
PIENPANIMON LAADUNVALVONTA JA MENETELMÄT



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Visamäki, työn hyväksymispäivä

Lasse Lehtonen



VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Elintarviketekniikka

Tekijä

Lasse Lehtonen

Vuosi 2012**Työn nimi**

Pienpanimon Laadunvalvonta ja Menetelmät

TIIVISTELMÄ

Pienpanimoiden laadunvalvonta ja prosessin hallinta on usein riittämätöntä tai perustuu oletuksiin, joille ei ole päteviä perusteluita. Vaikka laatujohtamisen integroiminen pieneen tuotantolaitokseen tuntuu kaukaiselta, laatuun vaikuttavien fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja prosessiolosuhteiden hallitseminen vaativat teoreettisen tiedon ymmärtämistä pätevän laaduntarkkailun suorittamisessa ja suunnittelussa.

Tässä opinnäytetyössä on tarkasteltu oluen laatuominaisuuksiin vaikuttavia fysikaalis-kemiallisia ilmiöitä. Tätä teoreettista tietoa on sovellettu pienpanimoiden laadunvalvonnan näkökulmasta. Kirjallisuuskatsauksen toivotaan toimivan oppaana pienpanimoille laadun parantamisessa sekä tasalaatuisen tuotannon kehittämisessä. Kokeellisen osion tavoite oli arvioida toimeksiantajan prosessin toimivuutta. Työssä sovellettiin panimotieteen ja –teknologian tietoa ja tutkimuksia sekä oluen ominaisuuksia ilmentävien tekijöiden teoriaa.

Kokeellisen osion tutkimusmenetelminä käytettiin mikrobiologisia ja kemiallisia analyysimenetelmiä prosessin hygienian ja panimon ilmanlaadun analysoimiseen. Tuloksena saatiin tietoa osaprosessien toimivuudesta ja niiden laadunvalvonta pisteiden valvonnan riittävydestä. Tuloksista tehtyjen tarkastelujen pohjalta tehtiin kehitysehdotuksia laadunvalvonnan tehostamiseksi. Tuloksien pohjalta valmisteltiin myös jatkotoimenpiteitä prosessin toimivuuden parantamiseksi.

Avainsanat Pienpanimo, laadunvalvonta, analyysimenetelmät, laatu ominaisuudet

Sivut

73 s, + liitteet 1 s.

VISAMÄKI
Biotechnology and food engineering
Food Technology

Author	Lasse Lehtonen	Year 2012
Subject of Bachelor's thesis	Quality Management and Analysis Methods for Craft-Brewery	

ABSTRACT

Quality and process control in craft-breweries is generally insufficient or based on irrationally founded unempirical assumptions. While integrating quality management and control systems to a small-scale production plant seems remote, understanding of the theoretical knowledge is essential. Even in the most concise quality management, well-planned and properly applied quality control system will be sufficient.

In this thesis, the physical and chemical phenomena affecting quality characteristics was reviewed. The science and theory behind analysis methods and physical phenomena of quality characteristics and process' effects was bent on the use for quality control and development to achieve consistent production and supreme quality.

The empirical studies evaluated the efficiency of the quality control of standard operations and the performance of the process in Malmgård Brewery Ltd. Chemical and microbiological analysis methods were used to determine the level of process hygiene, potential sources of airborne contaminants and chemical composition of process gases in the storage tanks' headspace. The level of potential quality risks was also evaluated based on the analysis results. Development suggestions to improve the quality control of control points and to enhance standard operations were made to manage and sustain high quality brewing.

Keywords Craft-brewery, quality management, analysis methods, quality characteristics

Pages 73 p + appendices 1 p.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	OLUEN LAATUUN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT	3
3	FYSIKAALISKEMIAALLISET TEKIJÄT	6
3.1	Alkoholipitoisuus ja uutejäämä.....	6
3.2	Väri.....	7
3.3	Sameus	11
3.4	Karbonointi.....	16
3.5	Liennut happi.....	23
3.6	Vaahdon muodostuminen ja ominaisuudet	27
3.7	Katkeruus	38
3.8	pH.....	39
4	MIKROBIOLOGINEN LAATU.....	41
4.1	Haittamikrobit ja niiden ryhmittely merkityksen mukaan	41
4.2	Villihiivat	42
4.3	Bakteerit	46
4.4	Mikrobien määrittäminen ja osoittaminen sekä siinä käytettävät elatusalustat	49
4.4.1	Villihiivojen pintaviljely selektiivisellä YM-agarilla	49
4.4.2	Bakteerien määrittäminen pintaviljelyllä	50
5	LAADUNVALVONTA	52
5.1	HACCP.....	52
5.2	Laadunvalvonnan suunnittelu ja tuotteen laatu.....	53
6	KOKEELLINEN OSIO.....	55
6.1	Ilmanlaadun analysointimenetelmät.....	55
6.1.1	Panimon mikrobiologinen ilmanlaatu	55
6.1.2	Varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu.....	56
6.2	Pintahygienian arviointi ja ATP-luminometrin käyttöönotto.....	57
6.3	Pullotuskoneen puhtaus.....	58
7	TULOKSET JA TARKASTELU.....	59
7.1	Ilmanlaatu.....	59
7.1.1	Panimon mikrobiologinen ilmanlaatu	59
7.1.2	Varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu.....	60
7.2	Pintahygienian arviointi ja ATP-luminometrin käyttöönotto.....	61
7.3	Pullotuskoneen puhtaus.....	61
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	63
	LÄHTEET	65

1 JOHDANTO

Kuluttajan käsitys tuotteen laadusta on hyvin vaihteleva. Siihen vaikuttavat monet eri näkökulmat, jotka yhdessä luovat tuotteen absoluuttisen laadun. Absoluuttinen laatu kiteyttää mitattavissa olevan, kuluttajan kokeman ja efektiivisen laadun yhteen – ehdottoman laadun kokeminen.

Tuotteiden laatuvertailua on hankala toteuttaa aistinvaraisesti. Tuloksena saadaan yleensä täysin kuluttajan mielivaltainen käsitys laadusta. Vaikka kuluttajaraadilta kerätty aistinvaraisten arviointitulosten aineisto olisi laaja, ja se analysoitaisiin pätevin tilastollisin menetelmin, kertoo se vain kyseiseen raatiin kuuluvien henkilöiden henkilökohtaisen mielipiteen. Se ei kuitenkaan kerro tuotteen absoluuttisesta laadusta mitään, lähinnä vain kuluttajan mieltymyksen. Ihmisten käsitykseen laadusta voidaan vaikuttaa ensisijaisesti mainonnalla.

Kun aistinvaraista arviointia toteuttaa koulutettu raati, arviointitulokset eivät välttämättä ole täysin sovellettavissa suureen kuluttaja joukkoon, mutta tuottavat paljon informaatiota kuinka tuotteen laatu todentuu. Koulutettua raatia käytettäessä aistinvaraista arviointia voidaan käyttää tuotteen tarkempaan aistinvaraiseen tarkasteluun, kuten efektiivisen laadun tutkimiseen. Efektiivinen laatu kuvaa tuotteen ominaisuuksien todentumista esimerkiksi tieteellisen teorian pohjalta johdetun perusmallin mukaan.

Kuluttaja laadun mittarina ei ole pätevä. Tuotteen fysikaalis-kemiallinen laatu (mitattavissa oleva laatu) on prosessin hallittavissa olevien ominaisuuksien summa, johon lisätään tuotteeseen ulkoisesti liittyvät laatua parantavat psyykkiset vaikutteet. Oluen kannalta sen fysikaalis-kemiallinen laatu on monelle kuluttajalle täysin toisarvoinen tekijä.

Tuotteen fysikaalis-kemiallista laatua ja valmistajan toimintaa voidaan sen sijaan arvioida täysin objektiivisesti. Valmistajan on pystyttävä vastaamaan sitä asiakassegmentin käsitystä tuotteen fysikaalis-kemiallisesta laadusta, jonka se tulkitsee laaduksi. Sen vuoksi toimijan on tiedettävä kuinka tällaisia fyysisiä ominaisuuksia ilmentävä tuote valmistetaan. Tämä tieto rakentuu kahdesta osa-alueesta: teoriasta ja sen soveltamisesta.

Usein pientoimijat turvautuvat yleistyksiin ja rakentavat omia käsityksiä fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ilmenemisestä ja niiden hallinnasta. Tämä korreloi suoranaisesti tuotteen efektiiviseen laatuun, joka pahimmassa tapauksessa ei vastaa toimijan käsitystä millään tavalla. On irrationaalista ajatella, että semantiikalla ja retoriikalla voidaan selittää ja tutkia fysikaalisia ja kemiallisia ilmiöitä. On eri asia perustella oletus faktoilla kuin kuvitelmillä – sitä kutsutaan empiiriseksi toiminnaksi.

Valmistajan toiminnan arviointi perustuu edellisen kappaleen mukaan täysin samoihin tekijöihin. Ei voida olettaa prosessin olevan toimiva niiden käsitysten mukaan, joista ei ole konkreettista mittaustulosta. Tuotteen tasalaatuisen valmistuksen perustana on prosessin hallinta. Tässäkin suhteessa pientoimijoilla on usein varalla iso pakka selityksiä, mutta ei mittaustulok-

sia – konkreettisia perusteluja. Prosessihygienian kannalta, selitykset ovat välinpitämättömyyttä.

Niin prosessihäiriöiden kuin laatuvirheidenkin huomaaminen on huomattavasti helpompaa, systemaattisempaa ja tuloksellisempaa, kun teoreettinen tieto ja sen soveltaminen ovat taustalla omavalvontaa suunnitellessa. Mitä et voi mitata, et voi kehittää!

Laatujohtaminen ja laatujärjestelmien integrointi pieniin tuotantolaitoksiin voi tuntua kaukaiselta. Kokonaisvaltainen laatujohtaminen on kuitenkin tehokas systeemi, joka integroi laatukehittämiseen, laadun säilyttämiseen ja laadun parantamiseen käytetyt resurssit organisaation sisällä siten, että se mahdollistaa taloudellisemman tuotannon ja palvelun tuottaen erinomaisen asiakastyytyväisyyden.

Tämän opinnäytetyön teoreettinen osa rakentuu laatuun vaikuttavien fyysikaaliskemiallisten tekijöiden teoriasta ja niiden analyysimenetelmien soveltuvuudesta pienpanimoihin. Vaikka teoria tuntuu raskaalta ja käytännön soveltamisen kannalta kaukaiselta, sen merkitys ominaisuuksien ilmene-
misen kannalta on keskeinen. Se auttaa myös kokonaisvaltaisen laadunvalvonnan suunnitteluun, jotta valvonnan hyöty on maksimaalinen. Väärin asioiden mittaaminen ei ole mielekäästä. Teoria auttaa myös ymmärtämään, mitä mittaustulokset kertovat ja mitä ei. Se auttaa myös valitsemaan oikeat analyysimenetelmät.

2 OLUEN LAATUUN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

Olut, panimoprosessin lopputuote, on ennen kaikkea suunniteltu kulutettavaksi. Se on monimutkainen sekoitus yli 450 aineosasta, jotka rakentavat oluen luonteen (Briggs, Boulton, Brookes & Stevens 2004, 662). Charles W. Bamforth (2006, 13) jakaa oluen laatuun vaikuttavat tekijät seuraavasti viiteen eri kategoriaan:

- maku
- vaahto
- väri
- kirkkaus
- terveyteen vaikuttavat tekijät

Kaikkiin näihin Bamforthin (2006, 13) määrittelemiin laatuattribuutteihin vaikuttaa oluen moninainen kemiallinen koostumus sekä valmistusprosessi, valmistusmenetelmät ja mikrobiologiset seikat.

Oluen laatutekijöihin vaikuttava kokonaisuus muodostuu pääosin käytetyistä raaka-aineista, kuten maltaasta, korvaavista uutelahteista, humalasta, prosessivedestä ja panimohiivan metabolian tuotteista. Muita laatuun vaikuttavia tekijöitä ovat kontaminaatiot tai prosessihäiriöt, joiden vaikutukset lopputuotteeseen ja prosessiin voivat olla kohtalokkaita. (Bamforth 2006, 13)

Bamforthin laatu kategoriat voidaan eritellä kemiallisiin ja fysikaalisiin laatuattribuutteihin niitä ilmentävien aineosien ja tuotteen ominaisuuksien mukaan (Briggs ym. 2004, 662 - 715). On kuitenkin syytä muistaa, että Bamforthin (2006, 13) laatu kategoriat ovat molempien, niin kemiallisten kuin fysikaalistenkin ominaisuuksien, summa, joka luo oluen kokonaisuuden.

Ihmisen kieli havaitsee neljä eri makua: makea, suolainen, hapan ja katkera. Aasialaiselle ruoalle ominainen *umami*-maku käsitetään viidenneksi perusmauksi, mutta sen yhteyttä oluen makuun vaikuttavana tekijänä ei ole kokonaisvaltaisesti tutkittu. Kaikki muut maut havaitaan hajuaistin avulla. Makuun vaikuttavana tekijänä voidaan pitää myös suutuntumaa, joka muodostuu monesta eri tekijästä. Kaikista keskeisimpänä suutuntumaan vaikuttavana tekijänä voidaan pitää olueen liuennutta hiilihappoa, jonka ihminen tunnistaa pääosin kipuna. Suutuntumaan vaikuttavat tekijät, kuten tanniinien aiheuttama kuiva ja kurtistava suutuntuma karbonoinnin ohella, ovat hyvin hankalasti tutkittavia ominaisuuksia. (Bamforth 2006, 13)

Kuluttajan terveyteen kohdistuvien vaikutusten osalta Bamforth (2006, 18 -19) jakaa oluen sisältämät aineosat potentiaalisesti haitallisiin ja potentiaalisesti suotuisiin.

Merkittävin oluen potentiaalisesti haitallisista aineosista on alkoholi. Alkoholin haitalliset vaikutukset on tunnettu yhtä kauan kuin sen valmistuksenkin salat. Alkoholi on psykoaktiivinen huumausaine, jonka liiallinen käyttö johtaa antisosiaalisen käyttäytymisen lisäksi moniin lieveilmiöihin

(krapula), terveyshaittoihin ja sairauksiin, esim. alkoholimyrkytykseen, verenpaineongelmiin, maksakirroosiin ja monenlaisiin syöpiin (Bamforth 2006, 18). Etanoli, eli kansankielessä alkoholi, on liuotin, joka sekoittuu hyvin veden kanssa (eng. *miscible*), jonka vuoksi se leviää helposti veren mukana koko kehoon. Merkittävin lieveilmiö on alkoholin vaikutus keskushermostoon, josta seuraa alkoholimyrkytykselle ominaisia oireita. Etanolia käytetään suurina pitoisuuksina myös puudutus- ja desinfiointiaineena (Myers & Myers 2007, 121 - 122). Sen rooli oluen, tai elintarvikkeen kaltaisen tuotteen, aineosana on hyvin kiistelty.

Alkoholin potentiaalisesti suotuisat ominaisuudet ovat erittäin kiistanalainen kysymys. Oluen potentiaalisesti suotuisat vaikutukset kumoutuvat sen sisältämän alkoholin aiheuttamilla haittavaikutuksilla. Eräissä kliinisissä tutkimuksissa on havaittu kohtuullisen ja hillityn oluen kulutuksen pienentävän riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin verrokkiryhmään verrattuna. Juomien, jotka sisältävät yli 1,2 tilavuusprosenttia alkoholia, markkinointiin ei saa lupaa liittää terveystväittämiä (EY, N:o 1924/2006 4§). Alkoholin on todettu estävän rasvan tukkeutumista verisuoniin ja veritulpien muodostumista (Bamforth 2006, 18). Vaikka kohtuullisen oluen tai alkoholin käytöllä olisikin potentiaalisesti suotuisia vaikutuksia, piilee sen käytössä silti aina riski terveydelle.

Oluen hiilihydraatti- ja kaloripitoisuus ovat matalat verrattuna muihin virvoitusjuomiin, ja olut on lähes rasvatonta. Olut on myös varteenotettava B-vitamiinien lähde, ja sisältää esim. niasiinia, pyridoksiinia, riboflaviinia, B₁₂-vitamiinia ja antioksidantteja, sekä vaihtelevia määriä folaattia. Olut sisältää myös paljon mineraaleja, esim. magnesiumia ja kaliumia, sekä alhaisen natrium/kalium-suhteen, jolla on suotuisia vaikutuksia verenpaineelle. (Bamforth 2006, 18)

Lähes kaikista elintarvikkeista, kuten myös oluesta, on löydetty aineosia, jotka ovat haitallisia terveydelle. Nämä yhdisteet voivat olla jäämiä, raaka-aineissa luontaisesti esiintyviä yhdisteitä tai valmistusprosessissa muodostuneita yhdisteitä. Analyyttisten tekniikoiden kehittyminen on mahdollistanut erilaisten haitallisten aineiden havaitsemisen erittäin pienissä pitoisuuksissa, ja aineiden haitallisuus ja vaikutus elintarviketurvallisuuteen on tunnistettu. Mallastus- ja panimoteollisuus ovat perustaneet toiminta- ja tutkimusmenetelmiä haitallisten aineiden minimoimiseksi. Oluessa mahdollisia elintarviketurvallisuutta heikentäviä ja terveydelle vaarallisia aineita ovat:

- pestisidit, eli tuholaismyrkyt ja muut torjunta-aineet.
- nitrosoamiinit ja ns. *apparent total nitroso compounds* (ATNC). Oluen tuoteturvallisuuden kannalta niihin on suhtauduttava vaadittavalla vakavuudella. Nitrosoamiinit ovat tehokkaita karsinogeenia, ja merkitys syöpäriskin kasvamiselle on merkittävä. Nitrosoamiinien muodostuminen on hyvin tunnettua jo 1980-luvulta, ja pitoisuuksien eliminoimiseksi on tehty perustavaa laatua olevia toimenpiteitä esimerkiksi panimossa hiivahuoltoon ja mallastamossa maltaan kuivausohjelmiin. Tärkeintä on eliminoida nitraattia pelkistävät kontaminantit kuten *Obesumbacterium proteus*. (Boulton & Quain 2006)

- Monoklooripropanolit, joita syntyy värimaltaiden, joiden väriarvo on korkea, valmistuksen yhteydessä. Intensiivinen lämpökäsittely muodostaa monoklooripropanoleja glyserolin ja kloridin reagoidessa keskenään. Monoklooripropanolien pitoisuuksia seurataan, vaikka se ei kestä panimoprosessia, eikä siitä johtuen esiinny lopputuotteessa.
- Mykotoksiinit, esim. *Fusarium*-suvun erittämä deoksinivalenoli. Mykotoksiineilla on haitallisten terveysvaikutusten lisäksi epäsuotuisia vaikutuksia oluen laatuun, esim. ylikuohuminen. Ne lisäävät hydrofobisten molekyylien määrää.
- Lyijy ja muut raskasmetallit, esim. maaperästä, putkistoista tai laitteistosta.
- Nitraatit, esim. lannoitteista. (Bamforth 2006, 19)

3 FYSIKAALISKEMIAALLISET TEKIJÄT

3.1 Alkoholipitoisuus ja uutejäämä

Alkoholin pitoisuus on oluen kriittisin suure. Se määrittää kuluttajalle oluen vahvuuden. Monissa maissa tuotetusta oluesta maksetaan alkoholiveroa sen sisältämän alkoholin tilavuusprosentin mukaan. Alkoholin pitoisuus määrittää myös oluita tyyllillisesti esimerkiksi Saksassa bock-tyylisissä oluissa on oltava vähintään 6 tilavuusprosenttia alkoholia. Joissain maissa alkoholi pitoisuuden perusteella on rajoitettu myös oluiden jälleenmyyntiä. (Briggs ym. 2004, Bamforth 2006)

Suomessa alkoholipitoisuuden ilmoittaminen oluen etiketissä on pakollista ja ilmoitetun pitoisuuden on pysyttävä sallituissa poikkeamissa (Valvira Dnro 71/43/2005). Vierteen valmistuksessa uutesaanto määrittää kantavierrevahvuuden. Kantavierrevahvuus ilmaisee kuinka paljon vierteessä on maltaasta uutettuja sokereita. Kantavierrevahvuuden mittaaminen on tärkein yksittäinen mittaus oluen valmistamisessa. Se mitataan yleensä hydrometrillä tai refraktometrisesti. (Markkula 2007)

Hiiva käyttää uutetun sokerin alkoholiksi. Kun hiivan käymisaste on tiedossa, voidaan kantavierteen avulla määrittää alkoholipitoisuus. Käymisaste ilmaisee kuinka suuren osan kantavierrevahvuudesta hiiva pystyy käyttämään ravinnokseen. Kaikki sokerit eivät kuitenkaan ole käymiskelpoisia, jolloin hiivan käymisaste on suhteellisesti pienempi eli näennäinen käymisaste laskee. Jäljelle jäävät oligosakkaridit muodostavat ns. uutejäämän, jonka avulla voidaan määrittää alkoholiksi käyneiden sokereiden määrä, ja siten alkoholipitoisuus. (Markkula 2007, Bamforth 2006)

Koska vierteen käymiskelpoisten sokereiden määrittäminen on haastavaa, pienpanimomittakaavassa määritysten tekeminen päivittäin vaatisi jo suuria ajallisia ja taloudellisia sijoituksia. Vierteen hiilihydraattiprofiilin määrittäminen on kuitenkin kannattavaa määräajoin. Kun kantavierrevahvuus on tiedossa, absoluuttinen käymisaste voidaan määrittää pienpanimomittakaavan soveltuvammin mittaamalla oluen alkoholipitoisuus tislaamalla. Toinen tapa määrittää alkoholipitoisuus on määrittää vierteen näennäinen loppuun käymisaste (NLKA), jossa ylimäärällä hiivaa pyritään käyttämään kaikki käymiskelpoinen sokeri alkoholiksi. Alkoholin määrittäminen tislaamalla on kustannustehokas ja yksinkertainen testi.

Pienpanimomittakaavassa pelkällä hydrometrillä pääsee jo pitkälle analysoitaessa uutejäämää. Uutejäämän avulla määritetty alkoholipitoisuus on kuitenkin aina laskennallinen. Vaikka hydrometri on kestävä, tarkka ja varma mittalaite, ominaispaine on aina suhteellinen lämpötilaan ja lain määrittämät poikkeamarajat kuitenkin mittatarkkuuteen nähden tiukat (Alkoholipitoisuuden ilmoittaminen pakkausmerkinnöissä 8.2.2005 Dnro 71/43/2005). Tästä syystä tislaaminen on varteenotettava menetelmä. Tislaaminen on mahdollista kuitenkin vasta pääkäymisen jälkeen. NLKA voidaan kuitenkin toteuttaa pienestä näytteestä pääkäymisaikaan nähden suhteellisen nopeasti, noin 1 – 2 vuorokaudessa.

3.2 Väri

Väri on oluen suurin yksittäinen laatuun vaikuttava fysikaalinen ominaisuus. Se kertoo jo kohtalaisen paljon kuluttajalle oluen mausta ja aromista. Oluen väriin vaikuttaa ensisijaisesti maltaasta uutetut väriaineet, toiseksi panimoprosessi ja kolmanneksi tuotteen viimeistelyyn käytettävät lisäaineet. (Briggs ym. 2004, 295)

Mallastusprosessi on tärkeä niin prosessiteknisesti oluen valmistamiselle kuin myös värin muodostumisen kannalta. Mallastamaton ohra sisältää pieniä konsentraatiota väriä tuottavia yhdisteitä. Tärkeimmät mallastusprosessin vaiheet värin muodostumisen kannalta ovat idättäminen ja kuivaaminen. Oluen väriin vaikuttavia yhdisteitä syntyy Maillard-reaktiossa, sokerien karamellisoitumisessa ja pyrolyysin aikana. Maillard-reaktioilla tarkoitetaan proteiinien aminoryhmien ja sokerien karbonyyliryhmien välillä tapahtuvia moninaisia reaktioita. Karamellisoituminen tapahtuu sokेरimolekyylien välillä. Myös korvaavina uutelähteinä käytetyt aineet, esim. kandisiirappi, tummentavat oluen väriä. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 221)

Prosessin vaikutus oluen värin muodostumiseen mäsäämisen jälkeen on hyvin pieni. Keiton aikana tapahtuva karamellisoituminen tummentaa oluen väriä, mikä on otettava huomioon. Jälkikäymisen aikana oluen väriin voi vaikuttaa hapettuneet polyfenolit, erityisesti hivenaineiden kuten raudan ja kuparin läsnäollessa. Polyfenolien hapettuminen johtaa myös polyfenoli-proteiini interaktioihin, joka voi aiheuttaa sameusongelmia lopputuotteessa. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 222)

Muita värin muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat olueen lisätyt lisäaineet kuten erilaiset sokerikulöörit (E150). Vaaleissa oluissa esimerkiksi jotkin vitamiinit, kuten riboflaviini, voivat vaikuttaa myös värin muodostukseen. (Briggs ym. 2004, 295)

Euroopassa käytetään oluen värin ilmoittamiseen European Beer Convention määrittelemänä EBC-arvoa (*European Beer Color*), joka ilmaisee maltaan väriarvon kongressivierteestä uutepitoisuudella 9 %. EBC-arvo antaa oluen valmistajalle suurpiirteisen mielikuvan millainen lämpökäsittely maltaalle on tehty. Eniten EBC-arvoa käytetään oluen tuotekehityksessä ja reseptiikassa. EBC-arvojen avulla voidaan laskea valmiin tuotteen tummuus.

EBC-arvon mittaaminen on spektrofotometrisesti suoritettava vierteen tai valmiin tuotteen värin analysointimenetelmä aallonpituudella 430 nm. EBC-menetelmä käyttää 10 mm kyvettejä standardoidussa menetelmässä. Vastaavassa amerikkalaisessa ASBC(*American Society of Brewing Chemists*)menetelmässä käytetään puolen tuuman kyvetteä.

$$EBC = A_{430}(10 \text{ mm kyvetti}) \times 25$$

$$ASBC = A_{430} \left(\frac{1}{2} \text{ tuuman kyvetti} \right) \times 10$$

$$1,97 \times ASBC = EBC$$

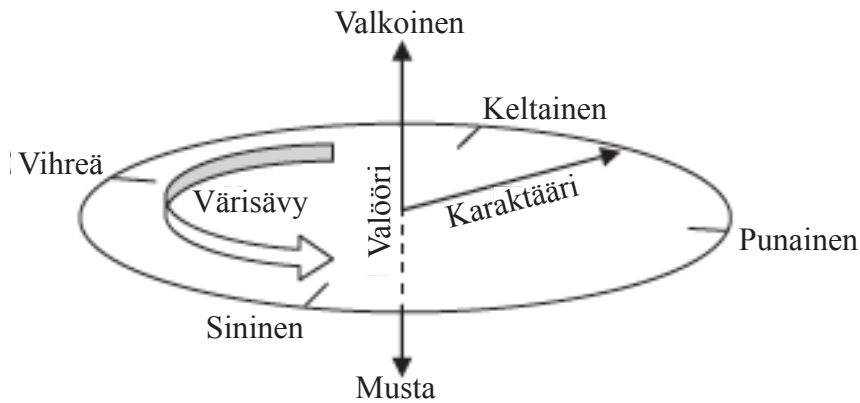
Tummuuden laskemiseen vaikuttavat myös vierteen uutepitoisuus, maltaiden määrä ja niiden massa, väriarvojen lisäksi. Muita oluen ja maltaiden väriarvoja ovat Lovibond ja SRM, jotka käytännössä vastaavat toisiaan. ASBC-värin analysointimenetelmä muunnettiin vastaamaan Lovibond-asteikkoa.

EBC-arvoa tulkittaessa on otettava huomioon, että se on riippuvainen vierteen ominaispainosta. Jopa mäskäyksestä siivilöity vierre, voi olla EBC-arvoltaan eriarvoinen kuin lopputuote, esim. lisäaineiden tai valmistustapojen vuoksi. Myös kaksi mallasta, joilla on sama väriarvo, voivat vaikuttaa oluen todelliseen väriin hyvinkin eritavalla. Oli tarkastelukohde mikä tahansa, sen todelliseen väriin vaikuttavat Wyszeckin & Stilesin (1967) mukaan kolme ominaisuutta

- Värisävyllä tarkoitetaan yksinkertaisesti objektin väriä: punainen, keltainen, sininen jne. (eng. *hue*).
- Valööri ilmaisee kuinka tumma tai vaalea väri on (eng. *lightness*).
- Karaktääri ilmaisee onko väri kylläinen vai harmahtava. (eng. *saturation*). Karaktääri voidaan ymmärtää myös ns. värin puhtautena.

(Wyszecki & Stiles 1967)

Näiden kolmen väriattribuutin mallintamiseen käytetään kolmiulotteista karttaa (kuva 1).



Kuva 1 Kolmiulotteinen värikartta, joka kuvaa värin ominaisuuksien vaikutusta todelliseen väriin (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 215).

Värin havaitsemiseen tarvitaan valonlähde, objekti ja detektori. Suurin vaihtelu syntyy valonlähteessä ja detektorissa. Tästä syystä CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) on standardoinut värin analysointimenetelmissä käytetyt instrumentit. CIE C on käytetyin ja soveltuvin elintarvikkeiden värianalysointiin (Delgado-Vargas & Lopez 2003).

CIE C-valaisin mallintaa päivänvaloa, jonka spektrijakauma $S_{(\lambda)}$ korreloi valonlämpötilaa 6740 K. Jotta spektrijakauma simuloisi normaalin ihmisen silmää paremmin, CIE standardoi myös tarvittavat detektorinstrumentit. (Loughrey 2000)

Ihmissilmässä on kolme erilaista fotoreseptoria, jotka havaitsevat valon eri aallonpituuksilla: S (lyhyt, eng. *short*, 420 – 440 nm), M (keskipitkä, eng. *medium*, 530 – 540 nm) ja L (pitkä, eng. *long*, 560 – 580 nm). CIE C-havainnoija simuloi ihmissilmää vastaavilla tristimulus-arvoilla XYZ. Ne vastaavat karkeasti värejä punainen, vihreä ja sininen, eli niiden aallonpituus ei ole sama kuin ko. väreillä, vaan tristimulus-arvot ovat johdettu näiden värien pohjalta. XYZ-arvot voidaan laskea läpinäkyvän nesteen värille, kun valonlähde ja detektori ovat vakioita. Valonlähde eli illuminantti, objekti ja detektori muodostavat yleiskaavan:

$$\begin{array}{r} \text{Illuminantin} \\ \text{spektrienergia} \end{array} \times \begin{array}{r} \text{Objektin} \\ \text{transmittanssi} \end{array} \times \text{Detektorin havainto} = \begin{array}{l} X \\ Y \\ Z \end{array}$$

Oluen värinmittauksessa spektrofotometri mittaa näytteen transmission $T_{(\lambda)}$ havainnoijan spektriherkkyyksillä $x_{10(\lambda)}$, $y_{10(\lambda)}$ ja $z_{10(\lambda)}$. Illuminantin spektrienergia on vakio $S_{(\lambda)}$. Kun havainnoijan spektriherkkyydet integroidaan koko visuaaliselle spektrille, voidaan laskea CIE tristimulus-arvot X , Y ja Z .

$$X = k \sum_{\lambda=380}^{780} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} x_{10(\lambda)}$$

$$Y = k \sum_{\lambda=380}^{780} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} y_{10(\lambda)}$$

$$Z = k \sum_{\lambda=380}^{780} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} z_{10(\lambda)}$$

Jossa k on normalisointikerroin

$$k = \frac{100}{\sum_{\lambda=380}^{780} S_{(\lambda)} y_{10(\lambda)}}$$

Ihmissilmään verrattuna tristimulus-arvot eivät reagoi tristimulus-arvojen värieroihin, jolloin CIE XYZ-systeemi ei havaitse kahden eri värin sävyeroja. CIE LAB-systeemi korjaa kuitenkin ongelman, koska se pohjautuu vastaväriteoriaan. Ihmisen näköhavainto tulkitaan kahden värisävysignaalin ja yhden valöörisignaalin avulla. LAB-systeemi muuttaa ns. tristimulus-arvot yhdeksi valööriarvoksi ja kahdeksi värisignaaliksi. L -arvo ilmentää valöörisignaalia, joka ilmentää väriä vertaamalla sitä akselilla 0 – 100, jossa arvo 0 ilmentää valkoista ja 100 ilmentää täysin mustaa. Kaksi värisignaalia a ja b ilmentävät samanaikaisesti niin värisävyä kuin karaktääriäkin kolmiulotteisessa värikartassa. (Hughes & Baxter, 2001)

Kun a saa positiivisen arvon, väri on lähempänä punaista. Negatiivinen a :n arvo on lähempänä vihreää väriä. Kun b saa positiivisen arvon, väri on lähempänä keltaista. Negatiivinen b :n arvo on lähempänä sinistä. LAB-arvot voidaan laskea XYZ-arvoista seuraavasti:

$$L = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16$$

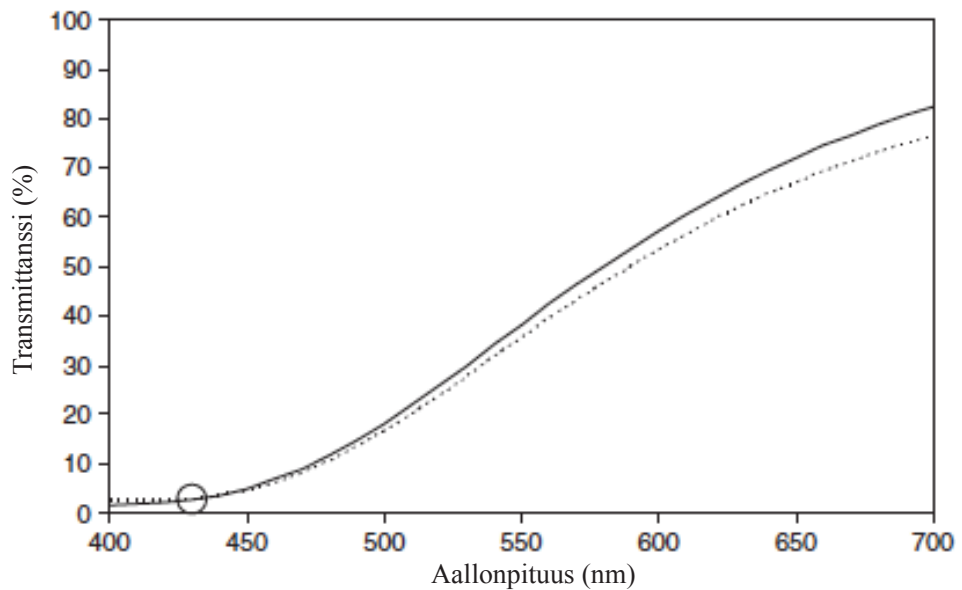
$$a = 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right]$$

$$b = 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right]$$

LAB-systeemi on huomattavasti intuitiivisempi kuin XYZ, eli se tulkitsee tristimulus-arvojen vaikutusta toisiinsa. Värierojen suuruusluokka voidaan määrittellä seuraavasti

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Kun $\Delta E > 1$, väriero on silmämääräisesti erottuva (Hughes & Baxter, 2001). Kuvassa 2 näytteen EBC on 38.8 ja $\Delta E = 1.98$. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 221)



Kuva 2 Kahden eri oluen transmissispektri, joiden tristimulusarvot ovat erisuuret, mutta absorbanssi on identtinen 430 nm aallonpituudella (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 221).

Oluen värin analysointi pienpanimo-olosuhteissa spektrofotometrisesti voi kuulostaa liioittelulta. Vaikka spektrofotometrinen värinanalysointi ei ole ainoa menetelmä, se on kuitenkin ainoa täysin ihmisestä riippumaton analysointimenetelmä. Nykypäivänä on saatavilla yksinkertaisia ja kustannustehokkaita spektrofotometrejä, jotka on räätälöity pienpanimon tarpeisiin, lähinnä EBC-analyysin tekemiseen. Joseph Lovibondin kehittämä tintometri on edelleen täysin validi menetelmä, joskin nykyään harvinainen.

Menetelmä perustuu standardoitujen väri lasien vertailuun silmämääräisesti oluen värin kanssa.

Spektrofotometri on kuitenkin hyvä sijoitus laadunvarmistamisen kannalta, koska spektrofotometrisiä analyysimenetelmiä on useita liittyen panimo-toimintaan.

3.3 Sameus

Sameus, eli kolloidinen tai ei-biologinen epävakaus, on kirkkauden vasta-kohta. Sameus voi olla joko biologista tai kolloidista.

Biologista sameutta aiheuttaa bakteeri- tai villihiivainfektio. Tässä tapauksessa sameus aiheutuu pääosin kontaminantin nopeasta kasvusta. Saman aikaisesti kontaminantti muodostaa sille ominaisia makuyhdisteitä, virhemakuja. (Bamforth 2006, 141; Briggs, Boulton, Brookes & Stevens 2004, 699-700)

Vaikka oluen pastörinti ja steriilisuodatus ovat tehneet kontaminaatiot ja proteiinien muodostaman sameuden harvinaiseksi lopputuotteessa, sameuden muodostuminen muun muassa vaikuttaa pakatun tuotteen myyntiaikaan hyvin paljon. Kolloidinen sameus on täysin ominainen ilmiö oluessa. Kolloidista sameutta on kahdenlaista: *näkyvää* ja *pseudo-sameutta*. (Bamforth 2006, 141; Briggs, Boulton, Brookes & Stevens 2004, 699-700)

Pseudo-sameus on ihmissilmälle näkymätöntä. Se muodostuu hyvin pienistä partikkeleista ($< 0,1 \mu\text{m}$). Partikkeleiden merkitys on hyvin ilmeinen mitattaessa sameutta spektrofotometrisillä menetelmillä, jossa ne taivuttavat valoa hyvin voimakkaasti. Ne näyttelevät myös hyvin olennaista osaa vaahdonmuodostumisessa. Nämä partikkelit muodostuvat yleensä tärkkelysendospermin jäänteistä kuten α -glukaanista tai hiivan autolyysin jäänteistä. (Bamforth 2006, 141)

Näkyvä sameus voi olla monenlaista.

- Proteiinin ja polyfenolin muodostamia yhdisteitä
- Mäskäytymätön tärkkelys, tai muut polysakkaridit esim. pentosaani (vehnä), β -glukaani.
- Oksalaatita (kalsium-puutteelliset vierteet)
- Vahingoittuneesta hiivasta peräisin olevat hiilihydraatit ja proteiinit
- Prosessilaitteistosta peräisin olevat voiteluaineet
- Kuolleet mikro-organismit, esim. maltaasta

(Bamforth 2006, 141; Briggs, Boulton, Brookes & Stevens 2004, 700)

Proteiinit voivat aiheuttaa yksinäänkin sameusongelmia. Jo 2 mg sameutta muodostavia proteiineja 1 litrassa olutta muodostaa ihmissilmin havaittavan sameuden, joka vastaa n. 1 EBC-sameusyksikköä, taulukko 1. Suurin osa oluista sisältää lähes 2 g proteiineja litraa kohden, jonka vuoksi sameuden muodostuminen on lähes väistämätöntä. EBC-, ASBC- ja NTU-analyysimenetelmät tunnistavat jo pienetkin proteiinipitoisuudet, taulukko

1. (Bamforth 2006, 142). Bishopin (1975) mukaan oluessa on n. 300 - 800 mg/dm³ proteiininkaltaista materiaalia, josta suurin osa on polypeptidejä. Polypeptidien suuren molekyylikoon vuoksi oluen sisältämien polypeptidien kuvaamiseen käytetään yleisnimitystä proteiini.

Taulukko 1 Spektrofotometrisessä analyysimenetelmissä käytettävät sameusskaalat. NTU on *Nephelometric Turbidity Units*. EBC on *European Brewery Commission* määrittämä suhteellinen sameus. ASBC on amerikkalainen vastaava kuin EBC.

Kuvaus	NTU	EBC	ASBC
Kirkas	< 2	< 0.5	< 35
Lähes kirkas	2 – 4	0.1 – 1	35 – 70
Hieman samea	4 – 8	1 – 2	70 – 140
Kohtalaisen samea	8 – 16	2 – 4	140 – 280
Samea	> 16	> 4	> 280

Oluen proteiinit tulevat pääasiallisesti maltaasta, sekä mahdollisesti muista viljapohjaisista ja korvaavista uutelahteista ja pieni osa humalasta. Mallastuksen aikana viljan proteiinit altistuvat monille muutoksille. Ensisijaisesti jyvän idättämisen aikana proteiinit pilkkoutuvat proteolyyttisten reaktioiden seurauksena pienemmiksi polypeptideiksi, FAN-yhdisteiksi (vapaa aminotyyppi) ja aminohapoiksi. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 115, 222)

Proteolyttiset reaktiot jatkuvat mäsäyksen yhteydessä. Vaikka lämpötilat ovat epäsuotuisat tehokkaaseen proteolyttiseen aktiivisuuteen mäsäyksen aikana, jotkut panimot käyttävät vaiheinfuusiomäsäyksen alussa ns. proteiini-taukoa. Proteiini-tauko n. 48 °C:ssa aktivoi maltaan proteolyttiset entsyymit. Tauon merkitys kasvaa mäskeissä, joissa käytetään raaka-aineita joiden proteiini pitoisuus on suuri tai korvaavien uutelahteiden määrä vierteen käymiskelpoisista sokereista on suuri. Proteolyttisten entsyymien, endoproteaasien ja karboksipeptidaasien, lisäksi proteiinitauon aikana aktivoituvat prosessin kannalta tärkeät sytolyttiset entsyymit, kuten β-glukanaasi. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 115; Markkula 2007, 16 - 17)

FAN-yhdisteet ja aminohapot ovat hiivan kannalta katsottuna tärkeitä ravinteita, joita syntyy proteiinien pilkkoutuessa. Vierteen keiton aikana suurin osa proteiineista denaturoituu ns. kuuma- tai kylmärupana (esim. mäsäyksessä tärkeät entsyymit). Ne polypeptidit, jotka selviytyvät lopputuotteeseen, ilmentävät oluen ominaisuuksia kuten sameutta ja vaahdon stabiilisuutta. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 116)

Oluen proteiinien koon ja oluen ominaisuuksien välille on yritetty löytää korrelaatiota, mutta proteiinien pieni kvalitatiivinen lukumäärä ja proteiinien tunnistusmenetelmien epätarkkuus ovat tehneet korrelaation löytämisen monimutkaiseksi. Vaikka eri proteiinien tehtävien yksilöiminen on saanut tulokseksi ristiriitaista kirjallisuutta, proteiinien merkitystä ei kuitenkaan voi vähätellä, koska

- Proteiinit ovat merkittävä sameuden muodostaja.

- Proteiinit ilmentävät oluen ominaisuuksia, esim. vaahto.
- Proteiinit vaikuttavat stabiilisuuteen merkittävästi.

(Bamforth, Russell & Stewart 2009, 117)

Vain murto-osa polypeptideistä on tunnistettu ja niiden tehtävistä on päästy osittain yksimielisyyteen. Oluen polypeptidien aminohappokoostumus on erikoislaatuinen. Polypeptidit antigeeni 1, eli proteiini Z, ja LTP1 on tunnistettu ja niiden tehtävät vaahdonmuodostuksessa on osittain selvitetty (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 132). Suurin osa sameutta muodostavista polypeptideistä ovat maltaasta peräisin olevan hordeiinin johdannaisia, ja sisältävät suhteellisen paljon proliinia, glutamiinihappoa, arginiinia ja glysiiniä. Albumiini- ja globuliinijohdannaiset aiheuttavat kylmäsameutta, mutta ne saostuvat vasta hordeiinijohdannaisten polypeptidien jälkeen. (Bamforth 2006, 142; Bamforth, Russell & Stewart 2009, 132).

Polyfenolit ovat peräisin maltaasta ja humalasta. Niillä on todettu olevan ainakin kaksi merkittävää roolia oluessa.

1. Kolloidisen sameuden muodostaminen proteiinien kanssa
2. Antioxidanttiset vaikutukset (Maun stabiliteetti)

(Whittle, Eldridge, Bartley & Organ 1999)

Olut sisältää n. 100 – 300 mg/dm³ polyfenoleita. Olut sisältää kahden tyyppisiä polyfenoleita. Ensimmäinen ryhmä on hydroksibentsoe- ja hydroksikanelihapon johdannaisia, ja toinen ryhmä flavanolijohdannaisia. Flavanolien osuus polyfenoleista on n. 10 %. Flavanolit on yhdistetty kolloidisen sameuden muodostumiseen (Hough, Briggs, Stevens & Young 1982). Doner ym. (1993) tarkensi kolloidiseen sameuteen yhdistettyjen polyfenolien erittelyä. Flavanoidit, eli flavanolien oligomeerit voidaan jakaa yksinkertaisiin (mono-, di- ja tri-) ja monimutkaisiin (polymeerit) flavanoideihin.

Polyfenolien merkitys kolloidisen sameuden muodostumisessa on hyvin tutkittua, mutta polyfenolien muut vaikutukset suutuntumaan ja ravitsemuksellisiin ja antioksidanttisiin ominaisuuksiin ovat hyvin kiistelyjä. (Bamforth 2006, 137)

Whittle ym. (1999) tutkimuksessa ohrasta löydettiin ja alustavasti tunnistettiin 56 erilaista flavanoidia. Toisin kuin proteiinit, polyfenolit eivät altistu suurille muutoksille panimoprosessin aikana. Mäskäyksen aikana n. 23 % ohran sisältämistä flavanoideista uuttuu vierteeseen (McMurrough, Hennigan, & Loughrey 1993). Vierteen keiton yhteydessä monimutkaisemmat ja suuremmat polyfenolit saostuvat proteiinien kanssa, minkä seurauksena vierteeseen jää vain yksinkertaisia polyfenoleja, jotka muodostavat kolloidista sameutta (Siebert & Lynn 1998). Noin 70 % maltaan polyfenoleista säilyy muuttumattomana vierteen keitossa. (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 135)

Humala sisältää n. 2 – 4 % kuivapainosta polyfenoleita. Humalaa käytetään oluen valmistamisessa kuitenkin vain murto-osa maltaan määrästä. Vierteen keitosta selviää vain n. 20 % humalan polyfenoleista (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 136). Vierteen keiton jälkeen polyfenoleita menetetään jäähdytyksen ja varastokäymisen yhteydessä. Oluen sisältämistä polyfenoleista flavanoideja on n. 15 mg /dm³. (McMurrough & O'Rourke 1997)

Whittle ym. (1999) löysivät valmiista oluesta 24 erilaista flavanoidia, jotka ovat merkittäviä kolloidisen sameuden muodostumisessa. Sameuden kannalta oleellisimpia flavanoideja ovat dimeerit, procyanidin (katekiini – katekiini) ja prodelphinidin (kallokatekiini – katekiini). Näitä yhdisteitä kutsutaan nimellä antosyanogeenit, jotka muiden flavanoidien tapaan ovat peräisin ohrasta ja humalasta.

Proteiini-polyfenoli interaktio muodostaa ns. kylmäsameutta, joka muodostuu kun olut jäähdytetään 0 °C:een. Heikkojen vetysidosten muodostama makromolekyylili hajoaa kuitenkin oluen lämmitessä (Bamforth 2006, 142). Tällainen sameus on täysin normaalia oluelle, etenkin lager-olut on huomattavasti herkempää kylmäsameuden muodostumiselle kuin ale-olut (Bamforth, Russell & Stewart 2009, 114). Ongelmat polyfenolien kanssa alkavat hapettumisen myötä. Hapettuessaan polyfenolit polymeroituvat, ja muodostaessaan proteiinien kanssa kylmäsameutta makromolekyylisiä tuolee pysyvä (Bamforth 2006, 142; McMurrough & O'Rourke 1997).

Proteiini-polyfenoli interaktiossa polyfenolien hydroksyyli-ryhmien lukumäärä ja sijainti molekyylissä ovat avainasemassa kovalenttisten sidosten muodostamisessa. Mitä enemmän fenolin aromaattisessa hiilirenkaassa on hydroksyyli-ryhmiä, sitä aktiivisempi se on muodostamaan sidoksia proteiinin kanssa. Flavanoidit, joissa on vain yksi hydroksyyli-ryhmä, ovat lähes inaktiivisia. Tästä johtuen prodelfiini on huomattavasti aktiivisempi sameuden muodostaja. (Siebert 1997)

Hydroksyyli-ryhmät ovat alttiita hapettumiselle, jolloin flavanoidi joka sisältää useita hydroksyyli-ryhmiä on alttiimpi hapettumaan (McMurrough 1995). Chapon (1994) kutsuu kolloidista sameutta muodostavia hapettuneita polyfenoleita tannoideiksi. Tannoidit polymeroituvat tanniineiksi, jotka saostavat proteiineja. Kaikki tanniinit eivät kuitenkaan ole anthosyanogeenisiä, mutta niiden rakenne muistuttaa hyvin paljon flavanoidien oligomeerejä (McMurrough 1995). Chaponin (1994) mukaan oluessa on tannoideja n. 10 – 60 mg/dm³ ja tanniineja ei yhtään kunnes niitä syntyy redox-reaktioissa.

Siebert & Lynn (1997) tutkiessa proteiini-polyfenoli interaktiota ilmeni proliinin ilmeinen merkitys polypeptidirakenteessa. Suurille katekiinipitoisuuksille altistettu polyproliini reagoi muodostaen sameutta. Toisaalta katekiini ei oluessa yksinään muodosta sameutta, koska se on suhteellisen pieni molekyylili.

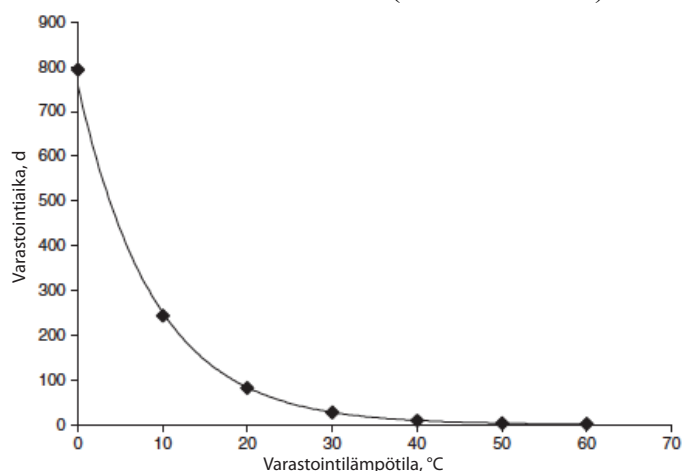
Hiilihydraattien osuus sameuden muodostumisessa on prosessihäiriön seurauksena jäänyt mäsäkäytymätön tärkkelys sekä jäännösuutteessa olevat

dekstriinit. Siebert ym. (1996) löysivät jopa 80 % hiilihydraattipitoisuuksia saostuneesta materiasta. Koska sameus muodostuu pääosin proteiini-polyfenoli interaktion seurauksena, hiilihydraatit saostuvat passiivisesti suurien proteiini-polyfenoli oligomeerien mukana.

Proteiini-polyfenoli-interaktion muodostama sameus vaatii aikaa. Sen vuoksi näkyvä sameus ennen varastokäymistä tai stabilointikäsitteilyjen jälkeen voi olla oluen kirkkauden kannalta kohtalokasta. Näkyvää sameutta muodostavat molekyylikooltaan ja -massaltaan isommat molekyylit ja partikkelit muodostavat pysyvää sameutta, jonka poistaminen voi olla hankalaa. Tällainen sameus ilmentyy yleensä prosessihäiriöiden seurauksena, jonka on herätettävä oluen valmistajan huomio. Yleensä prosessihäiriöt liittyvät hiivaus- ja erotusmenetelmiin tai epäonnistuneeseen stabilointikäsitteilyyn. (Basarova 1990)

Sameuden mittaaminen on pienpanimo-olosuhteissa haastavaa, koska se vaatii paljon analyysilaitteistoa ja erityistietotaitoa. Spektrofotometri on kuitenkin tässäkin tapauksessa hyvä sijoitus ja helppokäyttöinen, esim. polyfenolien määrittämiseen käytetään kolorimetristä menetelmää sekä kokonaissameuden arvioimiseen. Potentiaalista sameutta ja oluen stabiilisuutta voidaan arvioida kuitenkin pidemmälle teoriaa soveltamalla. Potentiaalisen kylmä-sameuden ilmennetään myös jäähdyttämällä olut $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:een 40 min ajaksi, jolloin kaikki mahdollinen kylmä-sameus saadaan muodostumaan (Bamforth 2006).

Koska proteiini-polyfenoli interaktio muodostaa kylmä-sameutta, voidaan oluelle tehdä ns. Lämpörasitusta, kuva 3. Lämpörasitustesteistä on paljon erilaisia versioita. Tunnetuin lienee kuitenkin Guinness-testi, jossa olutta säilytetään $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:a. Oluelle yksi viikko tässä lämpötilassa vastaa yhden kuukauden varastointiaikaa $18\text{ }^{\circ}\text{C}$:a. Rasituksen aikana mitataan muutoksia oluessa. Nopeampaakin lämpökiertoa voidaan käyttää. Tällöin rasituslämpötilat kasvavat, jolloin lämpötilojen hallinta hankaloituu. Oluen varastointi $60\text{ }^{\circ}\text{C}$:a 2 vuorokautta ja $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$:a yksi vuorokausi vastaa noin 6 viikon normaalia varastointia. (Bamforth 2006)



Kuva 3 Lämpötilan vaikutus makuprofiilin muutoksen nopeuteen, kun näytteen varastointi aika on yksi vuorokausi. (Bamforth 2009).

Sameuden tutkimisessa on kuitenkin ongelmana sameuden arviointi – kuinka paljon ja mikä sameuden aiheuttaa. Olut on itsessään jo sameaa, ja joihinkin oluttyyleihin kuuluu sameus. Panimon laadunvalvonnan kannalta ajateltuna vahvan sameuden aiheuttajan löytäminen on tärkeämpää kuin oluen sameuden kvantitatiivinen analysointi. Helpoin tapa tähän on sameutta aiheuttavan materian eristäminen esim. sentrifugilla ja retentaatin mikroskopointi. Mikroskopoinnilla voidaan erottaa hiiva, hiilihydraatteja, kirkastus- ja suodatusapuaineita ja oksalaatteja. Värjääminen helpottaa eri materiaalien tunnistamista, esim. metyleeni-sini värjää kuolleet solut, proteiineja, hiilihydraatteja ja kirkastusaineita (kuten piioksidit), tioniini värjää hiilihydraatit purppuraksi, oranssi G värjää proteiinit keltaiseksi ja jodi värjää tärkkelyksen violetiksi. (Buckee 1989)

3.4 Karbonointi

Hiilidioksidi on oluen kannalta tärkein prosessikaasu. Se raikastaa oluen makua, vaikuttaa eniten sen suutuntumaan ja mahdollistaa vaahdon muodostumisen (Bamforth 2006). Hiilidioksidia syntyy pääkäymisen aikana, kun hiiva käyttää vierteessä olevat sokerit alkoholiksi.

Oluen valmistamisen yhteydessä puhutaan yleensä ylikyllästämistä, mutta se saattaa olla harhaan johtava termi. Ylikyllästetty liuos on suhteellinen termi. Kun teekuppiin lisää liikaa sokeria, liukenematon sokeri jää kupin pohjalle. Muuttamalla olosuhteita sokeri kuitenkin saadaan liukenemaan ennen pitkään teehen. Hiilidioksidin liuottamisessa on kyseessä samat periaatteet.

Kun olut siirretään pääkäymisen jälkeen varastotankkeihin, siihen on liuenneena pääkäymisolosuhteista riippuvainen määrä hiilidioksidia. Tällöin hiilidioksidi on tasapainotilassa. Yleensä karbonointi tapahtuu varastotankeissa oluen kypsymisen aikana. Muita mahdollisuuksia ovat varastosiirron aikana tapahtuva karbonointi siirtolinjassa tai ravinteiden ja hiivan lisääminen pakkaukseen.

Oluen ylikyllästäminen on yksinkertaista, kun yleiset kaasuja koskevat lainalaisuudet ovat tiedossa. Vincenti & Kruger (1982) on koonnut panimoprosessin kannalta yleiset kemialliset ja fysikaaliset lainalaisuudet seuraavasti:

- Kaasu koostuu molekyyleistä. Jokaisella molekyylillä on suunnattua (direktionaalista) kineettistä energiaa, eli se liikkuu suoraan tilanteen määrittämällä nopeudella. Nopeus riippuu molekyylin koostumuksesta ja olosuhteista.
- Kaasumolekyylit ovat niin pieniä, että niitä ei voida mitata tilavuutena. Yleisin kaasun määrää mittaava suure on paine (P).
- Kaasumolekyylit törmäilevät keskenään, jolloin niille ominainen kineettinen energia vaihtelee molekyylin suunnan muuttuessa. Kineettisen energia kokonaismäärä pysyy kuitenkin vakiona vallitsevissa olosuhteissa, eli törmäyksen jälkeen toinen molekyyli liikkuu nopeammin kuin toinen.

- Lämpötila on verrannollinen kaasumolekyylien kineettiseen kokonaisenergia määrään. Kun lämpötila (T) nousee, molekyylit liikkuvat nopeammin, eli systeemin kineettinen kokonaisenergiämäärä kasvaa.
- Kaasumolekyylit törmäävät myös tiheämpiin ja suurempiin molekyylimassoihin, eli panimo-olosuhteissa esim. säiliön seinämiin. Näistä törmäyksistä, jotka eivät jaa molekyylien kineettistä energiaa, muodostuu systeemin paine. Mitä enemmän törmäyksiä tapahtuu aikayksikköä kohti, sitä suurempi systeemin paine on.

Kaasun kokonaismäärää tarkastellessa ainemäärä, eli mooli, on hyvin tarpeellinen suure. Mooli mitä tahansa ainetta vastaa yhtä monta grammaa ainetta kuin on aineen molekyylin tai muun perusosan massa atomimassayksikköinä. Yhdessä moolissa on perusosasia Avogadron vakion verran eli noin $6,0221415 \times 10^{23}$ kpl. 1 mooli ainetta vastaa siis sen moolimassaa grammoissa. Hiilidioksidin, CO_2 , moolimassa on siis 44 g/mol. (Fix 1999))

Kaasupullo, jossa on 3 kg hiilidioksidia sisältää 68,1 moolia hiilidioksidia.

$$n = \frac{m}{M} = \frac{3000 \text{ g}}{44 \text{ g/mol}} = 68,1 \text{ mol}$$

Jossa

n = mooli

m = massa (g)

M = moolimassa (g/mol)

Kaasu ei ole koskaan ideaalia, koska se on seos eri molekyyleistä. Panimo-olosuhteissa prosessikaasut kuitenkin käyttäytyvät ideaalikaasumallin mukaisesti:

$$PV = nRT$$

Jossa

P = paine (J)

V = tilavuus (dm^3)

n = mooli

R = ideaalikaasuvakio; 8,3145 J/(mol x K)

tai 0,083145 (bar x dm^3)/(mol x K)

T = lämpötila (K; K = 273,15 + °C)

68,1 mol hiilidioksidia paineistetaan 52 bariin 20 °C. Kuinka suuri astia tarvitaan?

$$V = \frac{nRT}{P}$$

$$V = \frac{68,1 \text{ mol} \times 0,083145 \frac{\text{bar} \times \text{dm}^3}{\text{mol} \times \text{K}} \times 293,15 \text{ K}}{52 \text{ bar}}$$

$$V = 31,9 \text{ dm}^3$$

Pienpanimon kannalta 52 bariin pakattu hiilidioksidipullo on hyvin käytännöllinen. On kuitenkin hyvä muistaa sen ainemäärän rajallisuus. Tästä

syystä prosessissa tarvittavan kaasumäärän laskeminen on niin taloudellisesti kuin prosessin jatkuvuuden kannalta keskeistä.

Panimoprosessin aikana olosuhteet pyritään muuttamaan prosessin sujuvuuden kannalta optimaaliseksi. Muuttaessa olosuhteita ideaalikaasumallilla voidaan ennakoida mahdollisten muutosten vaikutusta olosuhteisiin, taulukko 2. Ainemäärä ja ideaalikaasuvakio supistuvat pois yhtälöistä, koska ne ovat yhtä suuret, kun kaasun massa pysyy samana.

$$(P_1V_1)/T_1 = (P_2V_2)/T_2$$

Taulukko 2

	Yhtälö	Vakio
Boylen laki	$P_1V_1 = P_2V_2$	$T_1 = T_2$
Charlesin laki	$P_1/T_1 = P_2/T_2$	$V_1 = V_2$
Gay-Lussacin laki	$V_1/T_1 = V_2/T_2$	$P_1 = P_2$

Vaikka panimo-olosuhteissa voidaan soveltaa ideaalikaasumallia pätevästi, kaasun heterogeeninen rakenne on hyvin kriittinen tekijä oluen laadun kannalta. Koska hiilidioksidin liukeneminen olueen on tietoisesti toivottua, liukenemista ja kaasun käyttäytymistä koskevat lain alaisuudet ovat yhtenevät. Prosessikaasut muodostuvat panimossa pääosin hiilidioksidista, typestä ja hapesta. Osittain vaikuttaa siltä, että absoluuttista kaasua ei koske ideaalikaasumalli. John Daltonin mukaan jokainen kaasuseoksessa oleva eri kaasumolekyylifraktio toimii toisistaan riippumattomasti, eli jokaisen kaasun ominaisuuksia kuvaa ideaalikaasumallin mukaiset lain alaisuudet. (Fix 1999)

Näin ollen jokaiselle kaasumolekyylifraktiolle pätee ideaalikaasumallin mukainen $PV = nRT$ -suhde, joka on riippumaton muiden kaasumolekyylifraktioiden toiminnasta tai ideaalikaasusuhteesta. Näin ollen absoluuttinen kaasu rakentuu kaikkien läsnä olevien kaasumolekyylifraktioiden osapaineesta:

$$P_{Kokonaispaine} = P_{CO_2} + P_{N_2} + P_{O_2}$$

$$P_{Kokonaispaine} = \left[\frac{nRT}{V} \right]_{CO_2} + \left[\frac{nRT}{V} \right]_{N_2} + \left[\frac{nRT}{V} \right]_{O_2}$$

Daltonin laki osapaineesta on panimossa hyvin käytännöllinen, koska kaasujen liukeneminen on prosessin ja tuotteen laadun kannalta hyvin kriittinen osa, esim. hapen liukeneminen olueen ja oluen karbonointi. Koska kaasun liukeneminen olueen on olennainen osa tuotetta ja panimoprosessia, on hyvä tietää mitkä tekijät vaikuttavat liukenemiseen. Liukenemiseen vaikuttavat tekijät ovat paine, lämpötila ja suolaisuus (*salinity*). (Fix 1999)

Kaasun liukenemiseen liittyviä laskennallisia tarkasteluja teki TkT Liisa Rihko-Struckmann (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg, Saksa). Tulokset on esitetty taulukossa 3. Mitauksissa havaitaan, etteivät kaasujen osapaineet vaikuta toisiinsa.

Taulukko 3 Osapaineiden vaikutus liukenemiseen. (Rihko-Struckmann, Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme)

Sisäänvirtaus kaasu (mol)

CO2	0,03	0,03	0,05	0,05	0,55	0,55	0,98
O2	0,01	0,1	0,01	0,1	0,01	0,1	0,01
N2	0,96	0,87	0,94	0,85	0,44	0,35	0,01

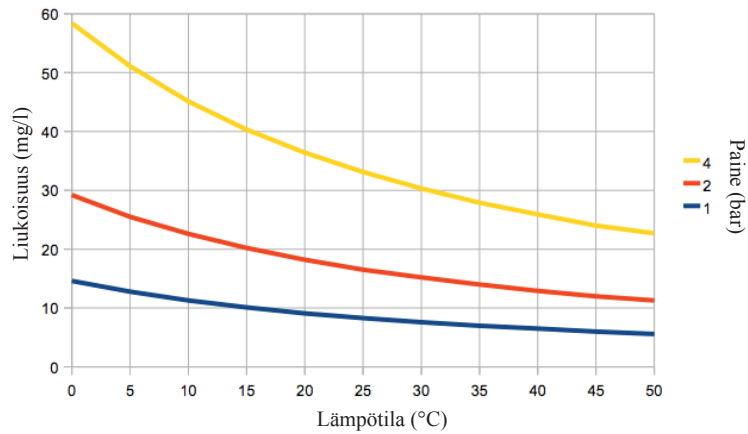
Sisäänvirtaus neste(mol)

H2O	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-----	------	------	------	------	------	------	------

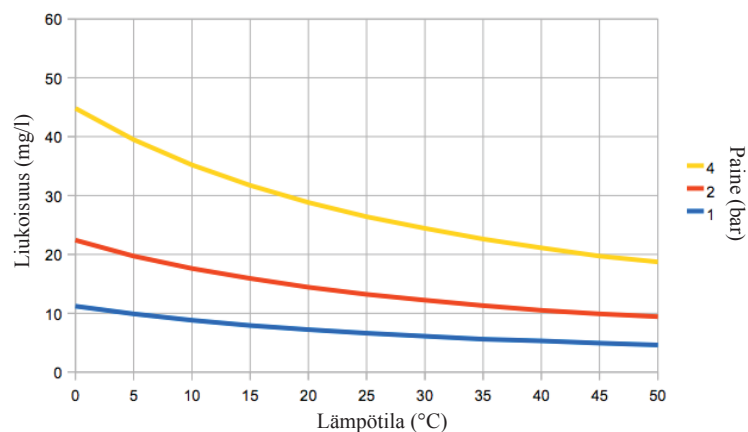
Ulostuleva neste (mmol)

CO2	0,439	0,439	0,731	0,731	8,162	8,163	14,733
O2	0,012	0,121	0,012	0,121	0,012	0,123	0,012
N2	0,928	0,841	0,909	0,822	0,432	0,343	0,010
H2O	968,088	968,090	968,106	968,108	968,562	968,562	968,958

Hapen liukoisuus, Suolaisuus 0 ppm



Hapen liukoisuus, Suolaisuus 35 ppm



Kuva 4 Suolaisuuden, paineen ja lämpötilan vaikutus kaasun liukoisuuteen.

Paineen ja kaasun liukenemisen välillä on Henryn laki: Nesteeseen liuenneen kaasun määrä on suoraan verrannollinen kaasun paineeseen, joka on nesteen pinnan yläpuolella. Mitä suurempi paine, sitä enemmän kaasua

liukenee, kuva 4. Kun paine kasvaa, systeemi pyrkii tasapainotilaan ympäristönsä kanssa. Kaasu liukenee nesteeseen, jotta systeemin paine pysyisi vakiona. Mikäli kaasun ainemäärä on vakio paineen noustessa, kaasumolekyyliden ainemäärä vähenee nesteen pinnan yläpuolella, jolloin kaasufaasin paine laskee. (Holle 2003, Fix 1999)

Kaasun liukeneminen nesteeseen laskee lämpötilan noustessa, kuva 4. Lämpötilan nousu lisää molekyylien kineettistä energiaa, jolloin niiden voimistunut liike rikkoo molekyylliset väliset sidokset. Liikkeen voimistumisen voi havaita paineen ja lämpötilan riippuvuudesta. Lämpötilan kasvaessa kaasufaasin kokonaispaine kasvaa tilavuuden ollessa vakio (kts. Taulukko 2, Charlesin laki). Oluen karbonoinnin kannalta Charlesin laki ei täytä prosessin olosuhteita tyydyttävästi, koska oletuksena Charlesin laissa on että systeemin massa on vakio. Oluen pyritään liuottamaan ylimäärä hiilidioksidia, jolloin hiilidioksidin massa on teoriassa varastotankissa ääretön – käytännössä talousrajoitteinen. (Fix 1999)

Klassinen termodynamiikka pyrkii määrittämään termodynaamisen systeemin ominaisuuksia ja tasapainotilan saavuttamista. Termodynamiikan toisen pääsäännön mukaan suljettu systeemi pyrkii spontaanisti tasapainotilaan. Varastotankin olosuhteet, lämpötila ja paine, pyritään vakioimaan. Tällöin liuenneen hiilidioksidin määrä voidaan osoittaa tasapainotilassa. Termodynaamisesti tarkasteltuna tasapainotila saavutetaan, kun Gibbsin energia saa minimiarvon. (Gibbs 1928)

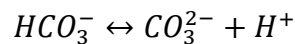
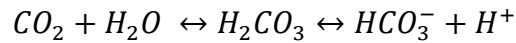
Gibbsin energia kuvaa suurinta mekaanisen työn määrää, jonka prosessi voi tehdä vakiolämpötilassa ja paineessa. Karbonoinnin osalta tilannetta voitaisiin kuvailla sylinterillä, jossa on olutta ja hiilidioksidia. Kun mäntä painaa sylinterin tilavuutta pienemmäksi, hiilidioksidia liukenee olueen. Kun haluttu hiilidioksidipitoisuus on saavutettu olueen, se määrä työtä, joka on tehty männän painamiseen sylinterin sisään on tasapainotilalle ominainen potentiaalienergia, Gibbsin energia. (Gibbs 1928)

Fugasiteetti on yhdisteelle ominainen termodynaaminen ominaisuus, joka kuvaa yhdisteen taipumusta laajentua tai paeta suhteessa sen osapaineseen, eli vakiopaineessa ja lämpötilassa yhdiste suosii olomuotoa, jossa Gibbsin energia on alhaisin. Tästä johtuen hiilidioksidin liuetessa varastotankissa olueen, jonka paine ja lämpötilaolosuhteet ovat vakio hiilidioksidia vapautuu kokoajan takaisin varastotankin ilmatilaan, jolloin nestefaasin rajapinnalla on jatkuva kaasun liike. Liukenevan kaasun määrä on kuitenkin suurempi kuin vapautuvan hiilidioksidin määrä kunnes tasapainotila on saavutettu, jolloin nestefaasin pinnalla olevat kaasun osavirtaukset ovat yhtä suuret (Holle 2003). Kaasun vapautuminen tapahtuu vain nestefaasin pinnalla, koska kaasufaasin osapaine on niin suuri, että nukleaatioenergiarajan ylittäminen nestefaasissa olevilla nukleaatioalueilla on lähes mahdotonta.

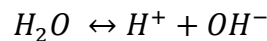
Suolaisuus (*salinity*) on yksi kaasun liukenemiseen vaikuttava tekijä. Se kuvaa nestefaasiin liuenneiden suolojen määrää, esim. natriumkloridi, magnesium, kalsiumkarbonaatti, kalsiumsulfaatti ja bikarbonaatti (vety-

karbonaatti-ioni). Suolaisuus estää kaasun liukenemistä, tästä syystä makeaan veteen liukenee enemmän kaasua, kuva 4.

Koska olut on pääosin vettä, voidaan oluen kohdalla olettaa, että hiilidioksidi liukenee veteen. Ainoa ominaisuus, joka vaikuttaa kaasun liukenemiseen olueen on tensidi, pinta-aktiivinen aine, joka hidastaa kaasun vapautumista nesteestä (Bamforth 2009). Kun hiilidioksidi liukenee veteen, syntyy hiilihappo. (Savioja 1972, Ratilainen 1986)

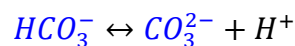
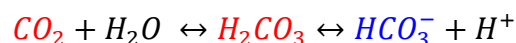


Vedessä hiilihappo reagoi kuitenkin kaksiarvoisena happona, jolloin se muodostaa vetykarbonaatti-, karbonaatti ja vety-ioneja. Koska vesi on amfolyttinen aine, eli se voi toimia happona tai emäksenä, liuennut hiilidioksidi nostaa nesteen vety-ioni konsentraatiota. (Savioja 1972, Ratilainen 1986)



Liuennut hiilidioksidi nostaa nesteen alkaliteettiä, joka muodostuu emäksistä ioneista. Alkaliteetti kokonaiskonsentraatio muodostuu vetykarbonaatti-, karbonaatti- ja hydroksidi-ionikonsentraatioista. Alkaliteetti antaa nesteelle puskurikykyä, joka stabiloi oluen pH-arvoa, mikä parantaa oluen säilyvyyttä ja vähentää prosessihäiriöitä. (Savioja 1972, Ratilainen 1986)

Liuennut hiilidioksidi on joko **dissosioitunutta** tai **dissosioitumatonta**. Dissosioitunut hiilidioksidi on vetykarbonaatti- ja karbonaatti-ioneina. Dissosioitumaton hiilidioksidi on ns. vapaata hiilidioksidia, joka koostuu hiilidioksidista ja hiilihaposta. Kun hiilidioksidi vapautuu oluesta, vapaa hiilidioksidi vapautuu ensin. Dissosioitunut hiilidioksidi nostaa nesteen suolaisuutta. (Savioja 1972, Ratilainen 1986)



Veden suolaisuutta nostaa myös sen kovuus, eli kalsium- ja magnesiumioni konsentraatio. Kovuus jakautuu karbonaatti- ja mineraalihappokovuuteen. Tärkein ero on karbonaattikovuuden hetkellisyys, mikä voidaan poistaa kuumentamalla, jolloin saostuu kalsiumkarbonaattia (kalkki). Mineraalihappokovuus on toisaalta pysyvää, mikä nostaa myös suolaisuutta (kalsiumsulfaatti, -kloridi, -nitraatti). (Savioja 1972, Ratilainen 1986)

Panimoprosessin kannalta suolaisuus määrittyy vierteen valmistuksessa käytettävän veden kemiallisesta käsittelystä. Kemiallisella veden käsittelyllä pyritään optimoimaan prosessiolosuhteita ja tuotteen säilyvyyttä. Liiallinen käsittely voi kuitenkin pidentää myös prosessiaikoja hiilidioksidin liukenemisen osalta. Suolaisuuden vaikutus kaasun liukenemiseen on kui-

tenkin marginaalinen verrattuna kaasun osapaineen ja lämpötilan vaikutukseen. (Fix 1999)

Liuenneen hiilidioksidin konsentraatiota voidaan mitata monella eri tavalla, mutta konsentraatio ilmoitetaan yleensä g/litra tai tilavuusyksikkönä vol-CO₂. EBC-standardit käyttävät g/litra ja ASBC-standardit käyttävät tilavuusyksikköä. Kaasun käsittäminen massana on huomattavasti helpompaa kuin tilavuutena, koska kaasun absoluuttinen määrä on suhteellista. Koska kaasun tiheyteen vaikuttavat lämpötila ja paine, kaasun määrää verrataan aina standardoiduissa olosuhteissa, NTP. (Fix 1999)

Liuenneen hiilidioksidin tilavuus kertoo kuinka moninkertainen määrä hiilidioksidia on liuenneena NTP-olosuhteissa nesteen tilavuuteen. Eli

$$1 \text{ vol-CO}_2 = 1 \text{ dm}^3 \text{ CO}_2 / 1 \text{ litraa nestettä}$$

Näin ollen konsentraation avulla voidaan laskea liuenneen hiilidioksidin ainemäärä, tilavuus ja massa.

$$\frac{n}{V} = Vol. \times \left(\frac{\rho}{M} \right)$$

NTP olosuhteissa ρ on noin 1,96 kg/dm³. Hiilidioksidin moolimassa 44 g/mol.

$$\frac{n}{V} = \frac{Vol. (dm^3 CO_2)}{1 dm^3 neste} \times \frac{\rho (1,97 \frac{g CO_2}{dm^3 CO_2})}{M (44 \frac{g CO_2}{mol CO_2})}$$

$$\frac{n}{V} = \frac{Vol.}{22,3} \text{ mol CO}_2 \text{ per } 1 dm^3 \text{ nestettä}$$

$$Vol. = 22,3 \left(\frac{n}{V} \right) = 22,3 \left(\frac{P}{RT} \right)$$

Tilavuuden muutos massaksi on tiheyden avulla yksinkertaista.

$$1 Vol. CO_2 \times 1,97 \frac{g}{dm^3} = 1,97 \frac{g}{dm^3}$$

Tilavuus- ja massayksiköiden välinen pitoisuuksien muuntaminen on tärkeää karbonoinnin määrän laskemiseksi. Varastotankkien olosuhteiden vakioinnilla voidaan arvioida paineistettuun olueen liukeneva maksimi kaasumäärä tasapainoteorian avulla. Koska tasapainon saavuttamiseen kuluva aika on pitkä, suuremmalla paineella päästään nopeammin haluttuun pitoisuuteen. Tällöin tasapainotilassa saavutettava liuenneen hiilidioksidin määrä on tuotteen maksimipitoisuus, mikä ei ylitä vaikka kypsymisaika olisikin vaadittavaa aikaa pidempi. Minimiarvo asetetaan prosessiolosuhteiden ja tuotteen ominaisuuksien mukaan. (Fix 1999)

Pienpanimomittakaavassa liuenneen hiilidioksidin mittaamiseen löytyy luotettavia, kustannustehokkaita ja yllättävän tarkkoja menetelmiä ja laitteita, jotka ovat helppokäyttöisiä. Pakatussa tuotteessa olevan liuennon kaasun määrittämiseen löytyy yksinkertainen EBC-analyysiin pohjautuva mittausmenetelmä, joka mittaa vapautuvan hiilidioksidin muodostaman paineen muutosta. Tätä testiä kutsutaan volumetriseksi laajentumis testiksi (*volumetric expansion test*).

Liuennutta hiilidioksidia mitataan painemittarilla, jossa on korkin lävistäjä. Ensin kaulailma päästetään pullosta pois. Tämän jälkeen pulloa ravistetaan niin kauan kunnes paine ei enää kasva. Mitataan oluen lämpötila. Kun paine ja lämpötila ovat tiedossa, voidaan tasapainotilassa saavutettu hiilidioksidipitoisuus määrittää taulukosta. Sama testi voidaan toteuttaa myös varastotankista siihen soveltuvalla laitteella.

Varastotankissa karbonointi tapahtuu joko paineistamalla tankki pinnan päältä tai käyttämällä ns. karbonointikiveä. Karbonointikivi sijoitetaan lähelle tankin pohjaa. Karbonointikivi muodostaa pieniä kuplia, jotka liukenevat olueen nopeammin. Tankki vaatii kuitenkin 20 – 30 % sen tilavuudesta tyhjää, koska karbonointikiven aiheuttamat kuplat muodostavat vaahtoa tankin sisälle. Pinnan päältä paineistaminen on huomattavasti hitaampaa.

3.5 Liennut happi

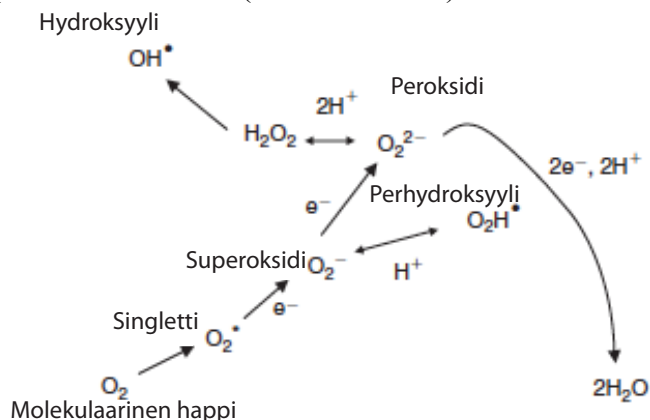
Hapettuminen on oluelle kohtalokasta. Se nopeuttaa oluen pilaantumista hapettamalla aromaattisia yhdisteitä, sameutta muodostavia fenoleja ja lisäämällä pilaajamikrobien riskiä. Molekulaarinen happi on toivottua vain jäädytetyn vierteen ilmaamisessa panimohiivan ravinteeksi. Muutoin happi on aina oluelle epäsuotuisaa. Karbonoinnin yhteydessä käsitellyt kaasun lainalaisuudet pätevät myös molekulaariselle hapelle, mutta hapettumista voi tapahtua oluessa myös kemiallisina reaktioina entsyymaattisesti. (Briggs ym 2004; Bamforth 2006, 2009; Fix 1999)

Molekulaarinen happi tarvitsee liuetakseen aina lähteen ja epäpuhtaan prosessikaasun tai vuotavan siirtolinjan. Toiseksi on huomioitava, että olut kuluttaa happea aktiivisesti reaktioihin. (Briggs ym. 2004; Fix 1999)

Hapettumista on panimossa kahdenlaista: kuumalla ja kylmällä puolella. Kuuma puoli tarkoittaa mäskäyksen ja keiton yhteydessä tapahtuvaa hapettumista. Kuumalla puolella hapettuminen tapahtuu sekunneissa, koska korkea lämpötila katalysoi reaktioita. Tämän takia kuumalla puolella tapahtuva hapettuminen tai hapen liukeneminen on tärkeää estää. Huolellisella prosessoinnilla ja suojakaasuja käyttämällä voidaan hapettuminen kuumalla puolella estää kokonaan. (Bamforth 2006; Fix 1999)

Pienpanimomittakaavassa suojakaasujen käyttöä kannattaa harkita tarkkaan, koska kaasuseoksen osapaineiden manipulointi voi olla hankalaa ja kallista. Huolellisella prosessoinnilla saavutetaan riittävä taso.

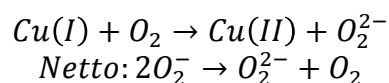
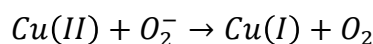
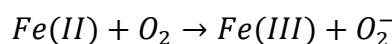
Kylmällä puolella hapettuminen hidastuu muodostaen laaturiskin. Liuenneen hapen pitoisuus on yksi oluen säilyvyyttä heikentäviä laatukriteeri. Valmiissa oluessa suurin osa hapettumisesta tapahtuu molekulaarisen hapen ja redox-reaktioiden avulla. Hapettumisen lopputuotteet aiheuttavat makuvirheitä ja antavat viitteitä oluen vanhenemisesta, kun oluen maku-profiili ns. yksinkertaistuu (Bamforth 2006, Fix 1999). Hapettumisen aiheuttamia makuprofiilin muutoksia voidaan arvioida lämpörasitustestillä, aivan kuten sameuden muodostumista. Lämpötila ja valo katalysoivat hapettumisreaktioita. (Bamforth 2009)



Kuva 5 Happiradikaalien muodostuminen (Bamforth 2009).

Molekulaarinen happi ei reagoi suoraan oluen yhdisteiden kanssa. Sen sijaan ongelmana ovat hapen vapaat radikaalit tai reaktiiviset happiradikaalit (ROS, *reactive oxygen species*), kuva 5. Ne ovat hapesta muodostuneita yhdisteitä, jotka sisältävät yhden tai useamman parittoman elektronin. Tästä syystä ne ovat hyvin reaktiivisia. Kemiallisesti parittomia elektroneja sisältävät yhdisteet ovat erittäin lyhytikäisiä, sillä energiataloudellisesti parittomat elektronit ovat epäsuosiollisia ja yhdiste pyrkii parilliseen elektronimäärään reagoimalla läheisyydessä olevien muiden yhdisteiden kanssa. Tyypillisiä reaktiivisia happiradikaaleja ovat muun muassa superoksidianioni, hydroksyyli-radikaali, erilaiset peroksidit ja alkoksiradikaalit.

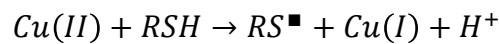
Toinen merkittävä radikaaleja muodostava ryhmä on metalli-ionit, kuten rauta ja kupari. Rauta on hyvin yleinen metalli panimon prosessivedessä samoin kuin kupari. Kupari on hyvin tärkeä ravinne hiivan elinvoimaisuuden ja metalli-homeostaasin takia (De Freitas 2003). Metallionit toimivat radikaalien tapaan, koska niillä on parittomia elektroneja. (Bamforth 2009)



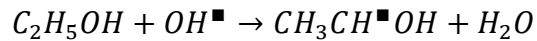
Kuten yllä on osoitettu kupari toimii katalyyttinä happiradikaalien muodostumisena ja tuottaa superoksideja. Kuparia ei kulu reaktiossa. Sinkki ei muodosta raudan ja kuparin tavoin radikaaleja, mutta magnesium voi osallistua redox-reaktioihin. (Bamforth 2009)

Koska metalli-ionit pystyvät muodostamaan vetyperoksidia ja sitä kautta muita happiradikaaleja, on kuumalla puolella huomioitava mallasproteiinien tioli-ryhmien (R-S-H) hapettumisen vaikutus siivilöintiin. Tioli-ryhmien hapettuessa proteiinit muodostavat rikkisiltojen avulla kompleksisia makromolekyylejä, jotka hidastavat siivilöintiä. Saman aikaisesti syntyy peroksiedeja (Muller 1997). Hapen liukeneminen veteen on huomattavasti pienempää kuin orgaanisiin liuoksiin. Sen vuoksi mäskäyksen yhteydessä on huomioitava hapen parempi liukoisuus esim. ohran ja ruvan paikallisesti konsentroituneisiin lipidi- ja proteiinifraktioihin. (Bamforth 2009)

Tioli-ryhmien hapettuessa siinä esiintyvä rikki muodostaa radikaaleja esim. kuparin katalysoimana.



Radikaalien muodostuminen on ketjureaktio, jossa radikaalien määrä lisääntyy – radikaalit muodostavat radikaaleja. Koska etanolia on oluessa suhteellisen merkittävä määrä, etanolin osallistuminen hapetusreaktioihin on kohtalokasta oluelle. Perhydroksyylin reagoiminen alkoholin kanssa muodostaa asteldehydiä. Korkeammat alkoholit muodostavat aldehydejä. Edelleen hapettuessaan ne muodostavat karboksyylihappoja. Etanolin hapettuessa syntyy hydroksietyyliradikaali, jota esiintyy eniten oluessa. (Bamforth 2009, Fix 1999)



Toinen merkittävä osa hapettumiselle alttiita yhdisteitä ovat iso-alfa-hapot, jotka muodostavat oluen katkeruuden. Niiden muutokset havaitaan yleensä makuprofiilissa ensin. Iso-alfa-hapot hapettuvat karbonyyliryhmästä, jonka seurauksena syntyy rasvahappoja. Rasvahapot muodostavat virhemakuja. Myös valo saa aikaan iso-alfa-hapoissa reaktioita, jotka ovat epäsuotuisia oluen maulle. Lopputuotteena syntyy mm. tioleita, jotka muodostavat hyvin tunnistettavissa olevia tunkkaisia, pahvimaisia makuvirheitä. (Bamforth 2009; Fix 1999)

Rasvahapot ovat oluen makuprofiilin ja säilyvyyden kannalta kohtalokkaita. Niitä tulee joko maltaasta tai hiivan metaboliasta. Rasvahapot osallistuvat redox-reaktioihin joko entsyymaattisesti tai hapettuvat radikaalien toimesta. Yleensä tuloksena on happoja, jotka muodostavat saippuamaisia virhemakuja esim. öljyhappoa (*oleic acid*). Melanoidiinit hapettuvat hie-man samalla tavalla. Tämä vaati tapahtuakseen paljon energiaa. Melanoidiinit pelkistyvät kuitenkin reagoidessaan etanolin kanssa, jolloin tuloksena muodostuu asetaldehydiä ja melanoidiinia. (Bamforth 2009; Fix 1999)

Mallas- ja humalaperäiset fenolit reagoivat myös samaan tapaan rasvahappojen kanssa. Yhdessä tyydyttymättömien rasvahappojen ja hapettuneiden melanoidiinien kanssa fenolit muodostavat monimutkaisen redox-reaktioketjun, jonka tuloksena on hapettuneita fenoleja, tyydyttyneitä ras-

vahappoja ja melanoidiineja. Hapettuneet fenolit polymeroituvat ja muodostavat muita laatuvirheitä kuten sameutta. (Fix 1999)

Monityydyttymättömien rasvahappojen hapettumien on suurin enstymaattisesti katalysoitu reaktio. Ohra muodostaa kahta lipoksygenaasia, jotka hapettavat linoli- ja linoleenihappoja. Hapettumisen tuloksena muodostuu happiradikaali hydroperoksidia, joka toimii lähtöaineena trans-2-nonenaalille. Trans-2-nonenaali on pelätyin makuvirheiden aiheuttaja panimossa. Sen makukynnys on 0,1 ppb, eikä tilannetta auta sekään, että vain hyppysellinen oluen kuluttajista eivät maista sitä. (Bamforth 2009; Fix 1999)

Rasvahappojen entsyymaattinen hapettuminen tapahtuu ennemmin mäsikin kiinteissä partikkeleissa kuin nesteessä. Lipoksynaasit toimivat mäskäyksen proteiinitauon aikana n. 52 °C lämpötilassa. Lipoksynaasit liittyvät ohran normaaliin sytolyyttiseen pilkkoutumiseen. Lipoksygenaasien toiminta hidastuu pH:n laskiessa alle 5. Mäskäyksen aikana mäsikin pH laskee ohran luontaisen entsyymin fytaasin toimesta. Se katalysoi hydrolyyttisiä reaktioita, minkä seurauksena mäsikin pH-arvo laskee. Fytaasi aktivoituu lipoksynaasien kanssa samassa lämpötilassa. Tästä syystä liian pitkä proteiini-tauko voi mahdollistaa lipoksygenaasien epäsuotuisan toiminnan. (Bamforth 2009)

Hapettuminen on monimutkainen reaktioketju, johon vaikuttaa monien eri osa-alueiden tapahtumat. Kokonaisuutena hapettumien on suurin yksittäinen oluen säilyvyyteen vaikuttava asia. Happea on kuitenkin kaikkialla, joten siltä välttyminen on hankalaa, mutta järjestelmällisellä ja kokonaisvaltaisella toiminnan arvioinnilla ja prosessidiagnostiikalla hapen liukeminen voidaan minimoida. Ensisijaisesti on minimoitava molekulaarisen hapen pitoisuus varastotankeissa, josta se siirtyy pakkaukseen.

Oluen valmistamisessa on kaksi kriittistä pistettä, jossa molekulaarisen hapen mittaaminen on asianmukaista: varastotankki ja pakkaus. Hapen mittaamiseen on olemassa monia eri menetelmiä kuten sähkökemiallisia, voltametrisiä ja polarograafisia, jotka kaikki perustuvat elektrodilla tehtäviin mittauksiin. Sähkökemialliset mittalaitteet voivat olla kalliita pienpanimolle. Tässäkin tapauksessa on olemassa spektrofotometrinen tai kolorimetrinen analyysimenetelmä.

Tärkeintä kuitenkin on näytteenotto. Pullotettu olut on suojassa kaasujen osapainevaihteluilta ja toimii siksi hyvänä näytteenä. Pullotettu olut on jo kuitenkin pakkauksessa, ja happipitoisuuksien ollessa yli sallitun voidaan enää vain todeta pullotetun erän olevan säilyvyydeltään heikompaa. Tästä syystä varasto- tai pullotustankissa olevan oluen asianmukainen näytteenotto on tärkeää. Näytteenotto on kuitenkin tehtävä siten, etteivät kaasujen osapaineiden vaihtelut vääristä mittaustulosta. Näytteenotto laitteita on monia, ja mitä analyysimenetelmää tahansa käytetään on näytteenotto-tapa suunniteltava sen mukaan.

3.6 Vaahdon muodostuminen ja ominaisuudet

Oluen vaahto on luultavasti yksi eniten kuluttajaan vetoavista laatutekijöistä. Vaahto luo ensimmäisen kosketuksen oluen aromeihin ja suutuntumaan. Vaahto muodostuu, kun kaasulla ylikyllästetty olut (hiilidioksidi tai typpi) pyrkii tasapainotilaan diffuusion avulla. Kaasun mukana oluesta purkautuu epästabiileja yhdisteitä, jotka muodostavat oluen tuoksun. (Delvaux, Deams, Vanmachelen, Neven & Derdelinckx 1995, 533 - 542)

Tiedostamattomasti kuluttaja tekee ensimmäiset arviot oluen laadusta vaahdosta, arvioimalla sen visuaalista vaikutelmaa, tuoksua, makua, tuoreutta ja raikkautta. Kun on aika maistaa olutta, vaahdon rakenne ja pysyvyys luovat vaikutelman suutuntumaan, joka hetkeä myöhemmin muuttuu vapautuvan hiilidioksidin aiheuttamaksi kivuksi. (Todd, Held & Guzinski 1996, 91 – 95)

Vaahto on kiehtonut niin kuluttajia kuin panimotieteilijöitä pitkään, mutta vaahdon laatu-omaisuudet ovat pysyneet samoina Bamforthin (1985) katselmuksesta asti:

- Pysyvyys/stabiilisuus
- Määrä
- Tarrautuminen (lasin sisäpintaan)
- Vaaleus
- Suutuntuma: 'kermaisuus' ja vahvuus

Myös kuluttajan näkemys lasissa olevasta oluesta voi muuttua pelkästään vaahdon perusteella. Bamforthin (2000; 2009) mukaan tähän vaikuttavat sekä kuluttajan sukupuoli että alueelliset tekijät. Jotkut kuluttajat jopa nauttivat oluensa suoraan pullosta tai tölkestä! Vaikka Bamforth (2009, 2) antaa ymmärtää, että naispuoliset kuluttajat eivät pidä minkäänlaisesta oluesta, koska liika vaahto pilaa huolellisen meikin, vaahdoton ja matalahiilihappoinen olut vaikuttaa väljähtyneeltä ja liiallinen vaahdon tarttuminen lasin sisäpintaan antaa vaikutelman huonosti pestystä tarjoilulasista. Kohtalaisen epä johdonmukaisen päätelmän pohjalta on oluen valmistajan pystyttävä vastaamaan kohderyhmän vaatimuksia ja odotuksia. On tiedettävä mitkä tekijät vaikuttavat vaahdon muodostumiseen tuotteessa ja kuinka vaahdon muodostumiseen ja pysyvyyteen voidaan vaikuttaa.

Reologisesti tarkasteltuna vaahto on kaasun ja nesteem emulsio, jossa on liukoinen tensidi, eli pinta-aktiivinen aine, joka mahdollistaa pysyvän vaahdon muodostumisen (Lewis & Bamforth 2007). Tästä voidaan johtaa yksi vaahdonmuodostumisen nyrkkisäännöistä: Vaahtoa ei muodostu mikäli olueen ei ole liennut kaasua ja tensidiä. Nestefaasin stabiilisuus on avainasemassa, kun elintarvikkeen laatutekijänä on stabiili ja pitkäaikainen vaahto.

Oluen vaahtoaminen ja sen muodostuminen on monimutkainen tapahtumien kulku, jonka ymmärtäminen vaatii ilmiöön liittyvien fysiikan lainalaisuuksien ja oluen kemiallisen rakenteen tuntemusta (Bamforth 2009, 3). Briggs ym. (2004) kiteytti ilmiön seuraavasti: ”Vaahto on kolloidinen

ysteemi, joka muodostuu neste- ja kaasufaasin välille, jonka tiheys vähennee, eli systeemi muuttuu kaasuksi ajan kuluessa.” Ronteltap ym. (1991), Bamforth (2004), Prins & Marle (1999) ja Prins (1988) ovat yksinkertaisesti vaahdonmuodostumiseen liittyvää fysiikkaa, ja ovat eritelleet ilmiön viiteen toisiinsa yhteydessä olevaan tapahtumaan:

1. Kuplan muodostuminen ja koko
2. Kuplan nouseminen ja *beading*; *creaming*; kuohunta

Nämä kaksi tapahtumaa mahdollistavat vaahdon muodostumisen. Mitä vaahdolle sen jälkeen tapahtuu, vaikuttaa olennaisesti sen pysyvyyteen. Seuraavien kolmen tapahtumaketjun viimeisen vaiheen aikana tapahtuvat fysikaaliset reaktiot ilmentävät Bamforthin (1985) laatuteesejä. Näihin tapahtumiin vaikuttavat olennaisesti oluen kemiallinen kompositio ja fysikaaliset ominaisuudet, sekä miten vaahdonmuodostumisen kaksi edellistä vaihetta ovat tapahtuneet ja millaiset edellytykset näille tapahtumille on.

3. Kuivuminen
4. Koalesenssi
5. Disproportionaatio

Vaikka olut onkin ylikyllästetty kaasulla, diffuusion dynaamisten ominaisuuksien vuoksi kaasu vapautuu vain nestefaasin pinnalta seoksen tavoitellessa tasapainotilaa. Tästä syystä kuplan muodostuminen nestefaasissa on välttämätöntä vaahdon muodostumiseksi. Kuplia ei muodostu spontaanisti, ellei ns. nukleaatiota tapahdu partikkelin tai tarjoilulasin pinnalla. (Prins & Marle, 1999)

Jotta tuloksena olisi nestefaasin pintaa kohti nouseva kupla, on kuplan muodostumisprosessissa tapahduttava kolme vaihetta:

- Kuplan nukleaatio
- Kuplan kasvaminen
- Kuplan irtoaminen

Se miten kuplat muodostuvat ja kuinka isoja kuplat ovat, vaikuttavat olennaisesti vaahdon pysyvyyteen ja laatuun. Mitä suurempi kokoero kuplilla on, ja mitä suurempia kuplat ovat, sitä epästabiilimpaa vaahto on. (Briggs ym. 2004, 703; Fisher ym. 1999, 37)

Kupla voi muodostua hajaantumalla tai kondensaation avulla. Pääasiallisena nyrkkisääntönä kuplan muodostumisessa voidaan sanoa, että heterogeenisesti muodostunut vaahto on epästabiilimpaa kuin homogeenisesti muodostunut. (Briggs ym. 2004, 703). Heterogeenisesti muodostuvien kuplien välillä vallitsee siis suurempi epäjärjestys, eli entropia. Kuplien kokonais- ja osapaine-erot jouduttavat vaahdon katoamista, koska kuplien väliset paine-erot pyrkivät tasautumaan diffuusion avulla. Mitä suurempi heterogeenisyys vallitsee vaahdossa, sitä epävakaampaa vaahto on.

Hajaantumalla muodostuva kupla syntyy, kun esim. vesilasissa olevaan pilliin puhaltaa. Kupla irtoaa pillin päästä, kun kaasuseoksen noste on suu-

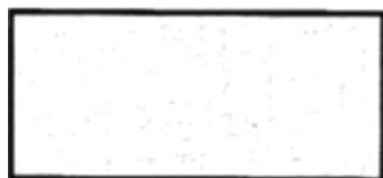
rempi kuin nesteen pintajännite. Tällaisista kuplista muodostuva vaahto olisi oluessa hyvin epästabiili, eli tuloksena olisi heterogeeninen vaahto, jonka kuplat olisivat hyvin suuria. (Briggs ym. 2004, 703; Fisher ym. 1999, 37)

Kondensoituminen, jossa muodostuu homogeenisiä kuplia, tapahtuu esimerkiksi, kun kylmän olutpullon avaa. Äkillinen tilavuuden laajeneminen laskee lämpötilaa paikallisesti jopa $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$:een, jolloin kaasu tiivistyy ja muodostaa kuplia. Tasapainotilan äkillinen muutos aiheuttaa hyvin intensiivisen diffuusion, jonka seurauksena voi olla jopa ylikuohunta. Normaaliolosuhteissa kupla muodostuu diffuusion aiheuttaman heterogeenisen kondensaation seurauksena, i. klassinen heterogeeninen nukleaatio. (Briggs ym. 2004, 703)

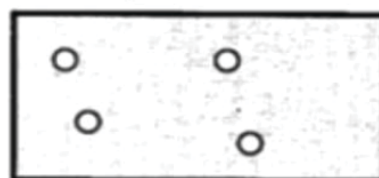
Kuten Prins & Marle (1999) totesivat, että kuplia ei muodostu ilman nukleaatiota, kaasulla ylikyllästetyssä oluessaakaan. Nukleaatio voi tapahtua neljällä eri tavalla: klassinen homogeeninen, klassinen heterogeeninen, semi-klassinen ja ei-klassinen nukleaatio (Jones, Evans & Galvin 1999).

Virvokkeissa ja oluessa kuplat muodostuvat heterogeenisen nukleaation seurauksena. Shokribousjeina ym. (2010) kategorioi oluessa tapahtuvan kuplan muodostumisen semi-klassiseksi ja ei-klassiseksi nukleaatioksi.

Täysin homogeeninen, i. klassinen homogeeninen nukleaatio (kuva 6), tarvitsee tapahtuakseen noin 100-kertaisen ilmanpaineen (Jones ym. 1999) – samppanja-korkki pitää maksimissaan noin 6 barin paineen. Tällainen nukleaatio on hyvin epätodennäköistä oluessa johtuen sen heterogeenisestä luonteesta. (Jones ym. 1999)



Ennen ylikyllästymistä



Ylikylläinen

Kuva 6 Klassinen homogeeninen nukleaatio; Klassisessa homogeenisessä nukleaatiossa kuplat syntyvät ilman partikkeleiden tai säiliön pinnan epätasaisuuksien apua, ja vaatii erittäin homogeenisen liuoksen tapahtuakseen. (Jones ym. 1999)

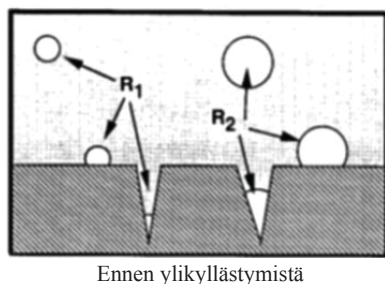
Klassinen heterogeeninen nukleaatio (kuva 7) tapahtuu bulkki-nesteessä partikkeleiden ja astian kulumien pinnoille syntyneihin kaviteetteihin. Kun systeemistä tehdään ylikyllästetty äkillisen paineen alentumisen avulla (olutpullon avaaminen), kaasu kondensoituu lasin kulumien ja partikkeleiden pinnoille (Jones ym. 1999).



Kuva 7 Klassinen heterogeeninen nukleatio (Jones ym. 1999)

Semi-klassisessa nukleaatiossa tapahtuu niin homo- kuin heterogeenistäkin nukleatiota. Erona klassiseen nukleatioon on, että olut on jo valmiiksi ylikyllästetty. Nesteessä olevien partikkeleiden ja astian pinnoille esitiivistyneet tilapäiset mikrokuplat mahdollistavat nukleation. Toinen ero klassiseen nukleatioon on mikrokuplien kasvaminen ylikyllästämisen seurauksena, eli paineen äkillisen laskun seurauksena tapahtunut kondensoituminen. (Jones ym. 1999)

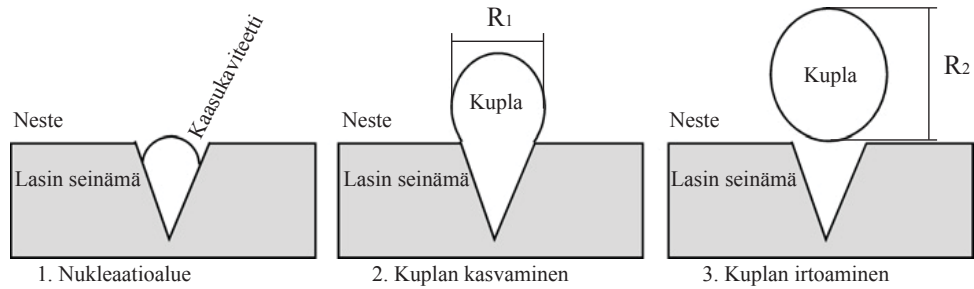
Mikrokuplat eivät kuitenkaan aiheuta vaahtoa vaan muodostavat ns. nukleatioalueita. Jotta mikrokuplasta muodostuisi vaahtoa muodostava kupla, l. kuplan noste kasvaisi suuremmaksi kuin pintajännite ja hydrostaattinen paine, on mikrokuplan ylitettävä nukleatioalueelle spesifi nukleatioenergiaraja, l. ns. kriittinen säde. Tämän jälkeen kupla irtoaa ja nousee oluen pinnalle. (Jones ym. 1999)



Kuva 8 Semi-klassinen ja ei-klassinen nukleatio: $R_1 < R_{\text{Kriittinen}} < R_2$ (Jones ym. 1999)

Ei-klassinen nukleation tapahtumiseen ei tarvita nukleatioenergiarajan ylittämistä. Nukleatio tapahtuu esitiivistetyissä kuplissa, joiden koko on suurempi kuin kriittinen säde. Tällainen kupla muodostaa jatkuvan nukleation. (Jones ym. 1999) Ei-klassinen nukleatio voi olla luonnollista tai keinotekoisista.

Liger-Belair ym. (2008) ovat tehneet perusteellisen selvityksen ei-klassillisen luonnollisesta ja keinotekoisesta nukleatiosta. Tarjoilulaseja voidaan pintakäsitellä, jotta kuplan muodostumisesta saadaan mahdollisimman houkutteleva. Tällainen käsittely mahdollistaa keinotekoisien ei-klassisen nukleation. Luonnollisessa ei-klassisessa nukleaatiossa nukleatioalueet ovat sijoittuneet polysakkaridien esimuodostuneisiin kaasukaviteetteihin, jotka jäävät tarjoilulasin pinnalle elektrostaattisten voimien takia. Myös tarjoilulasin huuhteluun käytettävän veden jäämät haihtuessaan saostavat tartraatti-kiteitä lasin pinnalle, joiden sisälle jää kaasukaviteetteja.



Kuva 9 Kuplan muodostuminen (Jones ym. 1999); $R_1 < R_{\text{kriittinen}} < R_2$

Miten tahansa nukleaatio saa alkunsa, se kuluttaa liennuttua kaasua nesteestä. Nukleaatioalueilta muodostuvien kuplien määrä ja taajuus pienenee mitä pienemmäksi liunneen kaasun konsentraatio laskee, kunnes tasapaino on saavutettu. (Liger-Belair ym. 2008)

Nukleaatio ei vielä sinänsä synnytä kuplaa, vaan se mahdollistaa kuplan muodostumisen. Kun nukleaatio on tapahtunut, kupla alkaa kasvamaan. Mikäli nukleaatioalueelle syntyvän kuplan koko on pienempi kuin kriittinen säde, kupla katoaa. Kun paikalliset energiavaihtelut pysyvät riittävän korkeina riittävän pitkän ajan, nukleaatioprosessi mahdollistaa kuplan kasvamisen. Kun kupla ylittää kriittisen säteen, se ylittää myös tarvittavan nukleaatioenergiarajan. (Jones ym. 1999)

Jones ym. (1999) mukaan kuplan irtoamiseen ja nousemiseen vaikuttavat myös neste- ja kaasufaasin väliset voimavirtaukset. Tätä hän kuvaa yhtälöllä

$$F_d + F_s = F_l + F_p + F_b$$

Jossa

F_d = Kasvavan kuplan aiheuttama suhteellinen virtausnopeus nestefaasissa

F_s = Tensidin aiheuttama pintajännite ja hydrostaattinen paine

F_l = Inertiavoimat (Kupla)

F_p = Nukleaatioalueen paine

F_b = Kuplan aiheuttama noste

Yhtälön oikea puoli summaa voimat, jotka pyrkivät nostamaan kuplan. Kun yhtälön oikean puoleiset voimat ovat suuremmat kuin vasemman, kupla ylittää tarvittavan nukleaatioenergiarajan (Jones ym. 1999). Koska homogeeninen ja pienikuplainen vaahto on stabiilimpaa, optimaalinen vaahto saavutetaan, kun nukleaatioalue ja tarvittava –energiaraja ovat mahdollisimman pieniä.

Tensidi on kaasun ohella yksi tärkeimmistä tekijöistä, kun tavoitteena on stabiili ja pitkäaikainen vaahto. Tensidi-molekyylin reaalikoko ja paino vaikuttavat sen muodostaman vaahton stabiiliteettiin (Fruhner ym. 1999): mitä suurempi molekulaarinen paino tensidillä on, sitä epästabiilimman vaahton se muodostaa (Murray 2007).

Titze ym. (2010) yhdisti tensidin potentiaalisen pinta-aktiivisuuden kahden eri ominaisuuteen: suhteelliseen kokoon ja sähkövaraukseen. Tässä yhteydessä suhteellinen koko on partikkelin pinta-alan ja tilavuuden suhde eli

$$x = \frac{o}{V} = \frac{4\pi r^2}{3/4\pi r^3} = \frac{3}{r}$$

Jossa

o = Molekulaarinen pinta-ala

V = Molekulaarinen tilavuus

Kun r on pieni, suhteellinen koko x on suuri, eli tensidin potentiaalinen pinta-aktiivisuus on korkea.

Kun molekyylin reaalikoko kasvaa, sen uloimpien atomien, eli rajapinnan, määrä vähenee prosentuaalisesti. Pienellä molekyylillä on vastaavasti suhteessa moninkertainen määrä uloimpia atomeja, jotka pystyvät reagoimaan molekyylin rajapinnalla muiden molekyylien kanssa. Molekyylin suhteellinen koko on siis suoraan yhteydessä sen potentiaaliseen pinta-aktiivisuuteen ja sähkövaraukseen. (Titze ym. 2010)

Proteiinit ovat hyvä esimerkki tensidistä, jonka ominaisuudet stabiilin vaahdon muodostumiseen ovat lähes optimaaliset:

- Ne adsorboituvat vahvasti kaasu- ja nestefaasin rajapinnoille hydrofobisten ja –fiilisten ominaisuuksien vuoksi.
- Ne parantavat molekyyilirakenteen sisäistä stabiilisuutta ja elektrostaattista vakautta
- Niiden muodostamat proteiinifilmit rajapinnoilla pysyvät hyvin koossa (struktuurallinen koheesio)

(Murray 2007)

Fruhner ym. (1999) listasi kaksi muuta tärkeää tekijää, jotka vaikuttavat vaahdon pysyvyyteen: vaahtoavan nesteen fysikaaliskemialliset ominaisuudet ja vaahdon vuorovaikutus ympäröivän, esim. astian pintamateriaalin kanssa

Proteiinit ovat tärkein positiivisesti vaahdon stabiilisuuteen vaikuttava yksittäinen pinta-aktiivinen orgaaninen aineryhmä. Vaahtoon vaikuttavia proteiineja on kuitenkin erilaisia, sekä niiden ominaisuudet saattavat muuttua rakenteellisten muutosten seurauksena, esim. denaturoituminen.

LTP1 (Lipid Transfer Protein) on maltaan aleuronissa esiintyvä proteiini, joka on merkittävä oluen vaahdon muodostumiselle (Bamforth, 2006; Sorensen ym. 1993). Se on osa jyvän immuunijärjestelmää, joka suojelee sitä tuholaisilta ja patogeeneiltä jyvän alkuvaiheessa ja idätyksen aikana. Tästä syystä ohra, joka kasvaa kosteammassa olosuhteissa sisältää suuremman määrän LTP1:tä. (Bamforth 2009)

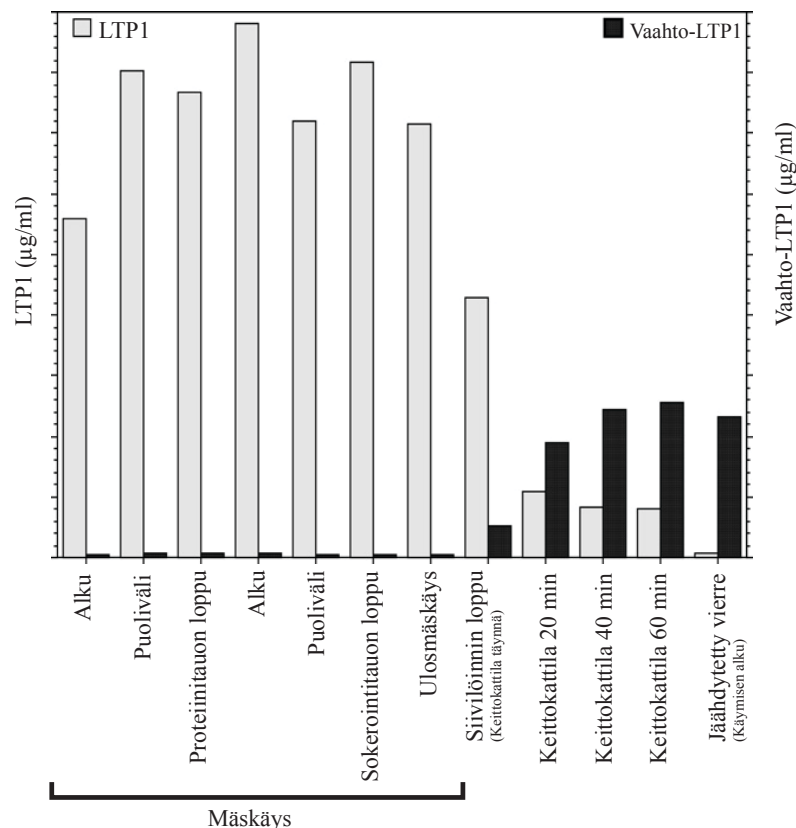
LTP1 uuttuu mäsäyksen yhteydessä vierteeseen. Vierteen keiton yhteydessä LTP1:n konformaatio denaturoituu peruuttamattomasti. Denaturointi vähentää merkittävästi LTP1:n luonnollista lipidejä muuttavaa vaikutusta. Denaturoituneen LTP1:n ominaisuudet vaahdon muodostumisen kannalta ovat paremmat kuin alkuperäisen LTP1:n (Bech ym. 1995; Lusk ym. 2001a,b; Sorensen ym. 1993). Van Nierop ym. (2004) tutkivat denaturoituneen LTP1:n ominaisuuksia ja päättelivät myös sen vapaan rasvahappo-

jen (FFA, *free fatty acids*) sitomiskyvyn heikentyvän merkittävästi. Toisaalta liiallinen LTP1:n denaturoiminen vierteen keiton aikana voi olla epäsuotuisaa oluen vaahton pysyvyydelle, koska alkuperäinen LTP1 sitoo vaahtoa destabiloivia vapaita rasvahappoja. Näin ollen se parantaa muiden tensidien potentiaalista suotuisia vaikutuksia vaahton pysyvyyteen.

Taulukko 4 Van Nierop ym. 2004 Kolmen eri panimon vertailu: vierteen keitto ja vaahton laatu, ja vapaiden rasvahappojen määrä.

Brewery	A	B	C
Paikka	Rannikolla	Sisämaassa	Rannikolla
Korkeus	200 m	1600 m	150 m
Kiuhumispiste	102 °C	96 °C	102 °C
LTP1 (μ g/ml)	2 - 3	17 - 35	2 - 3
FFA (mg/ml)	2,84	1,12	0,70
Vaahto	Alhainen	Runsas	Runsas

Van Nierop ym. (2004, taulukko 4) tilastoi karkean, mutta hyvin havainnollistavan esimerkin LTP1 ja rasvahappojen suhteesta, sen vaikutuksesta oluen vaahtoamiseen ja sijainnin vaikutuksesta kolmen eri panimon fysiikaalisten ominaisuuksien vaikutuksesta LTP1 ja FFA pitoisuuksiin. Mitä enemmän natiivia LTP1 on jäljellä oluessa, sitä suurempi puskurointikyky sillä on vaahto destabiloivia rasvahappoja vastaan.



Kuva 10 LTP1- proteiinipitoisuuden kehittyminen vierteen valmistuksen aikana. Vaahto-LTP1 = denaturoitunut LTP1, joka toimii tensidinä. (Lusk ym. 2001a,b)

Sorensen ym. (1993) mukaan LTP1:n ominaisuudet ovat paremmat vaahdon muodostumisen kannalta kuin vaahdon stabiilisuuden, kuva 10. LTP1:n reagoiessa muiden vaahdon kannalta otollisten proteiinien kuten hordeiinien tai proteiini Z kanssa, sen vaahdonstabilointiominaisuudet parantuvat.

Hordeiniitit ovat oluen vaahdon kannalta hyvin merkittäviä proteiineja. Suurin osa ohran jyvässä olevasta proteiinista ovat hordeiinia, joka toimii jyvän proteiinivarastona. Hordeiniitit kuuluvat prolamiini-ryhmään, ja tästä syystä ne vaativat proteolyyttisen hydrolyysin liuetakseen veteen. Vaahdon muodostuksen lisäksi hordeiniitit ovat hyvin aktiivisia kylmäsämeuden muodostamisessa, koska ne sisältävät paljon proliinia ja glutamiinia. (Sorensen ym. 1993, Bamforth 2006, Shokribousjeina 2011)

Hordeiinien merkitys stabiilin vaahdon muodostumisessa on osittain epäselvä. Hordeiini-ryhmien monipuolisuus ja proteolyyttisten rektioiden lopputuotteet mahdollistavat suuren määrän vaahdon kannalta suotuisia proteiineja. Samalla muodostuu myös sameuden kannalta potentiaalisesti epäsuotuisia hordeiini-johdannaisia proteiineja. Osa tutkimuksista on onnistunut tunnistamaan potentiaalisesti hyödyllisiä hordeiini-johdannaisia proteiineja. (Bamforth ym. 2009)

Proteiini Z on ensimmäinen proteiini, jonka on todettu parantavan vaahdon stabiiliteettiä reagoimalla muiden proteiinien kanssa kuten LTP1:n kanssa (Kaersgaard & Hejgaard, 1979). Proteiini Z on albumiini-johdannainen proteiini, joka on peräisin maltaasta. Maltaan koko proteiinista se vastaa noin 2 %. Proteiini Z on kahden eri isotyyppin yhteismäärä: Z4 ja Z7. Z4 vastaa n. 80 % proteiini Z:n kokonaispitoisuudesta. Proteiini Z:lla on ylivoimaisesti vahvin tensidi (Douma ym. 1997).

Vaahtoa muodostavien proteiinien, kuten Vaahto-LTP1 ja proteiini Z, hydrofobisuus parantaa vaahdon pysyvyyttä. Myös muiden polypeptidien ominaisuuksiin kuuluu vahva hydrofobisuus, mutta kaikissa tapauksissa se ei ole oluen kokonaislaadun kannalta suotuisaa. Hydrofobiset proteiinit aiheuttavat ylikuohuntaa. *Ylikuohumisella (Gushing)* tarkoitetaan avatun pullon hallitsematonta kuohuntaa ilman sekoitusta tai muuta nukleaatioita nopeuttavaa häirintää. Koska hydrofobiset proteiinit ovat voimakkaita tensidejä, ne kasaavat nopeasti nukleaatioalueille suuren massan kaasua, jolloin kuplan muodostuminen on taukoamatonta. Myös vaahdon muodostumisen ja pysyvyyden kannalta ominaisuudet ovat yliveraisia, jolloin vaahtoa hajottavat fysikaaliset ilmiöt tapahtuvat hitaammin. (Sarlin ym. 2007, Bamforth ym. 2009)

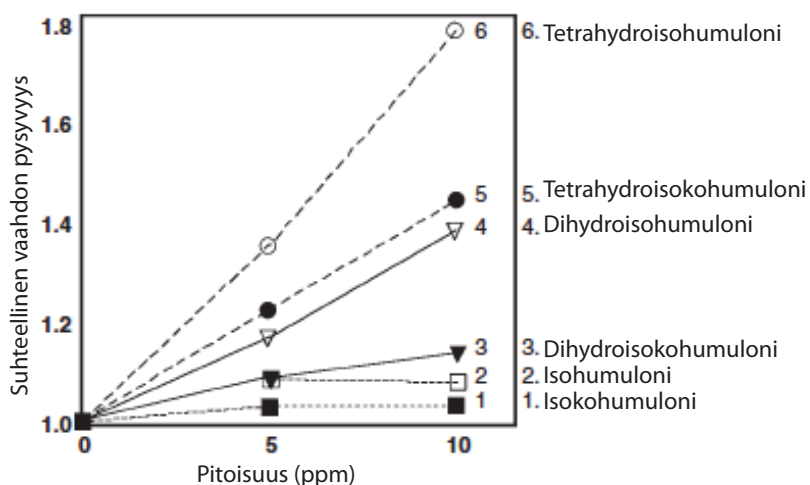
Primaarinen ylikuohunta johtuu ohran mikrobiflooraan kuuluvien sienien (*Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Nigrospora* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Stemphylium* sp.) erittämistä hydrofobisista molekyyleistä, kuten deoksivalenoli, jotka päätyvät olueen. Mallastusprosessin aikana hydrofobisten molekyylien määrä kasvaa jopa kymmenkertaiseksi liottamisen ja idättämisen aikana. Maltaan hydrofobisten molekyylien kokonaismäärästä noin 10 % säilyy olueen. Ylikuohunta on mahdollista oluessa, jonka hyd-

rofobisten molekyylien pitoisuus on vähintään 1 mg/litra, riippuen molekyylijä erittäneestä sienestä. (Bamforth ym. 2009; Sarlin ym. 2005, 2007)

Sekundaarinen ylikuohunta voi olla monen eri tekijän aiheuttama. Näitä tekijöitä ovat metalli-ionit, liian suuri liuennon kaasun määrä (esim. pullokäytetyissä oluissa, tai panimohiivan tai diastaattisten pilaajaorganismien aiheuttama käyminen pakkauksessa, tai muu prosessihäiriö painelinjassa), kalsiumoksalatit, sameus, isomeroituneet humulonit tai humalauutteet, ulkoiset tensidit (pesuaine) tai naarmuuntunut pakkaus. (Bamforth ym. 2009; Sarlin ym. 2005)

Oluen vaahdon kannalta tärkeitä aineita ovat myös humalan iso-alfa-hapot, jotka reagoivat hydrofobisten polypeptidien kanssa muodostaen vahvan pinnan vaahdon kuplille. Kaksiarvoiset kationit edistävät iso-alfahappojen ja peptidien välisiä reaktioita. Alfa-happojen isomeerit muodostavat olueen katkeruutta. Isomeroituminen tapahtuu vierteen keiton aikana, jolloin vierrettä keitetään voimakkaasti. (Bamforth 2006)

Vaahdon kannalta alfa-happojen transisomeerit isohumuloni ja isoadhumuloni ovat suotuisampia, koska ne konsentroituvat vaahtoon huomattavasti suurempina pitoisuuksina kuin cis-isomeroituneet alfa-hapot, kuva 11. Isomeerien hydrofobisuus on pienempi kuin alfa-happojen, mikä edistää vety- ja ioni-dipolisidosten muodostumista iso-alfahappojen ja polypeptidien välille. Kun iso-alfahappojen pitoisuus kasvaa, vaahdon stabiiliteetti ja tarrautuminen paranee. (Bamforth 2006; Roberts 1976)



Kuva 11 Iso-alfa-happojen pitoisuuden vaikutus vaahdon suhteelliseen pysyvyyteen. (Smith 1998)

Suurin osa vaahdon muodostumiseen ja pysyvyyteen vaikuttavista aineista ovat mallasperäisiä. Proteiinien lisäksi hiilihydraatit kuten oligosakkaridit, melanoidiinit ja ei-tärkkelyspohjaiset hiilihydraatit esim. beta-glukaani ja arabinoksyalaani parantavat vaahdon pysyvyyttä nostamalla oluen viskositeettiä, mikä hidastaa vaahdon kuivumista. (Lusk 1995)

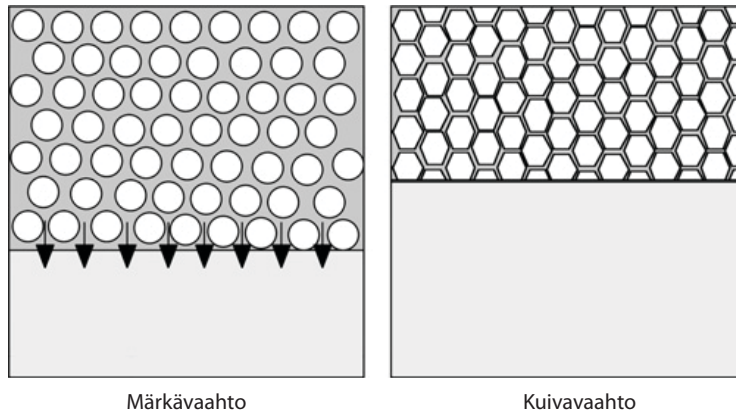
Kestävinkin vaahto kärsii kuitenkin fysikaalisista vaahtoa rikkovista ta-
pahtumista, joita edesauttavat myös vaahton kannalta epäsuotuisat aineet
ja prosessihäiriöt. Epäsuotuisista aineista suurin osa on lipideitä, rasva-
happoja, jotka häiritsevät hydrofobisten polypeptidien ja iso-alfa-happojen
välisiä reaktioita. Vaikka rasvahapot ovatkin hydrofobisia, niiden mole-
kyylikoko on niin pieni, että ne aiheuttavat koalesenssia. Pesuainejäämät
toimivat lipidien tavoin. (Roberts 1976)

Muiden epäsuotuisten aineiden vaikutukset ovat hyvin samankaltaisia li-
pidien kanssa. Aminohapot, kuten arginiini, histidiini ja lysiini, ja suuret
etanolitaisuudet heikentävät vaahton stabiilisuutta. (Bamforth 2006)

Prosessihäiriöillä voi olla kohtalokkaita seurauksia vaahton pysyvyyteen.
Proteinaasi A:n pitoisuudet kasvavat oluessa, jota on rasitettu voimakkaas-
ti esim. korkealla osmoottisella paine-erolla (vahvavierrettekniikka), erot-
tamalla hiiva separoimalla, liian nopea jäähdyttäminen pääkäymisen jäl-
keen tai hiivasuspension alhainen elävyys. Myös korkea pH-arvo voi inhi-
boida vaahtoa stabiilivia reaktioita. (Bamforth 2006)

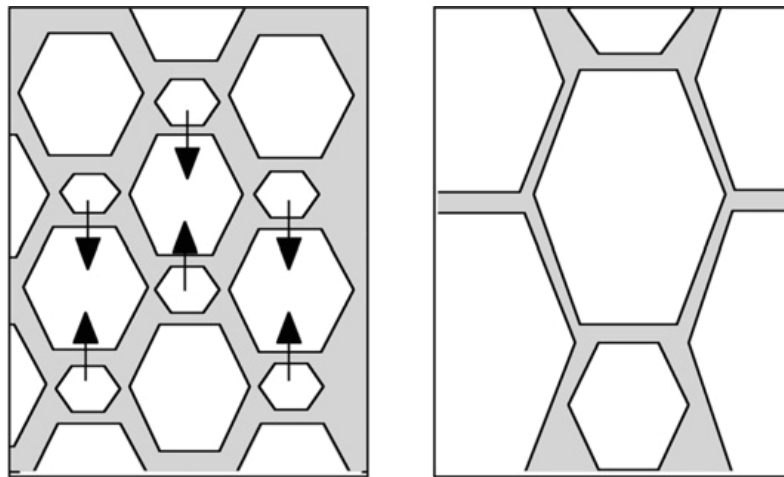
Mäskääminen on vaahton stabiilisuuden kannalta kriittisin prosessivaihe.
Pitkäaikainen mäskääminen alhaisissa lämpötiloissa (proteiinitauko, alle
55 °C) hajottaa polypeptidejä liikaa, jolloin molekyylikooltaan isojen po-
lypeptidien määrä pienenee. Alhaiset mäskäyslämpötilat mahdollistavat
myös lipoksygenaasin toiminnan, mikä hapettaa vapaita rasvahappoja hyd-
roperoksidiksi, jotka ovat niin vaahton pysyvyyden kuin oluen säilyvyy-
den kannalta epäsuotuisia. Proteiinitauon nopea ylittäminen tai poisjättä-
minen säilyttää enemmän vaahton kannalta suotuisia pitkäketjuisia hydro-
fobisia polypeptidejä. Yli 65 °C mäskäyslämpötilat kuitenkin inhiboivat
amylaasien toimintaa, mikä vaikuttaa uutesaantoon ja käymisasteeseen.
(Bamforth 2006)

Vaahton stabiilisuuteen vaikuttavien aineiden ja vaahton muodostumisen
yhteisvaikutus estää vaahton hajoamista. Paraskin vaahto kuitenkin hajoaa
fysikaalisten vaikutusten takia. Kuivuminen, koalesenssi ja disproportio-
naatio ovat vaahtoa hajottavia ilmiöitä (Shokribousjein 2011). Vaahto on
aluksi ns. märkää, koska nouseva kupla kerää ympärilleen ylimäärän olut-
ta. Kun vaahto on pinnalla, painovoima valuttaa ylimääräisen oluen takai-
sin nestefaasiin, mikä heikentää kuplan rakennetta. Kuivumista estävät
voimat ovat oluen viskositeetti, tensidit ja kapillaarivoimat, kuva 12 (Ron-
teltap 1991).



Kuva 12 Kuvaus vaahdon kuivumisesta. (Bamforth 2009)

Koalesenssi ja dispropotionaatio ovat kuplien välistä diffuusiota, kuva 13. Koska kuplien välillä olevat paine- ja kokoerot pyrkivät tasaantumaan, homogeeninen vahto on stabiilimpaa kuin isokokoinen vahto. Dispropotionaatiossa pienemmät kuplat integroituvat isompiin kupliin paineerojen tasaamiseksi. Kun kuplat kasvavat, vaahdosta tulee epästabiilimpi ja kuplat hajoavat. (Ronteltap 1991)



Kuva 13 Dispropotionaatio (Bamforth 2009)

Koalesenssiä esiintyy pienten kuplien välillä, joiden osapaine on sama. Kuplat kiinnittyvät toisiinsa ja muodostavat suurempia kuplia, mikä hajottaa kuplat. Koalesenssi tapahtuu joko ns. hydrofobisen partikkelin tai partikkelin venymisen avulla. Lipidit edistävät koalesenssin tapahtumista. (Ronteltap 1991)

Laajemmin katsottuna vaahdon hajoaminen johtuu diffuusiosta, joka tasaa oluen ja ilman paine-eroa. Ajan myötä vahto häviää kokonaan. Tärkeintä on, ettei vahto häviä ennen aikaansa. Tästä on oluen valmistajan pidettävä huolta. Vaahdon pysyvyyttä voi mitata monella eri tavalla sekä potentiaalisia vaahdon muodostumiseen liittyviä aineryhmiä voi analysoida. Pienpanimomittakaavassa tarkka kemiallinen analysointi on liioittelua. Jopa erien välinen vertailu on aivan liian työlästä, aikaa vievää eikä analysointituloksien erot välttämättä ilmene havaittavina eroina. Pienpanimomitta-

kaavassa pelkällä huolellisella prosessoinnilla ja raaka-aine valinnoilla saavutetaan jo hyvä vaahdon stabiliteetti.

Mitä vaahdosta kannattaa analysoida? Suurimman osan Bamforthin laatu-teeseistä voi analysoida organoleptisesti kaatamalla olutta lasiin. Oluen kaataminen samalla tavalla illan aikana useasti on haasteellista eikä siten kovin luotettavaa analytiikkaa. Stabiilisuus, määrä ja tarrautumien voidaan analysoida kuitenkin kohtalaisen helposti. Rudinin testi on hyvin yksinkertainen ja tuottaa hyvän käsityksen vaahdon stabiliteetistä. Toinen yksinkertainen testi on vaahdon tarrautumista mallintava Lacing index-testi.

Vaahtoa tarkastellessa on hyvä ymmärtää mitkä tekijät vaikuttavat sen muodostumiseen ja pysyvyyteen. Vaahdon pysyvyyttä analyysoivien menetelmien mittaustulokset voivat olla harhaan johtavia, jos käsitys eri tekijöiden vaikutuksista ovat epäselvät. Esimerkiksi vaahdosta saadaan pysyvä riittävällä hiilidioksidipitoisuudella ja alhaisella tarjoilu lämpötilalla, vaikka oluen vaahdon pysyvyyteen vaikuttavat ominaisuudet olisivatkin huonot. Edellisessä kappaleessa mainitut vaahtoa analyysoivat menetelmät käsittelevät vain osittain vaahdon ominaisuuksia. Siksi on hyvä tuntee kokonaisvaltaisesti ne tekijät, jotka vaikuttavat vaahdon ominaisuuksiin.

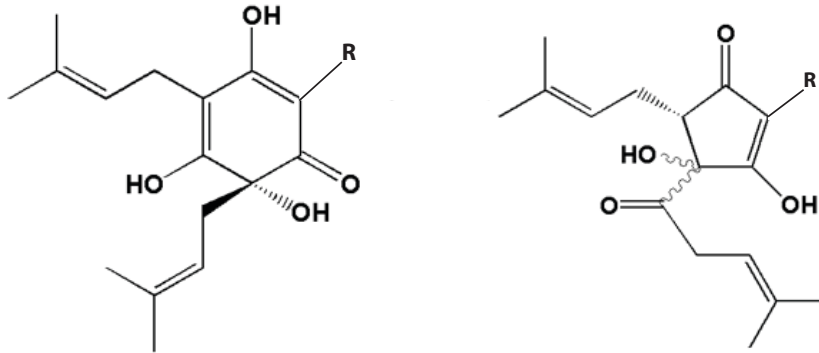
Kuinka usein vaahtoa kannattaa analysoida? Mikäli oluen valmistaja tuntee prosessinsa hyvin, pystyy minimoimaan mahdolliset prosessihäiriöt ja havaitsemaan mahdolliset muutokset prosessissa erien välillä tehokkaasti, analysointi voi olla tarpeellista vain tarvittaessa. Yksi hyvä nyrkkisääntö voisi olla, analysointi mallastetun ohran satokauden vaihtuessa, kun raaka-aineen koostumus muuttuu.

3.7 Katkeruus

Oluen katkeruus on humalan alfa-happojen isomeerien luoma suutuntuma. Oluen katkeruus on oluen valmistajalle hyvin tärkeä, koska se tasapainottaa maltaan luomaa makeutta ja tekee näin oluesta juotavamman. Humala luo myös yrttimäisiä miellyttäviä aromeja ja flavoreita, jotka luovat oluesta houkuttelevamman. (Daniels 2000)

Humalan katkeruuden aiheuttavat hartsit, jotka jaetaan alfa- ja beta-happoihin. Toinen tärkeä ainesosa oluen valmistajalle ovat humalan aromaattiset öljyt. Katkeruuden osalta hartsit ovat tärkeämpiä kuin öljyt. Iso-alfa-happojen määrä ilmoitetaan oluessa BU-yksikköinä (*Bitterness Units*). (Bamforth 2006)

Alfa-hapot, eli humulonit, ovat pääasiallisia katkeruutta muodostavia yhdisteitä kuten humuloni, kohumuloni ja adhumuloni. Alfa-happojen kannalta tärkeää on niiden liukoisuus olueen. Alfa-happojen liukoisuus veteen on huono, mutta isomeroituneena ne liukenevat paremmin. Isomeroituminen tapahtuu vierteen keiton yhteydessä. Tästä syystä on tärkeää, että keittäminen on voimakasta ja kestoaltaan pitkä, jotta mahdollisimman paljon alfa-happoja isomerisoituu. (Bamforth 2007; Markkula 2007)



Kuva 14 Vasemmalla alfa-happo. R on sivuketju, johon kiinnittyy isovaleryyli (humuloni), isobutyryyli (kohumuloni) tai 2-metyylibutyryyli (adhumuloni). Oikealla isomeroitunut alfa-happo. (Bamforth 2006)

Katkerohumalaa lisättäessä on otettava huomioon, että noin 50 % alfa-hapoista isomeroituu ja vain noin 25 % katkeropotentiaalista päätyy valmiiseen olueen. Iso-alfa-happojen katkeruuteen vaikuttaa myös niiden *trans*- ja *cis*-isomeerien erot. (Bamforth 2006). Alfa-happoja on humalan kuivapainosta 2 – 15 %. Mitä suurempi alfa-happopitoisuus, sitä vähemmän katkerohumalaa on lisättävä halutun katkeruuden saamiseksi. (Markkula 2007)

Beta-hapot, eli lupulonit, eivät normaalisti vaikuta katkeruuteen, mutta osallistuvat humalassa tapahtuviin hapettumisreaktioihin muodostaen tunkkaista, vanhan humalan tuoksua. (Bamforth 2006; Markkula 2007)

Humalan analysointi yleensä on hyvin ylimalkaista. Aromaattisia öljyjä on yli 300 yhdistettä, eikä niiden antamaa aromiprofiilia ole pystytty yhdistämään oluessa esiintyviin aromeihin (Bamforth 2006). Pienpanimossa nenä on paras humalan laadun arvioimisessa. Liika kosteus, valo ja lämpö pilaavat humalan, eikä sen käyttö oluen valmistamisessa ole enää suotavaa.

Panimolaitteistolle pyritään määrittämään saantoarvoja, jotta raaka-aineiden käyttöä voidaan tehostaa. Koska alfa-happojen isomeroituminen on tehotonta, on suositeltavaa mitata iso-alfa-happopitoisuus kohtuullisen ajan välein. Iso-alfa-happopitoisuus voidaan analysoida spektrofotometrisesti.

3.8 pH

pH:n merkitys oluen valmistamisessa on valtava. Se vaikuttaa moneen eri osa-alueeseen ja sitä kautta antaa kuvan prosessinkulusta ja sen vaiheista.

- Mäskäys: amylaasien optimointi 5,2 – 5,5; vierteenerotuksen aikana pH:n nousu yli 6 mahdollistaa ohran kuoresta liukenevien makuvirheiden liukenemisen.
- Vierteen keiton lopussa pH:n pitäisi olla 5,0 – 5,3; valmiin oluen pH pysyy optimaalisella alueella käymisen aikana.
- Vierteen iso-alfa-happopitoisuus laskee pH:n laskiessa.

- Käymisen alussa pH laskee hiivan tuottamien orgaanisten yhdisteiden takia. Liian hidas pH:n lasku kertoo huonokuntoisesta tai elinvoimattomasta hiivasta.
- Käymisen lopussa autolyysi nostaa pH:ta 0,1 – 0,2. Liian suuri pH:n nousu kertoo liian suuresta hiivan stressistä.
- Oluen liian korkea pH mahdollistaa mikrobiologiset laaturiskit, liian matala pH tuo makuun happamuutta.

Valmiin oluen pH tulisi olla 4,2 – 4,6. Poikkeamat indikoivat prosessihäiriöistä. (Markkula 2007)

Parasta pH:n mittaamisessa ja muodostumiseen liittyvässä teoriassa on sen hyödyllisyys ja kustannustehokkuus. pH-elektrodit ovat tarkkoja, kustannustehokkaita, luotettavia ja pienpanimo-olosuhteisiin soveltuvia eivätkä vaadi suurempaa tietotaitoa. Tärkeintä pH:n mittaamisessa on kuitenkin tietää mitä se kertoo, mistä ja kuinka usein se on mitattava.

4 MIKROBIOLOGINEN LAATU

4.1 Haittamikrobit ja niiden ryhmittely merkityksen mukaan

Oluessa on monia eri säilyvyyteen vaikuttavia tekijöitä, kuten

- humalan yhdisteitä → iso-alfa-hapot
- alkoholi
- hiilidioksidi → anaerobiset olosuhteet
- rikkioksidit
- ravinnon ja hapen puute
- matala pH

Myös oluen valmistamisessa vallitsevat olosuhteet ovat varsin epäsuotuisia mikrobikontaminanttien kasvuun, ja siksi niiden määrä oluessa on yleensä pieni. Mahdollisia kontaminanteja ovat villi-hiivat ja bakteerit. Yhteistä kaikille mikrobiologisille kontaminanteille on niiden vierasperäisyys ja laatuvaikutukset lopputuotteeseen ja prosessiin panimossa. Kaikki kontaminantit eivät kuitenkaan ole keskenään yhtä yleisiä tai yhtä haitallisia tuotteen laadulle. Oluen valmistusprosesseissa esiintyvät organismit on lajiteltu viiteen ryhmään, sen mukaan kuinka potentiaalisia pilaajia ne ovat. (Back, W. 1994.)

1. Absoluuttiset pilaajaorganismit
2. Potentiaaliset pilaajaorganismit
3. Välilliset pilaajaorganismit
4. Indikaattoriorganismit
5. Latentit organismit

Absoluuttiset pilaajaorganismit kestävät oluen ja valmistusprosessin olosuhteita. Tähän ryhmään kuuluvat organismit kasvavat oluessa ilman pitkää sopeutumisvaihetta ja muodostavat virhemakuja ja sameutta. Tähän ryhmään kuuluu pääasiassa heterofermentatiivisia maitohappobakteereita ja *Saccharomyces*-suvun villi-hiivoja. (Back, W. 1994.)

Potentiaaliset pilaajaorganismit eivät kasva normaalisti oluessa ja valmistusprosessissa vallitsevissa olosuhteissa. Tämän ryhmän organismit pääsevät kasvamaan, kun olosuhteet muuttuvat niille otollisemmiksi (esim. prosessihäiriöt, korkea pH, matala iso-alfa-happopitoisuus, matala käymisaste, matala alkoholipitoisuus, korkea liunneen hapen pitoisuus, tai ne pääsevät adaptoitumaan olosuhteisiin pitkän ajan kuluessa). Ryhmä sisältää mm. maitohappobakteereita ja koliformisia bakteereita sekä *Saccharomyces*-suvun villi-hiivoja. (Back, W. 1994.)

Välilliset pilaajaorganismit eivät kasva lopputuotteessa, mutta pystyvät pilaamaan tuotteen valmistusprosessin aikana. Yleisin lähde välilliselle kontaminaatiolle on hiivakierrossa oleva suspensio tai vierteen valmistuksessa käytettävät lisäaineet. Tähän ryhmään kuuluu *Saccharomyces*-suvun villi-

hiivoja sekä joitakin aerobisia hiivoja, sekä koliformisia bakteereita. Väil-lisille kontaminanteille suotuisia kasvuolosuhteita ovat pääkäymisen alku (ilmastettu, n. 20 °C vierre) ja hiivakierrossa oleva suspensio. (Back, W. 1994.)

Indikaattoriorganismit eivät pilaa lopputuotetta, mutta esiintyvät huonon hygienian tai prosessihäiriön seurauksena. Niiden läsnäolo indikoi yleensä pilaajaorganismien esiintymistä. Tähän ryhmään kuuluu joitakin etikka-happobakteereita ja aerobisia hiivoja. (Back, W. 1994.)

Latenteilla organismeilla tarkoitetaan satunnaisesti esiintyviä organismeja, jotka joissain tapauksissa voivat selviytyä koko valmistusprosessin osa-vaiheiden läpi ja päätyä lopputuotteeseen. Tämän ryhmän organismit tule-vat yleensä kontaminoidusta prosessivedestä tai panimolla tehtävistä muu-tos- tai rakennustöistä. Ko. organismien jatkuva esiintyminen kertoo huo-nosta prosessihygieniasta. Ryhmään kuuluu itiöitä muodostavia, kolifor-misia bakteereita ja biofilmejä muodostavia bakteereita ja hiivoja. (Back, W. 1994.)

Taulukoissa (taulukot 5 - 9) on esitetty panimossa esiintyvien vieraiden mikro-organismien luokkia ja ominaisuuksia. Luetteloissa on mikrobien ominaisuuksia käsittelevissä tiedoissa ilmaistu niiden asema Backin (1994) luokittelun suhteen.

4.2 Villihiivat

Kuten bakteeritkin, villihiivat aiheuttavat oluessa virhemakuja ja ei-toivottuja piirteitä. Villihiivaksi määritellään hiivakanta, jota ei tarkoituk-senmukaisesti ja hallitusti käytetä oluen valmistamisessa. Villihiivat voi-vat tapauksesta riippuen olla paljon hankalampia havaita ja kontrolloida kuin bakteerit. Villihiivat eivät aina aiheuta vahinkoa tuotteelle, mutta nii-den esiintyminen viittaa epähygieenisiin toimintatapoihin ja kontaminaa-tioon. (Allen, F. 1994c; Boulton, C. & Quain, D. 2006: 520 -521)

Villihiiwojen määrittämisessä käytetään hyödyksi niiden korkeampaa lämmönsietoa verrattuna viljeltyyn panimohiivaan. Vaikka villihiiwojen lämmönkestävyyden tutkiminen ilmiantaa suurimman osan yleisimpien villihiiwojen läsnäolosta, menetelmä ei ole kovin luotettava. Taulukosta 5 ja 6 nähdään yleisimpien villihiiwojen ominaisuuksia ja vaikutuksia olu-een. (Allen, F. 1994c)

Villihiivat jaetaan kahteen ryhmään: *Saccharomyces*-suvun (Taulukko 5) ja ei-*Saccharomyces*-suvun (Taulukko 6) villihiivoihin. Mahdollisia villi-hiivakontaminanteja on paljon, niiden havaitseminen on vaikeaa ja ne ovat hyvin samankaltaisia käytetyn panimohiivan kanssa (*Saccharomyces*-suvun villihiivat), minkä vuoksi villihiivakontaminaatioon on aina suhtau-duttava vakavasti, havaittiin se sitten prosessissa tai pakatussa tuotteessa. Villihiivakontaminaatiot eivät aina anna selkeitä viitteitä pilaantumisesta, eivätkä ne aina tuota vahvoja virhemakuja tai sameutta, ennen kuin kon-taminoiva populaatio on kasvanut tarpeeksi suureksi. Pienikin villihiiva-kontaminaatio voi aiheuttaa häiriötä prosessissa tai lopputuotteessa, minkä

vuoksi panimossa kiertävää hiivasuspensiota on tarkkailtava myös mikrobiologisesti, ja huomioitava hygieeniset toimintatavat ja aseptisen työskentelyn ylläpitäminen. (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 521)

Saccharomyces-suvun villihiivoja pidetään haitallisempina kuin ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoja. Visser ym. (1990) tutkimuksissa 75 hiivasuvusta vain 23 % lajeista pystyi kasvamaan anaerobisissa olosuhteissa. Vain *Saccharomyces*-suvun lajit pystyivät runsaaseen kasvuun ko. olosuhteissa. Panimoprosessin ja lopputuotteen pakkauksen kontaminaatioiden ja mikrobin kasvun kannalta fakultatiivisesti anaerobiset mikrobit, kuten *Saccharomyces*-suvun hiivat, ovat tuotteen ja prosessin mikrobiologisen turvallisuuden kannalta huomattavasti merkittävämpiä kuin yksinomaan aerobiset ei-*Saccharomyces*-suvun hiivat. *Saccharomyces*-suvun villihiivat ovat esitetty taulukossa 2. (Boulton, C. & Quain, D. 2006, 521)

Saccharomyces-suvun villihiivojen pilaavista vaikutuksista voidaan lueta kaksikin ominaisuutta, jotka vaikuttavat prosessissa ja lopputuotteessa yleisimmin: hiivat, joilla on POF-geeni tai tuottavat diastaasia, ja hiivat, jotka aktiivisesti tappavat alkuperäistä panimohiivaa (muuta mikro-organismeja) ja kilpailevat ravinteista. (Boulton, C. & Quain, D. 2006, 522)

Diastaasi-entsyymien tuottaminen mahdollistaa dekstriinien ja muiden polysakkaridien fermentoinnin (superattenuatio), joita viljelty panimohiiva, *S. cerevisiae*, ei pysty käyttämään ravinnoksi. Tällöin villihiivojen kasvu on mahdollista jo varastoinnin aikana. POF-geeni, (eng. *phenolic off-flavour*), tuottaa fenolihappodekarboksylaasia, joka nimensä mukaan poistaa hiiltä vierteessä olevista fenolihapoista, ja siten tuottaa virhemakua. (Boulton, C. & Quain, D. 2006, 522 - 523)

Alkuperäistä panimohiivaa tappavia kantoja ei ole panimoissa tavattu kuin neljä, mutta niitä pidetään suurempana uhkana kuin ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoja. Tappajahiivan läsnä ollessa hiivasuspension elävyys tippuu merkittävästi, joten kontaminoidun hiivasuspension havaitseminen on käytännössä yksinkertaista. Tuotteena syntyy molemmissa tapauksissa fenolisia, kasvimaaisia ja lääkkeen makuista (autolyysi) yhdisteitä, jotka pilaavat lopputuotteen maun. (Boulton, C. & Quain, D. 2006, 523)

Ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoja pidetään pienempänä mikrobiologisenä uhkana panimoprosessille ja lopputuotteelle, koska ko. villihiivoilla on heikommat ominaisuudet aiheuttaa häiriötä prosessille tai pilata lopputuote:

- Ne eivät sopeudu läheskään yhtä hyvin panimoprosessissa ja lopputuotteessa vallitseviin olosuhteisiin kuin *Saccharomyces*-suvun villihiivat.
- Ne ovat joko obligatorisesti aerobeja, eivätkä siis pysty fermentoimaan sokereita, tai hyvin heikosti fakultatiivisesti anaerobeja, ja pystyvät fermentoimaan vain hyvin harvoja sokereita.

Kaikissa näissä suhteissa *Saccharomyces*-suku on ylivertainen verrattuna ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoihin. Ongelmaksi tulee kuitenkin ei-

Saccharomyces-suvun villihiivojen monimuotoisuus. Ne ovat hyvin vaikeita määrittää ja tunnistaa. (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 523)

Osa ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoista ovat kotoperäisiä panimossa. Vaikka niitä esiintyy, ne harvoin pilaavat merkittävästi lopputuotetta edes prosessihäiriön seurauksena hapellisissa olosuhteissa. Niiden poistamisessa, aivan kuten muidenkin mikro-organismien, luotetaan pastörintiin tai steriilisuodattamiseen teollisessa mittakaavassa. Vaikka ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoja ei pidetä suurena uhkana lopputuotteelle, niitä pidetään arvokkaana mittarina panimon hygienialle. Ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivat toimivat ns. indikaattoriorganismeina ja ilmentävät mahdollisten vaarallisempien mikro-organismien läsnäolon tai tulevia mikrobiologisia ongelmia. (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 523 - 525)

Yleisimpiä ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoja ovat *Candida* ja *Pichia*-suvun hiivat, ja sellaiset ko. villihiivat, joita toisinaan käytetään panimoprosessissa hyvinkin merkittävässä roolissa, kuten esim. *Brettanomyces*-suvun hiivat. (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 523 - 525)

Taulukko 5 Panimoista eristettyjä *Saccharomyces*-suvun villihiivoja (Allen, F. 1994c; Boulton, C. & Quain, D. 2006, 522)

Nimi	Ominaisuuksia	Virhevaikutukset/flavorit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	Resistantti pastöroinnille >72 °C Muodostaa tiheän sameuden jo pieninä määrinä Muodostaa sameutta ja vaimentaa makuprofilia	Muodostaa fenolisen maun ja sameutta Heikentää tuotteen säilyvyyttä. Absoluuttisia ja potentiaalisia pilaajaorganismeja.

Villihiivojen määrittämiseen käytetään myös paljon selektiivisiä kasvatusalustoja, jotka inhiboivat panimohiivan kasvua tai mahdollistavat vain villihiivojen kasvun ravinteilla. Taulukossa 10 on esitetty yleisimpiä panimokontaminanttien määrittämiseen käytettäviä kasvatusalustoja. (Allen, F. 1994c) Villihiivan tunnistaminen tai tarkempi määrittely ei ole mahdollista pienpanimo-olosuhteissa. Jos niin pitkälle on mentävä, kannattaa tunnistus teettää ammattilaboratoriolla.

Pienpanimon laadunvalvonta ja menetelmät

Taulukko 6 Panimoista eristettyjä villihiivoja (Allen, F. 1994c; Boulton, C. & Quain, D. 2006: 524)

Nimi	Ominaisuuksia	Virhevaikutukset/ flavorit
<i>Dekkera</i> <i>bruxellensis</i> <i>anomala</i> (ent. <i>Brettanomyces</i>) <i>lambica</i>	Happi kiihdyttää fermentointia, fermentoi glukoosia, harvoin maltoosia, muttei koskaan sakkaroosia; käyttää paljon nitraattia; tuottaa etikkahappoa. Muodostaa koteloitiöitä; happi kiihdyttää fermentointia; fermentoi kannasta riippuen glukoosia, sukroosia ja maltoosia	Hevosen hiki, aiheuttaa makuvirheitä pääasiassa pullossa sekundaarikäytetyllä oluilla; spontaanikäymisessä menestyy <i>Saccharomyces</i> spp. paremmin, Absoluuttinen pilaaajaorg. Pilaa ei-pastöroidun hanaoluen; Potentiaalinen pilaaajaorg.
<i>Candida</i> <i>tropicalis</i> <i>boidinii</i> <i>vini</i> (ent. <i>Kloeckera vini</i> ja <i>K. cerevisiae</i>)	Aerobinen; fermentointi rajoittunut vain glukoosiin, lukuun ottamatta <i>C. tropicalis</i> , joka pystyy käyttämään myös maltoosia. Lämpöresistentti <75 °C, biofilmin muodostaja	Kontaminaatiot rajoittuvat pääkäymisen aerobiseen vaiheeseen/ ei-pastöroituu hanaoluekseen; osa <i>Candida</i> spp. voi fermentoida hyvin heikosti anaerobisissa olosuhteissa; Potentiaalinen pilaaajaorg. Muodostaa sameutta
<i>Zygosaccharomyces</i> <i>bailii</i> <i>rouxii</i>	Eritoten osmofiilinen; fermentoi glukoosia ja vaihtelevasti maltoosia ja sukroosia	Virvoitusjuomien, hedelmämehejen ja tuotteiden, joiden soke-ripitoisuus on eritoten korkea, pahamaineinen pilaaaja-mikrobi; Absoluuttinen pilaaajaorg.
<i>Cryptococcus</i> <i>laurentii</i>	Ei pysty fermentoimaan, mutta voi kuluttaa eri sokereita paljon; osa kannoista tuottaa pigmenttiä	Muodostaa sameutta; selviytyy hyvin, muttei vaikuta flavoriin; Potentiaalinen pilaaajaorg.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (ent. <i>Pichia anomala</i> ja <i>Hansenula anomala</i>) <i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia membranifaciens</i>	Aerobinen, lämpöresistentti, biofilmin ja itiöiden muodostaja; fermentoi yleensä vain glukoosia	Muodostaa sameutta ja etikkahappoa, Kontaminaatiot rajoittuvat pääkäymisen aerobiseen vaiheeseen/ ei-pastöroituu hanaoluekseen; <i>P. membranifaciens</i> tuottaa hapankaalia muistuttavan virhe- maun; Potentiaalinen pilaaajaorg.
<i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> <i>mucilaginosa</i>	Aerobinen; osa kannoista värjäytyy punaiseksi; ei pysty fermentoimaan, mutta voi kuluttaa eri sokereita paljon	Muodostaa sameutta; selviytyy hyvin, muttei vaikuta flavoriin; Potentiaalinen pilaaajaorg.
<i>Torulaspotas</i> <i>delbrueckii</i>	Fermentoi glukoosia ja vaihtelevasti maltoosia ja sakkaroosia	Hiiva-suspensiossa esiintyvä kontaminantti; Pilaa ei-pastöroidun hanaoluen; pystyy vähäiseen kasvuun anaerobisissa olosuhteissa Välillinen pilaaajaorg.

4.3 Bakteerit

Bakteereita on kaikkialla, myös kaikista siisteimmissäkin panimoissa. Bakteerien aiheuttamat vaikutukset alkavat näkyä nopeasti kontaminaation jälkeen, mikä mahdollistaa bakteerien huomaamisen ennen kuin ne aiheuttavat sen suurempaa ongelmaa. Panimoiden laadunvarmistamisen ei pitäisi olla reagoivaa, vaan ennaltaehkäisevää, mikä mahdollistaa toimenpiteiden tekemisen hyvissä ajoin. Laboratoriovälineiden hankkiminen ei kuitenkaan tunnu pienpanimo-mittakaavassa mielekkäältä, vaikka se onkin perustuoteturvallisuuden kannalta itsestään selvää. (Allen, F. 1994b)

Toinen ko. asiaan vaikuttava ongelma on oikeiden asioiden tekeminen – mitä menetelmiä käytetään? Mitä niiden tekemiseen tarvitaan? Mitä menetelmät kertovat? On turha tehdä mikrobiologisia määrityksiä, jos ne tehdään ”väärin” tai niiden pohjalta ei osata tehdä asianmukaisia toimenpiteitä. Toiseksi, on hankala pohtia, kuinka tarkkoja määritelmiä on tehtävä.

Bakteerien määrittämiseen on monia selektiivisiä kasvatusalustoja, joiden pääasiallinen yhteneväisyys on hiivojen kasvun inhibointi. Taulukoissa 7, 8 ja 9 on listattu yleisimpiä kontaminaatiota aiheuttavia bakteereita. (Allen, F. 1994c)

Tutkittaessa pääkäymisen ja panoshiivan mikrobiologista puhtautta on aloitettava varmistamalla panostettavan vierteen puhtaus. Vierteen keitossa 90 min voimakas keittäminen steriloi vierteen. Vain muutamat itiöitä muodostavat *Bacillus*- ja *Clostridium*-suvun bakteerit kestävät vierteen keiton, mutta niiden kasvu inhiboituu pääkäymisen alussa (Priest, F.G. & Campbell, I. 2003, 382).

Ongelmat vierteen mikrobiologisen puhtauden suhteen alkavat vasta keiton jälkeen, kun vierre jäähdytetään selkeyttämisen jälkeen. Suurin kriittinen piste oluenvalmistuksessa on jäädytyspakka, jäädytyspakan ulostulo ja putkisto tai letkusto. Kokonaisuutena voidaan sanoa, että vierre on alttiimmillaan mikrobiologisille kontaminaatioille jäädytyksen jälkeen 8 – 25 °C:een, riippuen käytettävästä panimohiivasta.

Vierteen mikrobiologisen puhtauden määrittämiseen on yksinkertainen analyysi – vierteen stabiilisuustesti. Stabiilisuustestillä mitataan jäädytetyn vierteen mikrobiologista puhtautta. Mikäli stabiilisuustestissä esiintyy merkkejä mikrobiologisesta kasvusta, ei vierteen valmistus laitteisto ole puhdas.

Pienpanimon laadunvalvonta ja menetelmät

Taulukko 7 Panimoista eristettyjä bakteereita: Etikkahappobakteerit (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 514 – 515; Back 1994)

Nimi	Ominaisuudet	Gram		Morfologia	Virhevaikutukset	
		+	-			
Etikkahappobakteerit	Aerobinen, mikroaerofiilinen, herkkä pienille humalapitoisuuksille, acidofiili			X	basilli, cocci	Lopputuotteen pinnalla esiintyvää kasvua ja sameutta, happamuutta, viinietikan tuoksu, muodostaa ohuita ketjumaisia biofilmejä, pilaa lopputuotteen hapettamalla alkoholia etikkahapoksi. Yleinen ei-pastöroidun oluen pilaaja, mutta harvemmin pilaa keg- tai pullo-olutta. Sameutta ja omenahapon tuoksua; siideri
<i>Acetobacter acetipasteurianus</i>	0.6 – 0.8 µm x 1 – 4 µm; katalaasi positiivinen; hapettaa etanolia					
<i>Gluconobacter oxydans</i>	0.6 – 0.8 µm x 1 – 4 µm; liikuntakykyinen (flagelloja), katalaasi positiivinen; hapettaa etanolia. Aerobinen acidofiili				Ketjuja muodostava basilli	

Taulukko 8 Panimosta eristettyjä bakteereita: Maitohappobakteerit (Boulton, C. & Quain, D. 2006: 514 – 515; Back, W. 1994)

Maitohappobakteerit				X		
<i>Lactobacillus delbrueckii brevis casei fermentum buchneri lindneri</i>	Fakultatiivisesti aerobinen, termofiilinen, maitohappobakteeri; Katalaasi -, homo- ja heterofermentatiivisia				basilli	Happamuus: maitohappo, etikkahappo, etanoli, hiilidioksidi; Potentiaalisia oluen pilaajia; opt. Kasvu pH 4 - 5; muodostaa sameutta, diasetyyliä; Vaihteleva herkkyysaste iso-alfa-hapuille. Happamuus, muodostaa ketjumaisia biofilmejä
	Anaerobinen, kestää suuria humalapitoisuuksia vienteessä ja alkoholipitoisuuksia, maitohappobakteeri				basilli	
<i>Pediococcus damnosus (cerevisiae) inopinatus</i>	Fakultatiivisesti aerobinen, termofiilinen, maitohappobakteeri; Katalaasi -, homofermentatiivinen				cocci	Resistentti suurille iso-alfa-happo- ja etanolipitoisuuksille; virhevaikutuksena diasetyyli tuotto, happamuus ja sameus
<i>Bacillus coagulans</i>	Aerobinen, katalaasi +, termofiilinen, muodostaa hyvin kestäviä itiöitä; vienteen pilaaja				basilli	Herkkiä iso-alfa-hapolle; ei pilaa valmista tuotetta, 55 -70 C-asteessa muodostaa maitohappoa, vienteen pilaaja ja esiintyy yleensä pääkäymisen alussa
<i>Kocuria (ent. Micrococcus) kristinae varians</i>	Katalaasi +, yleensä obligatorisia aerobeja lukuunottamatta <i>M. kristinae</i> , joka on fakultatiivisesti anaerobi				cocci	Kestää yleensä olosuhdevaihtelut ja selviää hyvin lopputuotteessa; harvoin aiheuttaa pilaantumista; virhemakuna hedelmällinen maku joka peittää katkeruutta, korkea pH

Pienpanimon laadunvalvonta ja menetelmät

Taulukko 9 Panimosta eristettyjä bakteereita: Koliformit (*Boulton, C. & Quain, D. 2006: 514 – 515; Back, W. 1994*)

Koliformit	Fekaali lämpöresistenttinen panimoveden ja vierteen pilaaja; fakultatiivisesti anaerobi	X		Sellerin ja fenolien tuoksuja; erilaisia metabolian sivutuotteita kuten orgaanisia happoja, fenoleja, butaanidioli
<i>Obesumbacterium proteus</i>	Katalaasi +, eritoten panimoissa esiintyvä mahdollinen hiiva-kierron kontaminantti, etanolitolerantti < 6 %, selviytyy parhaiten pääkäymisen olosuhteista, tuottaa nitrosoamiinia		0.8 – 1.2 µm x 1.5 – 4 µm; lyhyitä paksuja basilleja	Kasvaa pääkäymisen alussa aerobisessa vaiheessa ja laskee käymisasetettä, tuottaa rikkimäisiä virhemakuja, nostaa tuotteen pH:ta, pelkistää nitraattia nitriitiksi, nitrosamiinit
<i>Citrobacter freundii</i>	Katalaasi+, mahdollinen vierteen kontaminantti, kiihdyttää pääkäymistä		1 µm x 2 – 6 µm; suora basilli	Tuottaa orgaanisia happoja, ei selviä pääkäymisestä.
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoe agglomerans</i>	Selviytyy pääkäymisen olosuhteista.		0.6 x 2-3 µm basilli	Samoja piirteitä kuin <i>O. proteus</i> .
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Kocuria terrigena</i>			0.3-1 x 0.6-6 µm; basilli	Muodostaa POF-yhdisteitä kuten jotkut villihiivat; sekä rikkiyhdisteitä
<i>Zymomonas mobilis</i>	Obligatorinen anaerobi; Katalaasi+, fermentoi tehokkaasti glukoosia etanoliksi, ei fermentoi maltoosia, alkoholitolerantti, opt. kasvu 25 – 30 °C		1-1.4 x 2-6 µm; basilli	Hyvin spesifinen Ale-käymisen opt. lämpötiloihin ja oluisiin jotka jälkikäytetään glukoosilla, muodostaa virhemakuja esim. asetaldehydi
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	Obligatorinen anaerobi, hankala rikastuttaa perinteisillä mikrobiologisilla menetelmillä		kaarevia basilleja; 0.8-2-30 µm	Hyvin herkkä pienillekin happipitoisuuksille; virhemakuja ovat rikkiyhdisteet, asetaldehydi, propionihappo ja muut heikot hapot, kasvaa parhaiten pH 4 < x > 6
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	Obligatorinen anaerobi, Katalaasi -, hankala määrittää		cocci; 1-1.2 µm läpimitalta	Hyvin herkkä pienillekin happipitoisuuksille; virhemakuja ovat rikkiyhdisteet, eteenkin vetysulfidi; voihapo ja muut lyhytketjuiset rasvahapot; kasvu inhiboituu alle pH 4 ja 3.5 - 5-5 til-% alkoholia

4.4 Mikrobien määrittäminen ja osoittaminen sekä siinä käytettävät elatusalustat

Mikrobien tunnistamiseen on monia eri menetelmiä, kuten molekyylibiologiset (PCR), biokemialliset (fenotyyppitys) tunnistusmenetelmät. Perinteisillä elatusalustoilla voidaan tehdä jo kohtuullisen kokonaisvaltaista mikrobintunnistamista, mutta sen huono puoli on analyysien ajallinen kesto, vaadittavan työn määrä ja tietotaito. Hyvänä puolena voidaan pitää kustannustehokkuutta.

Pienpanimo-olosuhteissa mikrobien tunnistamiseen paras menetelmä on selektiivisten elatusalustojen käyttäminen.

4.4.1 Villihiivojen pintaviljely selektiivisellä YM-agarilla

Yeast and Mould agar on suunniteltu hiivojen ja homeiden eristämiseen. Happamuuden säätö maitohapolla parantaa alustan selektiivisyyttä. pH:n säätö on kuitenkin toisarvoinen hiiva-suspension määrittämistä tehdessä; mikäli hiiva-suspensio on kontaminoitunut *E. coli*n toimesta, tulisi hiivaliete viemäroidä ja kiinnittää huomiota panimon hygieniaan ja aseptisiin toimintatapoihin. Kuparisulfaatin (CuSO_4) lisääminen kasvatusalustaan inhiboi panimohiivan kasvua, jolloin alusta toimii selektiivisesti joillekin *Saccharomyces*- ja pääasiassa ei-*Saccharomyces*-suvun villihiivoille. Kuparisulfaatti inhiboi panimohiivan kasvua jo 0,05 – 0,30 g/l pitoisuuksissa, riippuen panimohiivan herkkyudesta kuparille. (Taylor, G. & Marsh, A. 1984. 134 – 145; Oxoid, Tuoteseloste CM0920)

Kupari on yksi tärkeimmistä metalleista hiivan elinvoimaisuuden kannalta. Se osallistuu moniin elektroninvaihtoreaktioihin molekyylien sekä atomien välillä, ja toimii tärkeänä kofaktorina monelle entsyymille hiivan metaboliassa. Kuparin ominaisuus vaihtaa elektroneja ed. mainitulla tavalla on myös sen myrkyllisyyden perusta. Korkea kuparipitoisuus tai sen vaihtelu aiheuttaa perusteellisia ongelmia hiivasolun metaboliassa, kasvussa ja kehityksessä. Kuparin myrkyllisyyden takia hiivasoluille on kehittynyt monimutkainen metalli-homeostaasi, joka kontrolloi kuparipitoisuuden tasapainoa ympäristön ja solun välillä. (De Freitas, J. Wintz, H. Kim, J.H. Poynton, H. Fox, T. & Vulpe, C. 2003. 185 – 197)

Panimohiivan herkkyyttä kuparille, ja sitä koskevaa metalli-homeostaasia säätelee CUP1-geeni, joka löytyy lähes kaikista villi- ja panimohiivoista. Korkeiden kupari-pitoisuuksien vastustuskykyyn perustuva selektiivisyys on suosituin tapa inhiboida panimohiivan kasvu, koska muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta kaikki panimohiivat ovat herkkiä korkeille kuparipitoisuuksille toisin kuin villihiivat. (Priest, F.G. & Campbell, I. 2003, 80)

Inkubointi tapahtuu yhdistettyä anaerobi-aerobi-menettelytapaa käyttäen. Aloitetaan inkubointi 25 – 30 °C lämpötilassa 2 – 3 vrk ajan anaerobisissa olosuhteissa, jonka jälkeen alustat siirretään 1 – 2 vrk aerobisiin olosuhteisiin käyttäen samaa lämpötilaa. On tärkeää tarkkailla maljoja päivittäin, jotta ne eivät kasva umpeen. Mikäli anaerobisissa olosuhteissa inkuboitessa esiintyy runsasta ja nopeaa kasvua, on alustat siirrettävä aerobisiin olosuhteisiin. Anaerobisissa olosuhteissa inkuboitessa estetään homeiden

muodostuminen, lukuun ottamatta joitakin dimorfisia homeita, jotka saattavat muodostaa hiivankaltaisia pesäkkeitä, esim. *Mucor spp.* Inkuboinnin jälkeen pesäkkeiden muodon ja ulkoisten merkkien tai mikroskopoinnin perusteella määritellään villi-hiivojen läsnäolo. (De Jong J. & Put H.M.C. 1980. 289 – 292)

Villihiivojen ja homeiden määrittämiseen selektiivinen YM-agari on helppo ja yksinkertainen. Mikäli pesäkkeiden tarkempi tunnistaminen on asianmukaista, kannattaa kääntyä ammattimaisen laboratorion puoleen.

Villihiivoja määrittäessä muita menetelmiä kasvatusalustan selektiivisyyden luomiselle ovat ravinteiden muokkaaminen tai kemiallinen rasitus.

Villihiivat voivat käyttää ravinnokseen monimutkaisempia sokereita, esim. maltotetraaloosia. Tekemällä maltotetraaloosista ainoan hiilihydraattilähteen kasvualustalle, voidaan määrittää *Saccharomyces*-suvun villi-hiivoja, kuten esim. *S. diastaticus*. Mikäli kasvualustalle muodostuu pesäkkeitä, on villi-hiivakontaminaatio ilmeinen. Toinen tapa *Saccharomyces*-suvun villihiivojen määrittämiseen on kristallivioletin lisääminen kasvualustaan. Kristalliviolettia käytetään mm. Gram-värjäyksessä. Pigmentti on myrkyllinen mutageeni, joka ko. menetelmässä inhiboi panimohiivan kasvun ja mahdollistaa villihiivojen ja panimohiivojen variaatioiden kasvun. Kasvualustalle muodostuvat pesäkkeet määrittävät villihiivakontaminaation. (Allen, F. 1994c)

4.4.2 Bakteerien määrittäminen pintaviljelyllä

Yleisimmin esiintyviä ja vaarallisimpia pilaajabakteereita panimossa ovat *Lactobacillus* ja *Pediococcus spp.*, joiden määrittäminen selektiivisellä alustalla on helppoa.

Universal Beer Agar (UBA) on panimoteollisuudessa paljon käytetty kasvatusalusta, jota muokkaamalla voidaan tehdä alustalle haluttu selektiivisyys. Bakteereita määrittäessä selektiivisyyttä voidaan muokata antibiootilla. (Oxoid, Tuoteseloste CM0651)

Sykloheksimidi (actidione) on antibiootti, joka inhiboi eukaryoottien proteiinisynteesiä. Prokaryootit sen sijaan kestävät antibiootin korkeatkin pitoisuudet. Sykloheksimidi on erittäin vaarallinen ihmiselle, ja sen käsittelyssä on noudatettava käyttöturvallisuustiedotteen antamia työturvallisuusmääräyksiä. Jo 0,2 ppm:n sykloheksimidipitoisuus inhiboi hiivojen ja homeiden kasvun kokonaan ja mahdollistaa bakteeripesäkkeiden määrittämisen. Sykloheksimidi on kaupallinen tuote. (Allen, F. 1994c; Priest, F.G. & Campbell, I. 2003, 379 – 380)

Taulukko 10 Kasvualustoja panimonäytteiden hiivojen ja bakteerien määrittämiseen (Allen, F. 1994c), 1) Taylor, G.T. and Marsh, A.S. (1984) *J. Inst. Brew.*, 90: 134-145, 2) Kozulis J. A. and Page H. E. (1968) *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 52-58

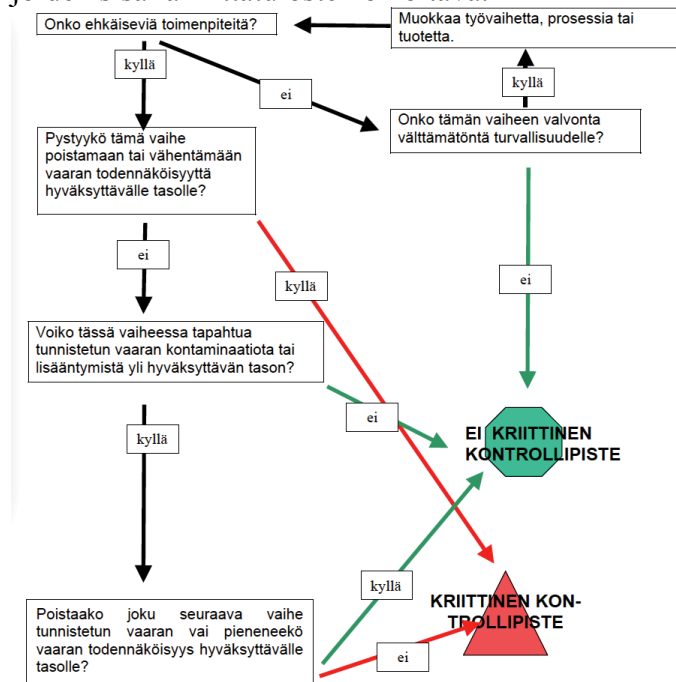
Kasvualusta	Määritettävä mikrobi	Huom.
Lysiini (LYS)	Villihyvät <i>Saccharomyces</i>	Lysiini on aminohappo. Hiiva tarvitsee typenlähteen fermentoidessaan. Kun lyysiini on ainoa saatavilla oleva typen lähde, <i>Saccharomyces spp.</i> ei voi siinä kasvaa.
Schwartz (SDM)	Villihyvät	
Lin's Wild Yeast Medium (LWYM)	Villihyvät	<i>Saccharomyces spp.</i> Alustaan lisätään krystalliviolettiä.
Lin's Cupric Sulfate Medium (LCSM)	Villi-hiivat	Määrittää myös <i>Saccharomyces spp.</i> Voidaan korvata Yeast Mould agarilla johon lisätään kuparisulfaattia ₁
TTC overlay	Puutteellista soluhegitystä tekevät mutaatiot (RDM)	
HLP medium	<i>Lactobacillus spp.</i> ja <i>Pediococcus spp.</i> määrittämiseen	Voidaan korvata UBA:lla johon on lisätty heksimidiä ₂
MRS Broth	<i>Lactobacillus spp.</i>	
Vierre-agar	Bakteerit ja hiivat	Agar lisäravinteilla
Hsu's Rapid Growth Medium (HRM)	Bakteerit ja hiivat Mikro-organismien määrittämiseen jäädytetystä vierteestä	
Universal Beer Agar (UBA)	<i>Brettanomyces</i> Lisäksi <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Zymomonas</i>	Universaali agar panimojen käyttöön, jonka muokkaaminen eritutkimustarpeisiin on helppoa.

5 LAADUNVALVONTA

5.1 HACCP

Olut on suhteellisen turvallinen tuote verrattuna moneen elintarvikkeeseen. Olut on pilaantunut niin pahasti, että se olisi kuluttajalle hengenvaarallinen. Olut on varsin huono kasvualusta patogeenisille mikrobeille. Kirjoittajan tiedossa ei ole oluen haittamikrobeista johtuvia ruokamyrkytystapauksia. Silti panimoprosessi on altis monille tuoteturvallisuutta vaarantaville laatuvirheille ja kontaminanteille. HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Points*) ja omavalvonta ovat lain nojalla pakollisia myös pienpanimoille. Ne muodostavat tuotteen ja prosessin laadulle vähittäisvaatimuksen. HACCP-järjestelmän pohjalta on hyvä laajentaa ja vahvistaa panimon omaa laatuja järjestelmää.

Terveydelle vaaralliset ja tuotteen tasalaatuisuudelle epäsuotuisat laatuvirheet ja kontaminantit voivat olla peräisin mistä tahansa prosessin vaiheesta. Kriittisissä kontrollipisteissä (*CCP-piste*) vaara on niin ilmeinen, että kyseisessä vaiheessa voi aiheutua terveysvaara. Muita vaatimuksia kontrollipisteelle on, että vaara voidaan mitata tai arvioida todeta. Sitä voidaan hallita ja hallittavalle asialle voidaan määrittää kriittiset rajat. Tällöin kriittisen rajan ylittyessä turvallisuus voidaan taata korjaavilla toimenpiteillä (Evira, Hygieniasaamisen tietopaketti 2012. Kuva 15). HACCP-järjestelmässä jokainen prosessivaihe analysoidaan potentiaalisten prosessihäiriöiden ja -vaara mukaan, jotka ovat jaettu mikrobiologisiin, kemiallisiin ja fysikaalisiin vaaratekijöihin. Esiintyvien vaaratekijöiden pohjalta määritetään kriittiset kontrollipisteet, joiden valvontamenetelmien ja lainsäädännön ja asetusten pohjalta määritellään ns. kriittiset raja-arvot, joiden sisällä mittatulosten on oltava.



Kuva 15 Kriittisen kontrollipisteen löytäminen (STTV 1.3.2006 Dnro 109/43/2006: Elintarvikevirasto)

HACCP-järjestelmä rakentuu seuraavasti 7 kohdan mukaan:

- Potentiaalisten vaarojen arviointi.
- Kriittisten valvonta pisteiden valinta.
- Kriittisten raja-arvojen määrittäminen. Tarvittaessa tuotekohtaisesti.
- Valitaan kriittisten valvontapisteiden ja raja-arvojen seuranta- ja analysointimenetelmät.
- Laaditaan tarvittavat toimenpiteet, kun poikkeama ilmenee
- Kokonaisvaltaisen dokumentoinnin suunnittelu.
- HACCP-järjestelmän seuranta- ja analysointimenetelmien toiminnan todentaminen.

(<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/haccp/>)

Liitteessä 1 on kuvattu esimerkki panimon kriittisten hallintapisteiden määrittelystä. Esimerkissä on kriittisiksi hallintapisteiksi valittu kantavierrevahvuus, alkoholipitoisuus ja uutejäämä, joiden keskinäinen merkitys oluen laadun ja lainsäädännöllisten asetusten kannalta on merkillepantavaa. Oluen tuoteturvallisuuden, lainsäädännön asettamien rajoitteiden ja kokonaislaadun kannalta on tärkeää tuntea miten eri ominaisuuden ilmenevät oluessa - mitkä fysikaaliset ilmiöt ja kemialliset tekijät ilmentävät ominaisuuksia. Kun HACCP-järjestelmän pohjalta laajennetaan panimon laatujärjestelmää, on niin laadun kuin kriittisten kontrollipisteidenkin kannalta tärkeää perustella niiden merkittävyys pätevästi.

5.2 Laadunvalvonnan suunnittelu ja tuotteen laatu

Mitä kannattaa mitata ja mitä menetelmiä käyttää? Tietysti kriittiset kontrollipisteet ovat etusijalla, mutta laadunvalvonnan suunnittelussa muihin tuotteen laatuominaisuuksiin kysymykseen vastaaminen on hankalampaa. Ensimmäisenä kannattaa rajata tuotteen ominaisuudet, joissa vaihtelu on suurempaa ja vaikutus kokonaislaatuun merkittävämpi. Esimerkiksi pienpanimon käyttämät raaka-aineet eivät välttämättä vaadi laajoja laadunvarmistusmenetelmiä. Raaka-ainevaraston kiertonopeus takaa tuoreuden, ja toimittajien tuottama tieto ja spesifikaatiot ovat yleensä analytiikaltaan tarkempia kuin pienpanimossa on tarpeellista pyrkiä.

Laadunvalvonnan kannalta tarkasteltuna kannattaa keskittyä niihin ominaisuuksiin, jotka ovat tuotteen kokonaisuuden kannalta merkittäviä ja joilla ei vielä ole ns. raja-arvoa. Usein kuvitellaan, että tuotekehitys on reseptiikkaa. Oluen kannalta koko prosessin vaikutus on hyvin ilmeinen lopputuloksen kannalta, ja prosessihäiriöt voivat vaikuttaa jopa reseptiin. Nyrkkisääntönä voisi sanoa: mitä et voi mitata, et voi kehittää.

Onneksi prosessi vaatii harvoin reseptimuutoksia. Suurempi hyöty ominaisuuksien mittaamisessa ja teorian soveltamisessa on prosessin ja tuotannon suunnittelulle. Esimerkiksi niinkin yksinkertainen kuin oluen lämpötilanmittaus pakkaustankissa voi antaa tuotannolle paljon informaatiota tarvittavista toimenpiteistä pakkaamossa. Tästä syystä tuotannossa oleva tuote on tunnettava hyvin. Esimerkiksi suodattamaton olut on ominaisuuksiltaan

hyvin erilainen kuin suodatettu. Fysikaaliskemialliset ominaisuuksien kannalta tarkasteltuna suodattamattomuus luo potentiaalisen sameusriskin, koska sen proteiini- ja fenoliaineryhmät sekä vallitseva hiivapopulaatio pysyvät pääkäymisen jälkeen lähes muuttumattomina, minkä vuoksi liunneen hapen pitoisuudelle pakkausvalmiille oluelle on oltava tiukemmat raja-arvot.

Suodattamisen lisäksi olutta voidaan jälkikäsitellä monin eri tavoin, esimerkiksi separoimalla, stabiloimalla kirkastusapuaineilla, kylmäkäsitelyillä ja pastöroimalla (lämpökäsittely). Näiden osaprosessien tarkoituksena on stabiloida olut, eli manipuloida tuotetta säilymään muuttumattomana pidempään. Kuitenkin suodattamaton olut voi olla separoitua, jolla saavutetaan lähes suodatetun oluen kokonaismikrobimäärä. Separoinnilla voi olla kuitenkin fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin hyvinkin epäsuotuisia vaikutuksia, kuten vaahdonmuodostumisessa tarvittavien proteiinien hävikki tai hajoaminen ja hiivan rasiutus (autolyysi).

Toinen esimerkki on pastörinti. Vaikka pastörinti stabiloii oluen tuhoamalla mikrobit ja entsyymit, lämpökäsittelyllä voi olla oluen kannalta tuhoisia seurauksiakin. Suurin laaturiski on kuitenkin lämpökäsittelyn nopeuttamat kemialliset ja redox-reaktiot. Kaikki molekulaarinen happi ns. ”keittyy” olueen ja siten nopeuttaa pilaantumista. Toisaalta lämpökäsittely tuhoaa esimerkiksi proteiinaasi A:n, mikä on vaahdon muodostumisen kannalta hyvä asia.

Olut on itsessään jo hyvin säilyvä tuote, mutta sekin pilaantuu joskus. Missä vaiheessa olut on pilalla? Nykyaikainen kuluttaja vaatii olueltaan hyvin kummallisia asioita. Oluen pitää säilyä pitkään, maistua aina samalta, olla kirkasta ja kuplivaa. Kummallisten vaatimusten takia olutta rasitetaan välillä aivan tarpeettomasti. Pitääkö olut suodattaa, jos se vastaa ennen suodatusta jo kuluttajan vaatimuksia? Oli syy mikä tahansa, miksi panimot joutuvat rasittamaan oluttaan myydäkseen sen, kuluttaja haluaa oluensa aina samanlaisena, mutta kuinka suuria makueroja kuluttaja havaitsee?

Jos tarkastellaan oluen laatua säilyvyyden kannalta, voidaan sanoa, että olut on pilalla, kun sitä ei enää tunnista samaksi tuotteeksi. Entä jos kuluttaja tunnistaa sen parasta ennen päiväyksen jälkeen? Onko olut silloin laadukas, vai onko sen fysikaaliskemialliset ja aistinvaraiset ominaisuudet niin heikot, että niiden muuttumista ei huomaa.

Koska käsitys oluen laadusta vaihtelee, on hyvä tuntea ne tekijät, jotka ilmentävät niitä ominaisuuksia, mitkä kohderyhmä mieltää laaduksi.

6 KOKEELLINEN OSIO

Työn toimeksiantaja, Malmgårdin Panimo Oy, on suomalainen pienpanimo, jonka tavoitteena on valmistaa korkealaatuisia suodattamattomia oluita.

Kokeellinen osio suoritettiin Malmgårdin Panimolla ja Hämeen Ammatti- korkeakoulun laboratoriossa. Päämääränä oli saada käsitys panimon toiminnan ja työtapojen laadusta.

- Pullotuskoneen puhtaus
- Hapen määrä varastotankkien ilmankoostumuksessa
- Panimon mikrobiologinen ilmanlaatu
- Pintahygienia

6.1 Ilmanlaadun analysointimenetelmät

6.1.1 Panimon mikrobiologinen ilmanlaatu

Huoneilma on potentiaalinen kontaminanttien lähde. Huoneilman mikrobiologinen laatu ja sen muutokset tuotantopäivän aika ovat suurimmat hetkellisesti vaikuttavat tekijät huoneilman mikrobiologisessa laadussa. Toinen vaihtelua aiheuttava tekijä on prosessikaasuvirtojen ohjaaminen tuotantotiloihin ja tuotantotilojen koneellinen ilmastointi. Suurimman kausittaisen vaihtelun aiheuttaa vuodenaikojen vaihtelu.

Vuodenaikojen vaihtelu tuottaa teollisen mittakaavan panimoille vähemmän harmia, koska tuotantotilojen sisään tuleva ilma on suodatettua tai tuotantotilat paineistettuja. Suurin osa mikrobiologisista kontaminanteista tulee ns. maaseudulta, joko raaka-aineiden kuten ohran mukana tai kulkeutuvat luonnollisilla tavoilla panimoon esim. työntekijöiden mukana. Pienmittakaavassa tuotantotilojen paineistaminen tai sisään tulevan ilman mikro-suodattaminen on hyvin harvinaista.

	Anaerobiset bakteerit			
Näytealue	Syksy KA.	Vaihteluväli	Kevät KA.	Vaihteluväli
Tuleva ilma	50	10 - 280	50	10 - 410
Huone	560	10 - 3900	240	10 - 1500
Ulosmenevä ilma	210	10 - 1100	90	10 - 380
	Hiivat			
	Syksy KA.	Vaihteluväli	Kevät KA.	Vaihteluväli
Tuleva ilma	20	10 - 150	30	10 - 230
Huone	110	10 - 780	90	10 - 1300
Ulosmenevä ilma	40	10 - 310	20	10 - 100

Taulukko 11 Pakkaamon mikrobiologinen ilmanlaatu. (Henriksson & Haikara 1992)

Mittauksien referenssinä käytetään VTT:n tutkimusta Haikara & Henriksson (1992) *Detection of airborne microorganisms as a means of hygiene*

control in the brewery filling area, jonka tuloksiin verrataan panimon omaa ilmanlaatua, taulukko 11. Vertailun perusteella pyritään arvioimaan mahdollisten kontaminanttien lähdettä sekä arvioimaan mahdollisten ilmanlaatua parantavien toimenpiteiden tarpeellisuutta.

Malmgårdin Panimo sijaitsee keskellä luomupeltoja, raikkaan maalaisilman lähteellä, eli keskellä tuulista laakson notkelmaa, jossa mikro-organismeja kyyditsevä tuuli puhaltaa ne vanhan navetan seinänraoista panimoon. Talvisin panimojen ilmanlaatu on huomattavasti loppukesää parempi. Loppukesän helteet kasvattavat mikrobien määrää panimojen huoneilmassa noin kaksinkertaiseksi.

Tuotannon aikana huoneesta, lattialta ja muilta pinnoilta nousee ilmaan mikrobeja, jotka nostavat huoneen mikrobimäärää. Mallaspöly on yksi yleisimmistä mikrobiologisten kontaminanttien lähteistä. Mallaspöly on hyvin potentiaalinen kontaminanttilähde. Sen joutuminen jäädytettyyn vierteeseen voi aiheuttaa hiivakierrossa kasvavan kontaminanttiriskin.

Panimon huoneilman mikrobiologista laatua arvioitiin alkukeväällä ennen päivän tuotannon aloittamista, mäsäyksen alussa, jolloin mallaspölyn määrä on suurimmillaan, pullotuksen aikana ja eri tuotantotiloista, sekä keittolaitteiston pesun jälkeen.

Näytteet otettiin MAS100 Airsampler-laitteella (EMD Chemicals Inc.) 10 min ajan pumpulla 28,3 litraa minuutissa. Näytteet otettiin PCA (kokonaismikrobi määrä), UBA (Bakteerit, Oxoid Ltd.) ja YM-agareille (Hiivat ja homeet, Oxoid Ltd.) ja inkuboitiin 28,2 °C 6 vrk ajan.

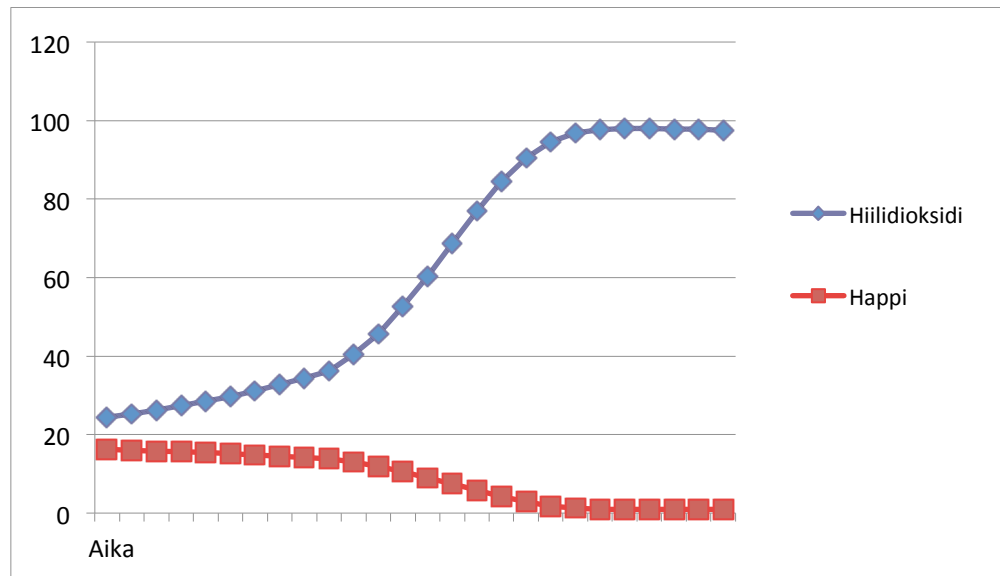
6.1.2 Varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu

Ilman kemiallinen laatu on kriittinen varastotankeissa ja pakkauksessa. Kokeellisessa osiossa keskityttiin varastotankkien kemiallisen hapen osapaineen määrittämiseen varastotankkeihin raaka-oluen siirron jälkeen jäävästä ilmasta. Samalla arvioitiin nykyisten toimintamallien soveltuvuutta minimoimaan hapen osapaine tankeissa ennen paineistamista.

Varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu ja hapen osapaineen määrä on hyvin tärkeä osa-alue oluen säilyvyyden kannalta. Panimossa hapen määrän minimoimiseksi käytettäviä toimintatapoja ovat

- Varastotankin paineistus hiilidioksidilla ennen tuotesiirtoa pesupallon kautta.
→ Oletetaan, että kaasut kerrostuvat varastotankkiin molekyylipainon mukaan, eli hiilidioksidi painuu alas, ja luo ”puskurin”. Tällöin siirrettävä tuote työntää hapen ulos.
- Varastotankin paineistus hiilidioksidilla pohjahanasta, jolloin virtaava hiilidioksidi työntää hapen ulos pesupallon kautta.
→ Manometrillä mitattuna tankin tilavuus ajetaan täyteen hiilidioksidia, jolloin hiilidioksidi ajaa ilman ulos.

Oletusten mukaan varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu vaihtelisi siirron aikana kuvan 16 mukaisesti.



Kuva 16 Oletus hapen ja hiilidioksidin osapaineiden (%) kehittymiselle varastotankkeissa raaka-oluen siirron aikana. Malli.

Näytteet otettiin GA 2000 Plus (Geotech) kaasuanalysaattorilla koko siirron ajan. Ilman varastotankit paineistusta ennen siirtoa ja ilman paineistusta, sekä paineistamisen onnistumista.

Mittausajo toteutettiin tuotesiirron aikana. Mittaväli oli 1 min. Tankista ulostuleva ilma johdettiin kaasuanalysaattorin läpi. Kaasuanalysaattori analysoi virtauksesta hiilidioksidipitoisuuden ja laskennallisen happipitoisuuden.

6.2 Pintahygienian arviointi ja ATP-luminometrin käyttöönotto

Prosessilaitteiden hygieniaa ja CIP-pesujen tehoa pyrittiin arvioimaan käyttönottamalla ATP-luminometri. ATP-luminometri mittaa lusiferaasin kuluttaman adenosiinitrifosfaatin muodostamaa bioluminesenssia. Se kertoo kuinka paljon eloperäistä materiaalia on näytteessä. Nykyään ATP-luminometrit ovat kannettavia, hyvin yksinkertaisia ja helppokäyttöisiä laitteita. Luminometrin heikko puoli on, että niiden muodostama tulos ei ole vertailukelpoinen muiden laitevalmistajien kanssa. Tuloksen yksikkö RLU, eli relative light units, on suhteellinen lusiferaasin muodostama valon määrä.

Prosessin puhtautta arvioitiin ottamalla pyyhkäisynäyte fermentoreista, varastotankeista, pullotuskoneesta ja prosessilaitteista esim. letkut, ennen pesuja, pesun jälkeen ja desinfioinnin jälkeen. Pyyhkäisynäyte otettiin UltraSnap-pikatestillä (Hygiena) 100 cm² alueelta. Pikatestiä ei tarvitse valmistella ennen pyyhkäisynäytteen ottoa. ATP-luminometrin käyttöönotossa ensimmäisenä määritetään kylmän prosessiveden RLU-arvo ja verrataan sitä pestyyn pintaan. Prosessiveden RLU-arvo määritettiin AquaSnap-pikatestillä (Hygiena). Desinfioidun pinnan tulisi näyttää 0 RLU. Huuh-

deltu tankki on ns. likainen. Tärkeintä on kuitenkin määrittää kriittiset rajat, mikä on ns. GO/NO-GO-rajaa, eli mikä RLU-arvo vastaa puhdasta ja likaista astiaa.

	Hyvä	Välttävä	Hylätty
Kriittiset kohteet: Pestyt sairaala-instrumentit, Täyttösuuttimet, Leikkurit Terät, Venttiilit	< 10	10 - 20	> 20
Hygieniakohteet: Käsittelytasot ja -linjat, astiat Leikkuulauta, Työvälineet Suurkeittiö	< 20	20 - 40	> 40
Saniteetikohteet: Pesun jälkeen	< 40	40 - 60	> 60

Taulukko 12 Laittevalmistajan antamia esimerkkejä ATP-määrittämisen kriittisistä rajoista, SystemSURE 2.

ATP-luminometrin käyttöönotossa määritettiin ensin puhtaustasot ja verrattiin laitevalmistajan antamiin esimerkkeihin, jotka on esitetty taulukossa 12. Laitteeksi valikoitui kustannustehokkuutensa ja toistettavuuden perusteella SystemSURE 2, joka havaitsee 1×10^{-15} mol ATP.

ATP-luminometrin käyttöönotossa käytettiin referenssinä myös Boulton & Quain (2006) Bass Brewery Ltd. julkaisua ATP-luminometrin käytöstä prosessihygienian ja pesutehon arviointimenetelmänä. Kriittiset rajat Bass Brewery Ltd. Biotrace-luminometrillä: 150 RLU hyvä, 150 – 299 RLU hyväksytty ja ≥ 300 RLU hylätty. Biotrace-luminometri havaitsee $3,5 \times 10^{-15}$ mol ATP.

6.3 Pullotuskoneen puhtaus

Pullotuskoneen puhtaus on hyvin kriittinen tekijä pakatun tuotteen säilyvyydessä. Pullotuskoneen puhtautta arvioitiin pullottamalla steriiliä vettä. Pullotettu vesi, 500 ml, suodatettiin ja suodatinkalvo viljeltiin PCA-alustalla (Oxoid) 37 °C 3 vrk ajan. Pullotuksella yritettiin simuloida tuotetta ja vastata kysymyksiin pullotuskoneen puhtaudesta: Onko pullotuskone puhdas? Onko täyttöpillien välillä eroa puhtaudessa? Väheneekö pullotuskoneen kokonaismikrobimäärä pullotuksen aikana?

Pullotuskoneen eri osista otettiin näytteitä (Taulukko 14), pulloista kerättiin huuhtelunäyte, ja pullotetusta steriilivedestä otettiin kontrollinäyte ja pulloista pillikohtaiset suodokset, yht. 16 kpl + rinnakkainen pintaviljely. Rinnakkaisia tehtiin 2 kpl, joihin pintaviljeltiin 1 ml näytettä per pullo.

7 TULOKSET JA TARKASTELU

7.1 Ilmanlaatu

7.1.1 Panimon mikrobiologinen ilmanlaatu

Mikrobiologisen ilmanlaadun arvioinnin tulokset on esitetty taulukossa 13. Tulokset ovat ilmoitettu kuinka monta pesäkettä muodostavaa yksikköä on yhdessä kuutiometrissä.

Kohde	PCA pmy/m ³		UBA pmy/m ³		YM+LA pmy/m ³	
Panimo, 1. Alku	25	11				
Panimo, 2. Alku	22	11				
Mäskäyksen alku	177	>1400	>1000	>1000	46	425
Kylmähuone	0	7				
Panimon Pesujen jälkeen	28	28				
Pakkaamo	22	50				
Pullotuksen aikana	424	340	318	92	4	18

Taulukko 13 Mikrobiologinen ilmanlaatu 20.4.2011, Malmgårdin Panimo.

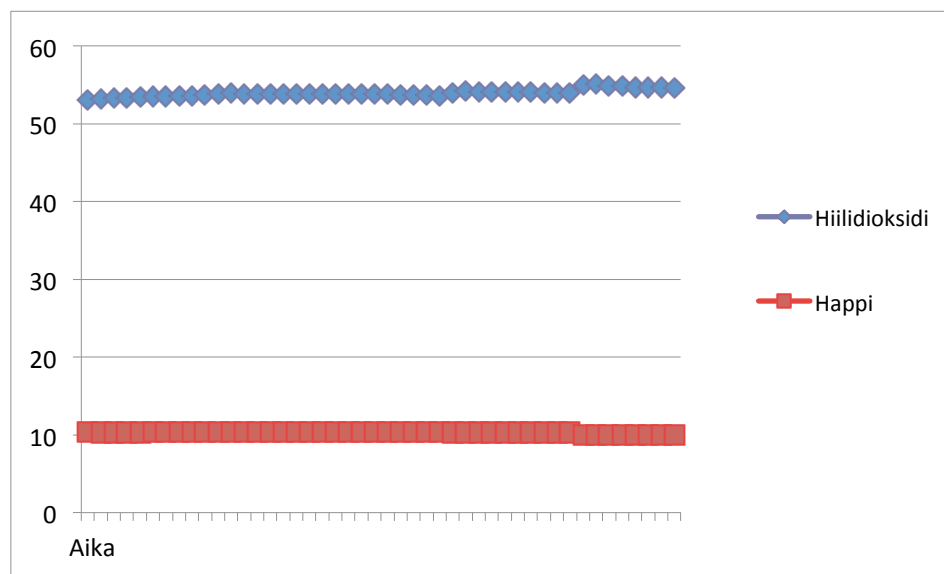
Verrattuna VTT:n tutkimukseen Haikara & Henrikson (1992) *Detection of airborne microorganisms as a means of hygiene control in the brewery filling area* (taulukko 11), panimon ilman mikrobiologinen laatu on hyvin saman tyyppinen. Kuitenkin mäskäyksen ja pullotuksen aikana tapahtuva mikrobien kokonaismäärän kasvu on moninkertainen. Pullotuksen aikana runsas paineilman käyttö, työntekijät ja pakkausmateriaalien käyttö nostattaa lattialta ja pinnoilta paljon mikro-organismeja ja pölyä yms. ilmaan.

Mäskäyksen alussa tapahtuva veden ja maltaan sekoittaminen tuottaa todellisen mikrobiologisen riskin panimolla, koska mallassuppilo on avonainen ja lähimpään fermentoriin on etäisyyttä n. 2 metriä. Panimolla käytetään vapaasti hengittäviä käymisastioita. Vaikka mallassuppilon ja fermentorin välissä on sisään tuleva ilmastointikanava, ilmastoinnin vaikutus hetkelliseen mikrobien määrän kasvuun on riittämätön. Mallaspölyn vaikutus huoneilmaan voidaan havaita myös fermentorien kannen päällä olevasta pölystä. Fermentorit kuumennetaan ennen käyttöä, mikä pienentää mikrobiologista riskiä. Myös tuotannon yhteydessä tehtävä vierteen stabiilisuustesti on ollut puhdas. Stabiilisuustestin perusteella voidaan panimon vierteen valmistus laitteistoa ja fermentoria pitää steriilinä.

Mallaspölyn vaikutukset on kuitenkin minimoitava peittämällä mallassuppilo ja parannettava fermentorien ominaisuuksia esim. vaihtamalla miesluukkujen tiivisteiden synteettiseksi kumiksi tai silikoniksi. Luonnonkumi on biofilmeille ja kontaminenteille hyvä tarttumisalusta, koska sen koostumus on hyvin huokoinen. Muita mahdollisia tuotantotilojen ilmanlaatua parantavia sovelluksia ovat tuloilman suodattaminen ja kesäaikaan tuloilman jäähdyttäminen.

7.1.2 Varastotankkien kemiallinen ilmanlaatu

Mittauskertoja tehtiin 10 kpl. Varastotankin kemiallisen ilmanlaadun keskimääräinen vaihtelu tuotesiirron aikana on esitetty kuvassa 17.



Kuva 17 Hapen ja hiilidioksidin todellinen osapaine (%) varastotankissa raaka-oluen siirron aikana.

Tehtyjen mittausten pohjalta voidaan todeta, etteivät alkuperäiset hypoteesit pidä paikkaansa. Hapen osapaine varastotankin kemiallisesta ilmanlaadusta oli todellisuudessa isompi. Kaasu on siis seos, eikä kerrostu. Ilmanlaadun manipulointi kemiallisesti on hankalaa pienpanimolosuhteissa. Hapen minimointiin ei löydetty mittausten yhteydessä pätevää toimintamallia.

Kuinka paljon molekulaarista happea varastotankkiin jää? Mallinnuksessa käytettiin n. 810 litran Grundy-tankkia, johon ajettiin 720 dm³ tuotetta. Ilman määräksi arvioitiin n. 85 dm³, ilmanpaine n. 1 atm. Kylmähuoneen lämpötila on n. 10 °C. Jos 10 % varastotankin ilmasta on happea, kokonaisuudessa on n. 11,5 g. Koska happi ei pääse tankista pois, se liukenee olueen. Näissä olosuhteissa maksimissaan happea liukenee olueen n. 16 mg/dm³ (Kuva 3). Jos kaikki 11,5 g happea liukenee, hapen konsentraatio on hieman alle 16 mg/dm³. Valmiin oluen happipitoisuuden tavoitearvo on 0,2 mg/dm³. Hapen pitoisuus on todella korkealla ja muodostaa potentiaalisen laaturiskin.

Koska olut on suodattamatonta, olueen jäävä hiivapopulaatio suojaa tuotetta molekulaariselta hapelta kuluttamalla sitä. Happi antaa kuitenkin muille mikrobeille myös mahdollisuuden kasvuun esim. villi-hiivoille. On hankalaa arvioida kuinka paljon happea todellisuudessa olueen liukenee. Laskennallisesti olut olisi kuitenkin pilalla. Jotta liuenneen hapen todelliseen määrään päästäisiin käsiksi, on hankittava analyysilaitteisto, jolla voidaan mitata liuenneen hapen määrä varastotankissa olevasta oluesta. Onneksi pienpanimomittakaavaan soveltuvia mittatarkkuudeltaan riittäviä ja helppokäyttöisiä analyysilaitteistoja on olemassa.

7.2 Pintahygienian arviointi ja ATP-luminometrin käyttöönotto

Ensimmäisenä määritettiin panimon kylmän veden RLU-arvo, jonkatulos oli 10 RLU. Kylmän veden puhtaus olisi verrattavissa sairaala-instrumenttien puhtauteen, mikä vaikuttaa epäloogiselta. Kriittisiä arvoja määrittäessä pesty varastotankki tai fermentori antoi RLU-arvoksi 0 – 40, joka korreloi osittain laitevalmistajan antamiin arvoihin verrattavan kohteen kanssa. Lekustosta otetuista mittauksista RLU-arvot olivat reilusti yli 200.

Verrattuna Biotrace-luminometriin, SystemSURE 2:n kriittiset rajat ovat huomattavasti matalammalla. Syynä tähän saattaa olla prosessien kokoerot ja laitteiden väliset erot RLU-arvojen ilmoittamisessa. Pesupallojen teho ja pesuihin käytettävä laitteisto, työntekijöiden määrä ja prosessin nopeus eroavat toisistaan niin paljon, että tarkempi vertailu ei ole kannattavaa. Bass Brewery Ltd. mittauksissa havaittiin kuitenkin pesutehojen parantuminen, eli RLU-arvojen laskeminen, tarkkailumittausten kuluessa. Työntekijöiden huolellisuuden kasvun vuoksi RLU-arvot pienenivät, lähes 50 RLU:ta. (Boulton & Quain 2006)

ATP-mittausten ja rajojen määrittäminen loi kohtuullisen hyvän kuvan prosessilaitteiston hygieniasta. Suurin hyöty ATP-luminometrin käyttöönotosta on paikallisten kohteiden puhtauden arviointi, kuten letkuston, tiivisteiden ja pullotuskoneen hankalasti pestävien kohteiden hygienian valvontaan. Luminometrin hyöty syntyy ajan myötä, kun paikallisten kohteiden pitkäaikaisessa seurannassa, jolloin raja-arvot tarkentuvat ja pesutehon heikkeneminen voidaan havaita selkeämmin.

7.3 Pullotuskoneen puhtaus

Pullotuskoneen CIP-pesun tehokkuutta arvioitiin steriilin veden pullottamisella. 500 ml pullotettu vesimäärä suodatettiin ja viljeltiin PCA:lle. Viljelyjen tuloksista ei löytynyt loogista suhdetta kokonaismikrobimäärän muuttumiseen. Pullojen pesäkemäärät vaihtelivat 4 – 300 pmy välillä. Pullotuskoneen kontrollinäytteet on esitetty taulukossa 14. Suodatuksen sijasta parempaan analyysitulokseen olisi saatettu päästä analysoimalla pulloitettu vesi virtaussytometrillä.

Taulukko 14 Kokonaisbakteerien pesäkemäärät pullotuskoneen eri kohteista otetuista näytteistä. Suodatus on tehty 500 ml pullotusnäytteestä. Toisessa sarakkeessa on esitetty 1 ml vesinäytteen (per pullo) pintaviljelystä saatu pesäkemäärä.

Näytteenotto paikka	Suodatus, pmy/ 500 ml plo	Rinnakainen, KA. pmy/ml pintaviljely
KEG	0	0
Pullotuskoneen letku	>300	1
Tyhjien pullojen keruu huuhtelunäyte	1	0
Syöttötankki, Surge	0	4
Snift, paineen tasaus letkusto	0	3
Täyttöpilli 1. (olutplo)	0 - 300	5
Täyttöpilli 2. (olutplo)	0 - 300	4
Täyttöpilli 3. (olutplo)	0 - 300	4
Täyttöpilli 4. (olutplo)	0 - 300	10

Pullotuskoneen puhtauden arviointi kokonaismikrobimäärityksellä tuotti silti käytettävää tietoa. Ensimmäisenä todettiin pullotuskoneen olevan epäpuhdas pesusta ja desinfioinnista huolimatta. Toiseksi rajattiin panimossa oleva kontaminanttilähde, letkusto. Vaikka letkut ovat elintarvike-laatua, ne ovat huokoista materiaalia ja keräävät ajan kanssa orgaanista materiaalia ja mahdollistavat biofilmien muodostumisen. Letkustolle tehdään aika-ajoin kuumennus, mutta ajan kuluessa letkuja ei saa riittävän puhtaaksi. Letkujen mikrobiologisen puhtauden varmistamiseen kokonaismikrobimääritys on liian työläs panimo-olosuhteissa. Tähän tarkoitukseen ATP-määritys on oletettavasti parempi.

Pullotuskoneen hygienian parantamiseksi pyritään määrittämään mitä mikrobeja siellä on. Mikäli kontaminantti on panimohiiva, ei pakatun tuotteen laaturiski ole pahin mahdollinen. Jos kontaminantti on bakteeri tai villihiiva, pullotettu tuote voi pilaantua nopeastikin, koska arvioitu happipitoisuus tuotteessa on iso. Tilannetta parantaa se, ettei tuotetta ole suodatettu. Tuotteen oma hiivapopulaatio, eli panimohiiva, suojaa olutta mikrobiologisilta kontaminanteilta ja kuluttaa molekulaarista happea.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Ensisijaisesti pienpanimon on pystyttävä takaamaan kestävä kokonaislaatu, joka erottaa tuotteen edukseen. Yleensä pienpanimoiden laatuarvoista maku on ensimmäinen periaate, jonka toteuttamisessa kompromisseille ei ole sijaa. Maku on kuitenkin vain yksi laatuominaisuus, joka voidaan pilata niin monella eri tavalla. Tärkeintä on määrittää minkä tekijöiden perusteella tuote koetaan ehdottomaksi laaduksi, ja millä toimenpiteillä laatu saavutetaan.

- Oluen laatuominaisuuksiin vaikuttava kokonaisuus muodostuu pääosin käytetyistä raaka-aineista, kuten maltaasta, korvaavista uutelahteista, humalasta, prosessivedestä ja panimohiivan metabolian tuotteista. Muita laatuun vaikuttavia tekijöitä ovat kontaminaatiot tai prosessihäiriöt, joiden vaikutukset lopputuotteeseen ja prosessiin voivat olla kohtalokkaita.
- Koska käsitys oluen laadusta vaihtelee, on hyvä tuntee ne tekijät, jotka ilmentävät niitä ominaisuuksia, mitkä kohderyhmä mieltää laaduksi.

Fysikaalis-kemiallisia laatuominaisuuksia:

- Alkoholipitoisuus on oluen kriittisin suure. Se määrittää kuluttajalle oluen vahvuuden. Vierteen valmistuksessa uutensaanto määrittää kantavierrevahvuuden. Kantavierrevahvuus ilmaisee kuinka paljon vierteessä on maltaasta uutettuja sokereita. Kun hiivan käymisaste on tiedossa, voidaan kantavierteen avulla määrittää alkoholipitoisuus. Absoluuttinen käymisaste voidaan määrittää pienpanimomittakaavan soveltuvammin mittaamalla oluen alkoholipitoisuus tislamalla.
- Väri on oluen suurin yksittäinen laatuominaisuus vaikuttava fysikaalinen ominaisuus. Se kertoo jo kohtalaisen paljon kuluttajalle oluen mausta ja aromeista. EBC-värianalyysi.
- Hapettuminen on oluella kohtalokasta. Se nopeuttaa oluen pilaantumista hapettamalla aromaattisia yhdisteitä, sameutta muodostavia fenoleja ja lisäämällä pilaajamikrobien riskiä. Sameus, eli kolloidinen tai ei-biologinen epävakaus, on kirkkauden vastakohta. Sameus voi olla joko biologista tai kolloidista. Liuenneen hapen määrä, sameuden muodostuminen pakkauksessa ja varastoinnissa sekä kokonaismikrobien määrä ovat yhteydessä.
- Hiilidioksidi on oluen kannalta tärkein prosessikaasu. Se raikastaa oluen makua, vaikuttaa eniten sen suutuntumaan ja mahdollistaa vaahdon muodostumisen.
- Oluen vaahto on luultavasti yksi eniten kuluttajaan vetoavista laatuominaisuuksista. Vaahto luo ensimmäisen kosketuksen oluen aromeihin ja suutuntumaan. Hiilidioksidin määrä ja oluen vaahtoaminen korreloivat osittain keskenään. Näiden yksittäisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien yhteisvaikutusten tarkastelu.
- Oluen katkeruus on humalan alfa-happojen isomeerien luoma suutuntuma. Oluen katkeruus on oluen valmistajalle hyvin tärkeä, koska se tasapainottaa maltaan luomaa makeutta ja tekee näin oluesta juotavamman. Humala luo myös yrttimäisiä miellyttäviä aromeja ja flavooreita, jotka luovat oluesta houkuttelevamman.

- pH:n merkitys oluen valmistamisessa on valtava. Se vaikuttaa moneen eri osa-alueeseen ja sitä kautta antaa kuvan prosessinkulusta ja sen vaiheista. Prosessihäiriöiden ennakoiminen.

Laadunvalvonnan aloittaminen:

- Ensimmäisenä kannattaa rajata tuotteen ominaisuudet, joissa vaihtelu on suurempaa ja vaikutus kokonaislaatuun merkittävämpi.
- Prosessin toimivuuden taso on pystyttävä osoittamaan ja tarvittaessa muuttamaan siten, että tuotanto pystyy vastaamaan laadullisesti valmistettavaa tuotetta.

Kun prosessiolosuhteiden, prosessin suorituskyvyn ja fysikaalis-kemialliset laatutekijöiden valvonta on suunniteltu ja toteutettu hyvin, tuotteen efektiivinen laatu ilmenee edukseen.

Kokeellisessa osiossa tutkittiin prosessin suorituskyvyn ja prosessiolosuhteiden tasoa.

Näillä osa-alueilla löydetyistä epäkohdista voitiin tehdä useita muutoksia toimintatapoihin, jotka osaltaan parantavat prosessin suorituskykyä. Esimerkiksi pullotuskoneen ja letkustojen kuumentaminen ja hygienian valvominen luminometrillä vaikuttavat suoranaisesti varastoidun ja pakatun oluen kokonaislaatuun.

LÄHTEET

- Back, W. 1994. Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil 1. Kultivierung/Methoden, Brauerei, Winzerei. Verlag Hans Carl, Nurnberg 165 p.
- Bamforth, C. W. 1985. Journal of Institute of Brewing.
- Bamforth, C. W. 2004. The relative significance of physics and chemistry for beer foam excellence: Theory and practice. Journal of the Institute of Brewing.
- Bamforth, C. W. 2006. Scientific Principles of Malting and Brewing. St. Paul, Minnesota: American Society of Brewing Chemists.
- Bamforth, C. W., Russell, I. & Stewart, G. G. 2009. Beer: A Quality Perspective. Burlington, Massachusetts: Elsevier Inc.
- Basarova, G. 1990. The structure-function relationship of polymeric sorbents for colloidal stabilization of beer. Food Structure, 9, 175 – 194.
- Bech, L. M., Vaag, P., Heinemann, B. & Breddam, K. 1995. Throughout the brewing process barley lipid transfer protein 1 (LTP1) is transformed into a more foam promoting form. Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Brussels, 25 , 561 – 568.
- Boulton, C. & Quain, D. 2006. Brewing Yeast and Fermentation. Oxford: Blackwell Publishing.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R. 2004. Brewing Science and Practice. Cambridge, England: Woodhead publishing limited. Boca Raton, USA: CRC Press LLC.
- Buckee, G. K. 1989. Identification of hazes, turbidities and sediments in beer. BRFI.
- Chapon, L. 1994. The mechanics of beer stabilization. Brewers' Guardian, 123, 46 – 50.
- De Freitas, J. Wintz, H. Kim, J.H. Poynton, H. Fox, T. & Vulpe, C. 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. Biometals. 2003 Mar. USA: Department of Nutritional Science, University of California, Berkeley, California. Viitattu 13.1.2011. PubMed-tietokannassa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572678>
- Delgado-Vargas, F. & Lopez, O.P. 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press: Boca Raton, FL.

Delvaux, F., Deams, V., Vanmachelen, H., Neven, H. & Derdelinckx, G. 1995. Retention of beer flavours by the choice of appropriate glass. Brussels: Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 25.

De Jong, J. & Put H. M. C. 1980. Biology and Activities of Yeasts. Society for Applied Bacteriology Symposium series No. 9. Skinner F.A., Passmore S.M. and Davenport R.R. (eds). London: Academic Press.

Doner, L. W., Becard, G. & Irwin, P. L. 1993. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 753 – 757.

Douma, A. C., Mocking-Bode, H. C. M., Kooijman, M., Stolzenbach, E., Orsel, R., Bekkers, A.C.A.P.A., Angelino, S.A.G.F., 1997. Identification of foam stabilizing proteins under conditions of normal beer dispense and their biochemical and physiochemical properties. Teoksessa Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Maastricht, 26 , pp. 671–679.

Priest, F.G. & Campbell, I. 2003. Brewing Microbiology, 3rd edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Fisher, S., Hauser, G. & Sommer, K. 1999. Beer foam quality. European Brewing Convention, Monograph No. 27. Amsterdam.

Fix, George. 1999. Principles of Brewing Science. Brewers Publications: Boulder, Colorado

Fruhner, H., Wantke, K.D., Lunkenheimer, K., 1999. Relationship between surface dilational properties and foam stability. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 162, 193–202.

Gibbs, J.W. The Collected Works of J. Willard Gibbs. Thermodynamics; Longmans, Green and Co.: New York, 1928

Haikara & Henrikson 1992. Detection of airborne microorganisms as a means of hygiene control in the brewery filling area. 410, VTT.

Hughes, P. S. & Baxter, E. D. 2001. Beer: Quality, safety and nutritional aspect. Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.

Holle, S. R. 2003. A Handbook of Basic Brewing Calculations. The Master Brewers Association of the Americas. St. Paul, Minnosota.

Hough, J. H., Briggs, D. E., Stevens, R. & Young, T. W. 1982. Malting and Brewing Science vol. 2, Hopped Wort and Beer, 2nd edition. Chapman & Hall.

Jones, S.F., Evans, G.M. & Galvin, K.P. 1999. Bubble nucleation from gas cavities – a review. Adv. Colloid Interface Sci. 80, 27–50.

Lewis, M.J. & Bamforth, C.W. 2007. *Essays in Brewing Science*. US: Springer. pp. 28–42.

Liger-Belair, G. Polidori, G. & Jeandet, P. 2008. Recent advances in the science of champagne bubbles. *Chem. Soc. Rev.* 37 (11), 2361–2580.

Loughrey, K. 2000. The measurement of color. *Teoksessa Natural Food Colorants* (toim. Lauro G. J. & Francis F. J.), s. 187 – 218. Marcel Dekker, Inc.: New York, NYC.

Lusk, L. T., Goldstein, H. & Ryder, D. 1995. Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53, 93 – 103.

Lusk, L. T., Ting, P., Goldstein, H., Ryder, D. & Navarro, A. 1999. Foam tower fractionation of beer proteins and bittering acids. *European Brewing Convention Monograph*, XXVII, Amsterdam, 166–187.

Lusk, L. T., Duncombe, G. R., Kay, S. B., Navarro, A. & Ryder, D. 2001a. Barley β -glucan and beer foam stability. *Journal of the American Society Brewing Chemists*, 59, 183 – 186.

Lusk, L. T., Goldstein, H., Watts, K., Navarro, A. & Ryder, D. 2001b. Monitoring barley lipid transfer protein levels in barley, malting and brewing. *Teoksessa Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Budapest*, 28, 663 – 672.

Lusk, L. T., Cronan, C. L., Ting, P. L., Seabrooks, J. & Ryder, D. 2003. An evolving understanding of foam bubbles based upon beer style development. *Teoksessa Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Dublin*, vol. 29, paper 79.

Markkula, T. 2007. *Oluen valmistaminen, Opetusmoniste, versio 5*. Olutkoulu Tuoppi.

McMurrough, I., Hennigan, G. P. & Loughrey, M. J. 1993. Contents of simple, polymeric and complexed flavanols in worts and beers and their relationship to haze formation. *Journal of the Institute of Brewing*, 89, 15 – 23.

McMurrough, I. 1995. Colloidal stabilization of beer. *Ferment*, 8, 39 – 45.

McMurrough, I. & O'Rourke, T. 1997. New insight into the mechanism of achieving colloidal stability. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the America*, 34, 271 – 277.

Murray, B.S., 2007. Stabilization of bubbles and foams. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 12, 232–241.

Myers, Richard L. & Myers, Rusty L. 2007. *The 100 most important chemical compounds: a reference guide*. Westport, Conn.: Greenwood Press.

Priest, F.G. & Campbell, I. 2003. *Brewing Microbiology*, 3rd edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Prins, A. 1988. Principles of foam stability. Teoksessa *Advances in Food Emulsions & Foams* (toim. Dickinson E. & Stainsby G.). London, England: Elsevier Applied Science.

Prins, A. & van Marle, J. T. 1999. Foam formation in beer: Some physics behind it. *Beer Foam Quality*. vol. Monograph 27. Amsterdam, Netherlands; Fachverlag Hans Carl, Nurnberg.

Ratilainen, M. 1986. *Vesikemian perusteet*. Oulun Yliopisto.

Roberts, R. T. 1976. Interaction between beer protein and isohumulone. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 282.

Ronteltap, A., Hollemans, M., Bisperink, C. G. J. & Prins, A. R. 1991. Beer foam physics. *MBAA Tech. Quart*, 28.

Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A., 2005. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 111 (2), 105–111.

Sarlin, T., Vilpola, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Haikara, A., 2007. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. *Journal of the Institute of Brewing*. 113 (2), 147–153.

Savioja T. 1972. *Vesikemian perusteita*. Kunnallinen terveydenhuoltoyhdistys.

Shokribousjeina, Z., Deckers, S. M., Gebruers, K., Lorgouilloux, Y., Baggerman, G., Verachtert, H., Delcour, Jan A., Etienne, P., Rockd, J.-M., Michiels, C., Derdelinckx, G. 2010. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *The Associations of the Former Students of the Belgian Brewing Schools*. London: Elsevier.

Siebert, K. J., Carrasco A. & Lynn, P. Y. 1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44.

Siebert, K. J. 1997. Beer clarity stability. *Proceedings of the 6th Convention of The Institute of Brewing, Commonwealth & South Africa Section, Durban*, 67 – 78.

Siebert, K. J. & Lynn, P. Y. 1998. Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpyrrolidone and haze-active protein. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56, 24 – 31.

Smith , R. J. Davidson , D. , and Wilson J. H. (1998) Natural foam stabilizing and bittering compounds derived from hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56 , 52 – 57.

Sorensen, S. B., Bech, L. M., Muldberg, M., Beenfeldt, T. & Breddam, K. 1993. Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 30, 135–145.

Taylor, G.T. and Marsh, A.S. 1984. *Journal of the Institute of Brewing*. 90. USA

Titze, J., Christian, M., Ilberg, V., Jacob, F., et al., 2010. Particle analysis- A combined method to analyze the colloidal characteristics of particles. *Brew. Sci.* 63, 62–71.

Todd , P. H. Held, R. W. & Guzinski, J. G. 1996. The development and use of modified hop extracts in the art of brewing. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 33.

Tuoteseloste CM0651. Universal Beer Agar, Oxoid.

Tuoteseloste CM0920. Yeast and Mould Agar, Oxoid.

Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte & van Dijken, J. P. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. ASM.

Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J. & Organ, G. 1999. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC-MS and HPLC-Electrochemical detection. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 89 – 99.

Wyszecki, G. & Stiles, W.S. 1967. *Color Science. Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulas*. John Wiley & Sons: New York, NYC.

ESIMERKKI KRIITTISESTÄ KONTROLLIPISTEESTÄ

Prosessivaihe/Valvontapiste	Riskit	Kuvaus	Mittausmenetelmä ja kuinka usein	Raja-arvot ± 0,2 tavoitearvosta	Toimenpide Laimentaminen tai kasaankeitäminen. Laimentaminen toisella keitto erällä varastoinninaikana.	Dokumentointi Keittöpöytäkirja	Vertailu 1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Refraktometrin ja hydrometrin tuloksen vertailu.
Keitto: Kantavierrevahvuus	Kemiallinen	Liian suuri kantavierrevahvuus nostaa käymisastetta, jolloin lopputuotteen alkoholipitoisuus nousee liian suureksi. Liian pieneksi jäänyt kantavierrevahvuus lassee alkoholipitoisuutta.	Joka keittion lopussa, refraktometri ja hydrometri	± 0,2 tavoitearvosta	Laimentaminen tai kasaankeitäminen. Laimentaminen toisella keitto erällä varastoinninaikana.	Keittöpöytäkirja	1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Refraktometrin ja hydrometrin tuloksen vertailu.
Fermentointi: Alkoholipitoisuus	Kemiallinen	Alkoholipitoisuus vaihtelee kantavierteen ja käymisasteen mukaan.	Joka fermentorista ennen jäähdyttämistä. Tislamalla, KV%/NLKA tai uutejäämän avulla laskennallinen pitoisuus, hydrometri.	± 0,36 tavoitearvosta	Sekoittaminen toiseen keittoerään	Keittöpöytäkirja	1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Tislauksen ja KV%/NLKA:n vertailu
Pakkausvalmistus: Uutejäämä	Kemiallinen	Koska tuote on suodattamaton, olut jatkaa käymistään mikäli käymiskelpoisia sokereita on jäljellä. Liika uutejäämä voi nostaa alkoholi- ja hiilidioksidipitoisuutta merkittävästi.	Ennen pakkaamista ja seuranta myyntiajan aikana näytepakkauksista. Hydrometri.	+0,1 % NLKA tuloksesta Vertailu luennenn hapen määrään varastotankissa, ja miläli pakattu sameuden kehittymiseen pakkauksessa, sameusmittari tai silmäääräinen arviointi. Hiilidioksidipit. vertailu.	Pakkaaminen vain paineastioihin, keg. Keittoerien sekoittaminen.	Keittöpöytäkirja (varastotankki), Pakkauspöytäkirja (pakkautankki)	1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Pakattun tuotteen säilyvyyden aistinvarainen seuranta.
	Fysikaalinen	Käyminen tuottaa hiilidioksidia, jolloin tuotteen hiilidioksidipitoisuus voi nousta. Paineen nousu pakkauksessa voi johtaa ylikuohumiseen, pakkauksen hajoamiseen tai murhin laatuvirheisiin.	Hiilidioksidin seuraaminen myyntiajan aikana, ja rimaakainen hydrometrillä tehty mittaus uutejäämistä. Joka pakkauserä ja pakkautankista ennen pakkausta vertailua varten.	<3 vol-CO ₂ pullossa Mittaus varastotankista vertailua varten.	Hiilidioksidipitoisuuden pienentäminen, sekoittaminen toiseen pakkauserään.	Pakkauspöytäkirja	1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Pakattun tuotteen säilyvyyden aistinvarainen seuranta.
	Mikrobiologinen	Uutejäämän lasku pakkauksessa alle NLKA tuloksen indikoi mikrobiologisesti kontaminoitua, joka voi käyttää jäljellä olevia ravintoa.	Mikrobiologiset määritykset: kokonaismikrobimäärä, bakteerit ja hiivat/homeet sekä panimohiivan määrä. Tarvittavat elatusalustat.	< 10 pmy bakteerit 0 pmy villihiivat Vertailu luennenn hapen määrään varastotankissa, ja miläli pakattu sameuden kehittymiseen pakkauksessa, sameusmittari tai silmäääräinen arviointi.	Kontaminoituneen oluen hävittäminen, pakattun tuotteen markkinoilta pois vetäminen. Säilyvyyden aistinvarainen lyhentäminen. Ei pakata.	Pakkauspöytäkirja	1 krr/a vertailu amm. laboratoriossa Pakattun tuotteen säilyvyyden aistinvarainen seuranta.