiten, joten opinnäytetyön jatkotoimenpiteenä voitaisiin keskittyä kyseisen käymishiivan testaamiseen ja käymisen optimointiin. Järkevää olisi kokeilla sellaisten lämpötilojen ja sokeripitoisuuksien yhdistelmiä, jotka ovat mahdollisimman lähellä opinnäytetyössä saavutetun parhaan alkoholituoton tuottaneita olosuhteita (lämpötila b, sokeripitoisuus 2). Kuten luvussa 5 todettiin on melassin sisältämä typen määrä melko vähäinen, ja se voi heikentää hiivan toimintaa. Opinnäytetyön käymiskokeissa ei käytetty erillistä typpilisäystä. Jatkossa voitaisiin testata, parantaisiko typen lisääminen hiivan toimintaa ja näin ollen alkoholituottoa.

Lähteet

- Anal, A. (2017). *Food processing by-products and their utilization*. John Wiley & Sons.
- Antony, J. (2003). *Design of experiments for engineers and scientists*. Butterworth-Heinemann.
- Asetus tislattujen alkoholijuomien määritelmistä 787/2019. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2019.130.01.0001.01.FIN&toc=OJ%3AL%3A2019%3A130%3AFULL
- Bamforth, C. W. (2008). *Food, fermentation and micro-organisms*. John Wiley & Sons. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:101:1-201410245624>
- Bamforth, C. W., & Cook, D. J. (2019). *Food, fermentation and micro-organisms* (Toinen painos). Wiley-Blackwell.
- Batt, C., & Tortorello, M. (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (Toinen painos). AP, Academic Press/Elsevier.
- BeMiller, J. N. (2003). Dextran. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (ss. 1772–1773). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00330-8>
- Burdock, G. A., & Fenaroli, G. (2010). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., & da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, ss. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- Cassano, A., & Drioli, E. (2014). *Integrated membrane operations in the food production*. Walter de Gruyter GmbH & Co., KG.
- Clarke, M. A. (2003). Syrups. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (ss. 5711–5717). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01175-5>
- de Queiroz, H., & Pareilleux, A. (1990). Growth kinetics of *Schizosaccharomyces pombe* under various culture conditions: Influence of pH, malate, ethanol and oxygenation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(5), ss. 578–581. <https://doi.org/10.1007/BF00172555>

- de Souza, M. D. C. A., Vásquez, P., del Mastro, N. L., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (2006). Characterization of cachaça and rum aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), ss. 485–488. <https://doi.org/10.1021/jf0511190>
- Enari, T.-M., & Mäkinen, V. (2014). *Panimotekniikka*. Panimolaboratorio-Bryggerilaboratorium Ab.
- Fahrasmane, L., Parfait, A., Jouret, C., & Galzy, P. (1985). Production of higher alcohols and short chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations. *Journal of Food Science*, 50(5), ss. 1427–1436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10492.x>
- Fernández, T., Marcet, M., Olivera, W., & Martín, C. (2008). Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y rones isolation and evaluation of thermotolerant strains of *saccharomyces cerevisiae* for aguardiente and rum production. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), ss. 64–70. <https://doi.org/10.1080/11358120809487629>
- Gibson, M., & Newsham, P. (2018). Food groups. In *Food Science and the Culinary Arts* (ss. 3–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811816-0.00001-4>
- Green, V. (2015). *The microbial ecology of a rum production process*. [Tutkielma, University of New South Wales]. <http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:36385/SOURCE02?view=true>
- Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (2019). *Alcoholic beverages*. Elsevier Science & Technology.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), ss. 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS microbiology reviews*, 43(3), ss. 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
- Hutkins, R. W. (2018). *Microbiology and technology of fermented foods*. John Wiley & Sons.

- Jacques, K. A., Lyons, T. P., & Kelsall, D. R. (2003). *The alcohol textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries* (Neljäs painos). Nottingham University Press.
- Karlstén, J. (2007). *Juomista jaloimmat*. Art House Oy.
- Lawson, J. (2010). *Design and analysis of experiments with sas*. CRC Press.
- Lehtiniemi, K., Turpeenoja, L. (2009). *Ihmisen ja elinympäristön kemia – Mooli 1*. Kustannusosakeyhtiö Otava.
- Litwack, G. (2018). Metabolism of amino acids. In *Human Biochemistry* (ss. 359–394). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383864-3.00013-2>
- Maarse, H. (2017). *Volatile compounds in foods and beverages*. Routledge.
- Mangwanda, T., Johnson, J. B., Mani, J. S., Jackson, S., Chandra, S., McKeown, T., White, S., & Naiker, M. (2021). Processes, challenges and optimisation of rum production from molasses—A contemporary review. *Fermentation*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010021>
- Nykänen, L. & Suomalainen, H. (1983). *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*. Springer Science & Business Media.
- Oates, J. A. (2008). *Lime and limestone: chemistry and technology, production and uses*. John Wiley & Sons.
- OECD. (2015). *Safety assessment of foods and feeds derived from transgenic crops, volume 2*. Haettu 16.12.2020 osoitteesta https://www.oecd-ilibrary.org/environment/safety-assessment-of-foods-and-feeds-derived-from-transgenic-crops-volume-2_9789264180338-en
- Pandey, A., Guocheng, D., Sanromán, M. Á., Soccol, C. R., & Dussap, C-G. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Food and beverages industry*. Elsevier.
- Piggott, J. (2012). *Alcoholic beverages: Sensory evaluation and consumer research*. Woodhead Pub.
- Pino, J. A., Tolle, S., Gök, R., & Winterhalter, P. (2012). Characterisation of odour-active compounds in aged rum. *Food Chemistry*, 132(3), ss. 1436–1441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.133>

- Petersen, J., & Russell, P. (2016). Growth and the Environment of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(3).
<https://doi.org/10.1101/pdb.top079764>
- Roos, Y. H. (2003). Water activity | effect on food stability. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (ss. 6094–6101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01275-X>
- Ruokavirasto. (2020). *Mikrobien kasvua edistävät tekijät*.
<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/mikrobien-kasvua-edistavat-tekijat/>
- Santos, F., Borém, A., & Caldas, C. (2015). *Sugarcane : Agricultural production, bioenergy and ethanol*. Elsevier Science & Technology.
- Sartorius Stedim Data Analytics. (2017). *User guide to MODDE*.
<https://blog.umetrics.com/hubfs/Download%20Files/MODDE%2012.0.1%20User%20Guide.pdf>
- Smith, J. E. (2009). *Biotechnology*. Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511802751>
- StatEase. (n.d.). *Central Composite Design (CCD)*.
<https://www.statease.com/docs/v11/designs/ccd/>
- Suomalainen, H., & Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 85(3), ss. 149–156.
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Yliruusi, J. (2018). *Koesuunnittelu ja tulostanalyysi*. Helsingin yliopisto Farmasin teknologian osasto. <https://courses.helsinki.fi/sites/default/files/course-material/4594904/Koesuunnittelu%20ja%20tulostanalyysi%202018.pdf>