



CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



Utvärdering av bryggeriers möjligheter till kvalitetsbestämning av öl genom kemisk analys

En jämförande studie gällande GC-MS och UV/Vis-spektrofotometri

Kandidatarbete inom analytisk kemi

ELVIRA ARNSTRAND JOHANNES HEDFORS
ELIN FORSLING MAX LILJEQVIST
AGNES FREDRIKSEN BRANKO MARKOVIĆ

INSTITUTIONEN FÖR KEMI OCH KEMITEKNIK
AVDELNINGEN FÖR KEMI OCH BIOKEMI

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2021
www.chalmers.se
Kandidatarbete KBTX10-21-03

KANDIDATARBETE KBTX10-21-03 2021

Utvärdering av bryggeriers möjligheter till kvalitetsbestämning av öl genom kemisk analys

En jämförande studie gällande GC-MS och UV/Vis-spektrofotometri

ELVIRA ARNSTRAND	JOHANNES HEDFORS
ELIN FORSLING	MAX LILJEQVIST
AGNES FREDRIKSEN	BRANKO MARKOVIĆ



CHALMERS

KEMI OCH KEMITEKNIK
Kemi och Biokemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2021

Utvärdering av bryggeriers möjligheter till kvalitetsbestämning av öl genom kemisk analys. En jämförande studie gällande GC-MS och UV/Vis-spektrofotometri.

ELVIRA ARNSTRAND JOHANNES HEDFORS
ELIN FORSLING MAX LILJEQVIST
AGNES FREDRIKSEN BRANKO MARKOVIĆ

© ELVIRA ARNSTRAND, 2021. © ELIN FORSLING, 2021.
© AGNES FREDRIKSEN, 2021. © JOHANNES HEDFORS, 2021.
© MAX LILJEQVIST, 2021. © BRANKO MARKOVIĆ, 2021.

Handledare: Nan Albertson, Per Malmberg
Examinator: Nikola Marković

Kemi och Kemiteknik
Chalmers Tekniska Högskola
412 96 Göteborg, Sverige
Telefon + 46 31 772 1000

Göteborg, Sverige 2021
Gothenburg, Sweden 2021

Förord

Denna rapport är en kandidatuppsats skriven på kemiteknik-programmet på Chalmers Tekniska Högskola. Arbetet genomfördes under vårterminen 2021 av en grupp på sex stycken studenter. Det har varit ett mycket intressant och lärorikt arbete som har fördjupat gruppens kunskap inom både kemisk analys, ölbryggeri och de olika smakkomponenterna i öl.

Vi vill framförallt tacka våra handledare Per Malmberg och Nan Albertson för alla ideér, värdefull feedback och givande diskussioner. Ni har väglett oss framåt och utan er hade detta arbete vart omöjligt att färdigställa.

Vi vill även rikta vår tacksamhet till Poppels Bryggeri i Jonsered för ölprover och speciellt bryggare Kristóf Szappanos för svar på frågor kring val och provtagning av ölen. Under det laborativa arbetet hade vi även stor hjälp av Simon Uzoni som vi vill tacka för god vägledning och trevliga timmar inne på labbet. Tack även till chefbryggmästare Richard Bengtsson på Spendrups för att du ville avsätta din tid och berätta mer om ditt arbete. Slutligen vill vi även tillägna ett tack till Joshua Mayers, före detta delägare av Craft Labs som ställt upp på intervju kring företaget och bryggeriers efterfrågan av kemisk ölanalys.

Stort tack!

Abstract

This report accounts for chemical analysis of beer. The methods which have been used for the analysis are UV/Vis spectrophotometry and GC-MS. For extraction and injection of the analytes in the GC-MS, three different methods were used. These were HS-SPME, IM-SPME and direct injection. The purpose of the analyses was to evaluate how useful different methods are for breweries. The utility of the methods were evaluated in both the aspect of what type of information was obtained as well as the aspect of cost. The financial aspect allows certain methods to be more suitable for some breweries but not for others. For breweries that have greater financial opportunities investments in expensive equipment can be profitable. Similar investments may be impossible for smaller breweries. The laboratory work was supplemented with literature studies as well as interviews with representatives from the brewing industry. The results from the experiments showed that HS-SPME with an extraction time of 15 minutes was the most effective method for beer analysis. This conclusion could be drawn since VOCs, which are most relevant for beer analysis, were best demonstrated with HS-SPME. An extraction time longer than 15 minutes did not provide any further valuable data. The conclusion was also drawn that the UV/Vis spectrophotometer can be valuable equipment to invest in if knowledge about specific measurements is possessed. It is not sustainable for smaller breweries to pay for the development of a method for analysis. Therefore a market exists for consultants, e.g BeerLab, that can perform analyses of beers for the smaller breweries.

Sammanfattning

Arbetet som denna rapport redovisar behandlar kemisk analys av öl. Metoderna som använts för analysen är UV/Vis-spektrofotometri och GC-MS. För GC-MS användes HS-SPME, IM-SPME samt direktinjektion för extrahering och injektion av analyterna. Syftet med analyserna var att utvärdera hur användbara olika metoder är för bryggerier. För att utvärdera användbarheten sågs metoderna både i aspekt av vad för information som erhålls samt ur en ekonomisk aspekt. Den ekonomiska synvinkeln gör att olika metoder lämpar sig för vissa bryggerier men inte för andra. För de bryggerier som har större ekonomiska möjligheter kan en investering i dyr apparatur vara lönsam. Samma investering kan vara omöjlig för mindre bryggerier där andra alternativ som sensorisk analys och enklare kemiska analyser får implementeras. Laborativt arbete utfördes, vilket kompletterades med litteraturstudier samt intervjuer med branschfolk. Resultaten av laborationerna visade att HS-SPME med en extraktionstid på 15 minuter är den bästa metoden för att analysera öl. Denna slutsats kunde dras då VOC:er, vilka är mest relevanta för ölanalys, påvisades bäst med HS-SPME och en extraktionstid på över 15 minuter gav ingen ytterligare värdefull data. Slutsatsen drogs även att en UV/Vis-spektrofotometer kan vara en bra apparatur att köpa in om det finns kunskap om specifika mätningar att utföra. Det är inte hållbart för mindre bryggerier att själva betala för att utveckla en analysmetod. Därför finns det en marknad för konsultföretag, som exempelvis BeerLab, vilka kan utföra analyser på öler åt de mindre bryggerierna.

Innehåll

1	Inledning	1
2	Bakgrund - Öl som hantverk	2
2.1	Tillverkning av öl	2
2.2	Ölstilar	3
2.3	Bryggerier i Sverige	3
2.4	Bryggmästare	4
3	Definition av projektet	5
3.1	Problemformulering	5
3.2	Syfte och frågeställningar	5
3.3	Avgränsningar	6
3.3.1	Prover	6
3.3.2	Apparatur och metod	6
4	Teori - Ölets kemi och analys	7
4.1	Arom- och smakföreningar i öl	7
4.1.1	Alkoholer	7
4.1.2	Estrar	7
4.1.3	Ketoner	7
4.1.4	Humlesyror	8
4.1.5	Svavelföreningar	8
4.2	Instrument och tekniker	8
4.2.1	GC-MS	8
4.2.2	SPME	8
4.2.3	Direktinjektion	9
4.2.4	UV/Vis-spektrofotometri	9
4.3	Analys av öl på bryggerier	9
4.3.1	Sensorisk analys	10
4.3.2	Kemisk analys	10
4.3.3	Företag som tillhandahåller analystjänster	11
5	Metod	12
5.1	Utförande	12
5.1.1	Provberedning	13
5.1.2	SPME	13
5.1.3	Direktinjektion	14
5.1.4	UV/Vis-spektrofotometri	14
5.2	Dataanalys	14
5.2.1	Manuell toppsortering	15
6	Resultat	16
6.1	Gaskromatogram och masspektrum	16
6.1.1	Jämförelse mellan Prov 1 och Prov 2	17
6.1.2	Avgränsning i datapresentation: varför IM valdes bort.	17

6.2	Antal påvisade ämnen	18
6.3	HS-SPME: påvisade ämnen i proven	19
6.3.1	Prov 1: HS 5 minuter	19
6.3.2	Prov 1: HS 15 minuter	20
6.3.3	Prov 1: HS 30 minuter	21
6.3.4	Prov 2: HS 5 minuter	22
6.3.5	Prov 2: HS 15 minuter	22
6.3.6	Prov 2: HS 30 minuter	23
6.4	UV/Vis-spektrofotometrianalys	23
7	Diskussion	24
7.1	Värdet av GC-datan	24
7.2	Provtagning med HS	24
7.3	Provtagning med IM	25
7.4	Provtagning med direktinjektion	25
7.5	UV/Vis-spektrofotometrins applicerbarhet	25
7.6	Kemisk analys av öl	26
7.7	Industriellt värde	27
7.8	Felkällor	28
7.8.1	SPME	28
7.8.2	Apparatur	28
7.8.3	Provberedning	28
7.8.4	Prover	28
7.8.5	Mänskliga faktorn	28
7.9	Etiska aspekter	29
7.10	Framtida problemställningar	29
8	Slutsatser	30

Nomenklatur

ALS	<i>Automatic Liquid Sampler / Automatisk vätskeprovtagare</i> Instrument som automatiskt suger upp provet och injicerar in det i gaskromatografen.
Heterocyklisk förening	Cyklisk organisk förening som innehåller minst en atom i ringskelettet som inte är kol eller väte, det vill säga en heteroatom.
HS	<i>Headspace / Huvudutrymme</i> Tillämpning av SPME där fibern exponeras i huvudutrymmet ovanför provet.
IBU	<i>International Bitterness Units / Internationell enhet för beska</i> Ett mått på beska i öl.
IM	<i>Immersive / Nedsänkt</i> Tillämpning av SPME där fibern sänks ner i provet och exponeras.
Munkänsla	Känslan som uppstår i munnen förutom smak. Ett torrt vin ger exempelvis en annan munkänsla jämfört med mjölk.
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> Forskarorganisation som drivs av USA:s handelsdepartement.
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction / Fastfas mikroextraktion</i> Vätskefri provberedningsmetod för att extrahera analyter med hjälp av en adsorberande fiber.
VDK	<i>Vicinal Diketone / Vicinal diketon</i> Grupp av smakämnen som finns i öl.
VOC	<i>Volatile Organic Compound / Lättflyktig organisk förening</i> Organisk förening som lätt förångas i rumstemperatur.

1 Inledning

På många universitet och högskolor finns en stark tradition av pubkultur och smakprovningar, så även på Chalmers. Det har både blivit ett sätt att umgås och ett intresse som kan bidra till gemenskap. Som chalmerister med intresse av analytisk kemi var därför kemisk analys av öl ett lockande val av kandidatarbete. I denna rapport redovisas resultatet av kemisk analys, intervjuer med branschfolk och litteraturstudier om öl. Genom att arbeta med apparatur i olika prisklasser kunde bryggeriers möjligheter att använda sig av dessa utvärderas.

Olika sorters öl tillverkas i stort sätt utifrån samma grundläggande steg. Variationer i tillverkningsprocessen leder till olika ölsorter med varierande karaktärer och smak. Den ölsort som analyseras i denna studie är barley wine vid olika lagringstid. Det som utmärker barley wine är att ölet lagras i tunnor, vilket påverkar smakkompositionen. Lagringen innebär att resultaten av den kemiska analysen av smakämnen bör variera för de olika provena .

Livsmedel idag utvecklas för att både smaka gott och hålla länge, vilket leder till att de även blir mer komplexa och bearbetade. Flera livsmedelsproducenter kan använda den komplexa molekyiluppgbyggnad för att genomföra livsmedelsbedrägerier [1], vilket uppmärksammas inom EU [2]. Ett exempel på ett livsmedel som blivit utsatt för förfalskningstekniker är olika whiskysorter. Dessa bedrägerier kan ske genom modifiering av dryckens innehållande komponenter men även genom substitution, där dyrare flaskor fylls på med en billigare whisky av lägre kvalitet. Genom användning av GC-MS kan värde adderas till dessa komplexa prover då MS-steget erbjuder direkt identifiering av en okänd topp i kromatogrammet. Detta öppnar även upp möjligheten till jämförelse av två drycker utan att i förväg veta vad som skall letas efter, vilket sker genom att identifiera markörkomponenter [3]. Den kemiska analys som utvärderas i denna studie kan fungera som en åtgärd av det högre kravet på kvalitetssäkring.

2 Bakgrund - Öl som hantverk

Bryggandet av öl har en historia som sträcker sig många tusentals år tillbaka, då människan bryggt öl så länge som spannmål har odlats. Gamla fynd från både sumeriska lerkrukor och egyptiska målningar kan identifiera ölbryggning långt bakåt i historien. [4, 5]. Kunskapen kring hur en sammansättning av odlat spannmål tillsammans med vatten kunde jäsa naturligt och resultera i en alkoholhaltig dryck spred sig fort och samhällen utvecklade olika drycker baserat på inhemska råvaror [6]. Ölbryggning har sedan dess gått från att vara en lokal och hantverksbaserad företeelse till att idag vara en storskalig industri världen över [4].

2.1 Tillverkning av öl

Idag tar man hänsyn till många olika grundläggande steg för att producera en öl som blir tillfredsställande för konsumenten. Genom att variera korntyp, bearbetnings- och fermenteringstider, temperaturer, jäststam och efterbehandlingssteg kan olika alkoholhalter och egenskaper i drycken framställas [7]. Ölproduktionen kan sammanfattas i följande steg:

- **Mältning.** Det första steget i ölproduktion är mältningen, där gryn (oftast av sädeslaget korn) läggs i blöt för att efter en tid torkas vid en viss temperatur. Under mältningen bildas även stärkelsespjälkande enzymer. Produkten som fås efter detta steg kallas malt.
- **Mäskning.** I mäskningen blandas malten med vatten och blandningen värms upp. Detta gör att enzymer som bildades under mältningen aktiveras och spjälkar stärkelsen från kornet till socker. Blandningen lakas därefter ur, filtreras och kyls. Den urlakade vätskan kallas vört.
- **Jäsning.** I jäsningen tillsätts jästceller till vörten som omvandlar enklare sockerarter till alkoholer, främst etanol. Polysackarider och andra längre sockerarter brukar inte omvandlas och bidrar istället till karaktärprofilen av slutprodukten. Det är främst under jäsningen som flyktiga organiska föreningar (VOC:er) utvecklas. VOC:er är ämnen som lätt förångas vid rumstemperatur och bidrar ofta mycket till smak och doft.
- **Lagring.** Lagring innebär att ölet låts stå under längre tid för att smakprofilen ska utvecklas ännu mer. Lagringstiden varierar mellan olika öltyper, från några veckor till flera år. Lagringen sker vanligtvis i tankar eller tunnor, där tunnor ibland avsiktligt inte är helt lufttäta. Under lagringen fortsätter ändring i den kemiska kompositionen. Både bildnings- och nedbrytningsreaktioner sker, vilket innebär att smaker från nybryggd öl kan upphöra men även att helt nya smaker kan utvecklas [8]. Generellt kan man säga att beskan minskar, söta smaker (som karamell, bränt socker och kola) ökar och att en distinkt svartvinbärsblad-arom utvecklas. Vid längre lagringsförlopp kan även kartongliknande smak uppstå [8]. När ölets önskade karaktärprofil är nådd avslutas lagringen.

2.2 Ölstillar

Intresset för att experimentera med olika smaker på öl är idag större än någonsin, vilket har resulterat i en stor mångfald på butikshyllorna [4]. Världens vanligaste ölstil är internationell lager vilket är en mild öl med låg beska [9]. Det finns även svensk lager, som utvecklades från det bayerska öl som Fredrik Rosenquist af Åkershult introducerade i Sverige med start i mitten av 1800-talet. Även denna lager är mild i smaken och har låg beska [5]. Lageröl har sitt ursprung i Tyskland där den tillverkades redan på 1300-talet. En ljus lager jäser i en sval temperatur vilket resulterar i att ölet får både smak och doft av malten [9]. Ett annat exempel på en ölstil är barley wine, på svenska ibland kallat kornvin, som har sitt ursprung i England på 1800-talet. Ölstillen uppfanns när engelska bryggerier ville påbörja en marknadsföring av starkare ölsorter till vindrickare. Barley wine får sin höga alkoholhalt och fyllighet till följd av en stark vört som får koka länge. Ölen lagras på fat och får därigenom mycket av sin karaktäristiska smak [10].

2.3 Bryggerier i Sverige

Den svenska ölkulturen har sina rötter i den mjöd som bryggdes under vikingatiden [5]. Den storskaliga svenska ölindustrin räknas dock ha sitt startskott först runt 1843, då den tidigare nämnde Fredrik Rosenquist af Åkershult lämnade militären och började brygga öl. Efter en resa med besök på olika bryggerier förde han med sig det bayerska sättet att brygga öl till Sverige där han startade ett eget bryggeri i Stockholm [11]. Tack vare att Åkershult var en affärsman som var duktig på att marknadsföra sin öl växte bryggeribranschen snabbt. Antalet bryggerier växte, och år 1885 hade antalet bryggerier i Sverige blivit fler än 500. 170 av dessa bryggerier gick då ihop för att starta branschorganisationen Svenska Bryggerier som skulle samordna och representera bryggerierna i frågor som tidigare hade splittrat dem [12]. Med tiden började bryggerierna dö ut och 1993 fanns det endast kvar 16 bryggerier i Sverige. Denna bryggeridöd började när starkölen förbjöds i början av 1900-talet. Många mindre bryggerier köptes även upp och slogs ihop med varandra, vilket gjorde att antalet bryggerier snabbt sjönk ännu mer [13]. Trots att bryggerierna har blivit färre lever dock organisationen Sveriges Bryggerier kvar och är idag Sveriges äldsta industribranschförening [12].

Två företag som köpte upp mindre bryggerier och därigenom växte sig stora under denna tid var Carlsberg och Spendrups. Dessa bryggerier är idag de två största leverantörerna till Systembolaget. Systembolagets årsredovisning redovisar att Spendrups Bryggeri under 2020 sålde 84.1 miljoner liter öl och Carlsberg Sverige 68.0 miljoner liter öl [14]. Stora bryggerier som dessa två har dominerat marknaden länge och gör så än idag. År 1993 började dock de mindre bryggerierna komma tillbaka till marknaden igen. Från 1993 fram till 2010 växte antalet bryggerier från 16 till 43 [13] och nu ytterligare drygt tio år senare är antalet uppe i över 450 [15]. Den stora tillväxten av bryggerier grundar sig i att intresset av öl har ökat något enormt under de senare åren, vilket gett plats på marknaden för både dyrare öl och en större mångfald i utbudet [13].

Med det sagt så har inte alla dessa nya bryggerier fysiska anläggningar. En hel del

av dem är så kallade fantom- eller kontraktbryggerier [Intervju, Mayers J, 2021-04-20]. Kontraktbryggerier skapar egna recept, men hyr in sig hos ett fysiskt bryggeri som får sköta bryggningen [16]. Att göra så kan vara ekonomiskt gynnsamt eftersom inköp och drift av bryggeriutrustning är dyrt. Kontraktsbryggning gör därmed att bryggare som är duktiga på att utveckla nya recept kan ta sig in på marknaden utan för stora investeringar [E-post, Albertson N, 2021-04-27]. Huruvida kontraktbryggerierna bör kallas bryggerier är diskuterbart. Anledningen till att de ändå hamnar i samma kategori är att de hos Skatteverket klassas som bryggeri-verksamhet. Därmed räknas även dessa icke-fysiska företag som bryggerier i den höga siffran som nämndes tidigare [Intervju, Mayers J, 2021-04-20].

Ett exempel på ett av dessa mindre bryggerier som har egen fysisk verksamhet är Poppels Bryggeri i Jonsered. Poppels öppnade 2012 [17] och sålde under 2020 1.0 miljon liter öl genom Systembolaget [14]. Även om denna mängd öl kan låta mycket är det fortfarande långt ifrån de marknadsledande bryggerierna Spendrups och Carlsberg. I detta projekt har ölprover erhållits från just Poppels Bryggeri med hjälp av Nan Albertson och hennes företag BeerLab som arbetar tillsammans med bryggeriet. Albertson är mikrobiolog som hjälper bryggerier runt om i landet att kvalitetssäkra öl genom kemiska och mikrobiologiska analyser. På Poppels arbetar bryggare Kristóf Szappanos som har varit behjälplig för Albertson vid frågor kring val och provtagning av ölen.

2.4 Bryggmästare

Bryggmästaren är en viktig del av bryggeriets verksamhet. Det är både en jobbtitel, men även en akademisk titel. Synen om en person verkligen får kalla sig bryggmästare utan utbildningen går isär [16, 18]. Arbetstiteln innebär att man har huvudansvar för öltillverkningen. Bryggmästaren har som uppgift att framställa nya smaker och recept, överser hela eller delar av produktionen och samordna kvalitetstestning där den sensoriska analysen är en stor del, mer om detta i avsnitt 4.3.1. Beroende på storleken på bryggeriet kan omfattningen av dessa områden variera [19]. Den som också önskar erhålla den akademiska titeln behöver generellt sätt först ha en kandidatexamen i kemiteknik, mikrobiologi, bioteknik eller liknande samt flera års erfarenhet av ölbryggning på ett bryggeri [16, 20, 21].

3 Definition av projektet

Projektets huvudfokus var att utföra kemiska analyser av öl. För att arbetet skulle bli genomförbart och bidra med meningsfulla slutsatser behövde det både specificeras men även begränsas. Projektets handledare Per Malmberg kunde redogöra för vilka apparaturer, kemikalier samt material som fanns tillgängliga. För att få en uppfattning kring vilka frågor som var relevanta att undersöka konsulterades gruppens andra handledare Nan Albertson, BeerLab. Hon bidrog med både inspiration och intressanta synvinklar från insidan av bryggerier. Efter en grundlig litteraturstudie av gruppen ihop med dessa rekommendationer från handledarna kunde en mer preciserad definition av projektet formuleras.

Med hjälp av olika analyser med instrumenten GC-MS och UV/Vis-spektrofotometer kunde data för sammansättning av ölet utvärderas. Simon Uzoni, kemistudent på Göteborgs Universitet, tillhandahöll optimerade inställningar och information kring funktioner på analysinstrumentet GC-MS. Den resulterade datan utvärderades och diskuterades genom ytterligare informationssökning samt två digitala intervjuer. Ett med Craft Labs ena grundare, Joshua Mayers samt ett med Produktionsutvecklingsdirektör och Chefsbryggmästare på Spendrups Bryggeri, Richard Bengtsson.

3.1 Problemformulering

Som tidigare nämnt är många av Sveriges bryggerier små aktörer vilket även innebär ett lågt antal anställda. Bryggerier förlitar sig ofta på sin bryggmästare, eventuellt även smakpaneler, som utför den sensoriska analysen för att säkerställa kvaliteten på sin produkt [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22]. Det låga antalet anställda och bryggeriets tillförlit till bryggmästaren innebär att den kvalitetsbestämmande processen blir skör. Om dessa anställda blir sjuka kan det innebära stora konsekvenser för processen då det gäller att bryggmästaren har sina smak- och luktsinnen på topp för att kvalitetssäkra ölen med just sensorisk analys. Om kvaliteten på ölet valideras med andra metoder, såsom kemisk analys, hade det kompletterat den annars sköra processen samt förebygga försök till förfalskade produkter. Detta innebär dock en extra kostnad för bryggerierna. En kostnad som varierar beroende på vilka analyser som skall utföras. Dessa kemiska analyser genererar information som är av olika värde för bryggerierna, där värdet av analysen måste överstiga kostnaden för att utföra den.

3.2 Syfte och frågeställningar

Syftet med detta projekt är att undersöka hur väl analytiska metoder kan användas för att kvalitetsbestämma öl, men även att undersöka bryggeriers möjligheter till att utföra sådan kemisk analys. För att uppfylla detta syfte kommer de olika analyserna utvärderas och vägas mot apparaturernas funktion och kostnad. Det kommer även utvärderas vilka metoder och möjligheter bryggerier har idag beroende på deras storlek och ekonomi. Arbetet önskas kunna bidra till en utvecklad och mer kvantitativ kvalitetsbestämning av öl hos bryggerier.

För att uppfylla detta syfte ställs följande frågeställningar: Kan UV/Vis-spektrofoto-

metri vara en användbar metod för att analysera ölets innehållande komponenter och dess kvalitet? Visar den mer avancerade metoden GC-MS något av värde som UV/Vis-spektrofotometri inte kan påvisa? I relation till apparaturernas funktion och ekonomiska aspekter, kan UV/Vis-spektrofotometri vara ett alternativ för kvalitetsbestämning av öl hos mindre bryggerier och GC-MS för större bryggerier?

3.3 Avgränsningar

Det finns flera faktorer som ligger till grund för vilka avgränsningar som gjorts under arbetets gång. Allt från prover, apparatur och metod begränsades utefter arbetes förutsättningar och tidsram. Vilka prover som valdes att analyseras begränsades av de ölsorter som fanns tillgängliga under den planerade laborationstiden. Apparaturen begränsades även till GC-MS och UV/Vis-spektrofotometer för att skapa ett tydligt fokus. Även tiden som var utsatt för studien begränsade omfånget av studien. Därför valdes att lägga fokus på att noggrant värdera och analysera datan.

3.3.1 Prover

Poppels är ett mindre bryggeri som producerar olika öl vid olika tidpunkter, vilket begränsar vilka ölsorter som kan användas till projektet. Albertson gav handledning i beslutet om ölsort, vilket grundade sig i att Albertson diskuterat med Kristóf Szappanos, Poppels. Efter konsultation valdes ölsorten barley wine, före och under lagring. Detta val var anpassat utifrån studiens tidschema och ger två fall med samma grundrecept men med potentiellt stor variation i komposition.

3.3.2 Apparatur och metod

Det finns flera anledningar till att apparaturen begränsades till GC-MS och UV/Vis-spektrofotometer. GC-MS är en metod som kan identifiera många olika ämnen i en komplex lösning, med hög precision. Det är dock en avancerad metod som kräver en dyr apparatur. Därför valdes även en billigare och mer tillgänglig apparatur, UV/Vis-spektrofotometer. Vid användning av UV/Vis-spektrofotometri för kemisk analys krävs däremot en mer omfattande laborativ kompetens. Efter diskussion med Malmberg och en initial litterär studie begränsades modellval för olika apparaturer, laborativ utrustning såsom fibern samt program som användes. Dessa val påverkades även av vad som fanns tillgängligt på Chalmers. Extraktionsmetoden fastfas mikroextraktion (SPME) valdes på grund av relevansen av att analysera VOC:er. För att även analysera ej extraherat prov användes en automatisk vätskeprovtagare (ALS) för att undvika manuella fel vid injektion.

Det laborativa arbetet med GC-MS skedde under handledning av Malmberg med stöd från Uzoni som även tillhandahöll optimerade inställningar för apparaturen. Dessa inställningar var en del av en metod optimerad för analys av vin men antogs kunna användas även för denna studie. Detta antagande underlättade studiens laborativa del betydligt.

4 Teori - Ölets kemi och analys

För att analysera öl behövs en teoretisk förståelse kring ölets kemiska egenskaper och hur dessa kan analyseras. Genom att utnyttja denna kunskap har bryggerier många olika sätt att undersöka sina produkter under bryggningsprocessen. Nedan redovisas både kemiskt innehåll i ölet, instrument och tekniker men även vilken analys som sker på bryggerier idag.

4.1 Arom- och smakföreningar i öl

Det finns ett stort antal kemiska ämnen som kan bidra till ölets egenskaper. Detta avsnitt beskriver några av de mest förekommande och betydelsefulla ämnesklasserna i öl. Därtill förklaras vilka egenskaper ämnesklasserna vanligtvis ger ölet.

Kemiska ämnen utgör smakprofilen och karaktärprofilen hos ölprodukten i form av smak, lukt och munkänsla. VOC:er ger upphov till dryckens olika smaker och aromer, där kunskapen för att analysera dessa på ett snabbt och effektivt sätt är viktigt för tillverkningsprocessen [22]. Oflyktiga analyter som exempelvis polysackarider, måste derivatiseras för att vara kompatibla med GC-MS. Därför kan andra analytiska metoder vara mer lämpliga för dessa [23].

4.1.1 Alkoholer

Alkoholer är de ämnen som står för berusningseffekten av öl. Etanol är allmänt känt som den alkohol som utgör relativt stor del av ölet och har en brännande munkänsla. Olika alkoholer har varierande berusningseffekt och arom. Under lagring tenderar heterocykliska föreningar att bildas, bland annat aldehyden furfural och alkoholen furfurylalkohol. Koncentrationen av dessa brukar däremot ligga under smakgränsvärdet. Fenoler och polyfenoler, som finns i både malt och humle, bidrar till munkänsla [8].

4.1.2 Estrar

Flyktiga estrar bildas av organiska syror från humle och alkoholer under jäsningen. Estrar bidrar med fruktiga aromer och brukar vara eftertraktade eftersom de bidrar till god smakprofil [23]. Exempelvis ger iso-amylacetat en smak som påminner om banan. Under lagring kan koncentrationen av vissa estrar minska under sitt smakgivande gränsvärde. Resultatet blir att ölet smakar mindre fruktigt. [8]. Däremot bildas vissa andra estrar under lagring, till exempel 2-metylbutanoat, som kan göra ölet mer vinsmakande [8].

4.1.3 Ketoner

Ketoner är ofta de ämnen som ger upphov till felsmaker (oönskade smaker i ölet) om deras halt överstiger ett gränsvärde, vilket sänker kvaliteten på ölet [23]. Viktiga sådana ämnen är diacetyl och vicinala diketoner, VDK:er. Diacetyl och VDK:er är bland de mest väsentliga ämnena att mäta för att säkerställa kvalitet. Ofta används GC-MS för att påvisa närvaron av dessa ämnen [24].

4.1.4 Humlesyror

Humlesyror, även kallade alfa- och betasyror, är oflyktiga molekyler som kommer från örten *humulus lupulus* vilken brukar tillsättas under vörtkokningen [23]. Iso-alfa-syror bidrar till ölets karaktärsprofil utgör även den huvudsakliga beskan, som mäts i International Bitterness Units (IBU). Iso-alfa-syror koncentreras under lagring, som förklarar varför lagring minskar upplevd beska. Humlesyror hämmar även tillväxt av bakterier, vilket bidrar till en sanitär slutprodukt [8].

4.1.5 Svavelföreningar

Svavelföreningar är något som bör minimeras i öl, eftersom att även låg närvaro av dessa kan påverka karaktärsprofilen hos ölet negativt. Smakgränsvärdet för svavelföreningar brukar vara extremt lågt; dimetyltrisulfid kan ge smak av lök-karaktär redan vid en koncentration så låg som 0,1 µg/l [8].

4.2 Instrument och tekniker

Diverse experiment har i denna studie utförts där ölprover analyserats med både UV/Vis-spektrofotometer och GC-MS. Vissa prover analyserades innan samt efter utspädning och andra prover analyserades efter att komponenter från proverna extraherats med olika modifikationer av SPME-tekniken.

4.2.1 GC-MS

GC-MS är en förkortning från engelskans *gas chromatography-mass spectrometry*, vilket på svenska heter gaskromatografi-masspektrometri. Det är en metod som används för att separera och detektera olika komponenter i ett prov [25].

Den första delen av denna metod är GC, vilket är en kemisk separationsmetod som används för att separera komponenter i ett prov baserat på flyktighet och förmåga att interagera med en stationärfas. Efter att ett utspädd prov injiceras med en spruta i en GC genom ett gastätt septum kommer provets komponenter separeras och lämna apparaten efter olika lång tid. Därefter analyseras komponenterna i en detektor [25].

Den andra delen av metoden är MS, vilket är en analysmetod som används för att detektera joner. En masspektrometer är en apparat som utför en masspektrometrianalys genom att jonisera inkommande molekyler, separera jonerna baserat på kvoten massa genom laddning och tillslut detektera dessa. Detektorn producerar ett masspektrum som visar signalintensitet som en funktion av kvoten massa genom laddning. Alltså framgår det vilka molekyler samt vilka fragment av molekyler som finns och hur stor del de utgör av provet. Därav fungerar masspektrometri för både kvalitativa och kvantitativa analyser [25].

4.2.2 SPME

SPME står för *solid-phase microextraction* och är en lösningsmedelsfri extraktionsmetod för att extrahera analyter från ett prov. Det finns två sorters SPME, headspace (HS) och immersive (IM). Principen för båda metoderna är densamma, men de skiljer sig i utförandet. Vid SPME förs en spruta med en adsorberande fiber ner i ett förseglat kärl för att extrahera analyter från provet som finns i kärlet. Det finns

flera olika sorters fibrer som fungerar olika bra för olika sorters analyter. Skillnaden mellan metoderna är att vid IM förs fibern ner i vätskan och vid HS hålls fibern ovanför vätskan. Denna skillnad i hur fibern placeras resulterar i att fibern endast adsorberar VOC:er samt andra flyktinga ämnen vid HS medan vid IM adsorberas även ämnen vilka inte är flyktiga. Efter att analyterna samlats in placeras sprutan med fibern i en GC-injektor för att desorbera analyterna, vilka därefter förs genom GC-apparaturen för separation och vidare analys [25].

4.2.3 Direktinjektion

En annan metod som kan användas för provupptagning är direktinjektion. Istället för att selektivt extrahera molekyler injiceras en volym av provet med hjälp av en spruta. Ett sätt att göra det är med användning av ALS. ALS:en är utrustad med en spruta och hållare för vialer[26]. Sprutan sänks automatiskt ner i vialerna och kanylen på sprutan suger upp en bestämd mängd vätska. Vätskan injiceras sedan direkt in i injektorn utan något mellanliggande steg.

4.2.4 UV/Vis-spektrofotometri

UV/Vis är en förkortning för det engelska uttrycket *ultraviolet/visible*, som på svenska betyder ultraviolett/synlig. UV/Vis-spektrofotometri syftar på ultraviolett/synlig absorptions- eller reflektansspektroskopi. Som namnet antyder, sker analysen över ett spektrum av det synliga och ultraviolette spektrumet, vilket är mellan ca 200-770nm [27], varav synligt ljus börjar vid 380nm. Metoden används för att analysera ett prov baserat på dess absorption, vilket grundar sig i kvantmekaniken och Lambert-Beers lag. Lambert-Beers lag är dock begränsad i att proportionaliteten stämmer väl endast för utspädda lösningar, med en koncentration under ungefär 0,01 M. Prov som skall analyseras uppfyller inte alltid kravet för Lambert-Beers lag initialt. Därför måste provet eventuellt förbehandlas på olika sätt för att kunna använda sig av UV/Vis-spektrofotometri. Bland annat genom derivatisering; en förbehandling som innebär att på kemisk väg påverka analyten för en enklare separation eller analys [28].

4.3 Analys av öl på bryggerier

Bryggeriets storlek avgör ofta deras möjlighet till analys av sina produkter. Mindre bryggerier riktar ofta in sig på att framställa särskilda ölsorter med unika smaker, men har inte samma produktionskapacitet eller ekonomiska säkerhet som ett större bryggeri [23].

Spendrups använder sig av olika arbetsgrupper för att genomföra företagets kvalitetsarbete. En arbetsgrupp har fokus på lokalt kvalitetsarbete, labb och förbättringsarbete medan den andra är en central arbetsgrupp som arbetar med certifieringar, lagar, myndighetskontakter och annan kvalitetsstyrning. Han förklarar även att det ännu inte finns lika höga krav när man producerar öl som för andra livsmedel. De två som finns är alkohollagstiftningen som beskriver att alkoholhalten inte får avvika mer än 0,5 procentenheter samt märkningslagstiftningen som beskriver att innehållet på märkningen måste stämma överens med innehållet [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

Till följd av dessa låga krav kommer kemiska analyser av öl ofta i skymundan. Många bryggerier idag är även små aktörer med begränsade ekonomiska möjligheter vilket leder till att dyra kvalitetsanalyser bortprioriteras. I takt med att bryggeriet växer kommer det krävas mer dokumentation av produkterna som levereras till konsument, då olika analyser bekräftar både produktsäkerheten och livsmedelskvaliteten. För att den öl som finns på marknaden idag skall vara av hög kvalitet handlar det därför om att bidra med specialkompetens för en prislapp som passar oavsett storlek på bryggeri. Att köpa in analysinstrument till alla bryggerier blir dock alldeles för dyrt. Istället skulle analystjänster kunna köpas in, se mer under avsnitt 4.3.3 [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

4.3.1 Sensorisk analys

Den sensoriska analysen är en viktig del på alla bryggerier och är en av bryggmästarens viktigaste arbetsuppgifter. Vid sensorisk analys används de olika sinnen för att kontrollera att ölen håller en bra kvalitet. Den sensoriska analysen innefattar att kontrollera smak, doft och munkänsla på den öl som bryggts för att bekräfta att ölet bryggts och jäst på rätt sätt. På mindre företag är den sensoriska analysen en formell aktivitet där en smakpanel bestående av personer som är dokumenterat bra på att känna av olika felsmaker [E-post, Albertson N, 2021-04-27]. Detta är alltså en förmåga som måste tränas upp. Ett större företag som Spendrups genomför den sensoriska analysen med tre stycken paneler. En av panelerna arbetar med öl och bedömer dagligen all den dryck som tappas upp. Dessa analyser sker i ölets alla olika stadier. Ölpanelen graderar sedan ölen på en fem-gradig skala efter hur nära den ligger originalet [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

Oavsett om ett bryggeri enbart har en bryggmästare eller en hel panel, är arbetet med sensorisk analys beroende av mänskliga faktorer då alla kan uppleva smaker olika från dag till dag. För att utföra analysen gäller att ha sina smak- och luktsinnen på topp, vilket även leder till att sjukdom kan begränsa eller i värsta fall förhindra arbetet. Richard Bengtsson, Spendrups, berättar att han under Covid-19 pandemin varit extra försiktig och som tur är har han hittills klarat sig undan. För att komma ifrån detta har elektroniska näsor och andra system undersökts, men då innehållet är såpass komplext finns det ännu inget fungerande system som skulle kunna ersätta den sensoriska analysen [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

4.3.2 Kemisk analys

Som tidigare nämnt avgör bryggeriets storlek och antal anställda med kompetens möjligheten till vilken typ av kemisk analys som utförs. På mindre bryggerier baseras ofta kvalitetsbedömningen på den sensoriska analysen [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22]. Utöver den sensoriska utförs mindre kemiska analyser som inte är lika kostsamma som exempelvis GC-MS. Ett mindre bryggeri använder ofta en hydrometer för att analysera densiteten och därmed kunna beräkna ölets etanolhalt. Vissa bryggerier har även mer avancerade densitetsmätare [E-post, Albertson N, 2021-04-27]. Denna analys ligger inte till grund för smakutveckling, utan undersöker endast ifall jäsningen gått som den ska [Möte, Albertson N, 2021-01-26]. Även UV/Vis-spektrofotometri används i viss utsträckning för att mäta beska och färg på ölet som del i kvalitetskontrollen [Handledarmöte, Albertson N, 2021-02-02]. Andra

analyser än de ovannämnda kräver avancerad och dyr utrustning, vilket därför är ovanligt på mindre bryggerier [Möte, Albertson N, 2021-02-09].

På större bryggerier är däremot både den sensoriska och kemiska analysen viktig. Den kemiska går snabbt att utföra och sker kontinuerligt, till skillnad från den sensoriska som kräver en panel som träffas dagligen. Dock kompletterar analyserna varandra och en produkt kan stoppas både på grund av kemiska värden eller upplevda felsmaker. Olika kemiska analyser görs beroende på var i processen man befinner sig. Några exempel på dessa analyser som undersöks på flera punkter i processen är färg, stamvört, pH-värde, beska och alkoholhalt [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22]. För att kvantitativt bestämma beska i ölets olika stadier görs en IBU-mätning. En IBU-mätning kan utföras med hjälp av UV/Vis-spektrofotometri. Metoden för mätningen finns beskriven i en sammanställning av *ASBC* (American Society of Brewing Chemists), under *Manual Isooctane Extraction: Reduced Solvent Technique* [29]. Trots att det är värdefullt med ett kvantitativt mått av beska, kan upplevelsen av beskan dock skilja sig mycket på grund av ölsort och alkoholstyrka. Det kan vara ett bra redskap för ett bryggeri när samma öl bryggs med olika satser av humle då den kan skilja sig från år till år [E-post, Albertson N, 2021-03-26].

Det är framförallt vid lagringsprocessen som flera specialanalyser sker. Där används bland annat GC-MS för att bekräfta att produktens innehåll av olika jäsningssämnen ligger inom rätt intervall. Ett exempel på ett ämne som indikerar att ölet inte är färdigt är diacetyl som ger en smak av smörkola. Det används även *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) för att skilja på olika humlesyror och oljor. Dessa analyser vid lagertanken görs för att ölen skall stämma överens med den framtagna profilen för produkten [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

4.3.3 Företag som tillhandahåller analystjänster

Det finns några få företag i Europa som arbetar med att göra kemiska och ibland även sensoriska analyser. BeerLab och Craft Labs är nämnda sen tidigare, men det finns även andra företag som VLB Berlin [30] och Humlegårdens Ekolager som erbjuder sådana tjänster [31].

Craft Labs startade 2018 då det fanns en avsaknad av företag som både erbjöd konsultation samt ölanalys för mindre bryggerier inom Sverige och närliggande länder. Intresset för deras tjänster var stort från bryggeriernas håll. Det var dock för få bryggerier som hade pengar till att kontinuerligt skicka in prover för analys vilket gjorde att ekonomin för Craft Labs inte gick ihop, vilket resulterade i att företaget var tvunget att stänga ner [Intervju, Mayers J, 2021-04-20]. BeerLab däremot har klarat sig bra, vilket delvis är tack vare företagets nära samarbete med Poppels Bryggeri. Detta samarbete har gett BeerLab en bra ingång i industrin och Poppels har kunnat vara en av de kontinuerliga kunder som Craft Labs saknade. Tack vare samarbetet har även BeerLabs kostnader för instrument, material och lokal kunnat hållas låga då dessa har delats med Poppels [E-post, Albertson N, 2021-05-06].

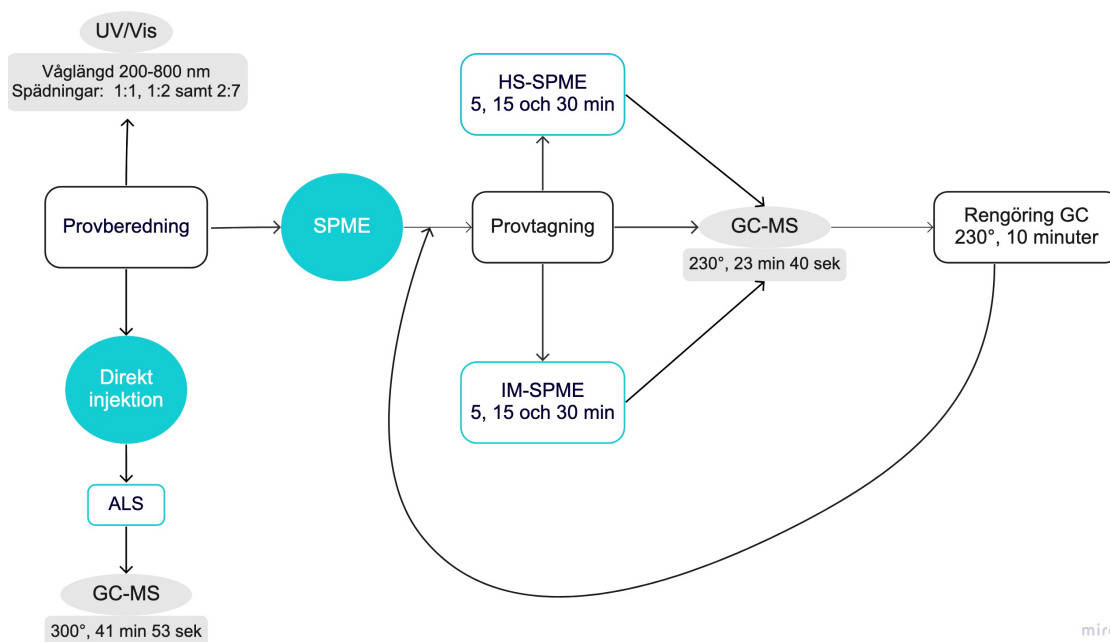
5 Metod

Två prover med samma grundrecept av ölsorten barley wine tappades upp i falconrör från Poppels Bryggeri den 1/3 2021. Ett prov togs direkt från tank under pågående fermentering och benämndes Prov 1. Det andra provet togs från ett Marsalafat under lagring där ölet började bryggas 27/8 2020. Detta benämndes som Prov 2. Till skillnad från färdig öl innehöll inte proven kolsyra ännu, vilket gjorde att förbehandling genom så kallad avgasning inte gjordes.

GC:n som användes var en Agilent 7890A utrustad med en ALS av märket Agilent 7693A som användes vid direktinjektion. Kromatografen var kopplad till en Agilent 5977A MS-detektor med en enkel kvadrupol. Den anslutna kolonnen var en HP-5ms UT 5% Fenylmetylsilox med dimensionen 30m x 0.25mm x 0.25 μ m och hade en flödes hastighet på 0.76 ml/min. Bärgasen som användes var helium. Fibern som användes för SPME var en 65 μ m StableFlexTM med PDMS/BVD-beläggning från Sigma-Aldrich. Injektorn som användes hade ett splitless inlopp med ett splitförhållande på 200:1 och en injektionsvolym på 1 μ l.

5.1 Utförande

Laborationen inleddes med att bereda proverna för att sedan analysera dessa med GC-MS (HS-SPME, IM-SPME samt direktinjektion) och till sist med en UV/Vispektrofotometer. Laborationsprocessen illustreras översiktligt i Figur 1.



Figur 1: Illustration över laborationsprocessen med använda instrument, tekniker, temperaturer och tider för respektive delmoment.

5.1.1 Provberedning

Från de två proverna samlades 10 ml av vardera och placerades i var sin spruta. Proverna sprutades sedan genom ett sterilt sprutfilter (0.2 μm cellulosa acetat membran) ner i två separata vialer som märktes upp med Prov 1 respektive Prov 2. Två magnetomrörarpellets sköljdes med respektive prov och placerades sedan i vialerna.

5.1.2 SPME

För SPME-provtagningarna användes två spruthållare för att förenkla provtagningen, se Bilaga 1. Dessa hade designats av Simon Uzoni som även gav tillåtelse för användning [Möte, Uzoni S, 2021-03-23]. Innan varje provtagning rengjordes fibern för att undvika kontamineringar från ämnen som adsorberats till fibern. Rengöringen utfördes genom att placera SPME-sprutan med fibern i en annan GC än den som användes för analysen. Injektorn hade ett splitless inlopp och en injektionsvolym på 1 μl . Injektortemperaturen sattes till 230°C och fibern hölls kvar i 10 minuter för att se till att alla eventuella kontamineringar desorberas från fibern. Rengöringen utfördes med en splitförhållande på 24.8:1 med gasbesparingen avstängd.

Vid HS-SPME täcktes provet med aluminiumfolie för att undvika att ämnen diffunderar till luften. Vialen placerades på en magnetomrörare och SPME-sprutan med den rengjorda fibern fördes genom folien utan att komma i kontakt med varken vätskan eller magnetomrörarpelletsen. När fibern började exponeras för provet startades tidtagning. På samma sätt placerades vialen på en magnetomrörare även vid IM-provtagning. Fibern fördes ner och positionerades i vätskan utan att komma i kontakt med magnetomrörarpelletsen. Efter att fibern exponerats doppades den tio gånger i MilliQ-vatten för att få bort eventuella sockerarter, stärkelse och andra stora molekyler som riskerar att fastna i kolonnen. Detta behövde enbart utföras för IM då fibern aldrig var i kontakt med vätskan vid HS.

Både HS- och IM-provtagningarna utfördes för tre olika exponeringstider: 5, 15 och 30 minuter för Prov 1 respektive Prov 2. Temperaturinställningarna som valdes var: Injektor 230°C, kvadropol 150°C och Aux-2 285°C. Temperaturprofilen som användes redovisas i Tabell 1 nedan.

Tabell 1: Temperaturprofil för SPME där första och sista temperaturen hålls konstant under angiven tid.

Steg	T, Start (°C)	T, Slut (°C)	Hastighet (°C/min)	Tid (min)
1	30	-	-	0,50
2	30	45	5	3,00
3	45	90	10	4,50
4	90	250	15	10,67
5	250	-	-	5,00

För att injicera sprutan i inloppet användes ytterligare en spruthållare som Simon Uzoni designat [Möte, Uzoni S, 2021-03-23], se Bilaga 1. Sprutan injicerades i GC:n

och efter 30 sekunders desorption drogs fibern tillbaka och sprutan avlägsnades från injektorn innan rengöringsprocessen upprepades. Den totala körtiden var 23 minuter och 40 sekunder.

5.1.3 Direktinjektion

Temperaturinställningarna som användes för direktinjektionen var: Injektor 300°C, kvadrupol 150°C samt Aux-2 310°C. Vialerna med filtrerad öl placerades i den ALS som GC:n var utrustad med. För att kontrollera hur väl inställningarna fungerade utfördes först en testkörning. Efter testkörningen noterades att vialerna som användes var av fel modell. Dessa byttes därför ut till vialer som är anpassade för ALS:en. Det konstaterades även att den tidigare använda temperaturprofilen behövde förändras på grund av att den orsakade bristfällig separation mellan topparna i kromatogrammet. Detta resulterade i att en ny optimerad temperaturprofil med ändrade temperaturförändringsintervall användes, se Tabell 2.

Tabell 2: Temperaturprofil för direktinjektion där första och sista temperaturen hålls konstant enligt angiven tid.

Steg	T, Start (°C)	T, Slut (°C)	Hastighet (°C/min)	Tid (min)
1	50	-	-	5,000
2	50	120	8	8,750
3	120	150	4	7,500
4	150	275	8	15,625
5	275	-	-	5,000

Den totala körtiden var 41 minuter och 53 sekunder. Processen utfördes först för Prov 1. När upptagning av Prov 2 utfördes böjdes kanylen på sprutan mot vialen och kunde därefter inte användas. Eftersom det inte fanns nya nålar att tillgå avbröts laborationen. Analysering av Prov 2 kunde därför inte utföras.

5.1.4 UV/Vis-spektrofotometri

Med en pipett adderades 5 ml MilliQ-vatten till en kyvett och bestrålades i spektrofotometern så att en baslinje skapades över ett våglängdsintervall 200-800 nm. Därefter bestrålades cirka 1.5 ml av filtrerat Prov 1 respektive Prov 2. För att undersöka hur koncentrationen av provet påverkade det erhållna absorbtionsspektrumet späddes provet med MilliQ-vatten till förhållandena 1:1, 1:2 samt 2:7.

5.2 Dataanalys

Programvaran som användes för dataanalys och för identifiering av ämnen var Agilent Masshunter Qualitative Analysis 10.0 (build 10.0.10305.0). För databehandlingen användes "Compound Discovery" där "Compound Mining" sattes till "Find by integration". Enligt en algoritm som bland annat jämförde elueringstid för en topp mot en referenstid för ämnet, gavs ett *score*-värde på hur stor sannolikheten var att en kromatogramtopp hade identifierats som korrekt ämne. För att programmet skulle kunna integrera och identifiera topparna valdes bortsortering av toppar i kromatogrammen som var lägre än 1% i relativ topphöjd jämfört med den

högsta toppen. Kompletterande identifiering av ämnen kunde även ske genom ett referensmasspektrum från *National Institute of Standards and Technology* (NIST). NIST utgår från uppmätta masspektrum från körningar med GC-MS och jämför med referensmasspektrum för olika ämnen, vilket ger *Match*-värden mellan 0-1000 för hur väl uppmätta masspektrum passar till ett visst ämne [32].

5.2.1 Manuell toppsortering

För att främja vidare analys och ge ett mer kärnfullt resultat exkluderades toppar manuellt från kromatogrammen med relativ höjd lägre än 5%. Kvarstående toppar som Agilent Masshunter Qualitative Analysis kunde bestämma till ett ämne med över 75% sannolikhet ansågs som tillräckligt träffsäkert. För de ämnen som hade en sannolikhet under 75% gjordes en manuell bedömning med hjälp av programvaran NIST och ersattes av det ämne med högst *Match*-värde. Till de resulterade tabellerna i rapporten exkluderades toppar som identifierats med orimliga föreningar som silaner eller termiskt instabila föreningar.

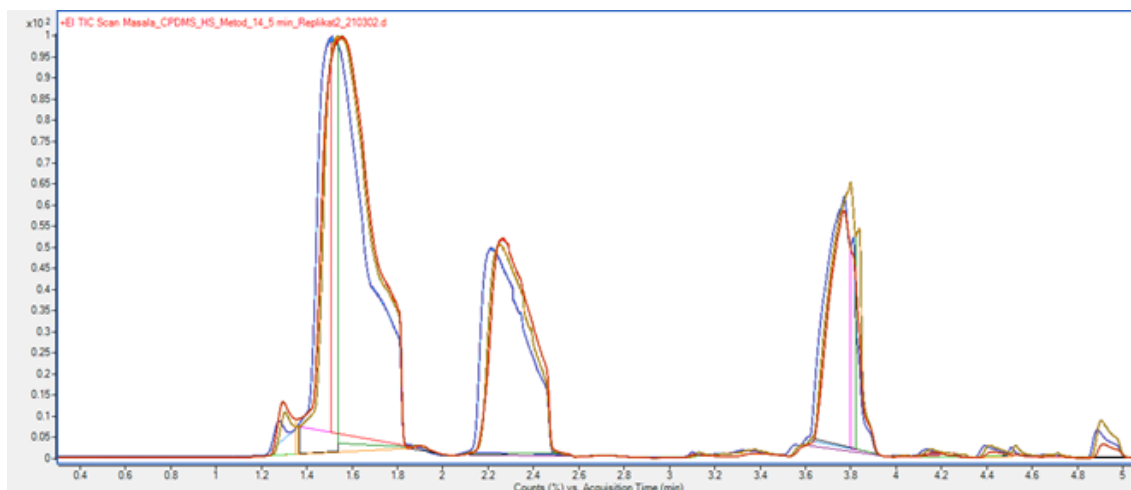
6 Resultat

Det laborativa utförandet resulterade i kromatogram för GC-analysen samt masspektrum för de toppar som kunde identifieras. UV/Vis-spektrofotometern gav upphov till tre olika absorbtionsspektrum.

6.1 Gaskromatogram och masspektrum

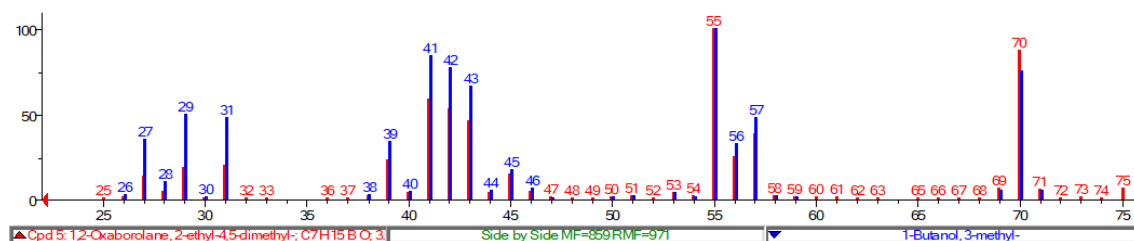
Totalt 13 olika kromatogram erhöles från körningarna med hjälp av Agilent Masshunter Qualitative Analysis. Sju kromatogram från Prov 1 (tre från HS, tre från IM och en från direktinjektion) och sex från Prov 2 (tre från HS och tre från IM). Varje identifierad topp i kromatogrammen hade tillhörande masspektum för molekyler med hög match-parameter (över 900 av 1000). Figur 2 visar kromatogram för Prov 2 med HS-provtagning mellan retentionstid 0 och 5 minuter.

Efter den manuella sorteringen enligt 5.2.1 redovisas de identifierade ämnena och dess sannolikhet i tabeller. Samtliga kromatogram från HS-provtagning utvärderades på samma sätt och dess tabeller finns under respektive avsnitt.



Figur 2: Kromatogram för HS med 5 minuters (röd), 15 minuters (gul), och 30 minuters (blå) provtagning för Prov 2. Figuren visar ej hela körningstiden för att tydligare kunna visa skillnad i topphöjd.

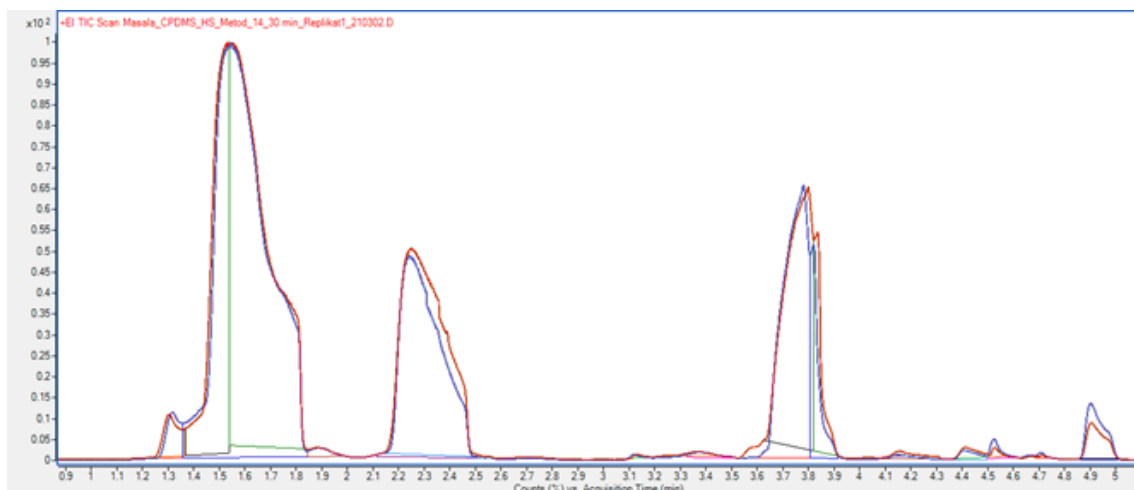
Vid manuell sortering analyserades topparna från körningarna med databasen i NIST för de ämnen som hade sannolikhet under 75%. Ett exempel på ett jämförande masspektrum kan ses i Figur 3.



Figur 3: Exempel på jämförande masspektrum som NIST kunde ge mellan två molekyler som underlag för molekylientifiering.

6.1.1 Jämförelse mellan Prov 1 och Prov 2

Kromatogrammen för de två proven var väldigt lika. En trend som kunde ses var att de mindre förekommande ämnena hade lite högre toppar i Prov 2. De högsta topparna i Prov 1 hade aningen lägre toppar i Prov 2 vilket illustreras i Figur 4.



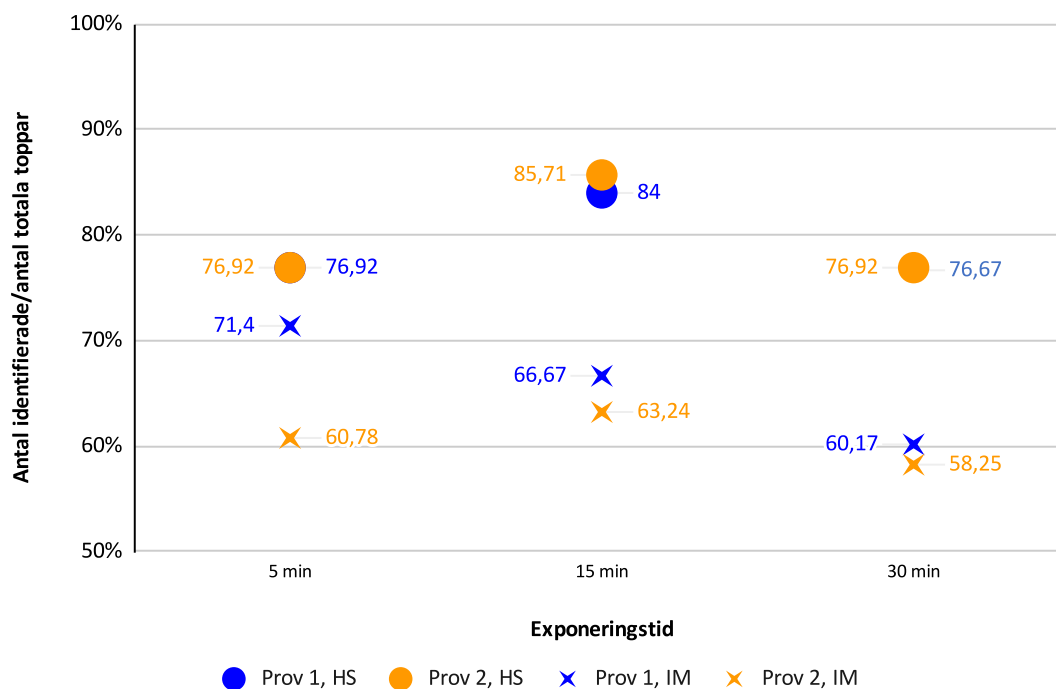
Figur 4: Kromatogram för HS med 30 minuters provtagning för både Prov 1 (blå) och Prov 2 (röd). Figuren visar ej hela körningstiden för att tydligare kunna visa skillnad i topphöjd.

6.1.2 Avgränsning i datapresentation: varför IM valdes bort.

Rådatan som erhöles från laborationen innehöll ett stort antal ämnen för samtliga körningar, varav IM-provtagning gav fler funna ämnen än för HS. Däremot påvisade IM endast marginellt fler VOC:er än HS, ämnen som nära kopplas till ölkvalitet. HS ger alltså mer kortfattad men mer relevant information om kvaliteten av ölproven.

För att jämföra HS och IM ytterligare beräknades kvoten av antal identifierade ämnen mot totala antalet toppar för ett kromatogram. Här innebär antal identifierade ämnen endast de molekyler som identifierats av datahanteringsprogrammet Agilent Masshunter Qualitative Analysis 10.0 och inte NIST, där inte heller hänsyn till sannolikhet tagits. Samtliga kvoter redovisas i Figur 5 där det framgår att IM konsekvent hade en lägre andel identifierade ämnen jämfört med HS. Allra högsta kvoten hade HS med 15 minuters exponeringstid. För att få en tydligare inriktning

valdes det att fokusera på ämnena funna via HS-provtagning. Med denna bakgrund gjordes valet att manuell sortering endast skulle ske för datan från HS-proverna, enligt avsnitt 5.2.



Figur 5: Jämförande graf av procent identifierade ämnen per antal toppar för de olika kromatogrammen. Prov 1 (blå), Prov 2 (orange), HS (cirkel) och IM (kryss)

6.2 Antal påvisade ämnen

Mätningarna av proven som utfördes i GC-MS:en kunde påvisa närvaro av en rad olika ämnen. Många ämnen kunde återfinnas i flera av körningarna. Exempelvis kunde etanol påvisas i alla mätningar. Däremot gav skillnad i provtagningsmetod även skillnad i antalet detekterade molekyler och slag av molekyler. En genomgående trend är att provtagningstiden på 5 minuter resulterade i att färre ämnen hittades. Fler ämnen hittades i provtagningsstider på 15 eller 30 minuter, men efter 15 minuter ökade inte antalet ämnen särskilt mycket. Istället kunde ämnen som påvisades vid 15 minuters provtagning helt försvinna vid 30 minuters provtagning och visa ämnen som inte detekterades vid 15 minuter. Notera att Tabell 3 visar antal ämnen i rådatan och antal efter manuell sortering. Tabellen ger alltså en uppfattning av skillnad i antal ämnen som kan påvisas med de olika metoderna.

Tabell 3: Antal funna toppar, hur många av topparna som kunde identifieras som ämnen av programvaran och hur många ämnen som återstod efter manuell sortering.

Prov 1	Funna toppar	Identifierade ämnen	Efter manuell sortering
HS 5 min	13	10	5
HS 15 min	25	21	9
HS 30 min	30	23	11
IM 5 min	42	30	-
IM 15 min	93	62	-
IM 30 min	118	71	-
ALS	74	17	-
Prov 2			
HS 5 min	13	10	4
HS 15 min	21	18	7
HS 30 min	26	20	10
IM 5 min	51	31	-
IM 15 min	68	43	-
IM 30 min	103	60	-

6.3 HS-SPME: påvisade ämnen i proven

Detta avsnitt beskriver vilka ämnen som har påvisats i varje körning för HS (5, 15 och 30 min), för Prov 1 respektive Prov 2. I tabellerna 4 till 9 kommer endast de ämnen som resulterat från manuell sortering att ingå. Det finns en beskrivande bedömning i respektive stycke. Tillhörande smakprofil för vardera ämne redovisas.

6.3.1 Prov 1: HS 5 minuter

Tabell 4 visar att tre av molekylerna tillhör ämnesgruppen estrar. 5 minuters provtagning ger en begränsad bild av provet, med bara fem ämnen som överstiger tillräcklig topphöjd.

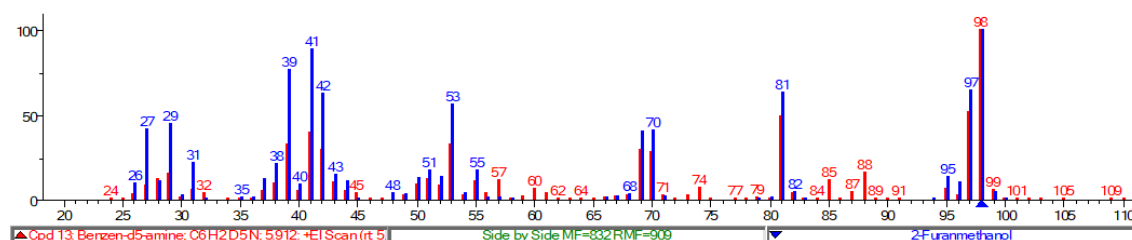
Notera att etylacetat har lägre än 75% sannolikhet i Tabell 4. Trots detta bedömdes etylacetat som rimligast med hjälp av NIST och resonemanget att det är en produkt av etanol och ättiksyra. Att iso-amylacetat står med i tabellen är ett resultat av den manuella sorteringen. Ämnet bedömdes först i Agilent Masshunter Qualitative Analysis till 1,2-Oxaborolan. Däremot ansågs förekomst av bormolekyler i provet som orimligt. Efter närmare analys i NIST påvisades att iso-amylacetat, en ester som bildas från alkohol och ättiksyra, hade hög *Match* och bedömdes som rimligare för provet.

Tabell 4: Ämnena som identifierades i Prov 1 med HS och 5 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	78,68	
Etylacetat	74,48	Arom, brandy, lim, druva.
Iso-amylacetat	77,07	Banan, lim, päron.
Etylhexanoat	77,02	Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
Etyloktanoat	77,79	Aprikos, brandy, fett, blomma, ananas.

6.3.2 Prov 1: HS 15 minuter

Majoriteten av de funna ämnena i detta prov var estrar. Antal identifierade ämnen var nio, vilket nästan är dubbelt så många som vid 5 minuters provtagning. Till skillnad från 5 minuters provtagning påvisades exempelvis fler estrar men även alkoholerna furfurylalkohol och 2-Metyl-1-butanol. 15 minuters provtagning gav alltså väsentligt mer information om provet. Förklaringar för etylacetat och iso-amylacetat var samma för denna körning som för 5 minuters provtagning.

**Figur 6:** Jämförande masspektrum mellan bensen-d5-amin (röd) och furfurylalkohol (blå).

Furfurylalkohol identifierades först som bensen-d5-amin, som i NIST bedömdes till det mer troliga ämnet furfurylalkohol. Masspektrumet i Figur 6 visar likheten mellan bensen-d5-amin och furfurylalkohol. Likheten kan förklara varför programvaran kunde ha svårt att särskilja dem. För att få en överblick av alla identifierade ämnen redovisas de i Tabell 5 nedan.

Tabell 5: Ämnen som identifierades i Prov 1 och HS med 15 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	79,09	
Etylacetat	74,42	Arom, brandy, lim, druva.
2-metyl-1-butanol	75,70	Fiskolja, malt, lök, vin.
Etylbutanoat	77,95	Äpple, smör, ost, ananas, jordgubbe.
Furfurylalkohol	70,68	Bränt, karamell, tillagat.
Iso-amylacetat	77,44	Banan, lim, päron.
Etylhexanoat	76,84	Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
3,4-Dimetyl-2-prop-2-enyl-2,5-dihydrotiofen 1,1-dioxid	76,48	
Etyloktanoat	78,23	Aprikos, brandy, fett, blomma, ananas.

6.3.3 Prov 1: HS 30 minuter

Provtagningsstid på 30 minuter gav något fler ämnen än 15 minuter. De flesta ämnen var återigen estrar, och 2,3-butylglykol påvisades återigen. P-tolyltrimetylsilan återfanns i rådatan vars närvaro förklarades att ha uppstått av blödning, alltså att molekyler av ämnet har lossnat från kolonnväggens material och identifierats av masspektrometern, i kolonnen och togs därför inte med i Tabell 6.

Samma resonemang som i rubrik 6.3.2 gäller för förekomst av etylacetat, furfurylalkohol och iso-amylacetat. Ämnet iso-amyl-iso-butytrat identifierades först som dietylmetoxyboran, och som tidigare ansågs bormolekyler som orimliga. Med hjälp av NIST bedömdes ämnet istället till Iso-amyl-iso-butytrat. Ämnet 3,4-Dimetyl-2-prop-2-enyl-2,5-dihydrotiofen 1,1-dioxid är en organisk molekyl som är baserad på svaveldioxid.

Tabell 6: Ämnen som identifierades i Prov 1 och HS med 30 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	78,76	Arom, brandy, lim, druva. Fiskolja, malt, lök, vin.
Etylacetat	74,41	
2-metyl-1-butanol	76,28	Äpple, smör, ost, ananas, jordgubbe. Bränt, karamell, tillagat.
2,3-butylglykol	75,93	
Etylbutanoat	78,00	Banan, lim, päron. Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
Furfurylalkohol	72,94	
Iso-amylacetat	77,43	Frukt. Aprikos, brandy, blomma, fett, ananas.
Etylhexanoat	76,40	
3,4-Dimetyl-2-prop-2-enyl- 2,5-dihydrotiofen 1,1-dioxid	82,11	
Iso-amyl-iso-butytrat	75,77	
Etyloktanoat	77,86	

6.3.4 Prov 2: HS 5 minuter

Jämfört med samma provtagningstid för Prov 1 påvisades endast ett färre ämne i Prov 2. Samma resonemang för att förklara förekomsten av etylacetat och iso-amylacetat gjordes som för Prov 1. Tabell 7 visar ämnena som identifierats vid nämnd provtagning. Likheten med Tabell 4 syns lätt vid jämförelse.

Tabell 7: Ämnen som identifierades i Prov 2 och HS med 5 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	78,40	Arom, brandy, lim, druva. Banan, lim, päron. Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
Etylacetat	74,98	
Iso-amylacetat	77,08	
Etylhexanoat	76,60	

6.3.5 Prov 2: HS 15 minuter

För denna körning finns inga nya ämnen att förklara. Med en jämförelse på 5 minuters provtagningstid hittas fler ämnen med 15, vilket ses i Tabell 8 jämfört med Tabell 7. Etylacetat och iso-amylacetat har samma förklaringar som tidigare.

Tabell 8: Ämnen som identifierades i Prov 2 och HS med 15 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	78,69	Arom, brandy, lim, druva. Äpple, smör, ost, ananas, jordgubbe. Fiskolja, malt, lök, vin. Banan, lim, päron. Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
Etylacetat	75,01	
Etylbutanoat	76,38	
2-metyl-1-butanol	76,39	
Iso-amylacetat	77,49	
Etylhexanoat	75,96	
3,4-Dimetyl-2-prop-2-enyl- 2,5-dihydrotiofen 1,1-dioxid	76,34	

6.3.6 Prov 2: HS 30 minuter

Inte heller i denna körning påvisades några nya ämnen. Etylacetat och iso-amylacetat har återigen samma förklaring som förut. Dock är alkoholerna furfural och fenetylalkohol unika för körningen. De unika ämnena utläsas som det femte och nionde ämnet i Tabell 9.

Tabell 9: Ämnen som identifierades i Prov 2 och HS med 30 minuters provtagning, sannolikhet enligt programvaran och deras smakprofil om funna i litteratur [33].

Ämne	Sannolikhet [%]	Smakprofil
Etanol	78,33	Arom, brandy, lim, druva. Äpple, smör, ost, ananas, jordgubbe. Fiskolja, malt, lök, vin. Mandel, bröd, bränt. Bränt, karamell, tillagat. Banan, lim, päron. Äppelskal, brandy, frukt, tuggumi, övermogen frukt, ananas.
Etylacetat	74,97	
Etylbutanoat	77,05	
2-metyl-1-butanol	76,81	
Furfural	78,10	
Furfurylalkohol		
Iso-amylacetat	77,47	
Etylhexanoat	75,84	Frukt, honung, ros. Aprikos, brandy, fett, blomma, ananas.
Fenetylalkohol	76,63	
Etyloktanoat	77,64	

6.4 UV/Vis-spektrofotometrianalys

Absorbansspektrumet för proverna gav likartade resultat. En jämförelse mellan spektrum A och B i Bilaga 2 visade att trenden var densamma för spädning av Prov 1 såsom Prov 2. Absorbansen vid synlig våglängd minskade då provet spädades med en större volym milliQ-vatten. Minskningen i absorbans var även större mellan 490nm och 540nm. Jämförelsen mellan Prov 1 och Prov 2 illustreras i Bilaga 2 där maximala absorbansen för Prov 2 var 4% högre än för Prov 1.

7 Diskussion

Efter utförande av laborativa moment, litteraturstudier, rådfrågande av handledare samt intervjuer med industrirepresentanter fanns det underlag till att utreda projektets frågeställningar närmare. Diskussionskapitlet utgår från analys av GC-MS- och UV/Vis-spektrofotometri med fokus på informationens användbarhet samt presenterar eventuella felkällor. Kapitlet avslutas med etiska aspekter och framtida problemställningar.

7.1 Värdet av GC-datan

GC-MS kunde träffsäkert påvisa många ämnen. Etanol fanns, som väntat, i båda proven. Mätning av etanolhalt görs dock mer ekonomiskt och enklare med hydrometer eller mer avancerad densitetsmätare. Utöver etanol var det mestadels estrar och andra alkoholer som påvisades. Som beskrivet i avsnitt 4 kopplas estrar starkt till vissa smaker. En stor del av analysens värde ligger i den stora mängd data som erhöles. Däremot ger en lista på funna estrar och alkoholer inte helheten kring smak- och karaktärsprofilen av ölet. Kompletterande sensorisk analys av en erfaren bryggare lär ge en bättre bild av smakprofilen. Som tidigare nämnt kan VDK:er nära kopplas till ölkvalitet. Inget av replikaten från laborationen kunde påvisa närvaro av dessa ketoner. Kvaliteten på barley winet kan då antas vara hög, men ur dataanalysperspektiv ger det begränsad möjlighet att optimera metoden för att påvisa VDK:er. Emellertid kan smak och kvalitet vara svårt att relatera till varandra. I vissa ölsorter kan klassiska felsemaker faktiskt vara önskvärda. Kvalitetsmässigt är det ofta inte vilket ämne som bestämmer kvaliteten, utan vilken ölstil som bryggs [E-post, Albertson N, 2021-05-12].

Värdet av GC-MS står i relation till den stora ekonomiska investering det innebär att både införskaffa och underhålla apparatur. För mindre bryggerier är det relativa värdet av GC-MS lågt, om informationen från datan ställs i jämförelse mot kostnaden. För ett mindre bryggeri kan en sats skilja sig mycket från en annan, även om det är samma recept. Värdet av att noga kunna mäta närvaro av kemiska föreningar med GC-MS överskuggas då av de processtekniska aspekterna som ger upphov till större skillnader i ölet [Intervju, Mayers J, 2021-04-20]. Det relativa värdet är högre för större bryggerier, där investeringen inte blir lika belastande. GC-MS används ofta för att spåra skillnader mellan ölsatser av redan fastställda och välutvecklade recept, där en parameter justeras [Intervju, Mayers J, 2021-04-20]. För större bryggerier ställs även högre yttre krav på ölkvaliteten. Det blir då större behov för mer precisa analysrutiner [Intervju, Bengtsson R, 2021-04-22].

7.2 Provtagning med HS

HS är den provtagningsmetod som har visats ge data som är bäst knutet till syftet med denna rapport, att utreda hur väl öl kan kvalitetsbestämmas med olika analysmetoder. VOC:er, som är nära knutet till ölkvalitet, påvisades bättre med HS.

Av de provtagningstider som testades (5, 15 och 30 minuter) kan 5 minuter vara

en ineffektiv provtagningstid för ändamålet att finna VOC:er. Det adsorberas för få molekyler på fibern jämfört med längre provtagningstid. Fördelen med 30 minuter över 15 minuters provtagning är inte lika tydlig. Antalet funna ämnen för 30 minuter är något fler, mot en avvägning i längre provtagningstid under laborationen. Därtill var andelen identifierade ämnen från topparna lägre för 30 minuter än för 15 minuter. Avvägningen i tid bedöms alltså inte vara värt det.

7.3 Provtagning med IM

IM-provtagning påvisar fler ämnen än HS, varav stor andel inte är VOC:er. Vid IM kan även icke-flyktiga ämnen, såsom polysackarider, adsorberas på fibern, eftersom den är nedsänkt i vätskan. IM innebär också ett extra steg av tvättning med vatten. Alltså lämpar sig IM-provtagning bättre om annat än VOC:er är av intresse.

7.4 Provtagning med direktinjektion

Faktumet att ALS:ens nål gick sönder under laborationen påvisar en av dess nackdelar som uppkommer vid sporadisk användning. Nålen som används för att upphämta prov är en förbrukningsvara som även är relativt dyr jämfört med annan provupptagningsutrustning, som en plastpipett. Eftersom nålen är ömtålig har laboratorier som använder ALS dessa nålar i lager. Vid kontinuerlig användning byts nålar ut efter hand om de går sönder.

Laborationen i detta fall var däremot en enstaka undersökning. Vid enstaka undersökningar måste nålen rengöras enligt instruktioner från tillverkaren vilket upptar tid och resurser. Tvättsteget kan möjligen utelämnas för att spara tid, men med ökad risk för nålen att gå sönder. Förbrukningen av nålar per undersökning blir då större och analysen blir ineffektiv kostnadsmässigt. För att kunna använda ALS ska rätt vialer användas och installering av ALS:en utföras. Installeringen tar dock tid att genomföra, men genom att lägga tid på att ställa in ALS:en sparas tid senare eftersom laboranten slipper utföra manuellt arbete. I detta fall skulle enbart två prover undersökas. Den tid som lades ner för att kunna använda ALS:en hann därför inte löna sig, eftersom två manuella provtagningar skulle gått snabbare. Ur en tidsaspekt kan användning av ALS alltså vara gynnsam på en kontinuerlig nivå, men inte vid enstaka provtagningar.

7.5 UV/Vis-spektrofotometrins applicerbarhet

Den topp som observeras i absorbansspektrumet från Bilaga 2 mellan 490nm och 540nm förklarar lösningens orangebruna färg [28]. Utöver det är absorptionsspektrumet från UV/Vis-spektrofotometern i hög grad tillintetsägande. Lambert-Beers lag är inte tillämpningsbar eftersom koncentrationen antagligen är för hög, trots spädning. Ytterligare kan det inte heller uteslutas att molekylerna i lösningen påverkar varandra, vilket troligtvis är fallet. Utifrån resultatet som gavs av GC-MS-analysen innehåller proverna bevisligen ett stort antal molekyler. Slutsatser angående provernas komposition utifrån UV/Vis-spektrofotometrin kan inte dras, eftersom kraven för ekvationen ej uppfylls. Hade koncentrationen varit lägre och därmed kravet för Lambert-Beers lag uppfyllts, skulle fortfarande antalet molekyler i provet störa analysen. Det skulle med andra ord vara nödvändigt att använda en metod där

förbehandling av proven ingår.

Det finns flera olika förbehandlingsmetoder för att ge möjlighet att analysera specifika grupper av molekyler. Flera metoder [34] utvärderades för eventuellt laborativt arbete, men vid diskussion mellan grupp och handledare visade det sig att dessa metoder inte var utförbara. Dels eftersom en del material ej fanns att tillgå, dels att vissa av metoderna var för avancerade. En metod för att kvantifiera karbonylgrupper [34] ansågs vara genomförbar men kunde inte utföras. Orsaken var att lösnings- och derivatiseringsmedel ej fanns att tillgå. Detta problem grundades i att när metoden färdigställdes var det för sent att införskaffa material för att utföra laborationen. Eftersom vidare laboration och förbehandling inte skedde kan denna studie inte påvisa vilken metod som fungerar eller är att föredra. Det som kan påvisas är dock graden av kemisk expertis som behövs för att både validera och utveckla en metod.

Den experimentella metoden som utfördes var mycket enkel men resultatet visade sig vara oanvändbart. Det påvisas därmed att det är lätt att använda en UV/Vis-spektrofotometer men svårt att få användbara resultat. Skulle UV/Vis-spektrofotometri användas på ett bryggeri är det alltså utförandet av analysen som är enkel, men behandlingen av provet innebär en stor utmaning beroende på metod. En lösning till detta är att köpa in analysen externt. Mer diskussion om att köpa in analytiska tjänster finns att läsa under avsnitt 7.6.

En IBU-mätning utfördes inte under det laborativa arbetet. För att bevisa att en IBU-mätning är genomförbar för den ölsort som behandlas i studien tillhandahöll Nan Albertson, BeerLab, resultat för detta. Albertson utförde metoden som finns beskriven i avsnitt 4.3.2 [E-post, Albertson N, 2021-04-18]. Analys med två replikat av motsvarande ölsort som Prov 1 gav 41,7 IBU samt 42,5 IBU. Enligt systembolaget ligger den kvantitativa beskan hos barley wine på 40-100 IBU [10]. Värdet kan jämföras med en ljus lager, modern stil på 30-45 IBU [35] och en Indian Pale Ale på 35-75 IBU [36]. Att jämföra IBU mellan olika öl säger dock mer om ölets innehåll än om den faktiska smaken, då upplevelsen av beskan beror av ölets totala sammansättning, se avsnitt 4.3.2.

För att bryggerier skall använda UV/Vis-spektrofotometri för att analysera sin produkt räcker det inte att köpa in apparaturen. De skulle utöver inköpet behöva anställa en kemisk analytiker för att utföra analysen, varav en metod först kan behöva utvecklas. Finns det däremot en beprövad och enkel metod kan den säkerligen adapteras av bryggerier. Ett första steg för att införa en högre användning av UV/Vis-spektrofotometri inom svenska bryggerier är att någon med expertis inom ämnet tillhandahåller tjänsten, såsom BeerLab.

7.6 Kemisk analys av öl

Det har hittills fungerat att producera öl med minimal användning av kemisk analys och det återstår att se hur länge detta kommer vara fallet. Ifall ett mindre bryggeri implementerar mer omfattande kemiska analyser kan de finnas både positiva och negativa aspekter. Skulle en hel sats kasseras innebär det även ett ekonomiskt bakslag,

vilket kan förebyggas med kemisk analys. Ett företag med mycket svinn eller bortfall inom sin produktion är inte fördelaktigt från ett hållbarhetsperspektiv, varken ekonomiskt eller miljömässigt. Hur ofta satser av öl måste kasseras har inte undersökts i denna studie och kan därmed inte diskuteras mer än hypotetiskt. Med kemisk analys kan detta eventuella svinn minskas då påvisandet av fel blir mer omfattande. Om man med kemisk analys tidigare kan märka fel och tidigare implementera åtgärder blir produktionen både mer tids- och materialeffektiv.

Bryggmästaren har huvudansvarar över produktionen och har stor kompetens gällande sitt arbete. Därför är det mindre troligt att en dålig öl skulle gå till försäljning, om ens produceras. Bryggmästaren besitter skickligheten att tillverka öl, en dryck som innehåller bland annat humlesyror och alkohol som i sig bidrar till en mer sanitär produkt. Därför kan antagandet göras att ölets kvalitet på de flesta bryggerier, även de som inte utför kontinuerliga kemiska analyser, är tillräckligt bra ur både hygien- och säkerhetssynpunkt. Detta styrks då många bryggerier utan kemisk analys tillverkar öl av godkänd produktkvalitet för konsumenten, framförallt med intressant smak och karaktär.

Om ett bryggeri har en bryggmästare med bristande kompetens kommer de med hög sannolikhet ändå sälja öl med mindre uppskattad smak vilket kommer resultera i låg försäljning. Dessa bryggerier riskerar, oavsett om de kompletterar med kemisk analys, att successivt upphöra från marknaden på grund av ouppskattad smak och bristande kvalitet. Trots detta är det i slutändan produktsäkerhet och livsmedelskvalitet som de kemiska analyserna handlar om. Både bryggmästarens sensoriska analys och den kemiska analysen bidrar till att kvalitetssäkra produkten men på olika sätt.

Ytterligare en fördel med kemisk analys är att den kan motverka och försvåra bedrägerier, som i fallet med whisky, se avsnitt 1. Det visar på att det är fördelaktigt för bryggerier att förstå vikten av kemisk analys. Whisky och öl skiljer sig dock i pris vilket gör att vinsten att förfalska öl inte lär vara gynnsam. Det är dessutom svårt att definiera vad en förfalskad öl är på grund av att kompositionen kan skilja sig så mycket mellan olika öler, men även mellan olika satser av samma öl. Detta är dock något som inte undersökts i denna rapport. De kemiska analyserna behövs däremot för att kunna påvisa innehållet i en produkt och kan leda till en bättre framförhållning hos bryggerierna, ifall striktare krav av kemisk analys realiseras i framtiden.

7.7 Industriellt värde

Möjligheten att kunna detektera när eventuella felsmaker i en öltillverkningsprocess uppstår vore av stort värde för industrin. Det skulle spara resurser då eventuella problem skulle kunna åtgärdas så snabbt som möjligt. Alltså vore det mer fördelaktigt att utföra liknande tester som utförs i denna studie tidigt i tillverkningsprocessen än i slutet av den.

En lista på innehållande komponenter ger inte någon betydande information för

hur ölet faktiskt smakar, det är något som en människa måste avgöra. Denna lista skulle dock vara värdefull att ha för varje steg i processen ty det kan underlätta för bryggaren och möjliggöra en kartläggning av var i processen eventuella felsmaker eller liknande tenderar att uppstå.

7.8 Felkällor

Experimenten som utförts i denna studie har inte följt en tidigare genomförd metod. Metoden har utvecklats under tidens gång, vilket medför en stor risk för flera olika felkällor. Genom att identifiera dessa kan metoden optimeras för att nästa gång utföras på ett bättre sätt.

7.8.1 SPME

En möjlig felkälla som kan ha påverkat resultatet är bristen på tät försegling av proven vid SPME-provtagningen. Då endast aluminiumfolie användes som försegling finns det en risk att lättflyktiga komponenter från proven, däribland VOC:er, läckte ut. Detta skulle kunna innebära att provets jämvikt försköts åt gasfasen, vilket kan ha lett till snabbare avdunstning. Alltså kan detta ge ett missvisande resultat där masspektrometern visar en för liten mängd VOC:er. Om vissa komponenter diffunderade från proven så skulle det innebära att desto längre tiden gick så skulle fler komponenter lämna. Detta skulle leda till att de försök som utfördes sist på ett och samma prov skulle ge sämst kvalitet på resultaten då det stått utan tät försegling under längst tid. Det är dock svårt att avgöra i vilken grad en eventuell flykt av VOC:er skedde. Därmed är detta en hypotetisk felkälla som har en okänd påverkan på det erhållna resultatet.

7.8.2 Apparatur

Baserat på resultatet går det att koppla vissa av de funna ämnena till en eventuell blödning i kolonnen, vilket kan ha orsakats av att material på kolonnväggen lossnat och detekterats av masspektrometern.

7.8.3 Provberedning

Eventuella kontamineringar kan ha funnits på magnetomrörarpelletsen samt i via-lerna. För att undvika detta sköljdes pelletsen med provet innan användning, men det är ingen garanti på att eventuella kontamineringar försvann. Dock skulle kontamineringarna inte vara en betydande felkälla då VOC-kompositionen troligen ej skulle påverkas.

7.8.4 Prover

Efter att de kemiska analyserna utförts visade det sig att det hade uppstått problem med jäsningen av ölsatsen som proverna kom ifrån. Detta skulle kunna leda till att vid eventuella vidare experiment med samma sorts öl från en annan sats skulle resultatet bli olikt det resultat som producerades i denna studie.

7.8.5 Mänskliga faktorn

Det finns flera olika moment under ett laborationsutförande där risken är stor att det går fel. En eventuell felkälla i denna studie är att fibern i sprutan vid SPME-utförandena inte behandlades på ett optimalt sätt. Fibern är väldigt känslig så det krävs inte mycket för att den ska skadas eller gå sönder, vilket skulle kunna ha

lett till missvisande resultat. En annan eventuell felkälla är att sprutan med fibern injicerades manuellt till GC-injektorn. Den manuella injektionen skulle kunna ha inneburit att desorberingstiden för fibern kunde ha varit inkonsekvent för de olika försöken.

7.9 Etiska aspekter

Öl innehåller en stor mängd kolhydrater och produceras ofta med alkohol. Förtäring kan därför leda till en försämrad hälsa. Konsumtion av öl sker alltså inte för hälsans skull utan för njutning eller berusning. Öl ska därför inte betraktas som ett väsentligt livsmedel utan snarare lyxprodukt. Projektets mål är inte att öka konsumtionen av alkoholhaltig öl i Sverige, snarare att främja bryggeriers möjlighet till analys.

En förbättrad ölproduktion skulle kunna öka efterfrågan av det aktuella bryggeriets öl. Däremot har Sverige en sträng alkohollagstiftning, speciellt beträffande butiks-försäljning där statligt monopol gäller. Detta leder till att företag inte får sälja eller annonsera om sina produkter på annat sätt än enligt svensk lagstiftning. Det finns alltså hinder för direkt koppling mellan svenska bryggeriers egna kemiska analyser och större konsumtion av alkoholhaltig öl.

7.10 Framtida problemställningar

Det finns många möjligheter till fortsatta arbeten baserat på denna studie. En direkt fortsättning hade kunnat vara att vidareutveckla analysen med UV/Vis-spektrofotometri. En utmaning är just svårighet att utveckla en sådan metod. Metodutveckling kräver kunskap om både metodik och apparatur, vilket diskuteras i avsnitt 7.5. Många av de metoder som redan nyttjas av bryggerier där UV/Vis-spektrofotometri används är relativt enkla och billiga. Kravet för att nya metoder skall implementeras är att de skall vara prisvärda. För att anses prisvärd måste analysen spara bryggeriet mer pengar än vad den kostar, direkt eller indirekt.

Som diskuterat i avsnitt 7.1 ligger en stor del av värdet för GC-analysen i den mängd information metoden ger om proven. En möjlig fortsättning på det laborativa utförande som skett i detta arbete är att följa en lagringsprocess mer noggrant. Om provtagning tas ur ett lagringsfat vid jämna intervaller kan utveckling av topparna i kromatogrammen följas, vilket ger information om när de olika smakföreningarna bildas i ölet. Kombinerar den kemiska analysen med sensorisk analys kan lagringstiden optimeras utefter önskade ämnen med rätt karaktärsprofil i ölet.

En ytterligare intressant studie skulle vara att undersöka förändring av sockerhalten samt sockerarter under tiden ölen fermenteras. Det skulle innebära en utökad kunskap om jästens beteende under fermenteringsprocessen. Med denna vetskap kan man på ett säkrare sätt veta i vilket skede man befinner sig eller borde befinna sig och därmed tidigt i processen kunna reglera eventuella fel.

8 Slutsatser

Sammanfattningsvis kan det konstateras att metoden för UV/Vis-spektrofotometri som utfördes i denna studie inte anses vara användbar. Dock kan diskussionen i avsnitt 7.5 påvisa att UV/Vis-spektrofotometri är användbart i vissa mätningar. Det har konstaterats att UV/Vis-spektrofotometri redan används inom analys hos somliga bryggerier. De analyser vars metod redan är utvecklad är användbara för att identifiera eller kvantifiera vissa specifika komponenter. Det fungerar som en del av kvalitetsbestämning, men kan endast besvara frågor om det specifika ämnet som metoden är utvecklad för. Genom att endast använda UV/Vis-spektrofotometri kan fullständig kvalitet av ölet ej valideras.

Frageställningen om GC-MS visar något som UV/Vis-spektrofotometri inte visar kan besvaras med att GC-MS i förhållande till UV/Vis-spektrofotometri ger mycket information. Att metoden ger mer information innebär dock inte att den är bättre. Som diskuteras i 7.1 kan data från GC-MS användas för att säkerställa likvärdiga ölsatser, vilket kan anses vara viktig information. Men för att få reda på IBU-värdet kan däremot inte GC-MS användas. Trots det kan slutsatsen dras att GC-MS kan ge användbar information som UV/Vis-spektrofotometri inte kan. Dock kan slutsats ej dras om vilken av de två metoderna som är att föredra eftersom det beror på vilken information som efterfrågas.

GC-MS ger detaljerad information om innehållet hos ölet. För ett bryggeri som har ekonomisk möjlighet att använda GC-MS kan det vara en god investering. Det krävs dock att satserna av samma ölsort är tillräckligt lika i sammansättning för att resultaten ska kunna användas. För mindre bryggerier däremot skulle inköp av GC-MS innebära en för stor investering.

UV/Vis-spektrofotometri används idag för mätning av IBU, färg och andra molekyler. För ett mindre bryggeri som har den ekonomiska möjligheten att investera i UV/Vis-spektrofotometer och kompetens kan det vara en användbar investering. Dock är det mindre troligt att små bryggerier har de ekonomiska möjligheterna för denna typ av investering. Alternativet för dem skulle vara att köpa in tjänster vid behov.

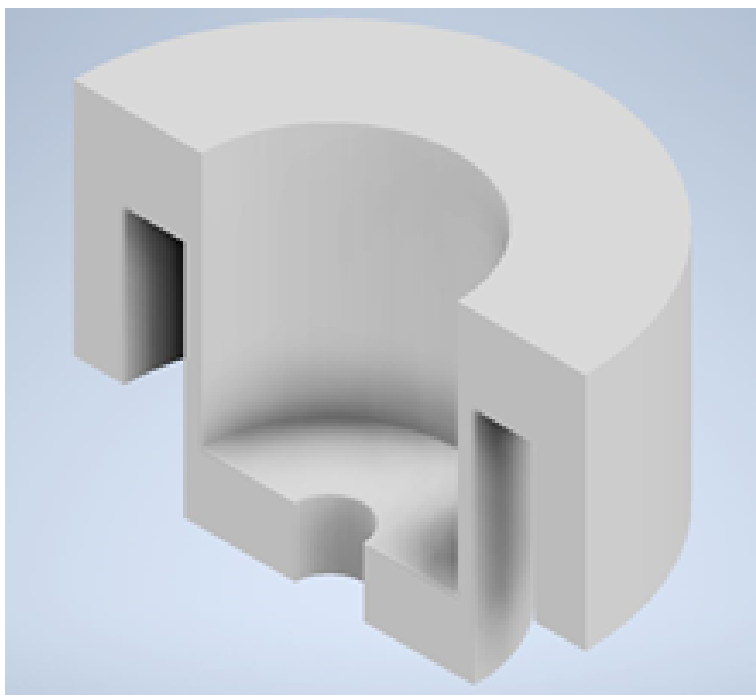
Referenser

1. Eurofins. Livsmedelsanalyser [Internet]. Lidköping: Eurofins. 2013. [2021-05-06]. Hämtad från: <https://www.eurofins.se/tjaenster/livsmedel>.
2. Europarlamentet. Betänkande. Om livsmedelskrisen, bedrägerier i livsmedelskedjan och kontrollen över detta [Internet]. 2013. [2021-05-06]. Hämtad från: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2013-0434_SV.pdf?re-direct.
3. Stupak M, Goodall I, Tomaniova M, Pulkrabova J och Hajslova J. A novel approach to assess the quality and authenticity of Scotch Whisky based on gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2018;1042:60–1. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.017>.
4. Systembolaget. Ölets historia [Internet]. Stockholm: Systembolaget. 2020. [2021-03-26]. Hämtad från: <https://www.systembolaget.se/ol/olets-historia/>.
5. Sveriges Bryggerier. Öl. Stockholm: Sveriges Bryggerier. 2020. [2021-04-12]. Hämtad från: <https://sverigesbryggerier.se/vara-drycker/ol/>.
6. Westermann DH och Huige NJ. Microbial Technology [Elektronisk]. Vol. 2. Amsterdam: Elsevier, 1979. Hämtad från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125515023500062?via%3Dihub>.
7. Harrison M och Albanese J. Beer/Brewing. I: *Encyclopedia of Microbiology [Elektronisk]*. Utg. av Schmidt TM. 4. utg. Oxford: Academic Press, 2019:467–77. ISBN: 9780128117378. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13014-6>.
8. Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H och Derdelinckx G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem* 2006;95:357–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.006>.
9. Systembolaget. Lär dig mer om ljus lager [Internet]. Stockholm: Systembolaget. 2020. [2021-03-26]. Hämtad från: <https://www.systembolaget.se/ol/olstilar/lager/ljus/>.
10. Systembolaget. Barley Wine [Internet]. Stockholm: Systembolaget. 2020. [2021-04-29]. Hämtad från: <https://www.systembolaget.se/ol/olstilar/ale/brittisk-amerikansk/barley-wine/>.
11. Kulturhistoriska föreningen för södra Sverige. Historik om öl och öltillverkning. Lund: Kulturen. [2021-04-03]. Hämtad från: http://www.kulturen.com/wp-content/uploads/2016/12/Historik_om_ol_och_oltillverkning.pdf.
12. Sveriges Bryggerier. Om oss. Stockholm: Sveriges Bryggerier. 2020. [2021-03-30]. Hämtad från: <https://sverigesbryggerier.se/om-oss/#bryggerierna-i-sverige>.
13. Björnsbacka S. Svensk bryggeriboom förändrar branschen [Internet]. Statistiska Central Byrån 2018. [2021-03-22]. Hämtad från: <https://www.scb.se/hitta-statistik/artiklar/2018/svensk-bryggeriboom-forandrar-branschen/>.
14. Systembolaget. Försäljning per de 50 största leverantörerna. Stockholm: Systembolaget. 2021. [2021-03-30]. Hämtad från: https://www.omsystembolaget.se/img/publishedmedia/ja0hfqmu3fiy8nxml300/F-rs-ljning_per_de_50-st-rsta_leverant-rerna_-liter_-_1-.pdf.

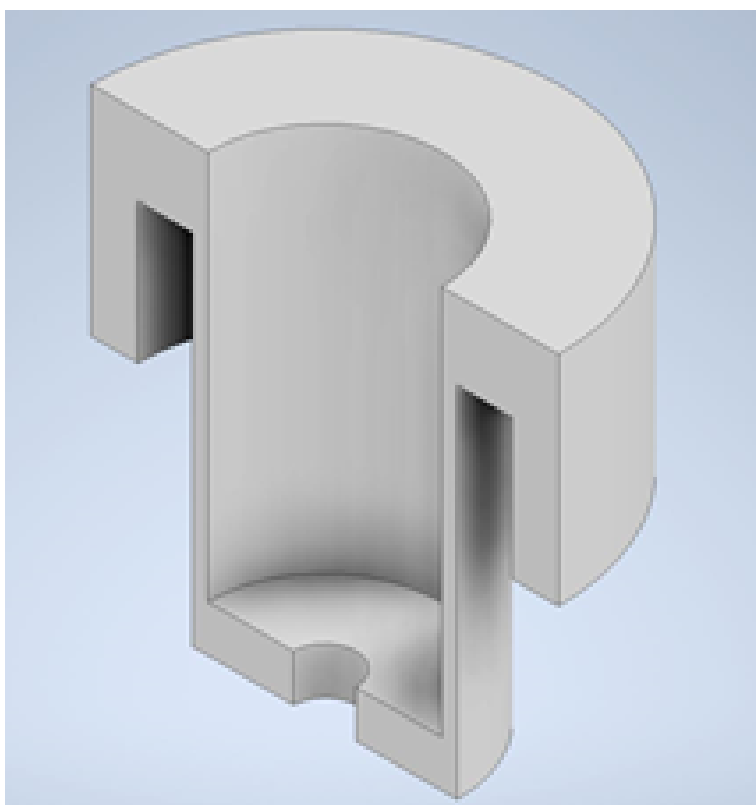
15. Sveriges Bryggerier. Över 40 nya bryggerier i Sverige 2020 [Pressmeddelande] (2021-02-08). [2021-04-12]. Hämtad från: <https://www.mynewsdesk.com/se/sverigesbryggerier/pressreleases/oever-40-nya-bryggerier-i-sverige-2020-3071024>.
16. Henningsson J. Vem är en bryggare? [Internet]. Karlstad: Me and my magazines. 2016. [2021-04-13]. Hämtad från: <https://cohops.se/vem-ar-en-bryggare/>.
17. Poppels Bryggeri. Historia. Jonsered: Poppels Bryggeri. 2021. [2021-04-12]. Hämtad från: <https://www.poppels.se/community/poppels-historia/>.
18. Lenner J. Richard Bengtsson [Internet]. Karlstad: Me and my magazines. 2017. [2021-04-14]. Hämtad från: <https://cohops.se/richard-bengtsson/>.
19. Beernews. ”Ser Spendrups som hantverksbryggeri” [Internet]. Göteborg: Beernews AB. 2017. [2021-04-13]. Hämtad från: <https://www.beernews.se/articles/richard-ar-ansvarig-190-miljoner-liter-ol/>.
20. Scandinavian School of Brewing. Diploma Master Brewer [Internet]. Köpenhamn: Scandinavian School of Brewing. 2019. [2021-04-15]. Hämtad från: <http://www.brewingschool.org/beer/diploma-master-brewer/>.
21. VLB Berlin. Certified Brewmaster Course 2022 [Internet]. Berlin: VLB Berlin. 2021. [2021-04-13]. Hämtad från: <https://www.vlb-berlin.org/en/brewmaster>.
22. Gibson NB, Costigan GT, Swannell RP och Woodfield MJ. Volatile organic compound (VOC) emissions during malting and beer manufacture. *Atmospheric Environ.* 1995;29(19):2661–72. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(94\)00303-3](https://doi.org/10.1016/1352-2310(94)00303-3).
23. Manelius R. Beer Flavor Component Analyses for Small Breweries. Examensarb. Finland: Turku University of Applied Sciences), 2017. Hämtad från: http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/133536/Manelius_Robin.pdf?sequence=4&isAllowed=y.
24. Leça JM, Pereira AC, Vieira AC, Reis MS och Marques JC. Optimal design of experiments applied to headspace solid phase microextraction for the quantification of vicinal diketones in beer through gas chromatography-mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 2015;887:101–10. Hämtad från: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015008454>.
25. Harvey D. Chromatographic and Electrophoretic Methods. I: Analytical Chemistry 2.1 [Elektronisk]. Vol. 2. New York: McGraw-Hill, 2016:770–81. [2021-03-15]. Hämtad från: http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.1.html. CC BY-NC-SA 4.0.
26. Agilent Technologies. 7693A Automatic Liquid Sampler Installation, Operation and Maintenance [Internet]. Wilmington: Agilent Technologies, Inc. 2010. [2021-04-29]. Hämtad från: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4513-90010.pdf>.
27. Hollas JM. General Features of Experimental Methods. I: Modern spectroscopy. Vol. 4. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004:s.41–71. ISBN: 9780470844168.
28. Harris DC. Fundamentals of Spectroscopy. I: Quantitative Chemical Analysis. Vol. 8. New York: W. H. Freeman och Company, 2010:s.393–418. ISBN: 9781429218153.
29. ASBC Technical Committee. Beer Bitterness. ASBC Methods of Analysis 2011:2–3. DOI: 10.1094/asbcmoa-beer-23.

30. VLB Berlin. Beer analysis [Internet]. Berlin: VLB Berlin. 2021. [2021-05-06]. Hämtad från: <https://www.vlb-berlin.org/en/beer>.
31. Humlegårdens Ekolager. Beer analysis [Internet]. Sollentuna: Humlegårdens Ekolager. 2021. [2021-05-06]. Hämtad från: <https://shop.humle.se/utrustning/matning/analystjanster/olanalys>.
32. National Institute of Standards and Technology. [Internet]. Gaithersburg: United States Department of Commerce. [2021-04-20]. Hämtad från: <https://webbook.nist.gov/>.
33. Flavor & Extract Manufacturers Association. Flavor ingredient library [Internet]. 2021. [2021-03-31]. Hämtad från: www.femaflavor.org/flavor-library/.
34. Jeffery GH, Bassett J, Mendham J och Denney RC. Colorimetry and Spectrophotometry. I: Textbook of Quantitative Chemical Analysis. Vol. 5. Essex: Longman Scientific & Technical, 1989:645–730. ISBN: 0582446937.
35. Systembolaget. Modern stil/India pale lager [Internet]. Stockholm: Systembolaget. 2020. [2021-04-29]. Hämtad från: <https://www.systembolaget.se/ol/olstilar/lager/ljus/india-pale-lager/>.
36. Systembolaget. India pale ale (IPA) [Internet]. Stockholm: Systembolaget. 2020. [2021-04-29]. Hämtad från: <https://www.systembolaget.se/ol/olstilar/ale/britisk-amerikansk/ipa/>.

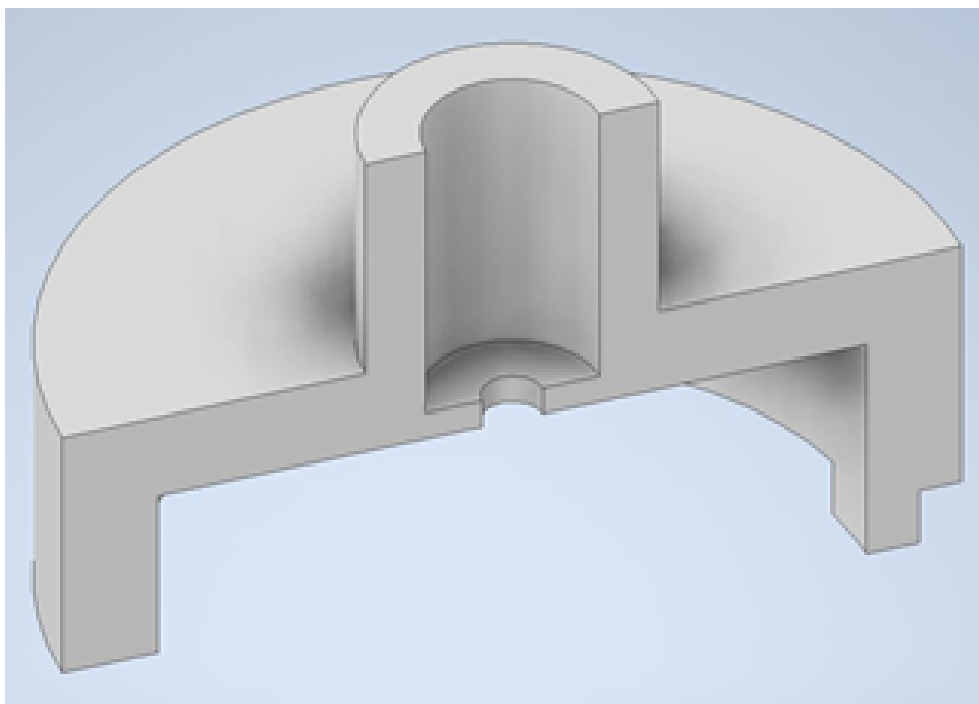
Bilaga 1



Figur 1: Spruthållare för HS-SPME provtagning.

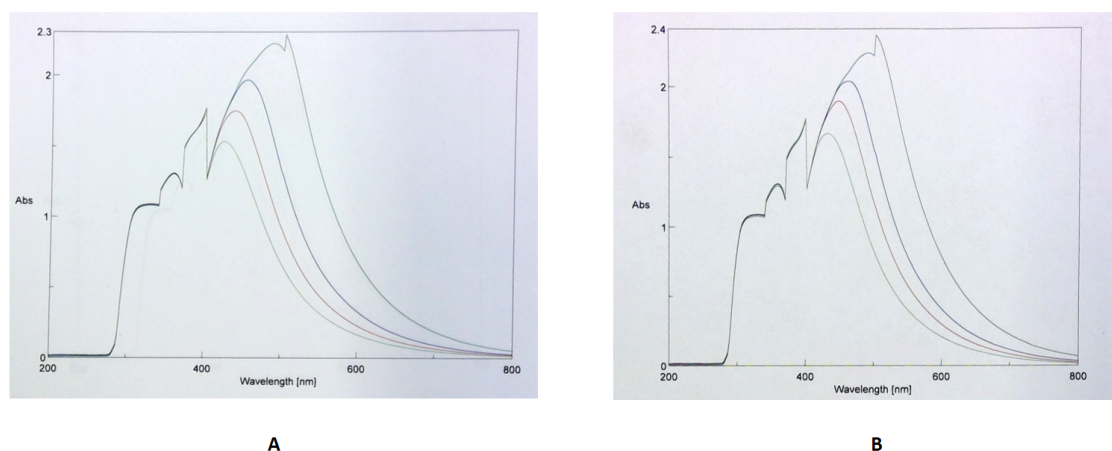


Figur 2: Spruthållare för IM-SPME provtagning.

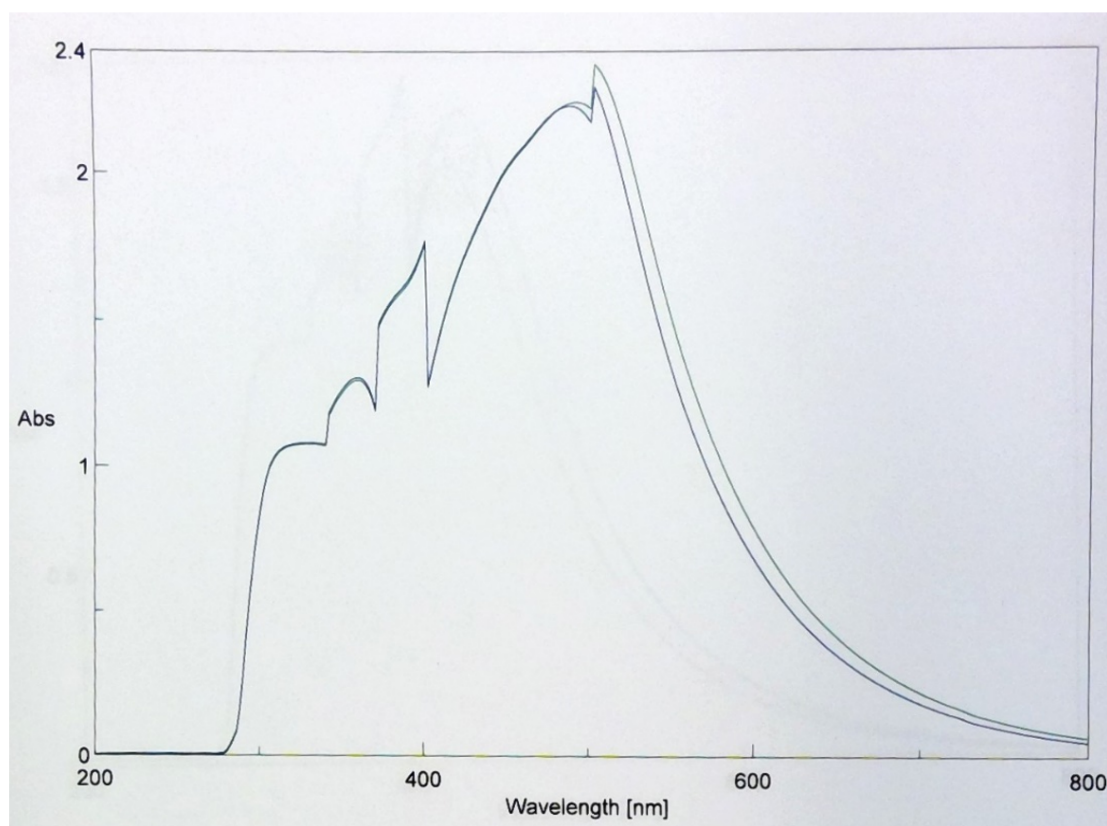


Figur 3: Spruthållare för SPME desorption i inloppet till GC 7890A.

Bilaga 2



Figur 1: Absorptionsspektrum för A: Prov 1, B: Prov 2. För både A och B representeras den högsta toppen av rent prov. I takt med att höjden på toppen minskar, ökar spädningsgraden. Förhållandet mellan prov och MilliQ-vatten är 1:1, respektive 1:2 och 2:7



Figur 2: Absorptionsspektrum för Prov 1 och 2, ej utspädda. Prov 2 motsvarar den högre absorbanzen.