



Oluen kypsytystynnyreiden puhdistusmenetelmän kehitys ja testaus

Markku Makkonen

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2022

Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

MAKKONEN, MARKKU:

Oluen kypsytystynnyreiden puhdistusmenetelmän kehitys ja testaus

Opinnäytetyö 26 sivua
Toukokuu 2022

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää oluen kypsytystynnyreille puhdistusmenetelmä. Tarkoituksena oli testata erilaisia puhdistusmenetelmiä ja arvioida niiden vaikutusta tynnyreiden aromeihin. Puhdistusmenetelmä haluttiin kehittää tynnyreiden uudelleenkäyttöä varten. Työ tehtiin Pyynikin Brewing Companyn toimesta.

Menetelmän kehityksessä käytettiin kolmea tammitynnyriä, joissa oli aiemmin valmistettu bourbonia. Tynnyreitä käsiteltiin kolmella eri puhdistustavalla. Ensimmäinen tynnyri käsiteltiin ensin höyryttämällä, sitten natriumvetykarbonaatilla ja lopuksi sitruunahapolla. Toisen ja kolmannen tynnyrin käsittelyssä höyrytys jätettiin pois ja natriumvetykarbonaatti vaihdettiin natriumperkarbonaattiin. Toisen ja kolmannen käsittelyn erotti natriumperkarbonaatin pitoisuuden muutos. Sitruunahapon pitoisuus pysyi samana toisessa ja kolmannessa tynnyrissä. Tynnyreiden puhdistuksen tehokkuutta tarkasteltiin mikrobiologisilla testeillä.

Puhdistusmenetelmissä käytettävien kemikaalien vaikutusta tynnyrin aromeihin testattiin aistinvaraisin testein. Koejärjestelyssä käytettiin bourbon-tynnyrin lastuja, joita liuotettiin vedessä, natriumvetykarbonaattiliuoksessa, natriumperkarbonaattiliuoksessa sekä sitruunahappoliuoksessa. Näistä liuoksista pyrittiin haistelemalla arvioimaan tynnyrin aromien voimakkuutta.

Ensimmäisen tynnyrin puhdistusmenetelmä ei sovellu tynnyreiden puhdistukseen mikrobimäärien nousun vuoksi. Toisen ja kolmannen tynnyrin tuloksissa ei ollut suuria eroja. Kummankin tynnyrin mikrobimäärät vähenivät huomattavasti, ja näissä käytetyt puhdistusmenetelmät olivat hyvin tehokkaita. Näiden menetelmien heikkoutena on niissä käytettävien kemikaalien vaikutus tynnyrin aromeihin. Natriumperkarbonaatin huomattiin vaikuttavan tynnyrin aromien vähenemiseen.

Muita puhdistusmenetelmiä ovat esimerkiksi tynnyrin uudelleen hiillostaminen, rikkipareen polttaminen sekä otsonin käyttäminen. Näiden menetelmien on havaittu poistavan mikrobikasvustoja tynnyreistä, mutta nämä käsittelyt vaativat erikoisjärjestelyjä, esimerkiksi hyvin ilmastoituja tai paloturvallisia tiloja.

Asiasanat: tynnyri, olut, aistinvarainen tutkimus

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

MAKKONEN, MARKKU:

Developing and Testing Cleaning Methods for Barrels Used for Aging Beer

Bachelor's 26 pages
May 2022

The purpose of this thesis was to develop a cleaning method for barrels used for aging beer. The objective was to test different cleaning methods and to evaluate the loss of aroma caused by the cleaning reagents. This thesis was commissioned by Pyynikin Brewing Company.

Three barrels were used in the cleaning method development. These barrels were previously used for making bourbon. The barrels were processed in three different ways. The first one was processed with steam, then sodium bicarbonate and finally with citric acid. The second and the third barrel were processed with sodium percarbonate and citric acid. The steaming phase was not applied on these two barrels. The difference between the second and third barrel was in the concentration of the sodium percarbonate. The concentration of the citric acid was the same through all the barrel tests. The effectiveness of the cleaning methods were analysed through microbiological tests.

The cleaning methods' effects on the aroma of the barrels were examined with sensory tests. Chips of bourbon barrels were soaked in water, sodium bicarbonate, sodium percarbonate and citric acid solutions. The soaked solutions were then examined with a smell test to find out if any of the aromas were diminished because of the cleaning chemical.

The results of cleaning the first barrel were not good, as the microbe count started to rise after adding the cleaning agent. The results between the second and the third barrel were highly similar to each other, as microbial growth level dropped massively in both barrels. The weakness of each cleaning technique was that the aroma of the barrel was also decreased. The diminishing of the barrel aroma was due to the use of sodium percarbonate, as discovered in the sensory tests.

The cleaning methods were effective, but the loss of aroma raises a few questions. There are other ways of cleaning the barrels, for example re-toasting the barrel or burning a sulfur stick to form sulfur dioxide. Studies have shown that these cleaning methods decrease the bacterial amount in the barrels, but they also require special arrangements. For example fire-safety issues should be taken into consideration and good ventilation is required to prevent the release of hazardous gases.

Key words: barrel, beer, sensory testing

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	TEORIA	6
2.1	Tynnyrit	6
2.1.1	Bourbon-tynnyri	6
2.1.2	Esteröinti	7
2.2	Puhdistusmenetelmät.....	7
2.2.1	Höyrytys	8
2.2.2	Kemikaalit.....	8
2.3	Oluen pilaajamikrobit.....	8
2.3.1	Gram-positiiviset bakteerit	9
2.3.2	Gram-negatiiviset bakteerit.....	9
2.3.3	Hiivat	10
2.4	Mikrobiologiset testit.....	11
2.5	Aistinvaraiset testit	12
3	MENETELMÄN KEHITYS JA AISTINVARAISET TESTIT	13
3.1	Menetelmän kehitys	13
3.2	Aistinvaraiset testit	14
4	TULOKSET.....	15
4.1	B16 Tynnyri.....	15
4.2	B15 Tynnyri.....	16
4.3	B14 Tynnyri.....	17
4.4	Aistinvaraiset testit	19
5	TULOSTEN TARKASTELU	20
6	POHDINTA	22
	LÄHTEET.....	25

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Pyynikin Brewing Companyn toimeksiannosta. Työn tavoitteena on kehittää oluen kypsytystynnyreiden puhdistusmenetelmä. Työssä käytetään käytöstä poistuneita tammitynnyreitä, joissa on aiemmin valmistettu bourbonia. Opinnäytetyön tarkoituksena on testata puhdistusmenetelmiä mikrobiologisin testein ja arvioida testien vaikutusta tynnyrin aromiin aistinvaraisin testein.

Teoriaosiossa käytiin läpi bourbon-tynnyreiden, puhdistusmenetelmien, oluen pilaajamikrobien ja aistinvaraisten testien taustaa. Työn kokeellisessa osiossa testattiin puhdistusmenetelmiä ja tehtiin aistinvaraisia vertailuita eri menetelmissä käytettävillä liuoksilla. Puhdistusmenetelminä testattiin vesihöyryä, natriumvety- ja natriumperkarbonaatteja sekä sitruunahappoa neutraloimiseen. Menetelmiä testattiin mikrobiologisten testien avulla ja verrattiin saatuja tuloksia keskenään.

Panimoalalla on käynnissä kova kilpailu oluen myynnin suhteen. Uusia erikoisia makuyhdisteitä kokeillaan ja pyritään saamaan kuluttajien suosioon. Tynnyrikypsytyks on yksi vaihtoehto oluen maun ja aromien monimutkaistamiseen. Oluen tynnyrikypsyttämällä pyritään tuomaan olueen tynnyrin tai tynnyrissä aiemmin tuotetun tuotteen aromeja ja siten laajentaa oluen maku- ja aromiprofiilia. Tynnyrin puhdistusmenetelmän tulee olla tehokas, koska pienikin kontaminaatio voi pahimmassa tapauksessa pilata koko erän. Tynnyreiden kierrätys on ekologista ja puhdistusmenetelmän haluttiin olevan ympäristöystävällinen. Tynnyreiden puhdistuksessa on tärkeää pyrkiä säilyttämään tynnyrille ominaisia aromeja, joita tässä opinnäytetyössä käsitellään aistinvaraisten tutkimusten avulla.

2 TEORIA

2.1 Tynnyrit

Puisia tynnyreitä on käytetty satojen vuosien ajan oluen valmistukseen, säilytykseen ja kuljetukseen. Ajan kuluessa puiset tynnyrit ovat väistyneet varsinkin alumiinista valmistettujen tynnyreiden vallatessa alaa. Nykyään puiset tynnyrit ovat nousseet pienpanimoiden myötä takaisin yhdeksi osaksi oluen valmistusprosessia. (Work 2014, 195–198.) Tynnyreissä voidaan kypsyttää esimerkiksi perinteisiä belgialaisia Lambic-oluita tai muita hapanoluita. Näissä tapauksissa tynnyrin makua ei suoranaisesti haluta oluihin, vaan tynnyri toimii hapen avulla erilaisten mikro-organismien, kuten laktobasillien, etikkahappobakteerien ja *Brettanomyces*-hiivojen kasvun mahdollistajana. Nämä mikrobit tuovat oluihin hapanoluille tyypillisiä makuominaisuuksia. (Boessaert, Winne, Opstaele, Buyse, Verreth, Herrera-Malaver, Verstrepen, De Rouck, Crauwels & Lievens, 2021.)

Valmiiksi fermentoituneen oluen makua voidaan tehostaa tynnyrikypsytyksellä, jolloin tynnyreistä halutaan irtoavan aromeja ja makuja. Tynnyreistä voidaan saada esimerkiksi aiemmin tynnyrissä olleen tuotteen, kuten bourbonin, aromeja. Toisaalta oluihin voidaan haluta tynnyristä irtoavia makuja tai aromeja oluihin, kuten savun, vaniljan ja paahdetun puun. Tynnyrikypsytettujen hapanoluiden valmistuksen mahdollistavat mikrobit ovat myös yksi vaihtoehto makujen monimutkaistamiseen. (Boessaert ym, 2021)

2.1.1 Bourbon-tynnyri

Bourbon-tynnyreitä käytetään usein oluiden tynnyrikypsytyksessä, varsinkin tynnyreiden saatavuuden vuoksi. Bourbonin valmistusta säädellään laeilla, joiden vuoksi bourbonia saa kypsyttää vain uusissa amerikkalaisissa tammitynnyreissä. Tämän mahdollistaa hyvän tynnyreiden saatavuuden. Bourbon-tynnyreissä käytettävä puu kuivataan, jolloin puusta irtoaa helpommin haluttuja komponentteja. Tämän jälkeen puu paahdetaan ja hiillostetaan ennen tynnyrin lopullista kasaaamista. Tislaamot voivat itse määrittää puun kuivausajan, paahto- ja hiillosasteen haluamalleen tynnyrille. (Demoranville & Heist, 2021)

Tynnyristä irttaa monenlaisia kemiallisia yhdisteitä bourbonia kypsytettäessä, esimerkiksi puun selluloosa ja hemiselluloosa voivat hajota kypsytyksprosessin aikana. Sokereita, kuten glukoosia, fruktoosia, ksyloosia, galaktoosia ja arabinoo-sia on havaittu irttaavan tynnyreistä. Ensimmäisenä kypsytyksvuotena viineistäkin tuttu tanniini liukenee puusta nesteeseen, antaen tuotteelle suutuntumaa ja lisää katkeruutta. Hiilloksen alla puun ligniinit hajoavat kypsytyksen aikana erilaisiksi yhdisteiksi, esimerkiksi vanilliiniksi, joka antaa vaniljan makua lopputuotteelle. Bourbonissa on havaittu pieniä vivahteita kookoksesta, jonka muodostaa tammi-laktonien isomeerit. *Cis*-muoto antaa puisen ja maamaisen maun, kun taas *trans*-muoto pienen vivahteen selleristä. Näiden on havaittu johtuvan puun hiiltymisestä. Muita hiiltyneestä puusta irtovia yhdisteitä ovat esimerkiksi furfuraalit ja sykloteenit. Furfuraalit tuovat paahteista, karamellimaista ja makeaa makua, kun taas sykloteenit antavat vaahteran-, karamellin- ja lakritsantapaisia vivahteita tuotteeseen. (Demoranville & Heist, 2021)

2.1.2 Esteröinti

Esteröinnillä on iso merkitys lopullisen tuotteen maun ja aromien kannalta. Kypsytyksprosessissa puun ja tisleen orgaaniset hapot voivat reagoida alkoholin kanssa muodostaen estereitä, jotka vahvistavat aromeja. Tynnyrikypsytyks poistaa epätoivottuja komponentteja lopputuotteesta. Esimerkiksi dimetyylisulfidi, joka antaa säilyketomaattimaisen maun tuotteeseen, poistuu osittain haihtumalla vesimäisten ominaisuuksien avulla, mutta myös hapettumalla dimetyylisulfoksidiksi. Tämä yhdiste on lopulta hajuton, jolloin epätoivottu tomaattimaku poistuu lopputuotteesta. Tynnyrin ja tisleen tuomien aromi- ja makuyhdisteiden pitoisuudet heikkenevät ja yhdisteiden irtaaminen lopputuotteeseen hidastuu, mitä useammin tynnyreitä käytetään. (Demoranville & Heist, 2021)

2.2 Puhdistusmenetelmät

Tammitynnyreitä on vaikea puhdistaa niiden materiaalin, muodon ja rakenteiden vuoksi. Varsinkin tynnyrin pitkien lautojen ja päätyjen välistä aluetta on vaikea puhdistaa. Puu on materiaalina huokoinen ja voi sisältää mikrobikasvustoa usean

millimetrin syvyydessä. Esimerkiksi *Brettanomyces bruxellensis* on havaittu tynnyrin huokosissa 8 mm syvyydessä. (De Roos & De Vuyst, 2018). Tynnyreiden puhdistus riippuu myös tynnyrin käyttötarkoituksesta. Laktobasillien, etikkahappobakteerien ja *Brettanomyces*-hiivojen olemassaolo ei haittaa hapen-oluiden valmistusta ja on jopa suotavaa (De Roos & De Vuyst, 2018), mutta muissa tapauksissa niiden mikrobien on havaittu olevan oluen pilaajamikrobeja (Garofalo, Osimani, Milanovic, Taccari, Aquilanti & Clementi. 2015).

2.2.1 Höyrytys

Höyrytyksellä on havaittu osittain hiivoja tuhoava vaikutus tynnyrin puhdistukseen. Tutkimuksissa on havaittu eri höyrytysaikojen vaikuttavan elävien hiivasolujen vähenemiseen. Höyrytysajat vaihtelevat eri tutkimusten mukaan 5–30 minuuttiin, mutta varsinaista varmuutta höyrytyksen lopullisesta tehosta ei ole. Ongelmaksi muodostuu kaupallisten höyrytyslaitteiden höyrytehon epätasaisuus ja mahdolliset ”kylmät kohdat”, eli höyry ei pääse tynnyrin jokaiseen kohtaan tasaisesti mahdollistaen hiivasolujen säilymisen elinkelpoisena. (Stadler & Fischer, 2020)

2.2.2 Kemikaalit

Natriumperkarbonaattia pidetään yhtenä vaihtoehtona tynnyrien puhdistamiseen. Yleisesti kemikaali tunnetaan valkaisuaineena. Natriumperkarbonaatin liuotessa veteen syntyy natriumkarbonaattia ja vetyperoksidia. Näistä jälkimmäinen on reaktiivinen ja muodostuu reaktiivisia happiradikaaleja, jotka hapettavat solun ja aiheuttavat solujen tuhoutumista. Natriumperkarbonaatin hajotessa lopputuotteiksi muodostuu vettä ja natriumkarbonaattia, joiden vuoksi yhdistettä voi kuvata ympäristölle vaarattomaksi yhdisteeksi. Natriumkarbonaatti on emäksinen, jolloin sitruunahappoa käytetään tynnyrin neutralisoimiseen. (Stadler & Ficher, 2020).

2.3 Oluen pilaajamikrobit

Olut on mikrobien kasvualustana huono monesta eri syystä, kuten etanolipitoisuuden, humalan antimikrobisten ominaisuuksien sekä matalan pH:n vuoksi. Myös hapen määrä oluessa on matalalla tasolla, kun taas hiilidioksidin määrä on

suhteellisen korkea, jolloin oluessa viihtyvien mikrobien määrä on hyvin rajoittunut. (Garofalo ym, 2015)

2.3.1 Gram-positiiviset bakteerit

On kuitenkin mikrobeja, jotka pystyvät elämään oluen karuissa oloissa. Näistä esimerkkinä aiemmissa kappaleissa tutuksi tulleet laktobasillit, eli maitohappobakteerit. Laktobasillit ovat gram-positiivisia ja fakultatiivisia anaerobeja, jotka tuottavat maitohappoa ja saavat oluen maistumaan happamalta sekä saattavat sakeuttaa ja muuttaa oluen viskositeettiä. Fakultatiiviset anaerobit voivat käyttää happea aineenvaihdunnassa, mutta pystyvät selviytymään myös hapettomissa olosuhteissa. Humalasta liukenevat iso- α -hapot inhiboivat useita gram-positiivisia bakteereita, mutta esimerkiksi *Lactobacillus brevis* pystyy sietämään korkeitakin iso- α -happo pitoisuuksia (De Roos & De Vuyst, 2018). *L. brevis* on yleisin oluenpilaajalaktobasilli, sen on arveltu aiheuttavan noin 50 % oluen kontaminaatioista (Esmaeili, Mogharrabi, Safi, Sohrabvandi, Mortazavian & Bagheripoor-Fallah. 2015). Muita löytyneitä, mutta harvempia oluenpilaajalaktobasilleja ovat esimerkiksi *L. lindneri*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. malefermentans*, ja *L. curvatus*. (Garofalo ym, 2015)

Muista gram-positiivisista bakteereista on mainittava *Pediococcus*-suvun bakteerit sekä *Kocuria kristinae*. Näistä yleisin oluenpilaaja bakteeri on *P. damnosus*. Sen on arvioitu aiheuttavan noin 90 % *Pediococcus*-sukuisten bakteerien kontaminaatioista. *P. damnosus* pystyy sietämään korkeita iso- α -happo pitoisuuksia ja muodostaa virhemakuna voimaista diasetyyliä sekä aiheuttaa oluen sameutta. Muita *Pediococcus*-sukuisia oluenpilaajabakteereita ovat esimerkiksi *P. inopinatus* ja *P. dextrinicus*, joita havaitaan matalien etanoli- ja iso- α -happopitoisuuksien oluissa. *K. kristinae* pystyy *P. inopinatus* ja *P. dextrinicus* tavoin kasvaamaan vain matalien etanoli- ja iso- α -happopitoisuuksien oluissa ja vaatii yli 4.5 pH:n. Virhemakuna se tuottaa hedelmäistä makua. (Esmaeili ym, 2015)

2.3.2 Gram-negatiiviset bakteerit

Gram-negatiiviset oluen pilaajabakteerit voidaan luokitella kahteen eri ryhmään etikkahappobakteereihin, *Zymomonas*-lajin ja tiettyjen *Enterobacteriaceae*-lajin

bakteereihin sekä *Pectinatus*-, *Megasphaera*-, *Zymophilus*- ja *Selenomonas*-suvun bakteereihin. Ensimmäinen ryhmä on nykyisin huomattavasti haitattomampi johtuen oluen valmistuksen hapettomuudesta sekä kohonneesta hygieniastasosta ja tehokkaasta puhdistuksesta. Jälkimmäinen ryhmä sisältää obligatorisia anaerobeja, joiden ilmaantuminen on mahdollistunut siirryttäessä hapettomampiin prosesseihin. Obligatoriset anaerobit pystyvät kasvamaan vain hapettomissa olosuhteissa. (Hill 2015, 175)

Jälkimmäisen ryhmän bakteereista *Pectinatus*, *Megasphaera* ja *Selenomonas* ovat obligatorisia anaerobeja. *Pectinatus*-suvun bakteerit voivat olla hyvin haitallisia oluille. Niiden tiedetään pystyvän sietämään iso- α -happoja (Esmaeili, ym. 2015) ja ne voivat kasvaa pH:n ollessa minimissään 3,5 ja etanolin ollessa maksimissaan välillä 5,8 %–8 %. Niillä muodostuu aineenvaihdunnan lopputuotteena esimerkiksi propioni-, meripihka- ja maitohappoa sekä rikkivetyä ja muita rikkiyhdisteitä. Lopputuotteen haitta ilmenee mädäntyneen kananmunan hajuna. Samankaltaista maku- ja hajuhaittaa aiheuttaa myös *Megasphaera*-bakteeri. Sen aineenvaihdunnantuloksena on rikkivedyn lisäksi erilaiset hapot, kuten butaanihappo (voihappo), kapronihappo ja isovaleriaanahappo. *Megasphaera* bakteeri voi kasvaa pH:n ollessa matalimmillaan 4,1. *Selenomonas* bakteerien tiedetään tuottavan aineenvaihdunnan lopputuotteena maitohappoa, joka erottaa sen muista obligatorisista anaerobeista. Kaikkien tämän ryhmän bakteerien on havaittu aiheuttavan sameutta lopputuotteessa. (Hill 2015, 195, 204-208)

2.3.3 Hiivat

Oluen pilaajahiivat ovat yleensä samansukuisia kuin hiivat, joita käytetään oluen fermentoimiseen (Suiker & Wösten, 2022). Yleisistä oluen pilaajahiivoista käytetään nimitystä villihiivat. Nämä voidaan jakaa kahteen eri luokkaan *Saccharomyces*- ja ei-*Saccharomyces*-sukuisiin villihiivoihin (Esmaeili ym, 2015). *Saccharomyces*-suvun villihiivat ovat yleensä *S. cerevisiae*-hiivan eri kantoja. Näistä tunnetuimpana kantana on *S. diastaticus*. Sen kyky pilkkoa jäännöshiilihydraatteja, kuten dekstriiniä ja tärkkelystä aiheuttaa oluen sameutta, jälkikäymistä ja virhemakuja. Tämä aiheuttaa lopputuotteen liian korkeaa etanoli- ja hiilidioksidipitoisuutta. (Suiker & Wösten, 2022)

Ei-*Saccharomyces*-sukuisiin villihiivoihin kuuluu tunnetuimpana *Brettanomyces*-suvun villihiivat. Tästä tunnetuimpana tynnyrin puhdistusosiossa aiemminkin mainittu *B. bruxellensis*. Tämä hiiva tuottaa etikkahappoa ja haihtuvia fenolisia yhdisteitä, jotka antavat lopputuotteelle laastarin, hien ja savun aromeja. (Suiker & Wösten, 2022)

2.4 Mikrobiologiset testit

Oluen pilaajamikrobien tunnistaminen on vaikeaa mikrobimäärien ollessa pieniä (Esmaeili ym, 2015). Näytteen suhde valmiiseen tuotteeseen on erittäin pieni esimerkiksi 250 ml näytettä ja 100 000 litraa olutta, tämän vuoksi pilaajamikrobien määrä jää erittäin pieneksi (Hill 2015. 289).

Mikrobeja tunnistetaan usein panimoilla perinteisillä mikrobiologisilla keinoilla, eli näytteen siirrostamisella elatusmaljalle, inkuboimalla ja lopulta mikroskopoimalla (Esmaeili ym, 2015). Gram-värjäys on yksi bakteerin tunnistamistekniikoista. Sillä erotellaan bakteereita soluseinämän rakenteen perusteella. Värjättävät bakteerit käsitellään ensiksi kristallivioletti-liuoksella, jonka jälkeen lisätään jodiliuos, joka kristallivioletin avulla muodostaa kompleksin. Värinpoistoreagenssi, eli alkoholi, huuhtoo lipidejä ja mahdollistaa gram-positiivisten ja gram-negatiivisten solujen erilaisen värjäytymisen. Gram-positiivisilla bakteereilla soluseinämä sisältää vähän lipidejä ja runsaasti peptidoglykaania, joka estää värinpoistoreagenssin pääsyn soluseinämän sisälle jättäen värjätyt bakteerit siniseksi tai violetiksi. Gram-negatiivisilla soluseinämä sisältää vähän peptidoglykaania ja paljon lipidejä, jolloin värinpoistoreagenssi pääsee seinämän sisään huuhtomaan kristallivioletin pois ja lopulta safraniiniliuos värjää bakteerit punaiseksi tai vaaleanpunaiseksi. (Smith & Hassey, 2005). Perinteisten metodien heikkoutena on niiden hitaus. (Esmaeili ym, 2015). Esimerkiksi inkubointiajat selektiiviselle UBA-maljalle on 3 päivää 22–25 °C ja YM CuSO₄- maljalle 2 päivää 25 °C (Hill 2015. 277 & 282).

Mikrobien tunnistamista pyritään helpottamaan valitsemalla selektiivisiä kasvatusalustoja. UBA, eli Universal beer agar, on yksi vaihtoehto pilaajamikrobien tunnistamiseen. Se koostuu suurimaksi osaksi oluesta ja sisältää oluille yleisiä komponentteja, kuten humalaa ja etanolia, mahdollistaen pilaajamikrobien kasvun.

UBAlla voi kasvaa *Lactobacillus*-, *Pediococcus*-, *Acetobacter*- ja *Zymomonas*-sukujen bakteerit. (Dalynn Biologicals, 2003)

Villihiivojen tunnistamiseen on kehitetty erilaisia kasvatusalustoja lisäämällä kemikaaleja, joiden mahdollistavat villihiivojen kasvun ja inhiboivat panimohiivoja. Yeast & mold CuSO₄ on kasvatusalusta, jonka kuparisulfaatti inhiboi panimohiivojen kasvua, mutta mahdollistaa villihiivojen kasvun. Muita vaihtoehtoja on esimerkiksi lysiinin lisääminen kasvatusalustaan, joka toimii typenlähteenä, jota panimohiivat eivät voi käyttää, mutta villihiivat voivat. (Hill 2015, 276)

2.5 Aistinvaraiset testit

Aistinvarainen tutkimus voidaan määrittää tieteelliseksi menetelmäksi, jolla saadaan aikaan sekä mitataan, analysoidaan ja tulkitaan aistien välityksellä syntyviä vasteita. Saada aikaan liittyy koejärjestelyihin, mittaus liittyy tutkimusaineiston kvantitatiivisuuteen, analysoinnilla tarkoitetaan tilastotieteitä ja tulkinnalla tarkoitetaan tulosten liittymistä lähtöoletuksiin sekä näytteeseen, että mittauksen laatuun. Koejärjestelyihin vaikuttaa tutkittava kohde ja kokeen tavoitteet. Näiden selvittyä voidaan valita raati kokeen suorittamiseen ja kokeen suorituspaikka. (Tuorila & Appelbye 2005. 19, 175)

Aistinvaraisessa kokeessa tutkitaan yhden tai useamman muuttujan vaikutusta vastemuuttujiin. Kokeen suunnittelussa muodostetaan hypoteesi, jonka perusteella rakennetaan varsinainen koeasetelma. Koeasetelman tarkoitus on olla yleissuunnitelma käytännön järjestelyistä. Näytteitä suunnitellessa pyritään vastaamaan kysymyksiin, mitä halutaan tietää ja miten tieto saadaan selville. Myös arviointiasteikko kuuluu näytesyunnitteluun. Näytteiden valmisteluissa on otettava huomioon näytteiden tasalaatuisuus, eli että kaikki näytteet ovat valmistettu samalla tavalla. (Tuorila & Appelbye 2005, 175–181)

Kokeen suoritettua ja tulosten käsittelyn jälkeen on hyvä tarkastella tutkimuksen luotettavuutta. Tätä voidaan arvioida selvittämällä menetelmän reliabiliteettia ja validiteettia. Reliabiliteetilla tarkoitetaan menetelmän tarkkuutta ja validiteetilla tarkoitetaan Tuorilan ja Appelbyen (2005, 191) mukaan ”menetelmän kykyä mitata sitä, mitä on tarkoitus mitata”. (Tuorila & Appelbye 2005, 190–191)

3 MENETELMÄN KEHITYS JA AISTINVARAISET TESTIT

3.1 Menetelmän kehitys

Kokeellinen osio tehtiin kolmea kuivaa bourbon-tynnnyriä käyttäen. Kaikki kolme tynnyriä olivat tilavuudeltaan samoja, 200 litran tynnyreitä. Tynnyreiden erottelemisen vuoksi tynnyrit merkittiin tunnuksilla B14, B15 ja B16. Mikrobiologista kasvua tutkittiin PCA-, UBA- ja YM-maljoilla. PCA, eli plate count agarmaljaa käytettiin kokonaisbakteerimäärän tarkasteluun. PCA ei ole selektiivinen malja. Maljoja inkuboitiin viisi päivää noin 20 °C anaerobisissa olosuhteissa. Kasvatusmaljoilla havaitut kasvustot laskettiin, gram-värijättiin ja mikroskoipoitiin.

Aluksi tynnyreitä turvotettiin vesitiiviiksi veden ja vesihöyryn avulla. Vesihöyry tuotettiin höyrypesurilla. Tiiviille tynnyreille tehtiin eri käsittelyt alla olevan taulukon 1. mukaisesti. B16 tynnyrin höyrytys tehtiin turvotuksessa käytetyllä höyrypesurilla. Vaiheissa käytettävät kemikaalit liuotettiin aluksi pieneen määrään vettä, jonka jälkeen liuos kaadettiin tynnyriin. Liuosta pyöriteltiin tynnyrissä muutamaman kierros ja lopuksi tynnyri täytettiin vedellä täyteen. Vaiheiden suoritusten jälkeen tynnyrit huuhdeltiin huolellisesti. Natriumvetykarbonaatin sekä natriumperkarbonaatin annettiin vaikuttaa 24 tuntia ennen huuhtelemista.

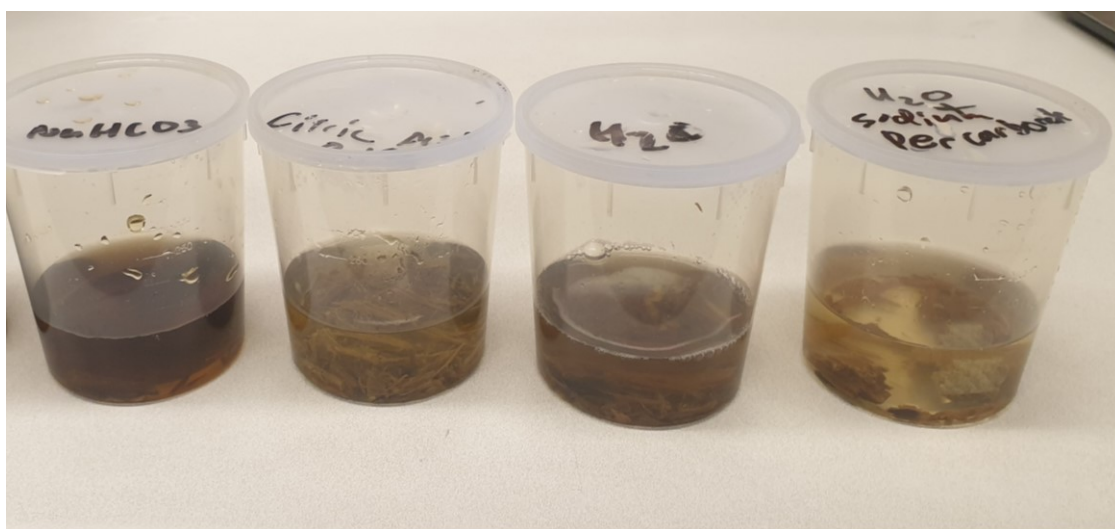
TAULUKKO 1. Tynnyreiden puhdistusmenetelmien vaiheet.

Tynnyri	1. vaihe	2. vaihe	3. vaihe
B14	Natriumperkarbonaatti 1 g/l	Sitruunahappo 0,1 %	
B15	Natriumperkarbonaatti 1,25 g/l	Sitruunahappo 0,1 %	
B16	Höyrytys 15 min	Natriumvetykarbonaatti 1 g/l	Sitruunahappo 0,1 %

Jokaisesta tynnyristä otettiin näyte ennen ensimmäisen vaiheen toteutusta sekä vaiheiden jälkeen. Näytettä otettiin tynnyrin täyttöaukosta pitkää pipetinkärkeä käyttäen 2 ml, josta pipetoitiin 0,5 ml jokaiselle maljalle.

3.2 Aistinvaraiset testit

Aistinvarasiin testeihin valmistettiin puhdistusmenetelmissä käytettävät liuokset pienempiin tilavuuksiin. Bourbon-tynnyrin lastuja punnittiin noin 5 grammaa, joita liotettiin neljän päivän ajan 100 ml:ssä tutkittavaa liuosta. Liuoksia haisteltiin ja tulkittiin aistinvaraisesti tammitynnyrin sekä bourbonin ominaisaromien vahvuuseroja liuoksissa. Alla olevassa kuvassa 1. on havainnollistettu hajutestien koeasetelmaa.



KUVA 1. Aistinvaraisten testien koeasetelma.

Kuvassa on vasemmalta oikealle liuokset seuraavassa järjestyksessä: natriumvetykarbonaattiliuos, sitruunahappo, vesi ja natriumperkarbonaattiliuos.

4 TULOKSET

4.1 B16 Tynnyri

B16 tynnyrin tehtävien testien tulokset ovat alla olevassa taulukossa 2. Taulukosta voidaan havaita mikrobien kasvu eri vaiheiden jälkeen.

TAULUKKO 2. B16 tynnyrin kasvatusmaljojen lasketut pesäkkeet.

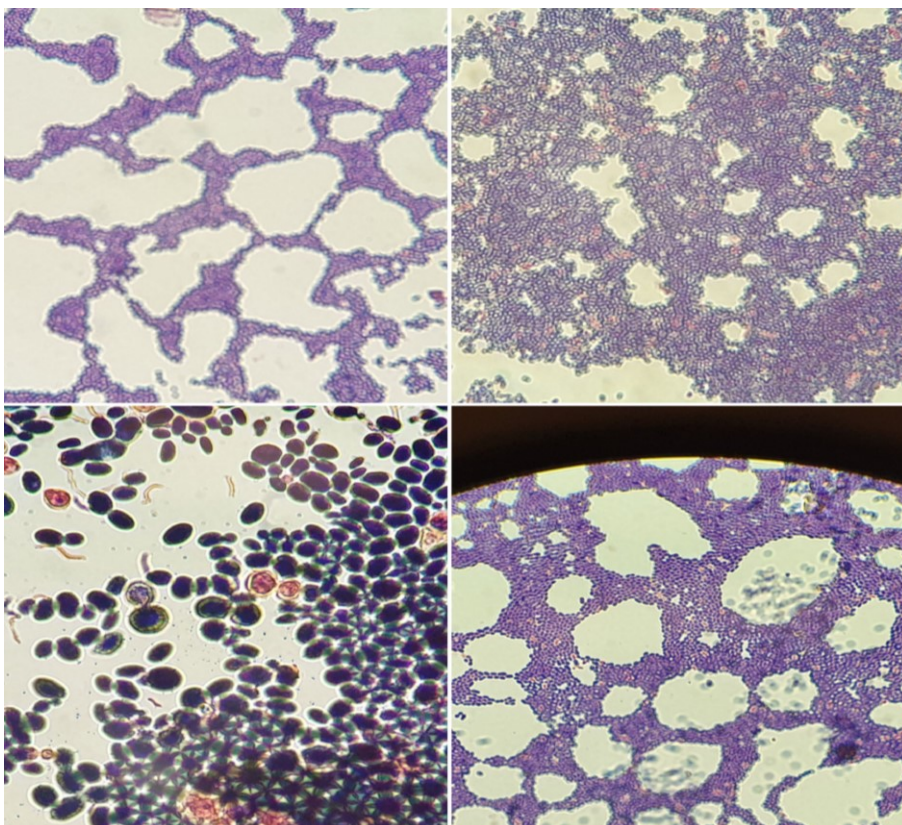
Kasvatusalusta	Ennen höyrytystä (cfu/ml)	Höyrytyksen jälkeen (cfu/ml)	Natriumvetykarbonaatti 1 g/l (cfu/ml)	Sitruunahappo 0,1 % (cfu/ml)
UBA	62	96	<2000	<2000
PCA	86	162	<2000	<2000
YM CuSO ₄	28	<2000	400	<2000

Gram-värijäyksen tulokset ovat alla olevassa taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Gram-värijäyksen tulokset tynnyristä B16.

Kasvatusalusta	Ennen höyrytystä	Höyrytyksen jälkeen	Natriumvetykarbonaatti 1 g/l	Sitruunahappo 0,1 %
UBA	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki
PCA	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki
YM CuSO ₄	Hiiva	Hiiva	Hiiva	Hiiva

Alla olevassa kuvassa 2. on havainnoitu B16 tynnyrin gram-värijäyksestä saatuja tuloksia, joista voidaan päätellä kyseessä olevan gram + kokkeja sekä hiivasoluja.



KUVA 2. Kollaasi B16 tynnyrin mikroskopoinnin tuloksista.

Kuvassa vasemmalla alalaidassa havainnoitu hiivasolujen mikroskopointi tulosta. Kaksi ylintä kuvaa ovat UBA-maljojen tuloksia, ja alareunassa oikealla on PCA-maljaa kuvaava otos.

4.2 B15 Tynnyri

B15 tynnyrin tehtävien testien tulokset ovat alla olevassa taulukossa 4. Taulukosta voidaan havaita mikrobien kasvu eri vaiheiden jälkeen.

TAULUKKO 4. B15 tynnyrin kasvatusmaljojen lasketut pesäkkeet.

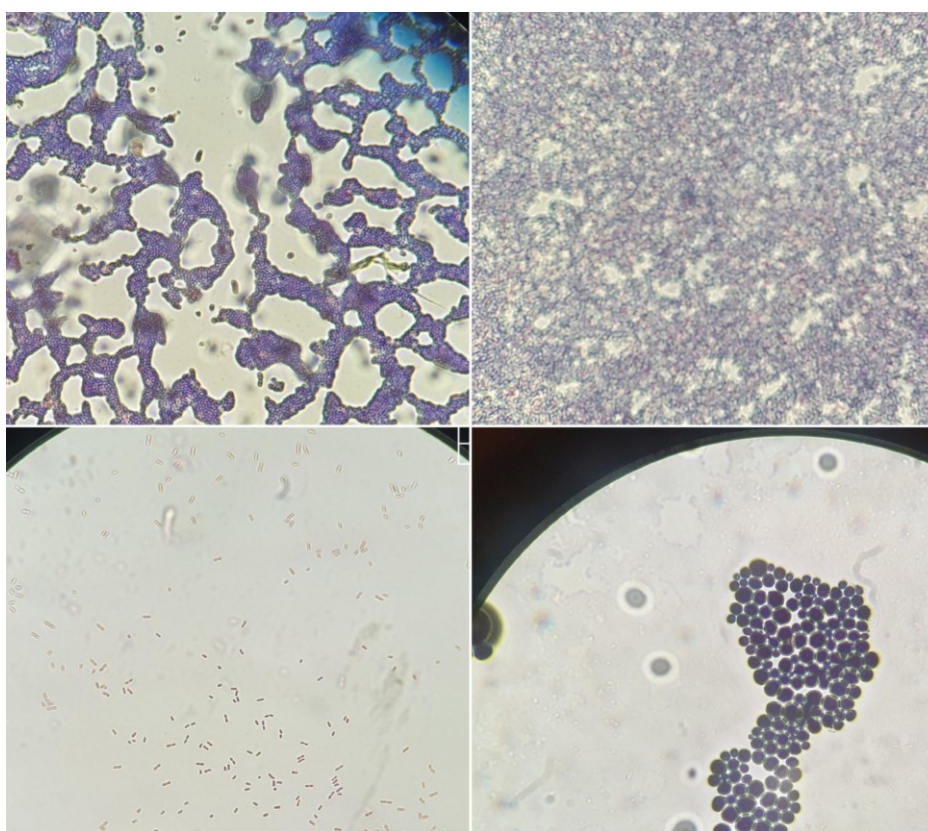
Kasvatusalusta	Ennen puhdistusta (cfu/ml)	Natriumperkarbonaatti 1,25 g/l (cfu/ml)	Sitruunahappo 0,1 % (cfu/ml)
UBA	800	<2000	2
PCA	900	1200	60
YM CuSO ₄	38	400	48

Gram-värjäyksen tulokset ovat alla olevassa taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Gram-värjäyksen tulokset tynnyristä B15.

Kasva- tusalusta	Ennen puhdistusta	Natriumperkarbonaatti 1,25 g/l	Sitruunahappo 0,1 %
UBA	Gram+ kokki	Gram + bacillus	Gram + kokki
PCA	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki
YM CuSO ₄	Hiiva	Hiiva	Hiiva

Alla olevassa kuvassa 3. on B15 tynnyrin mikroskoppoinnin tuloksia. Oikealla alhaalla on kuva hiivasolujen mikroskoppinnista.



KUVA 3. Kollaasi B15 tynnyrin mikroskoppoinnin tuloksista.

Yllä vasemmalla on PCA-maljan tulos ja oikealla UBA-maljan tulos. Alla vasemmalla on UBA-maljan tulos poikkeavasta bakteerista natriumperkarbonaatti vaiheen jälkeen.

4.3 B14 Tynnyri

B14 tynnyrin tehtävien testien tulokset ovat alla olevassa taulukossa 6. Taulukosta voidaan havaita mikrobien kasvu eri vaiheiden jälkeen.

TAULUKKO 6. B14 tynnyrin kasvatusmaljojen lasketut pesäkkeet.

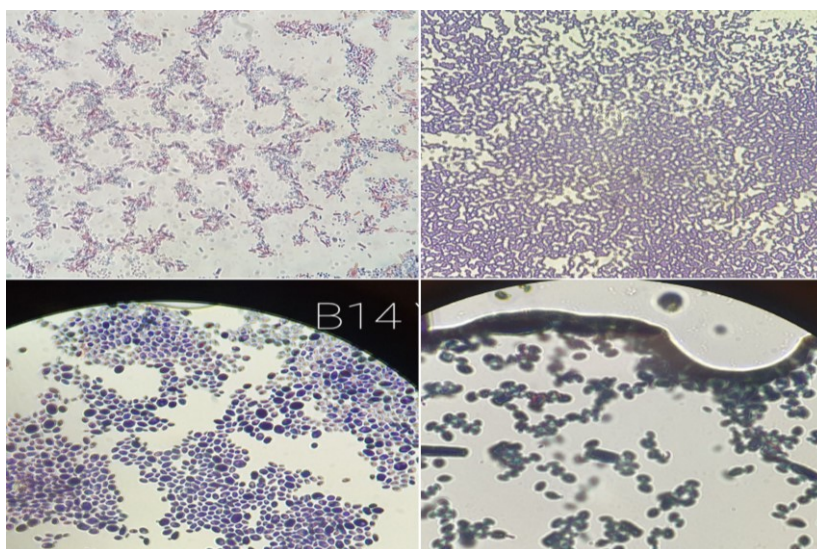
Kasva- tusalusta	Ennen puhdistusta (cfu/ml)	Natriumperkarbonaatti 1,0 g/l (cfu/ml)	Sitruunahappo 0,1 % (cfu/ml)
UBA	<2000	<2000	26
PCA	54	<2000	44
YM CuSO ₄	<2000	<2000	0

Gram-värjäyksen tulokset ovat alla olevassa taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Gram-värjäyksen tulokset tynnyristä B14.

Kasva- tusalusta	Ennen puhdistusta	Natriumperkarbonaatti 1,0 g/l	Sitruunahappo 0,1 %
UBA	Gram+ kokki	Gram + bacillus & kokki	Gram + kokki
PCA	Gram + kokki	Gram + kokki	Gram + kokki
YM CuSO ₄	Hiiva	Hiiva	Hiiva

Alla olevassa kuvassa on mikroskoppoinnin tuloksia tynnyristä B14.



KUVA 4. Kollaasi B14 tynnyrin mikroskoppoinnin tuloksista.

Ylhäällä oikealla on kuva PCA-maljasta ja vasemmalla kuva UBA-maljasta natriumperkarbonaatin lisäyksen jälkeen. Alhaalla olevat kuvat ovat hiivamaljoista.

4.4 Aistinvaraiset testit

Aistinvaraisten testien tulokset ovat taulukoitu alla olevassa taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Aistinvaraisten testien tulokset.

Liuos	Aromien vahvuus
Vesi	+++
Natriumvetykarbonaatti 1g/l	+
Natriumperkarbonaatti 1g/l	+
Sitruunahappo 0,1%	++

Taulukossa on havainnoitu tynnyrin aromeja +-merkeillä, jolloin pienin määrä merkkejä ilmoittaa aromien vähyyden.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Tynnyreiden mikrobimäärät eri maljojen mukaan ennen ensimmäistä vaihetta ja viimeisen puhdistusvaiheen jälkeen on alla olevassa taulukossa 9. B16 tynnyrin mikrobien määrässä ei tapahtunut lopullisen viimeisen puhdistusvaiheen jälkeen mikrobimäärän laskua. Ennen puhdistuksen aloitusta mikrobien määrä oli huomattavasti pienempi, jolloin B16 tynnyrin menetelmä ei sovellu tynnyreiden puhdistukseen. B15 tynnyrin lopullinen mikrobimäärä on ennen puhdistusta hiivojen osalta melko samalla tasolla. Eroa on havaittavissa bakteerien osalta, joiden määrät vähenivät erittäin paljon. B14 tynnyreissä ennen puhdistusta oli huomattava määrä hiivoja ja UBA-maljalla bakteereita. Puhdistuksen jälkeen määrät vähenivät hiivan osalta nollaan ja UBA-maljan bakteerien lähelle nollaa.

TAULUKKO 9. Mikrobien määrä tynnyri ja maljakohtaisesti ennen ensimmäistä vaihetta ja viimeisen puhdistusvaiheen jälkeen.

	YM CuSO ₄ (cfu/ml)		UBA (cfu/ml)		PCA (cfu/ml)	
	Alku	Loppu	Alku	Loppu	Alku	Loppu
B16	28	<2000	62	<2000	86	<2000
B15	38	48	800	2	900	60
B14	<2000	0	<2000	26	54	44

Gram-testien tuloksista oli havaittavissa samankaltaisia tuloksia tynnyreiden kesken. Jokaisessa tynnyrissä oli muodoltaan samankaltaisia hiivoja. Hiivasolut olivat hiukan ovaaleja, joskin B14 tynnyrin hiivakuvassa on havaittavissa pitkiä soluja, joka voi viitata *Brettanomyces*-suvun hiivaan. Bakteerien osalta suurin osa maljoilla olevista bakteereista olivat gram-positiivisia kokkeja. Anaerobisissa olosuhteissa tämä voi viitata *Pediococcus*-suvun bakteeriin. *Lactobacillus*-suvun edustajia voitiin havaita kahdelta eri maljalta ja kahdesta eri tynnyristä. Kummasakin tapauksessa bakteeri ilmeni natriumperkarbonaatin lisäyksen jälkeen, mutta poistui sitruunahappolisäyksen jälkeen.

Aistinvaraisen testissä heikoiten bourbon-tynnyrin aromeja säilyttivät natriumveetykarbonaatti sekä Natriumperkarbonaatti. Vedessä tynnyrin aromit kestivät

parhaiten, kun taas sitruunahappoliuoksessa havaittiin pieniä heikkouksia aromin vahvuudessa.

6 POHDINTA

Tälle työlle asetetut tavoitteet saavutettiin osittain onnistuneesti, joskaan kehitelty menetelmä ei välttämättä ole paras mahdollinen. Natriumperkarbonaatin tiedettiin kirjallisuuden perustella olevan tehokas aine mikrobien poistoon (Stadler & Ficher, 2020), mutta sen vaikutus tynnyrin aromiin oli huomattava. Tämän vuoksi, kun tarkoituksena olisi lisätä ja monimutkaistaa oluen aromeja, ei tämä menetelmä ole siihen sopiva. Tätä voisi suositella sellaiseen tynnyriin, jota halutaan vielä käyttää, mutta joka on vahvasti kontaminoitunut.

Menetelmässä natriumperkarbonaatin pitoisuudella ei tuntunut olevan suuria eroja. Kummallakin testatulla pitoisuudella saatiin samankaltaisia tuloksia. Natriumvetykarbonaatilla ei ollut vaikutusta puhdistustulokseen. Ennen natriumvetykarbonaatin lisäystä mikrobien määrät olivat bakteerien osalta 68 cfu/ml ja puhdistusvaiheiden jälkeen yli 2000 cfu/ml. Samankaltainen kasvu tapahtui hiivojen suhteen, jolloin lopussa kasvua oli yli 2000 cfu/ml. Höyrytyksen vaikutus mikrobien kasvuun oli huomattava. Tynnyreitä säilytettiin noin 15–17 C° lämpötilassa, jolloin höyrytys on voinut nostaa tynnyrin lämpötilaa mikrobien kasvuille optimaalisempaan lämpötilaan. Esimerkiksi *Pediococcus damnosuksen* optimaalinen kasvulämpötila on 22–25 C° (Hill 2015. 145), jolloin voi olla mahdollista, että tynnyrin lämpötila on noussut juuri tarvittavan määrän ja mahdollistanut bakteerien määrän kasvun.

Menetelmää voisi kehittää monella eri tavalla. Näytteenotossa voisi käyttää pitkää näytteenottajaa, jolla saisi tynnyrin kasvustosta laajemman kuvan. Nyt näyte otettiin tynnyrin täyttöaukosta pipetillä, jolloin saatiin vain pinnasta näyte. Myös näytemäärät ja maljojen määriä voisi lisätä, jolloin työn luotettavuus paranisi. Toisen kehityksen kohde olisi maljojen inkuboiminen aerobisissa oloissa. Tynnyrin ollessa normaalia käymisastiaa happipitoisempi, on todennäköistä, että hapettomat mikrobit eivät tynnyrissä pysty kasvamaan. Kolmas kehityksen kohde voisi olla oluella testaaminen. Tällaisen testauksen taloudellista kannattavuutta tulisi kuitenkin pohtia, koska testaus vaatisi ylimääräistä olutta, tynnyreitä ja pitkää testausaikaa luotettavien tulosten saamiseksi. Tynnyreiden tutkimiseen olisi hyvä käyttää muitakin testejä. Varsinkin aromien tutkiminen ja niiden heikentyminen

natriumperkarbonaatin lisäyksen jälkeen esimerkiksi kaasukromatografilla voisi tuoda syvempää tietämystä etenkin aromaattisten yhdisteiden pitoisuuksista. Tämän voisi yhdistää aistinvaraiseen tutkimukseen ja vertailla saatuja tuloksia keskenään.

Aistinvaraiseen tutkimukseen tynnyrin aromiin liittyen voisi kehittää varsinkin testaajien lukumäärää. Tällä kerralla koetilanteessa oli vain kaksi testaajaa, jolloin kokeen luotettavuus saattaa kärsiä. Mutta kyseessä oli kuitenkin testaajina henkilöt, jotka ovat työnsä puolesta kokeneita aistinvaraisien testien tekijöitä. Koeasetelmassa olisi voitu tehdä ”sokkotestit”, jolloin testaajien tiedot kokeen oletettuun lopputulokseen, eivät olisi vaikuttaneet hajutestin tulkintaan.

Muita tynnyrin puhdistusmenetelmiä ovat esimerkiksi viinitynnyreiden puhdistukseen käytettyä rikkipäreen polttoa tynnyrissä, jolloin muodostuu rikkidioksidia, jolla on mikrobeja puhdistavia ominaisuuksia (Stadler & Ficher, 2020). Tätä menetelmää voisi hyvinkin testata, mikäli puitteet ovat oivallisia, varsinkin ilmanvaihdon tulee olla hyvin toiminnassa, rikkidioksidin ollessa haitallista hengitettynä. Stadler ja Fischer (2020) ovat maininneet muutaman muunkin mahdollisen menetelmän. Esimerkiksi otsonin käytön, peretikkahapon käyttö ja kuumalla vedellä painepesun. Näissä kaikissa on omat hyötynsä ja haittansa, otsonin käyttö vaatii rikkipäreen tavoin hyvää ilmanvaihtoa. Peretikkahapon käytön seurauksena voi olla etikkahapon jääminen tynnyriin, joka voi aiheuttaa mikrobikasvuston kasvun. Kuumalla vedellä painepesu voi olla hankalaa tynnyrin lautojen ja päätyjen liitoskohdista, jotka ovat muutenkin hankalia puhdistaa. (Stadler & Ficher, 2020)

Yksi kiinnostava menetelmä voisi olla tynnyrin uudelleen hiillostaminen, jolloin varsinkin tynnyrin ominaisaromia saataisiin oluisiin. Jos tätä metodia haluaisi käyttää, tynnyri pitäisi purkaa, hioa, hiillostaa ja rakentaa uudelleen (Stadler & Ficher, 2020). Lisäksi tämä menetelmä vaatisi erikoisvälineet ja turvallisen paikan tynnyrin hiillostamiseen. Tällä voisi kuitenkin olla vaikutuksia tynnyrin käyttöikänsä ja käytön ekologisuuteen. Ekologisuutta kehitetyssä menetelmässä on tynnyrin uudelleenkäytön lisäksi kemikaalit, jotka eivät ole haitallisia ympäristölle. Toisaalta runsas vedenkäyttö vähentää menetelmän ekologisuutta. Vettä käytetään ensin tynnyrin turvottamiseen, sitten pesuihin puhdistusvaiheiden välissä ja lopulta kemikaalien liuottamiseen.

Panimoala on kasvanut huomattavasti viimeisen 15 vuoden aikana, esimerkiksi viimevuoden tilastojen mukaan oluen myynti kasvoi Yhdysvalloissa 1 %, kun käsiteläispanimoiden myynti kasvoi 8 % ja itsenäisten- ja pienpanimoiden myynti oluen kokonaismyynnistä kasvoi 13,1 % (Brewers association). Tämä kertoo panimoiden tuotteiden kysynnästä ja kysynnän vuoksi kilpailutilanne on myös kiristynyt ja uusia makuyhdistelmiä, joilla erottua muista pyritään kehittämään jatkuvasti. Tynnyrikypsytytys voi olla yksi keino erottua, mutta oluissa laatu ja tasalaatuisuus on hyvinkin tärkeä osa. Tynnyrikypsytytys on yrityksen ja erehdyksen prosessi, jolla voi olla negatiivisia vaikutuksia panimoiden talouteen (Bossaert ym 2020), mutta kyseessä on kokeilu, jonka avulla panimot voivat mahdollisesti saada etulyöntiaseman tynnyrikypsytettujen oluiden markkinoilla. Panimoiden tulisi kuitenkin arvioida ovatko puhdistusprosessin kehittämiseen käytetyt resurssit oikeassa suhteessa siitä saatujen hyötyjen kanssa.

LÄHTEET

- Boessaert, S. Winne, V. Opstaele, F. Buyse, J. Verreth, C. Herrera-Malaver, B. Verstrepen, K. De Rouck, G. Crauwels, S. & Lievens, B. 2021. Impact of wood species on microbial community composition, beer chemistry and sensory characteristics during barrel-ageing of beer. *International Journal of Food Science and Technology*. Luettu 16.4.2022 <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.15479>
- Dalynn Biologicals. 2003. Universal Beer Agar. Luettu 2.5.2022 https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/PU65.pdf
- De Roos, J. & De Vuyst, L. 2018. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Society of Chemical Industry*. Luettu 13.4.2022. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.9291>
- Demoranville, L. & Heist, P. 2021. The Chemistry of bourbon. Global home of chemical engineers. Luettu 13.4.2022 <https://www.aiche.org/resources/publications/cep/2021/august/chemistry-bourbon>
- Esmaeili, S. Mogharrabi, M. Safi, F. Sohrabvandi, S. Mortazavian, A. & Bagheripoor-Fallah, M. 2015. The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects, and determination -a review. *Carpathian journal of food science and technology*. Luettu 20.4.2022.
- Garofalo, C. Osimani, A. Milanović, V. Taccari, M. Aquilanti, L. & Clementi, F. 2015. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *Journal of food science*. Luettu 17.4.2022. <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.13112>
- National beer sales & production data. Luettu 3.5.2022. <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/>
- Paradh, A Spedding, G. Aiken, T. & Hill, A. Koonnut Hill, A. 2015. *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. UK: Woodhead Publishing
- Smith, A. & Hassey, M. 2005. Gram stain protocols. *American Society of Microbiology*. Luettu 2.5.2022 <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>Work,
- Stadler, E. & Fischer, U. 2020. Sanitization of Oak Barrels for Wine: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*. Luettu 18.4.2022. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.0c00816>
- Suiker, I. & Wösten, H. 2022. Spoilage yeasts in beer and beer products. *Current opinion in Food Science*. Luettu. 2.5.2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799322000170>
- Tuorila, H. & Appelbye, U. 2005 *Elintarvikkeiden aistinvaraiset tutkimusmenetelmät*. Helsinki. Yliopistopaino

H. 2014. Wood, whiskey & wine: A history of barrels. UK. Reaktion Books.