

Niklas Fred  
Johannes Mutta

# Hivasiirteen koon vaikutus oluen käymisprosessiin

---

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

17.4.2017

Tekijä(t) Otsikko	Niklas Fred, Johannes Mutta Hiivasiirteen koon vaikutus oluen käymisprosessiin
Sivumäärä Aika	24 sivua + 1 liite 17.4.2017
Tutkinto	Bioanalytiikka
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Heidi Malava Laadunvalvontavastaava Markus Räsänen
<p>Opinnäytetyö tehtiin Suomenlinnan Panimolle, joka on Helsingissä ja Vantaalla toimiva pienpanimo. Työssä määritettiin oluenvalmistuksessa vierteeseen lisätyn hiivan määrän vaihtelun vaikutuksia käymisprosessiin. Oluen valmistus aloitetaan muuntamalla raaka-aineena käytetyn mallasviljan sisältämä tärkkelys yksinkertaisemmiksi sokereiksi, yleensä maltaan oman entsyymaattisen toiminnan avulla. Tuloksena saatu mallassokerineste erotetaan vilja-aineksesta ja keitetään. Keiton aikana muodostuvaan vierteeseen lisätään humalakasvin kukintoja, joiden sisältämällä kemiallisilla yhdisteillä on katkeran maun lisäksi antimikrobiaalisia ominaisuuksia. Keiton jälkeen olutvierre jäähdytetään ja hapetetaan, minkä jälkeen siihen lisätään itse käymisprosessin tuottava hiivasiirre. Hiivasiirre käsittää suuren määrän muista mikrobeista puhdasta hiivasolukkoa. Hiiva käyttää olutvierteen sisältämät sokerit ravinnokseen tuottaen samalla valmistuvaan olueen alkoholia ja lukuisia makuyhdisteitä. Ilman hiivan tuottamaa käymistäpahtumaa ei olisi olutta.</p> <p>Teoriaosuudessa käsiteltiin oluenvalmistuksen eri vaiheita sekä siihen tarvittavia raaka-aineita ja hiivan käyttäytymistä käymisprosessissa. Kokeellisessa osuudessa suoritettiin hiivasolukon koon ja elävyyden määritykset solukammilaskentaa, maljalaskentaa sekä OD600-määritystä käyttäen. Määritykset suoritettiin kahdelle pintahiiva-oluterälle, joiden valmistuksessa käytettiin erikokoisia hiivasiirteitä. Kokeellinen osio suoritettiin Suomenlinnan Panimolla, Vantaalla.</p> <p>Tulosten perusteella voidaan väittää, että hiivasolujen kokonaismäärissä tai elävyyksissä ei ollut hiivasiirteiden kesken suuria eroja. Täysin varmasti ei kyetty osoittamaan suuremman hiivasiirteen tuottamaa nopeampaa pääkäymisprosessia, ja kumpikin hiivasiirrekoko oli riittävä käyttämään oluterän loppuun asti. Tuotantoaikataulun salliessa taloudellisia säästöjä pystytään siis saavuttamaan käyttämällä pienempiä hiivasiirteitä.</p>	
Avainsanat	Olut, hiiva, käymisprosessi, panimotoiminta

Author(s) Title	Niklas Fred, Johannes Mutta Effects of yeast pitch size to the fermentation process in brewing
Number of Pages Date	24 pages + 1 appendice 17 April 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical laboratory science
Specialisation option	Biomedical laboratory science
Instructor(s)	Lecturer, Heidi Malava Quality control manager, Markus Räsänen
<p>This thesis was made for Suomenlinna Brewery which is a microbrewery operating in Helsinki and Vantaa, Finland. The work concerned determining the effects of varying yeast pitch sizes in the beer fermentation process. The beer manufacturing process begins by transforming the starches from the malted cereals into simpler sugars. This is usually accomplished with the help of the malt's own enzymatic activity. The resulting sweet malt sugar liquid is then separated from the cereal mass and boiled. During the boil flower cones of the hop plant are added into the forming beer wort. The chemical compounds in these cones impart a bitter taste and antimicrobial compounds. After the boil the beer wort is chilled and aerated, after which it is pitched with yeast which is responsible for the whole fermentation process. The yeast pitch is formed by large number of single yeast cells free from other microbes. The yeast uses up the wort's sugars for its own metabolism, and at the same time produces ethanol and numerous flavor compounds into the beer. Without the fermentation process accomplished by the yeast, there would be no beer.</p> <p>The theoretic part covered the different stages of the beer manufacturing process, the ingredients used in it, as well as general attributes of brewer's yeast and it's behaviour in the fermentation process. In the practical part the size and viability of the yeast cell mass in two different production batches of beer was analyzed and assessed. The beer batches studied were two different ale-style beers, of which both received different sized yeast pitches. The practical part was performed at Suomenlinna Brewery Vantaa.</p> <p>Based on the results, it can be said that there were no major differences in the total cell count or viability of the yeast mass between the different pitch sizes. A faster primary fermentation caused by a larger pitch rate could not be verified by these results, and both yeast pitching rates were sufficient to ferment out the beers batches. From this we can deduct that production schedules permitting, financial savings can be achieved by the use of smaller yeast pitching rates.</p>	
Keywords	yeast, beer, brewing

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset	2
3	Hiiva oluenvalmistuksessa	2
3.1	Oluenvalmistuksen historia	2
3.2	Oluthiiva	4
3.2.1	Hiivan siirrostussuhteen merkitys	6
3.3	Oluenvalmistus prosessina	7
3.3.1	Vesi ja mallas	7
3.3.2	Mäskääminen	9
3.3.3	Siivilöinti ja huuhtelu	9
3.3.4	Keitto	10
4	Aineisto ja tutkimusmenetelmät	13
4.1	Näytteenotto ja hiivasolujen laskenta	13
5	Työn toteutus	14
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	18
6.1.1	Viiveaika ja hiivaus	18
6.1.2	Pääkäyminen	19
6.2	Pohdinta	22
6.3	Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys	23
	Lähteet	24

Liite 1. Tulokset

## 1 Johdanto

Hiivan käyttäytymistä oluen valmistuksessa on tutkittu runsaasti aina vuodesta 1857 lähtien, jolloin Louis Pasteurin tutkimukset hiivan roolista käymistapahtumassa tulivat yleisesti hyväksytyiksi (Barnett 2000). Korkea- ja tasalaatuisen oluen valmistaminen vaatii tarkkaa hallintaa hiivan määrän suhteen. Hiiva vaikuttaa suoraan ja välillisesti käymisen nopeuteen ja puhtauteen. Ilman tarkasti hallittua hiivasiirteen kokoa oluen maku voi vaihdella eri valmistuserien välillä. Sekä yli- että alihivaus vievät käymistä kauemmas ideaalitulosta, aiheuttaen esimerkiksi makuvirheinä aistittavia korkeita diasetyyli-, ester-, fenoli- ja asetaldehyditasoja jättäen käymisasteen matalaksi. Liian matala hiivaus voi myös hidastaa käymistä sekä aiheuttaa hyvin pitkiä adaptaatioaikoja, jotka suovat kilpaileville bakteereille ja muille pilaantumista aiheuttaville mikrobeille kasvuolosuhteita vierteessä. (White — Zainasheff 2010.)

Opinnäytetyössämme tarkastelemme oluen valmistuksessa käytettävän hiivasiirteen koon vaikutusta oluen käymisprosessiin. Valmiin oluen maku ja tasalaatuisuus ovat suurelta osin riippuvaisia hiivan suorittamasta käymistapahtumasta, ja siksi hiivan määrän mahdollisimman tarkalla arvioinnilla on suuri merkitys lopullisen tuotteen laadulle.

Opinnäytetyö tehdään Suomenlinnan Panimolle, joka on vuonna 1995 perustettu kotimainen pienpanimo. Panimon vuosituotanto oli vuonna 2016 noin 250 000 litraa, ja sen valikoimassa on toistakymmentä olutta ja siideriä. Suurin osa nykyisestä tuotannosta tapahtuu vuonna 2012 avatulla Nikinmäen panimolla, mutta myös alkuperäinen saaripanimo Suomenlinnassa on yhä toiminnassa.

## 2 Tarkoitus, tavoite ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena on määritellä elävän hiivasolukon koko valmistuvassa (käyvässä) oluessa, käymisprosessin eri kohdissa sekä suhteessa olueen siirretyn alkupe-  
räisen hiivasiirteen kokoon.

Opinnäytetyön tavoitteena on, että Suomenlinnan Panimo pystyisi hyödyntämään opinnäytetyön kautta saatua tietoa valmistusprosessinsa optimoimisessa.

Tutkimuskysymykset ovat:

1. Onko käytetyn hiivasiirteen ja oluesta mitattavan hiivasolukon kokojen välillä verrannollinen suhde?
2. Miten hiivasiirteen koko vaikuttaa oluen käymistapahtumaan?

## 3 Hiiva oluenvalmistuksessa

### 3.1 Oluenvalmistuksen historia

Moderni oluenvalmistusprosessi noudattaa maailmanlaajuisesti vuosisataisen perinteen, empiirisen kokeilun ja tieteellisen tutkimustiedon mukana kehittyneitä työvaiheita. Ensimmäiset viitteet oluen valmistuksesta ovat arviolta jopa 12 000 vuotta vanhoja. Vanhin kirjoitettu merkintä oluesta löytyy Mesopotamian nuolenpääkirjoituksista ajalta 2800 eKr., ja siinä kuvataan sääntöjä oluen ja leivän päivittäisestä säännöstelystä. (Kunze 2010: 21.)

Olut oli entisaikojen yhteisöissä sekä tärkeä osa päivittäistä ravintoa, että myös turvallinen juomaveden muoto, koska olut yleensä keitettiin valmistuksen yhteydessä. Olutta valmistettiin samoissa yhteisöissä, joissa se nautittiinkin. Tällainen olut ei alkeellisten valmistusmenetelmien vuoksi säilynyt kovin pitkään. Keskiajalla oluen valmistus alkoi hiljalleen siirtyä siihen erikoistuneiden tahojen, kuten luostareiden vastuulle. Tästä alkoi kehityskulku, joka muutamassa sadassa vuodessa johti oluenvalmistuksen teollistumiseen. (Kunze 2010: 21-22.)

Olutta valmistettiin tuhansien vuosien ajan ilman että olisi ymmärretty hiivan keskeistä osaa käymistapahtuman aiheuttajana. Hiivan ja sen tuottaman käymistapahtuman tutkiminen alkoi modernissa muodossaan 1800-luvun puolivälissä. Tällöin huomattiin hiivan olevan elävä organismi, joka muodostuu yhdestä solusta ja aiheuttaa fermentaatiota, eli käymistä. (Kunze 2010: 24.)

Kansainvälinen olutkulttuuri elää parhaillaan vahvaa nousukautta, joka alkoi 1970-luvulla USA:ssa perustettujen modernien ja kokeellisten pienpanimoiden parista. (Acitelli 2013: 55-56). Alun perin alueellisia ja kulttuureihin sidonnaisia oluttyyppejä valmistetaan nykyään ympäri maailmaa, ja laatutietoiselle kuluttajalle on tarjolla loputtomasti maku- ja tyyli vaihtoehtoja.

Taulukko 1. Nykyaikaisia, yleisiä oluttyylejä. Lähde: BJCP 2015 Style Guidelines.

Lajityyppi	Alkuperä	Vahvuus abv.	ale/lager	IBU*	Ominaispiirteet
Pilsner	Tsekki	4-6%	lager	25-45	klassinen vaalea, vahvasti humaloitu lager
Bitter	Englanti	3-5%	ale	25-50	perinteinen brittiolut, hedelmäinen ja voimakkaasti humaloitu
India Pale Ale IPA	Englanti/ USA	4-8%	ale	30-100+	erittäin vahvasti humaloituja
Bock	Saksa	6-9%	lager	20-40	vahvoja maltaisia lagereita
Porter/Stout	Englanti	4-10+%	ale/lager	20-100+	tummia englantilaisia klassikoita
Hefe-weizen	Saksa	5-8%	ale	15-30	saksalainen klassinen vehnäolut
Belgioluet	Belgia	5-10+%	ale	15-50	suuri joukko erilaisia oluita, joita yhdistää belgialaisten luonteikkaiden hiivakantojen käyttö
Lambic	Belgia	5-8%	seka	0	paikallisten villihiivojen, maitohappobakteerien yms. sekaflooran avulla käytettyjä perinneoluita
Gruit	Eurooppa	5-10+%	ale	0	humaloimaton, yrteillä maustettu muinaisolut

\*) International Bittering Unit. Mittaa oluen humaloinnista peräisin olevaa katkerotaso.

### 3.2 Oluthiiva

Oluthiiva, *Saccharomyces cerevisiae*, on yksisoluinen sieniin lukeutuva mikro-organismi, joka hankkii tarvitsemansa energian joko aerobisesti soluhengityksen avulla tai anaerobisesti fermentaation avulla. Hiivan koostumuksesta 75% on vettä ja lopusta neljäsosasta 45-60% proteiinia, 25-35% hiilihidraatteja, 4-7% rasvoja ja 6-9% mineraaleja, sekä myös lukuisia vitamiineja. (Kunze 2010: 96-97.)

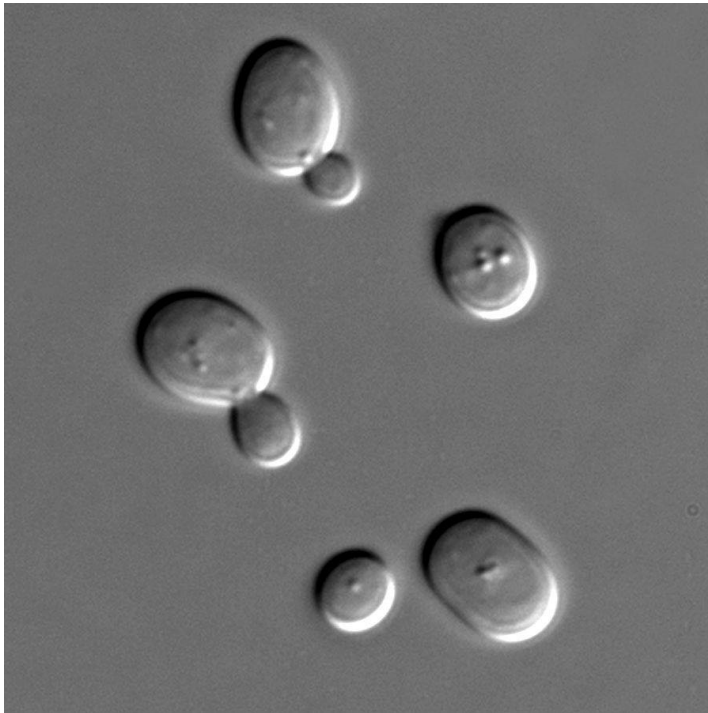
Oluen valmistuksessa käytetyt hiivakannat ovat kehittyneet vuosituhansia kestäneen, oluenvalmistajien enemmän tai vähemmän tietoisesti suorittaman valintapaineen tuloksina. Alun perin näiden hiivojen arvellaan olleen hedelmien ja marjojen kuorilla kasvavien villien hiivakantojen jälkeläisiä, joita on käytetty aluksi viinien valmistamisessa. (Annenmüller — Manger — Lietz. 2011: 36.)

Nykyään oluenvalmistuksessa käytetään lähinnä kahta *Saccharomyces* -hiivalajia, *S. cerevisiae* tunnetaan pintahiivana ja *S. pastorianus* pohjahiivana. Pintahiivalla käytettyjä oluita nimitetään myös "aleiksi" ja vastaavasti pohjahiivalla käytettyjä "lagereiksi". Pintahiivakantojen optimaaliset käymislämpötilat ovat korkeampia (n. 18-21°C) kuin viileässä (n. 10-13°C) hitaammin käyvät pohjahiivakannat. Pintahiivat synnyttävät yleensä myös enemmän käymisprosessista peräisin olevia makuja olueen kuin "puhtaammin" käyvät pohjahiivat. (White — Zainasheff 2010: 45-50.)

Täyttä yhteisymmärrystä näiden kahden hiivalajin historiasta ei tiedemiesten kesken ole. Yleisesti katsotaan ale-tyylin oluiden olevan vanhempaa perua, ja lager-tyylin oluiden (ja hiivan) syntyneen vasta noin 1500-luvulta lähtien. Tällöin keskieurooppalaiset munkit ryhtyivät valmistamaan olutta viileissä luolissa ja kellareissa, jolloin matalammat lämpötilat tuottivat valintapainetta kyseisissä olosuhteissa hyvin toimiville hiivalajeille. (Delphine — Legras 2011.)

Hiiva lisääntyy normaalisti kuroutumalla. Kuroutuminen aiheuttaa äitisolun pintaan "kuroutumisarpia" joita voi olla jopa 20 kappaletta. Kuroutuminen heikentää äitisolun solukalvon toimivuutta, mikä on huomioonotettava seikka oluenvalmistuksessa. (Kunze 2010: 101.)





Kuvio 1. Kuroutuvia hiivasoluja (Wikimedia Commons).

Pohja- ja pintahiiva eroavat mikroskoopissa tarkastellessa lähinnä niiden kuroutumiskäyttäymisen vuoksi. Pohjahiiva esiintyy lähes yksinomaan yksittäisinä soluina tai pareina, kun taas pintahiiva muodostaa kuroutuvista soluista syntyviä ketjuja. Pintahiivojen tapauksessa äiti- ja tytärsolut pysyvät myös kiinnittyneinä toisiinsa pidemmän aikaa. Pohjahiivojen äiti- ja tytärsolut eroavat toisistaan, kun jakautuminen on valmis. Solun muoto ei eroa merkittävästi pinta- ja pohjahiivoilla. (Kunze 2010: 103.)

Modernissa teollisessa oluenvalmistuksessa hiivaa lisätään mikrobiologisesti homogeenisenä ja puhtaana hiivasiirroksena keittämällä steriloituun ja jäähdytettyyn sokeripitoiseen vierteeseen. Vierre on sokeripitoista nestettä, joka sisältää kaikki vesiliukoiset komponentit ja käymiskelpoiset hiilihdraatit. (Kunze 2010: 860-863.)

Siirrostamisen jälkeisen adaptaatioajan (engl. *lag time*) aikana hiivasolut hyödyntävät kaiken vierteeseen sekoittuneen hapen, ja käyttävät sen hyödykseen syntetisoimalla sen avulla ennen kaikkea uusien hiivasolujen soluseinien rakentamisessa tarvittavia steroleja, joita esiintyy luonnossa paitsi sienissä, myös kasveissa ja eläimissä. Tämä viivejakso kestää muutamasta tunnista vajaan vuorokauteen. (White — Zainasheff 2010: 66.)

Kun kaikki saatavilla oleva happi on kulutettu loppuun, hiiva siirtyy kasvuvaiheeseen. Solujen lukumäärä lisääntyy nopeasti, ja hiiva ryhtyy pilkkomaan vierteen hiilihydraattiketjuja energiakseen anaerobisesti, tuottaen samalla etanolia ja hiilidioksidia, sekä pienissä pitoisuuksissa myös useita muita kemiallisia yhdisteitä; esimerkiksi erilaisia korkeampia alkoholeja (engl. *fusel*), estereitä ja fenoleja, jotka pienistä pitoisuuksista huolimatta vaikuttavat oleellisesti valmiin oluen makuun, tuoksuun ja muihin fyysisiin ominaisuuksiin. Näiden muodostuvien yhdisteiden laatu ja määrä ovat riippuvaisia mm. käytetystä hiivalajikkeesta, hiivasolukon kunnosta ja solumäärästä, sekä käymisympäristön lämpötilasta, puhtaudesta ja kaasupaineesta. Vierteen valmistamisen jälkeen oluenvalmistuksen tärkeimpiä tehtäviä onkin hiivasolukon hyvinvoinnista huolehtiminen. (White — Zainasheff 2010; Kunze 2010: 96.) Joillakin panimoilla lisäsyynä hiivan kasvuolosuhteiden optimointiin on hiivan kerääminen valmiista oluesta kierrätettäväksi käyttöön seuraavan oluterän valmistuksessa.

Kun lähes kaikki vierteen sokereista on käytetty, olosuhteista riippuen noin 3-10 päivässä, hiiva siirtyy stationaariseen jälkikäymisvaiheeseen, jota voidaan ajatella myös kypsymisvaiheena. Tämän vaiheen aikana hiiva mm. reabsorboi useita pääkäymisen aikana syntyneitä virhemakumolekyylejä kuten diasetyyliä ja asetaldehydiä. Jälkikäymisvaiheen lopuksi hiiva alkaa keräytyä tuhansien solujen muodostamiin kasoihin, jotka vaajoavat painovoiman vaikutuksesta käymisastian pohjalle. Tämä flokkulaatioksi kutsuttu ilmiö on oluthiivalle ominainen piirre, villit hiivakannat flokkuloituvat huonosti tai eivät ollenkaan. (White — Zainasheff. 2010: 69.)

### 3.2.1 Hiivan siirrostussuhteen merkitys

Siirrostussuhteella tarkoitetaan valmiiseen olutvierteeseen lisättävän hiivamassan oletustusti sisältämää hiivasolumäärää. Hiivan siirrostussuhteella on suuri merkitys ainakin käymisen ajalliseen keston sekä kierrätettäväksi kerättävän hiivan elävyyteen. Mitä korkeampi alkuperäinen siirrostussuhde, sitä lyhyempi käymisaika ja suurempi määrä kierrätettäväksi kerättävää hiivaa. (Kunze 2010: 460-461.)

Hiivasiirteiden kokoihin on kirjallisuudessa annettu monenlaisia tutkimuksiin perustuvia suosituksia. Yleisin käytetty suositussiirrostussuhde pintahiivaoluilla on 1 miljoonaa solua per millilitra vierrettä per astetta Plato. Plato-asteikko on panimotoiminnassa yleisesti

käytössä oleva mitta-asteikko ominaispainon mittaamista varten. Tämä suositussiirrostussuhde on kuitenkin vain yksi keskiarvo ja eri hiivalajikkeille sekä oluttyypeille on kirjallisuudessa esitetty eri lukuja, esimerkiksi ale-tyylin pintahiivaoluille löytyy suosituksia 0.75 miljoonan kertoimesta lähtien ja pohjahiivaoluille suositukset alkavat n. 1.5 miljoonan kertoimesta. Vaikka oluen tasaisen ja epätoivotuista sivumauista mahdollisimman vapaan laadun kannalta onkin mahdollista haarukoida tällaisia optimikokoja hiivasiirrokselle, niin käytännössä panimot voivat tavoitella esimerkiksi jotain tiettyä sivumakua (esim. esterä, fenolia, ym.) pienentämällä tai suurentamalla hiivasiirroksen kokoa tietoisesti. (White — Zainasheff 2010.)

Verbelen, Dekoninck, Saerens, Van Mulders, Thevelein ja Delvaux (2009) tekemässä tutkimuksessa tutkittiin käytetyn hiivamäärän suhdetta oluen laatuun. Lopputuloksena he totesivat siirrostussuhteen olleen diasetyyliä lukuun ottamatta vähäinen tekijä maun suhteen. Tutkimus kuitenkin osoitti, että merkittävät ajansäästöt käymisprosessissa ovat mahdollisia siirrostussuhdetta nostamalla. Diasetyylitasojen hallinta vaatii kuitenkin hiivan ja prosessiolosuhteiden optimointia.

Suomenlinnan Panimolla oluterän hiivasiirteiden koko valitaan hiivavalmistajien suosituksiin ja aiempaan kokemukseen perustuen. Käytettyjen hiivamäärien vaikutuksia oluen lopulliseen laatuun ei ole ennen tätä opinnäytetyötä järjestelmällisesti seurattu.

### 3.3 Oluenvalmistus prosessina

#### 3.3.1 Vesi ja mallas

Vesi on yksi tärkeimmistä elementeistä oluen valmistuksessa. Veden tulee olla mikrobiologisesti ja kemiallisesti puhdasta. Veden mineraaliprofiili ja pH-arvo ovat tärkeitä suu-reita jotka vaikuttavat esimerkiksi mäsäysvaiheen entsyymiaktiivisuuteen. (Palmer 2006: 154– 161.)

Olutmallas on yleensä mallastettua ohraa, mutta myös muita viljoja käytetään oluttyypistä ja -reseptistä riippuen. Mallastettaessa vilja ensin kostutetaan ja sitä idätetään muutamien päivien ajan, jolloin sen lepotila purkautuu ja siemenjyvän alkiossa varastossa oleva tärkkelysmatriisi alkaa purkautua entsyymitoiminnan vaikutuksesta. Mallasta-

mosta ja valmistettavasta mallastyypistä riippuen itäminen pysäytetään muutaman päivän kuluttua kuivaamalla ja lämmittämällä. Kuivaus suoritetaan noin 80°C lämpötilassa, mikä varmistaa maltaan entsyymien jäämisen toimintakykyisiksi. Nykyiset mallastamot valmistavat myös runsaasti erilaisia erikoismaltaita, joita valmistetaan moninaisilla erikoisprosesseilla. Mallas esimerkiksi paahdetaan tai sen sisältämät sokerit karamelisoidaan valmiiksi jo valmistusvaiheessa. Näitä maltaita käytetään tuottamaan erilaisia makuja ja värejä olueen. (Kunze 2010: 114; 181; 202.)



Kuvio 2. Mallassäkkejä.

### 3.3.2 Mäskääminen

Varsinainen oluen valmistaminen aloitetaan mäskäysvaiheella, jossa mallasmyllyssä mekaanisesti hienonnettu mallasvilja sekoitetaan lämpimään veteen. Maltaan hienontamisella edesautetaan veden imeytymistä maltaaseen, ja mallasohran tapauksessa jyvän kuoriosalla on myös tärkeä tehtävä mallasmassan pitämisessä ilmavana myöhemmässä huuhteluvaiheessa. Mäskäysvaiheessa maltaan entsyymit alkavat pilkkoa tärkkelysketjuja yksinkertaisemmiksi sokereiksi, joita myöhemmin valmistusprosessissa hiiva sitten pystyy käyttämään ravinnokseen. (Kunze 2010: 223; 245.)

Prosessin tärkeimmät entsyymit ovat  $\alpha$ - ja  $\beta$ - amylaasit, jotka hydrolysoivat tärkkelysketjun muodostavia glukoosimolekyylejä erilleen toisistaan. Mäskäyslämpöä ja -aikaa säättämällä ja muuttamalla pystytään vaikuttamaan eri entsyymien suhteelliseen aktiivisuuteen ja tätä kautta mm. lopullisen olutvierteen sokeriketjuprofiiliin; prosentuaalisesti enemmän käymiskelpoisia sokereita sisältävä vierre käy kuivemmaksi (eli matalampaan ominaispainoon), kun taas vähemmän niitä sisältävä maistuu valmiinakin täyteläisemmältä ja makeammalta matalamman käymisasteen vaikutuksesta. Entsyymiaktiivisuus on vilkkainta n. 60 - 72°C välillä, ja kaikki entsyymit denaturoituvat mäskäyksen lopettavassa ns. "ulosmäskäys"- vaiheessa, jolloin lämpötila nostetaan 78°C: aan. (Palmer 2006: 141– 151; Kunze 2010: 249.)

Suomenlinnan Panimolla tyypillinen mäskäysvaihe sisältää seuraavat vaiheet:

- 1) maltaan sekoittaminen ja kostuttaminen 50°C veteen mäskipadassa
- 2) lämmön nostaminen 65°C asteeseen, pääkonversiotauko 60 minuuttia
- 3) lämmön nostaminen 72°C asteeseen, 10 minuuttia
- 4) lämmön nostaminen 78°C asteeseen, ulosmäskäys, 10 minuuttia

Suomenlinnan panimolla mäskäys tapahtuu kahdessa rinnakkaisessa mäskäysastiassa, joiden tyypillinen mallasmäärä on noin 200-300 kg valmistettavasta oluesta riippuen. Tähän määrään sekoitetaan vettä noin 600-800 litraa.

### 3.3.3 Siivilöinti ja huuhtelu

Mäskäyksen jälkeen tuloksena on veden ja mallasmassan muodostama massa, jossa entsyymien maltaasta pilkkomat sokerit ovat vapaana vesiliuoksessa. Mukana on myös mm. maltaasta peräisin olevia proteiineja, polyfenoleja, hivenaineita ja mineraaleja.

Huuhteluvaiheessa mäskistä erotetaan toisistaan makea mallassokerineste ja käytetty mallas. Käytännössä tämä tapahtuu erillisessä siivilöintiastiassa, ensin valuttamalla ja sitten huuhtelemalla loputkin sokerit massasta lämpimällä vedellä. Lopputuloksena on miltei täysin kiinteästä mallasaineksesta vapaa makea mallassokerineste, joka siirretään seuraavaksi keittokattilaan. (Briggs ym. 2004: 3–4; Kunze 2010: 299.)

Suomenlinnan panimolla rinnakkain mäskätyt kaksi mäskiä siivilöidään yhteisen välialtian kautta samaan keittopataan, ja keiton alkaessa nestetilavuus on noin 2000 litraa.

#### 3.3.4 Keitto

Valmistettua makeaa mallassokerinestettä keitetään 60 minuutin ajan, jolloin se steriloidaan mahdollisista mikrobiallisista kontaminanteista, ja suuri osa sen sisältämistä proteiineista koaguloituu. Tämä mm. parantaa oluen makua, suutuntumaa ja säilyvyyttä. (Kunze 2010: 323-324.)

Keittämisen aikana nesteeseen lisätään myös naaraspuolisen humalakasvin (*Humulus lupulus*) kukintoja tai niistä valmistettuja pellettejä. Humalan kukinnot eli "kävyt" sisältävät useita kemiallisia yhdisteitä, esimerkiksi alfahappoja, jotka vaikuttavat oluen makuun. Humalan sisältämät alfahapot isomerisoituvat keitettäessä ja antavat makealle maltaisuudelle vastamakua, eli *katkeroa*. Oluen katkerotaso ilmoitetaan usein IBU- lukuna (International Bitterness Units), jossa suurempi luku tarkoittaa suurempaa katkeroa. Syntyvät yhdisteet omaavat myös antimikrobiallisia ominaisuuksia, jotka inhiboivat gram-positiivisia bakteereja (Kunze 2010: 64; 323-324); näin humalan lisäämisellä on siis myös oluen säilyvyyttä edistävä vaikutus.



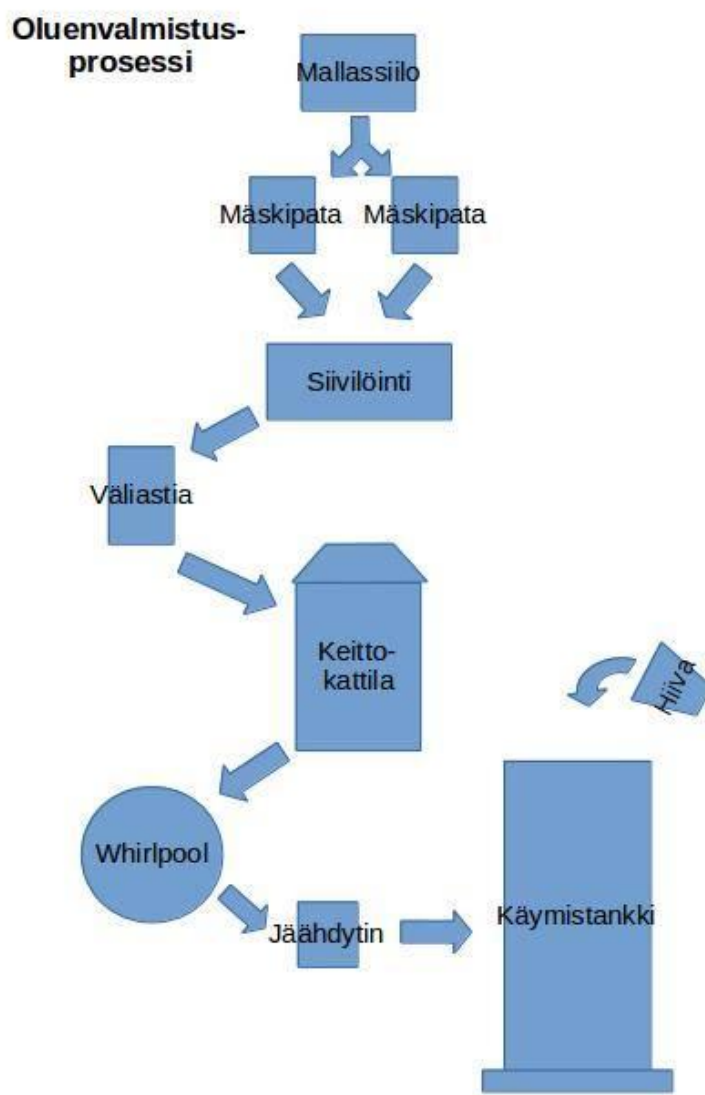
Kuvio 3. Humalapellettejä.

Keitetty ja humaloitu *olutvierre* siirretään keittokattilasta pyöreään ns. *whirlpool*-astiaan, johon se pumpataan suurella nopeudella pienessä sisääntulokulmassa, mikä saa koko vierteen pyörimään yhtenäisenä massana. Pyöriminen jatkuu noin puoli tuntia, minkä aikana keskipakoisvoima kokoaa keitossa koaguloituneet proteiinit, humalamassan, mallaspurun yms. kiinteän aineksen keoksi astian keskelle. Tämä mahdollistaa vierteen siirtämisen astian reunalta ilman kiinteitä aineksia jäädytettäväksi ja käymistankkiin. (Kunze 2010: 388-391.)

Vierre jäädytetään pintahiivaoluiden tapauksessa levylauhduttimella n. 18°C asteiseksi, ja siitä vierre siirretään edelleen steriilisti käymistankkiin. Keittäminen poistaa vierteestä käytännössä kaiken hapen, ja sitä lisätään jäädytyksen yhteydessä HEPA-suodattimen läpi puhalletulla steriilillä ilmalla. Riittävä happipitoisuus on tärkeä hiivan lisääntymiselle. Jäädyttämisestä eteenpäin vierre on erittäin altis mikrobiallisille kontaminaatioille; ravinnerikas vierre on ihanteellinen kasvualusta suurelle joukolle yleisiä pilaajamikrobeja. (Kunze 2010: 398-399; 406-407.)

Valmiin vierteen ominaispaino määritetään Suomenlinnan Panimolla Plato-asteina, mikä kertoo vierteen sisältämän liukoisen aineksen (etupäässä sokerit) määrän painoprosentteina. Esimerkiksi 12 °Plato vahvuinen vierre sisältäisi siis 12% liukoisia aineksia. Yleisesti sanottuna korkeampi ominaispaino tuottaa korkeamman alkoholipitoisuuden.

Vierteeseen siirrostetaan mahdollisimman nopeasti valmistumisen jälkeen oluthiivasiirros, jonka tehtävänä on valmistaa vierteestä olutta. Suomenlinnan Panimolla siirrostaminen tapahtuu yleisimmin lisäämällä suoraan käymistankin kattoluukusta kaatamalla vierteen sekaan kylmäkuivattua oluthiivaa.



Kuvio 4. Oluenvalmistusprosessin eri vaiheet.



## 4 Aineisto ja tutkimusmenetelmät

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää olutvierteeseen lisätyn alkuperäisen hiivasiiroksen koon ja käymisprosessin eri vaiheissa elossa olevien hiivasolujen mahdollinen suhde. Opinnäytetyössä käytettiin määrällistä (kvantitatiivista) tutkimusmenetelmää, sillä kyseessä on täsmällinen ilmiö. Sen rinnalla käytettiin myös laadullisen (kvalitatiivista) tutkimusmenetelmän piirteitä tulosten sekä tiedon luotettavuuden varmistamiseksi (esim. aistinvaraiset arvioinnit).

### 4.1 Näytteenotto ja hiivasolujen laskenta

Pääasiallisena mittausmenetelmänä käytettiin hiivasolujen suoraa kammiolaskentaa mikroskoopilla. Laskentakammiona käytettiin Neubauer improved- hemosytometriä, jonka tilavuus lasketulle alueelle on 100 nl. Mikroskopoitavien näytteiden värjääminen metyleenisinisellä mahdollistaa myös solujen elävyysprosentin määrittämisen samalla kertaa. (Briggs ym. 2004: 502; White — Zainasheff. 2010: 245). Kammiolaskenta on nopea ja yksinkertainen työmenetelmä.

Solumäärän ja elävyyden määrittämisessä sopiva suhde metyleenisinisistä on 1:1 näytteen kanssa. Elävät hiivasolut pystyvät pelkistämään värjäysaineen värittömään muotoon, jolloin värjäys näkyy vain kuolleissa hiivasoluissa. Kun lasketaan sekä värjäytyneiden että värjäytymättömien solujen määrät ja huomioidaan laimennossuhde, pystytään laskemaan hiivasolujen määrä suspensiossa sekä määrittämään elävien solujen osuus koko hiivasolumassasta. (Briggs ym. 2004: 502.) Metyleenisistä käytetään laajalti ja sen on todettu tuottavan hyviä tuloksia näytteen elävyyden pysyessä yli 80 %:ssa ja kunhan näytettä analysoi asiaan perehtynyt henkilö. (Briggs ym. 2004: 502.)

Vertailumenetelminä kammiolaskennalle käytettiin spektrofotometrillä suoritettua OD600- mittausta sekä maljaviljelyä YPD-agarille. OD600- määrittämisessä mitataan näytteen optista tiheyttä (engl. *optical density*), määrittämällä näytteen absorbanssi 600 nm-aallonpituuden valolle. (Trecó — Winston: 2008.) Solumäärien vastaavuus tietyille OD-arvoille riippuu monesta tekijästä; mm. käytettävän laitteiston ominaispiirteistä, tutkittavan hiivakannan solun koosta ja muodosta, yms., joten tutkimuksessa mitattiin OD-arvot lähinnä pohjustamaan panimon omia tulevia mittauksia, sekä mahdollisesti tukemaan kammiolaskennassa hahmottuvia solukonsentraatioiden kehityssuuntia.

Toisena vertailumenetelmänä viljeltiin näytelaimennoksia YPD-agar-maljoille, joita kasvatettiin sitten 24°C lämpötilassa. Maljoille kasvaneet pesäkkeet laskettiin inkuboinnin jälkeen. Jokainen yksittäinen pesäke on oletettavasti kasvanut yhdestä hiivasolusta, joten ne laskemalla pystytään laskemaan elävien solujen lukumäärä näytteessä. (Briggs ym. 2004.) Käytimme tätä laskentatapaa referenssinä varsinaiselle laskentakammiossa mikroskoopin avulla laskettavalle tekniikalle, joka on myös maljakasvatusta nopeampi menetelmä.

Työssä käytetyt menetelmät listattuna:

- Kammiolaskenta
- OD600-määrittäminen
- Maljalaskenta
- Ominaispainon mittaaminen
- pH:n mittaaminen
- Lämpötilan mittaaminen

## 5 Työn toteutus

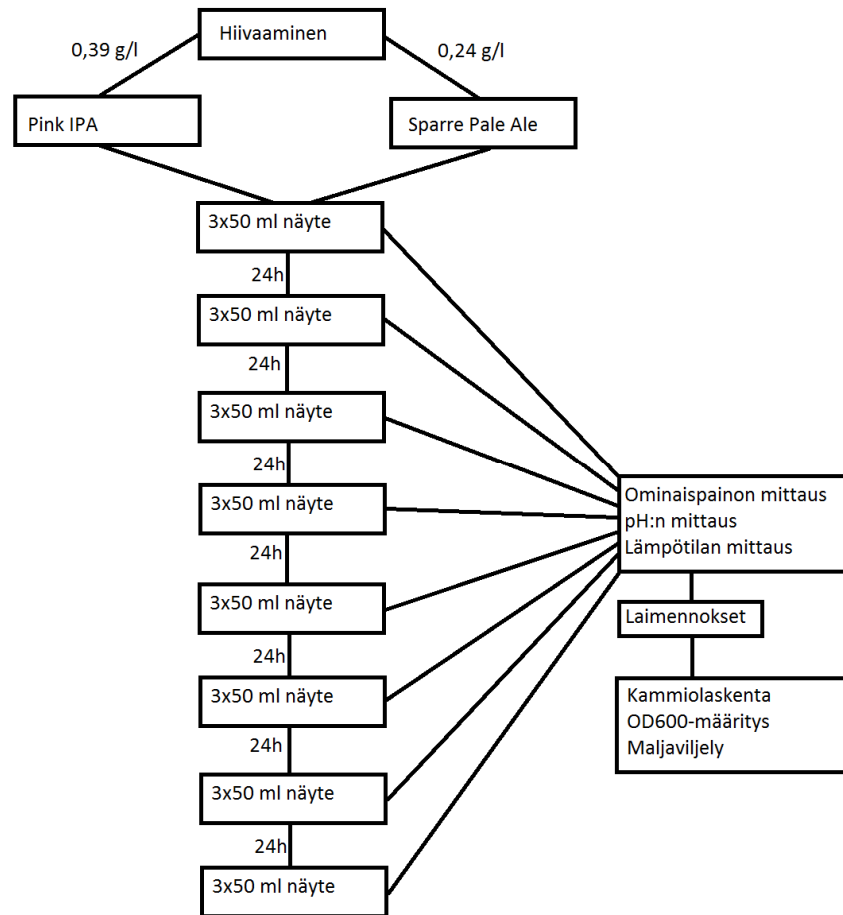
Mitattaviksi oluteriksi valikoituivat toteutusaikataulun sanelemana kaksi perusreseptiltään yksinkertaista pintahiivaolutta (Taulukko 2). Kummassakin käytettiin Fermentis Saffale US-05- hiivaa, ja niiden ominaispainot olivat tarpeeksi yhteneväiset vertailua ajatellen. Ensimmäisessä oluterässä ("Pink IPA") käytettiin maltaan lisäksi muutama painoprosentti marjatuoremehuja, jotka laskivat pH:n hieman normaalia alemmalle tasolle. Mittaukset suoritettiin kummastakin oluesta kahdeksan vuorokauden ajan keittopäivästä lähtien.

Taulukko 2. Tutkimukseen valikoituneet oluet ja niiden ominaisuudet.

<b>Olut</b>	<b>1. "Pink IPA"</b>	<b>2. "Sparre Pale Ale"</b>
<b>Keittopäivä</b>	13.3.2017	15.3.2017
<b>Kantavierreväkevyys ° Plato</b>	12,0	11,0
<b>Ph</b>	4,51	5,20
<b>Hiiva</b>	Safale US-05	Safale US-05
<b>Hiivasiirre g / litra</b>	0,39	0,24
<b>Eräkoko (litraa)</b>	1300	6300

Näytteenotto tapahtui Suomenlinnan Panimon tiloissa siellä valmistettavista oluista. Käytännössä työ suoritettiin siten, että panimolla käytiin ottamassa näytteitä kummastakin määritettävästä oluesta uuden oluterän hiivaamisen yhteydessä, ja tämän jälkeen 24 tunnin välein kahdeksan vuorokauden ajan. Kummassakin oluterässä kokeiltiin eri ko-koista hiivasiirrosta, jotta saataisiin näkyviin mahdolliset vaikutukset alkuperäisen siirrok-sen koon ja itse käymisessä toimivan hiivamäärän välillä.

Mitattavan oluen käymistankista otettiin näytettä kolmeen 50 ml Falcon-putkeen näyt-teenottohanan kautta. Ennen tätä laskettiin ulos vähintään 200 ml, jotta näytteenottoha-naan jääneet mahdolliset hiivapaakut yms. saatiin huuhdottua pois. Näytteestä mitattiin välittömästi lämpötila, pH sekä ominaispaino. Näytteet homogenisoitiin sekoittimella ja samalla saatiin poistettua niihin kertynyttä hiilidioksidia. Tämän jälkeen valmistettiin jo-kaisesta kolmesta rinnakkaisnäytteestä oma laimennossarjansa tislatus veden kanssa. Laimennoksia tehtiin 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 sekä 1:1 000 000. Kammiolaskentaa varten päädyttiin tekemään laimennos 1:2, jossa todettiin olevan las-kettavissa oleva määrä soluja. Tässä laimennoksessa soluja oli riittävästi, mutta ne eivät menneet päällekkäin tai muuten sekoittuneet toisiinsa. Laimennoksista 1:10, 1:100 sekä 1:1000 suoritettiin OD600-mittaukset ja näytteistä 1:10 000, 1:100 000 sekä 1:1 000 000 suoritettiin maljoille viljely.



Kuvio 5. Työn toteutuksen kulku.

Laimennetusta näytteestä sekoitettiin sekoittimella 1 ml laimennosta 1 ml metyleenisiniin (0,1%) steriilissä koeputkessa. Valmistettu seos sekoitettiin ja sitä siirrettiin pipetillä solulaskentakammioon. Hiivan annettiin laskeutua 2 minuuttia kammiossa ennen solujen laskemista. Solulaskenta suoritettiin 40x suurennoksella. Keskimmäisestä 5 x 5 ruudukosta laskettiin 5 pikkuruutua, joihin sisältyivät jokaiset neljä kulmaa sekä keskimäinen ruutu. Jos solut eivät olleet jakautuneet tasaisesti, valmistettiin uusi näyte. Ruudun vasenta ja ylärajaa halkovat solut laskettiin mukaan, oikeaa ja alarajaa halkovia soluja ei. Jakautuvia (engl. *budding*) hiivasoluja laskettiin mukaan, jos ne olivat kooltaan vähintään puolet emosolun koosta. Metyleenisinisen värjätessä kuolleet solut sinisiksi, laskettiin kuolleet ja elävät solut erikseen. Jokaisesta näytteestä valmistettiin 3 rinnakkaisnäytettä laskettaviksi, ja jokainen niistä laskettiin kahdesti. (Annemüller — Manger — Lietz. 2011: 342-345; White Labs.)

Kokonaissolumäärä saatiin seuraavalla laskukaavalla: tulos x 2 x 5 x laimennos x 10<sup>4</sup>. Laskukaavassa tulos kerrotaan kahdella metyleenisinisien vuoksi. Kertomalla tämä viidellä saadaan 5 lasketun ruudun tuloksesta koko 25 ruudun keskimääräinen tulos. Kertomalla tämä laimennoskertomalla saadaan 1:1 näytteen tulos ja kertomalla tämä edelleen 10<sup>4</sup>:llä saadaan oikea tilavuus kammion tilavuuden ollessa 100 nl. Tuloksena saadaan siis solumäärä/ml. (White Labs.)

1				2
		5		
4				3

Kuvio 6. Solukammionäkymä ja lasketut ruudut

Kokonaissolumäärät sekä pelkkien elävien hiivasolujen määrät laskettiin erikseen. Prosentuaalinen elävyys saatiin laskettua jakamalla elävien hiivasolujen määrä kokonaissolumäärällä. (Briggs ym. 2004: 502.)

Maljakasvatusta varten käytettiin YPD Agar-kasvualustaa, joka valmistettiin itse.

#### YPD- agar

- tryptooni 36 g
- hiivauute 18 g
- glukoosi 36 g
- agar 27 g
- add 1800 ml aqua

Agar jaettiin lasipulloihin ja steriloitiin 15 minuutin ajan 121-124°C:ssä. Sen jälkeen se jäähdytettiin 55°C:hen ja kaadettiin steriileille maljoille vetokaapissa. Maljojen annettiin jäähmettyä kansi suljettuna ja säilytettiin jääkaapissa.

Näytteitä viljeltäessä pipetoitiin maljalle 100 µl näytettä, levitettiin se steriilillä L- viljelysauvalla tasaisesti kasvualustalle, ja kasvatettiin maljoja 24°C:ssä kunnes pesäkkeet olivat tarpeeksi isoja laskettaviksi (noin 3 vrk) ja laskettiin pesäkkeet.

Tulos saatiin kertomalla laskettu pesäkemäärä näytteen konsentraatiolla (laimennokset 1:10 000, 1:100 000 tai 1:1 000 000) sekä näytemäärällä (10 x 100 µg = 1 ml).

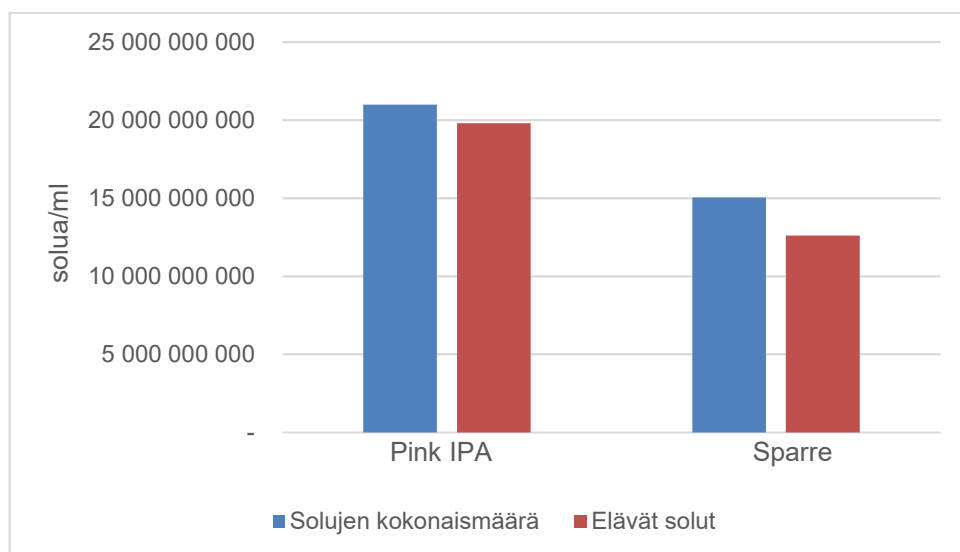
Kunkin oluterän hiivauksen yhteydessä suoritettiin myös käytettävän hiivan referenssielävyyden mittausta, jossa nesteytettiin 0,5 g käytettävää hiivaa 50 g keitettyä ionivaihdettua vettä ja annettiin liuoksen nesteytyä 30 minuuttia. Tämän jälkeen sille suoritettiin samat mittaukset kuin vierrenäytteille.

## 6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 6.1.1 Viiveaika ja hiivaus

Vaikka Pink IPA:ssa käytettiin 33,2 % suurempaa hiivaymppeä suhteessa Sparre Pale Aleen, niin käymistankista ulospurkautuvan hiilidioksidin perusteella arvioituna kummankin oluterän viiveaika oli noin 24 tuntia. Hiilidioksidin muodostus alkoi hitaasti ja voimistui noin 24 tunnin ajan alkamisestaan, pysyen sitten jotakuinkin tasaisena n. 6-7 vuorokauden ajan. Tästä voi päätellä, että osa hiivasolukosta on vielä aerobisen viiveajan puitteissa, kun osa solukosta on jo siirtynyt anaerobiseen tilaan.

Käytetyn hiivan valmistaja Fermentis lupaa yhden gramman sisältävän yli  $6 \times 10^9$  elävää hiivasolua (Fermentis 2016). Referenssielävyydsmittauksissa havaittiin kuitenkin vain noin kolmannes tästä solumäärästä, ja solukon elävyysprosentti oli vieläkin heikompi (Kuvio 7). Nesteytykseen käytettiin ionivaihdettua vettä.

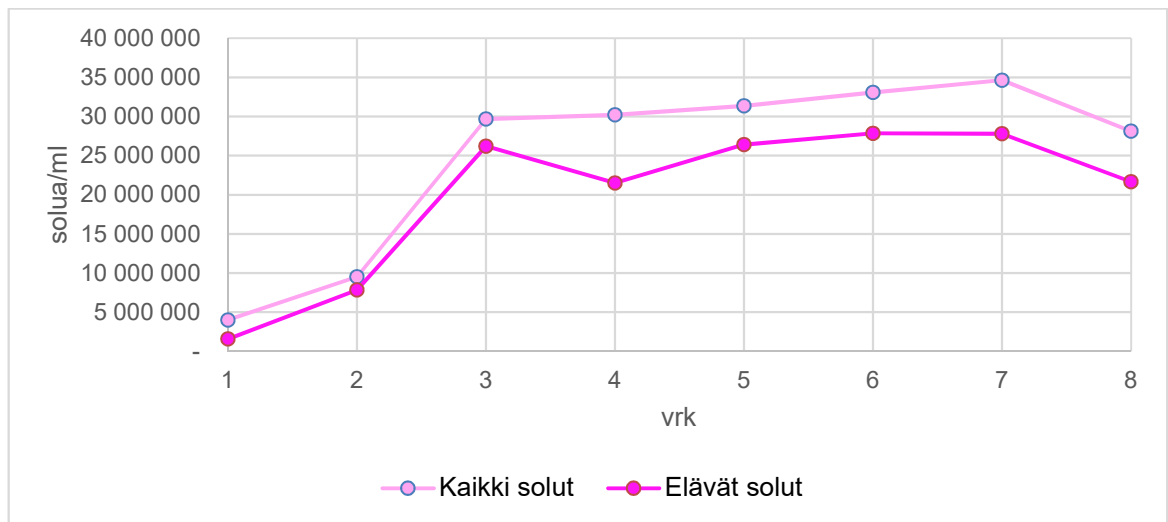


Kuvio 7. Referenssinäytteiden kokonaishiivasolumäärät sekä elävyydet. Pink IPA:n referenssin elävien solujen osuus kokonaissolumäärästä oli 71,7% ja Sparren referenssin elävien solujen osuus kokonaissolumäärästä 63,6%.

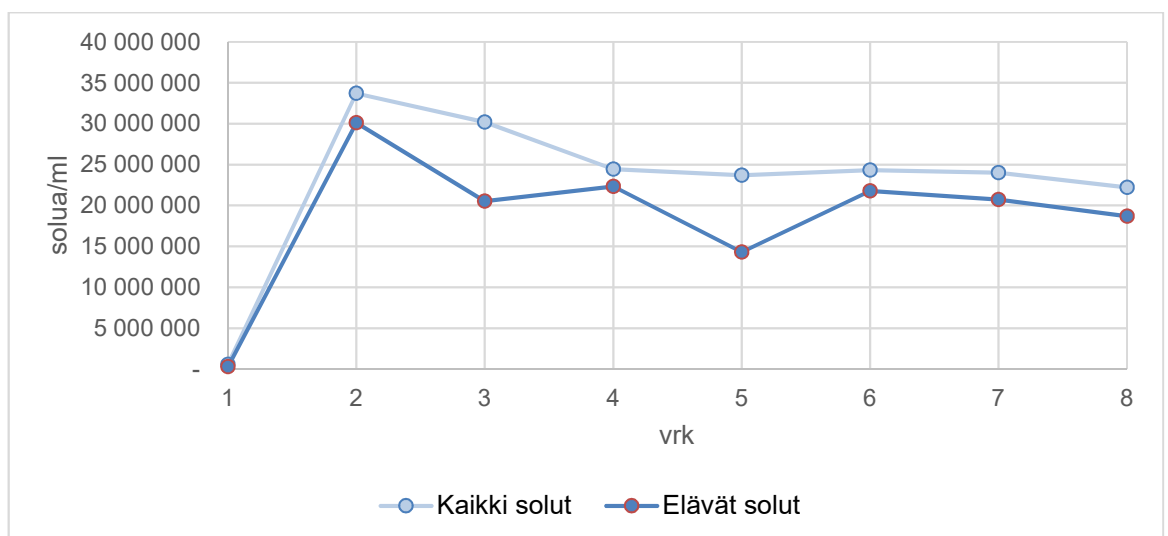
Ensimmäiset varsinaiset mittausräytteen otettiin tankeista 30 minuuttia sen jälkeen, kun koko oluterä oli saatu käymistankkiin. Nämäkin näytteet antoivat solumääräksi melko pieniä arvoja.

### 6.1.2 Pääkäyminen

Kummankin oluterän pääkäyminen edistyi melko tasaisesti. Solulaskennassa havaittiin nopeasti viiveajan jälkeen nousevan kokonaissolumäärä (Kuviot 8 ja 9). Kummankin erän kokonaissolupitoisuudet nousivat käytetyn hiivasiirteen kokoerosta huolimatta suunnilleen samalla kokonaistasolle, ollen korkeimmillaan noin  $3,4 \times 10^7$  solua/ml.

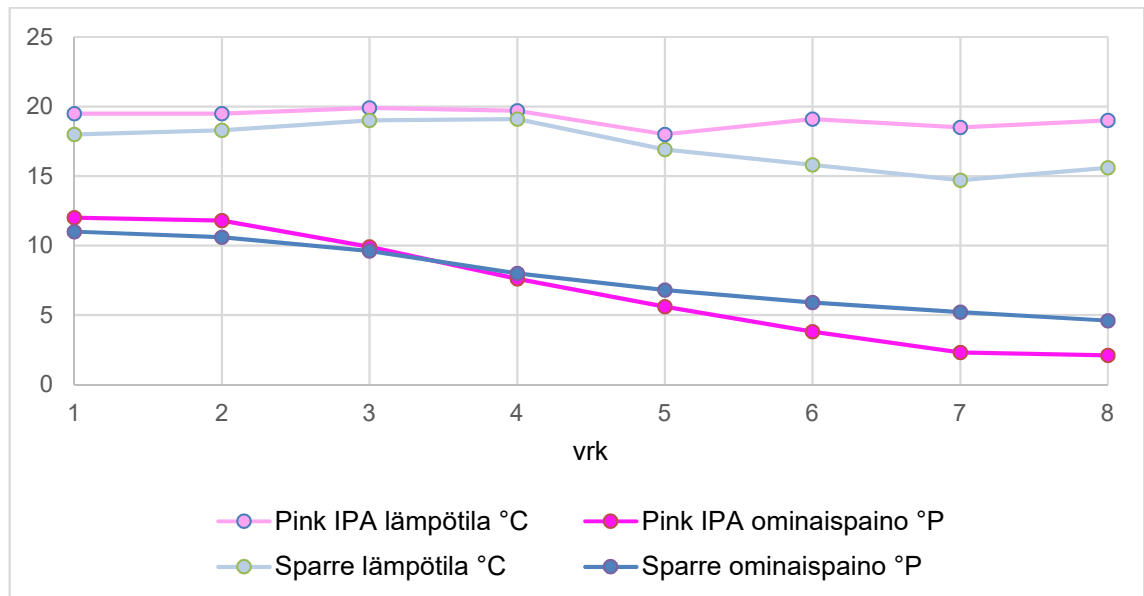


Kuvio 8. Pink IPA:n kokonaissolumäärän ja elävien solujen määrän suhde.



Kuvio 9. Sparren kokonaissolumäärä ja elävien solujen määrän suhde.

Sparre Pale Alen käymistankin jäähdytysjärjestelmään tuli noin neljän vuorokauden käymisen jälkeen tekninen vika, mikä laski oluen käymislämpöä noin kolme astetta aiottua alemmaksi. Tässä vaiheessa oluen käymisnopeudessa on havaittavissa hidastuminen, mutta pienen otannan valossa on mahdotonta päätellä, kuinka suuri vaikutus lämpötilalla tähän oli.

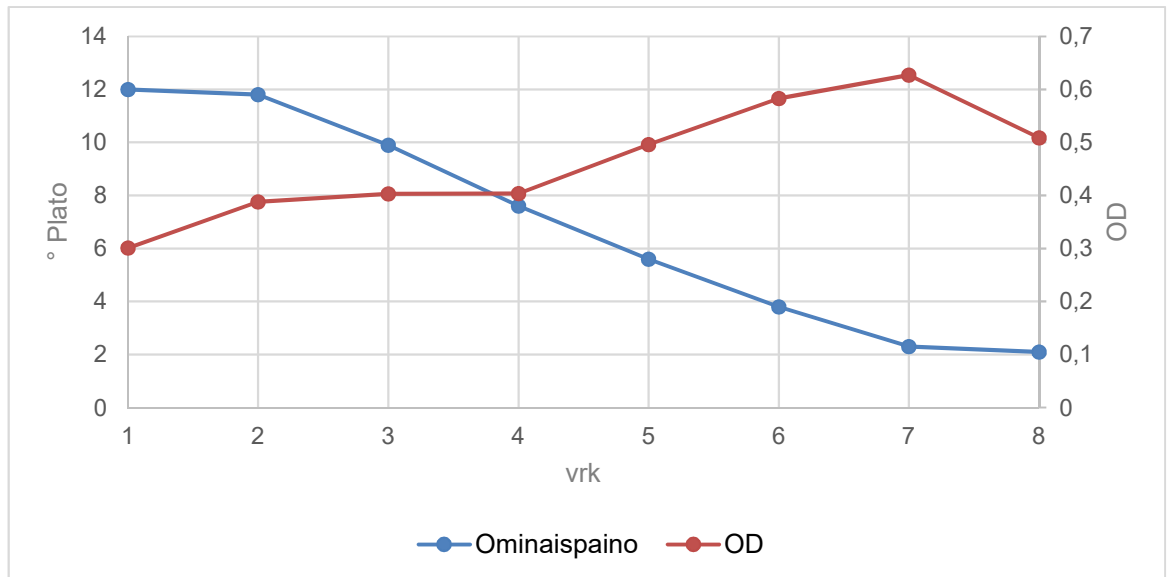


Kuvio 10. Oluterien lämpötila- ja ominaispainoerot.

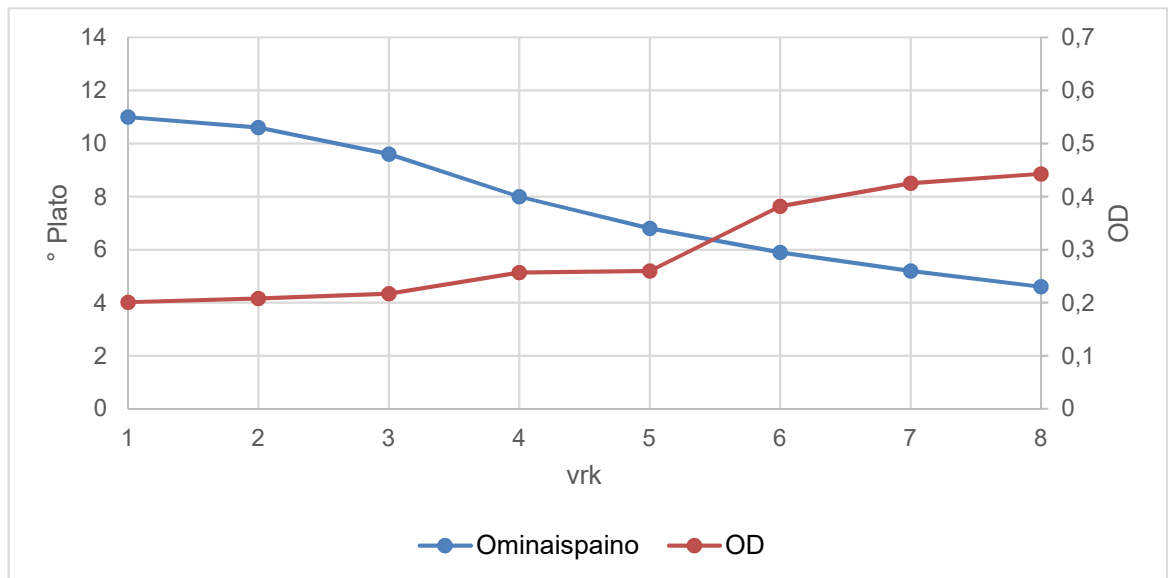
Mittausten mukaan Pink IPA:n pääkäyminen tapahtui noin 33% nopeammin ja ominaispaino laski 9,9 Plato-astetta kahdeksassa vuorokaudessa (Kuvio 10). Sparre Pale Alen ominaispaino putosi samassa ajassa 6,6 Plato-astetta.

OD600- mittausten tulokset seurasivat suhteessa oman oluteränsä solulaskentatuloksia, mutta vertailukelpoisia yhteneväisyyksiä kahden mitatun erän OD600- arvojen välillä ei löytynyt (Kuviot 11 ja 12).





Kuvio 11. Pink IPA:n ominaispaino suhteessa OD arvoon.



Kuvio 12. Sparren ominaispaino suhteessa OD arvoon.

## 6.2 Pohdinta

Opinnäytetyöprojektimme oli kattava poikkileikkaus reaaliaikaisten tieteellisten mittausten suunnitteluun ja toteuttamiseen, sekä niiden mahdollisuuksiin ja haasteisiin. Työ opetti meille konkreettisesti huolellisen ennakkosuunnittelun tärkeyden sekä suhteellisen pieneenkin mittaustutkimukseen sisältyvän käytännön laboratoriotyön teknisen ja organisatorisen haastavuuden.

Suurimpana muutoksena toteutukseen tuli kesken mittausjakson havaitut ongelmat elatusmaljaviljelyssä. Allekirjoittaneiden rutiinin puute kyseisessä työmenetelmässä yhdistettynä laboratorion epäoptimaalisiin steriilin työskentelyn puutteisiin (esimerkiksi ei laminaarivirtauskaappia), aiheutti sekä laatuongelmia (kontaminaatiokasvua maljoilla) että tuloksiltaan vertailukelvottomia kasvatustuloksia. Toisaalta kammiolaskenta tuntui olevan nopeutensa ja reaaliaikaisuutensa ansiosta tällaiseen nopeasti etenevään mittaustutkimukseen paremmin soveltuva protokolla. Referenssielävyyksien kohdalla pohdittavaksi jäi ionivaihdetun veden pienemmän elektrolyyttipitoisuuden mahdollinen negatiivinen vaikutus hiivan nesteytykseen.

Mittausotantamme oli niin pieni, ettei tuloksista voi vetää yleisiä johtopäätöksiä hiivasiirteen koon merkityksestä käymisprosessiin. Suhteellisesti suurempi hiivasiirre tuotti kyllä nopeamman käymisen, mutta toisen erän tahaton lämpötilan lasku saattoi osaltaan hidastaa sen käymistä. Kuitenkin olemassa oleva kirjallisuus tukee vahvasti nimenomaan suuremman hiivasiirteen tuottamaa ajallisesti nopeampaa käymistapahtumaa, ja tältä osin voimme todeta havainneemme yhtäläisyyksiä mittauksissamme.

Viiveajan ja hiivan huippusolumäärän yhteneväisyydet eri kokoisten hiivasiirteiden välillä tukevat Suomenlinnan Panimolla kokemuksen kautta muodostettua käsitystä siitä, että pienempikin hiivasiirre kykenee käyttämään oluterän valmiiksi, ja hiivan ollessa yksi kalteimmista oluentuotannon raaka-aineista tästä seuraa ymmärrettävästi taloudellista säästöä. Suurempi hiivasiirre puolestaan saattaa nopeuttaa valmistusprosessia, ja tuotannon tehokkuutta ja nopeutta optimoitaessa tämä saattaa nousta edellistä tärkeämmäksi taloudellisuuden parantajaksi.

Jatkotutkimuksia voisi kohdistaa hiivan referenssielävyyden määrittämiseen, kokeillen tislattun ja tislaamattoman veden vaikutuksia nesteytetyn hiivamassan solumääriin ja elävyyteen. Yleensäkin selvästi suuremman mittaustulosmäärän kerääminen useammasta oluterästä on vaatimuksena varmojen suuntaviivojen hahmottamiseksi hiivasiirteen koon vaikutuksista oluen käymiseen, sekä OD- arvojen ja hiivamassan välisten riippuvuussuhteiden kartoittamiseksi.

### 6.3 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys

Luotettavuuden arviointi on tärkeä osa tieteellisen tutkimuksen kokonaisuutta, ja omanikin tutkimuksemme kohdalla pohdimme useaan otteeseen käytettyjen menetelmien sekä tämän myötä saatujen tutkimustulosten luotettavuutta.

Noudatimme tutkimuksessamme kirjallisuudessa esitettyjä protokollia jokaisessa työvaiheessa. Solujen kammiolaskennasta saadut tulokset ovat mielestämme erittäin luotettavia. Tulokset ovat johdonmukaisia ja ne olivat kaksoisluettuja. Kuitenkin Sparre Pale Alen käymisprosessin aikana ilmenneet tekniset ongelmat saattoivat vaikuttaa tämän oluterän tuloksiin, ja otimme tämän huomioon arvioidessa saatuja tuloksia.

Maljalaskennan tuloksissa taasen oli suurta hajontaa jopa rinnakkaisnäytteiden kesken, muutamalla maljalla havaittiin kontaminaatiokasvua eivätkä saadut tulokset vertautuneet lainkaan kammiolaskennassa ja OD-mittauksissa saatuihin tuloksiin.

Solulaskennan aikana kirjaaminen tapahtui laskijan toimesta, samoin kuin tulosten laskeminen ja siirtäminen tuloskaavioon. Inhimilliset laskuvirheet tai kirjoitusvirheet tulosten siirrosta ovat periaatteessa mahdollisia, mutta tulosten johdonmukaisuus ei tällaisen virheen mahdollista tapahtumista tue.

Toimimme tutkimuksen aikana tutkimuseettisten periaatteiden mukaisesti, eli noudatimme tutkimuksessa rehellisyyttä ja kollegiaalisuutta. Vielä luotettavamman tutkimuksesta olisi voinut saada suuremmalla eräotannalla ja mahdollisesti täysin saman oluen valmistamisella samaan aikaan eri hiivamäärillä, jolloin eri vierteen aiheuttamat poikkeamat olisi saatu minimoitua, nyt esimerkiksi vierteiden happamuudet (pH) poikkesivat melko voimakkaasti toisistaan.

## Lähteet

Acitelli, Tom. 2013. Audacity of hops. Chicago Review Press. USA.

Annemüller, Gerolf — Manger, H-J — Lietz, P. 2011. The yeast in the brewery. VLB Berlin. Gilching.

Barnett, James A. 2000. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries. 1850–1880.

BJCP 2015 Style guidelines. Beer Style Guidelines. 2015. BJCP.

Briggs, Dennis E. — Boulton, Chris A. — Brookes, Peter A. — Stevens, Roger. 2004. Brewing Science and Practice. Woodhead Publishing. Englanti.

Delphine, S. — Legras, J. 2011. Bread, beer and wine. Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Ranska.

Fermentis. Yeast specification sheet. 2016. Verkkodokumentti. <<http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2016/12/SafAle-US-053.pdf>>. Luettu 3.4.2017.

Kunze, Wolfgang. 2010. Technology. Brewing & Malting. VLB. Saksa.

Palmer, John J. 2006. How to Brew. Brewers Publications. USA.

*Saccharomyces cerevisiae* cells in DIC microscopy. 2010. Wikimedia Commons Public Domain. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:S\\_cerevisiae\\_under\\_DIC\\_microscopy.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg)>. Viitattu 13.4.2017.

Treco, D. A. — Winston, Fred. 2008. Growth and Manipulation of Yeast. Current Protocols in Molecular Biology 13.2.1-13.2.12.

Verbelen, PJ. — Dekoninck, TM. — Saerens, SM. — Van Mulders, SE. — Thevelein, JM. — Delvaux, FR. 2009. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1/2009. 155-167.

White, Chris — Zainasheff, Jamil. 2010. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Publications. Colorado. 121; 122.

White Labs. Cell counting/ viability testing. Luettu 8.11.2016. < <http://www.white-labs.com/beer/cell-counting-viability-testing-0>>

## Tulokset

Pink IPA									
Pv	Solujen kokonaismäärä			Solujen kokonaismäärän KA			Elävien solujen määrät		
	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3						
1	4 000 000	4 150 000	3 900 000		4 016 667		1 566 500		
2	8 000 000	10 650 000	9 900 000		9 516 667		7 822 700		
3	26 400 000	30 500 000	32 150 000		29 683 333		26 210 383		
4	28 500 000	31 000 000	31 150 000		30 216 667		21 514 267		
5	35 200 000	29 200 000	29 700 000		31 366 667		26 410 733		
6	32 300 000	33 300 000	33 600 000		33 066 667		27 842 133		
7	34 100 000	34 200 000	35 600 000		34 633 333		27 810 566		
8	28 700 000	24 800 000	30 800 000		28 100 000		21 665 100		
Sparre									
Pv	Solujen kokonaismäärä			Solujen kokonaismäärän KA			Elävät solut		
1	500 000	650 000			575 000		277 725		
2	37 250 000	33 500 000	30 350 000		33 700 000		30 094 100		
3	34 400 000	25 800 000	30 400 000		30 200 000		20 505 800		
4	24 300 000	23 700 000	25 300 000		24 433 333		22 307 633		
5	29 300 000	21 200 000	20 600 000		23 700 000		14 291 100		
6	28 000 000	22 700 000	22 250 000		24 316 667		21 763 417		
7	23 600 000	23 900 000	24 500 000		24 000 000		20 712 000		
8	19 800 000	22 200 000	24 600 000		22 200 000		18 670 200		
Sparre									
Pink IPA					Sparre				
Pv	Celsius	Plato	pH		Pv	Celsius	Plato	pH	
1	19,5	12	4,51	4,51	1	18	11	5,2	5,2
2	19,5	11,8	4,42	4,42	2	18,3	10,6	5,1	5,1
3	19,9	9,9	4,3	4,3	3	19	9,6	4,65	4,65
4	19,7	7,6	4,14	4,14	4	19,1	8	4,54	4,54
5	18	5,6	4,08	4,08	5	16,9	6,8	4,49	4,49
6	19,1	3,8	4,12	4,12	6	15,8	5,9	4,42	4,42
7	18,5	2,3	4,12	4,12	7	14,7	5,2	4,41	4,41
8	19	2,1	4,16	4,16	8	15,6	4,6	4,37	4,37
Sparre									
Pink IPA					Sparre				
Pv	OD	1:10	1:100	1:1000	Pv	OD	1:10	1:100	1:1000
1		0,301	0,029		1	0,288	0,201	0,002	
2		0,388	0,03		2	0,359	0,208	0,002	
3		0,403	0,031		3		0,217	0,017	0,001
4	1,921	0,404	0,002		4		0,257	0,033	0,001
5		0,496	0,041	0,002	5		0,26	0,03	0
6		0,583	0,065	0,005	6		0,382	0,044	0,002
7		0,627	0,065	0,011	7		0,425	0,04	0,003
8		0,509	0,049	0,003	8		0,443	0,041	0,002
Sparre									
Pink IPA					Sparre				
Pv	Elävyys %	Näyte 2	Näyte 3	Elävyyden KA %	Pv	Elävyys	Näyte 2	Näyte 3	Elävyyden KA
	Näyte 1					Näyte 1			
1	37,0	38,2	41,8	39,0	1	27,3	69,2	48,3	48,3
2	80,6	87,8	78,2	82,2	2	89,1	89,3	89,5	89,3
3	89,9	86,7	88,2	88,3	3	69,2	63,2	71,4	67,9
4	67,6	77,8	68,1	71,2	4	89,9	93,3	90,7	91,3
5	87,8	83,9	80,8	84,2	5	42	60,4	78,6	60,3
6	89,2	83,5	79,8	84,2	6	83,2	92,7	92,7	89,5
7	81,8	79,5	80,1	80,5	7	87,3	87	84,5	86,3
8	75,3	74,6	81,5	77,1	8	84,9	90,1	77,2	84,1