

BİRADA DİASETİL, ASETOİN 2,3- BÜTANDİOL VE 2,3- PENTANDİOL

Doç. Dr. İsmet ŞAHİN
Fermantasyon Teknolojisi
Kürsüsü A.Ü.Z.F.
ANKARA

Bir fermantasyon ürünü olan bira, birbirine yakından bağlı olan bir seri teknolojik işlemler sonunda elde olunan serinletici bir içkidir. Bu teknolojik işlemlerden en önemlileri olarak malt yapılmasını, kaynatma bölümünde şıranın elde edilmesini ve elde olunan şıranın fermantasyonunu sayabiliriz. İyi ve her yönüyle kusursuz bir bira üretimi için bu safhaların her biri özel bir dikkat ve bilgiyi gerektirir. En ufak bir ihmal sonunda bunlardan birinde ortaya çıkacak olan bir hata, bir sonraki safhada kısmen giderilebilirse de tamamen ortadan kaldırılamaz ve son üründe az veya çok kendini gösterir.

Konumuzu teşkil eden diasetil, asetoin, 2,3 - butandiol ve 2,3 - pentandiol'ün oluşumları veya parçalanmaları asıl ve son fermantasyon safhalarında olur. Bu maddeler birada aroma ve tad yönünden arzulanan değişikliklere neden olurlar ve birada belirli miktarlardan daha fazla olmamaları gerekir. Hatta bu maddelerin miktarları sınır değerlerini aşarsa bira satılmaz durum alır. Bu ise ilk iki safhada ne kadar çaba harcanırsa harcanırsa fermantasyonda doğacak bir hatanın birayı kusurlu hatta içilemez hale getireceğini göstermektedir. İşte bu nedenle fermantasyon sırasında olagelen biyokimyasal olayları yakından tanımak ve çeşitli fermantasyon şartlarının ve sıra bileşiminin bunlara ne yönde etki ettiğini bilmek gerektiği gibi, ayrıca bunların etkisini olumlu yöne çevirmek için zorunlu tedbirleri almak bir biracının görevidir.

Birada son derece önemli olan bu maddelerin oluşumuna geçmeden önce kısaca, bunların özelliklerinden bahsetmek ve ayrı ayrı tanıtmak yerinde olur.

Diasetil (2,3 - Butandion)

CH_3 . CO. CO. CH_3 yapısında B, -dioksibutan olup yeşil- sarı renkte, batıcı kinon benzeri kokusu olan bir sıvıdır. Yoğunluğu $D=0.98$, kaynama noktası $88^{\circ}C$ dir. Su, alkol ve eterde kolay çözünür (Römpp, 1962). Diasetil - su karışımı daha $79^{\circ}C$ de uçmaya başlar. Aşırı seyreltiğinde tereyağı aroması verir. Birada artan konsantrasyonla bal, pastörizasyon veya karamelizasyon tadı olarak tanımlanan bir tada neden olur. Çoğu kez bu maddelerin oluşumu sarsına enfeksiyonuna bağlandığından sarsına tadı olarak da tanımlanmıştır. Buradan da anlaşılacağı gibi bu madde birada arzulanan bir refakat maddesidir (Drews ve ark. 1962).

Asetoin

CH_3 . CHOH. CO. CH_3 yapısında olan asetoin, asetilmetilkarbinol, 3 - hidroksi - 2 - butanon, dimetilketol; α - hidroksi - β - oksibutan adlarıyla da söylenir. Molekül ağırlığı 88,1 olup saf halde renksiz, hoş kokulu bir sıvıdır. Yoğunluğu $D = 0.997$, kaynama noktası $148^{\circ}C$ dir. Su ve alkolle karışabilir, eter ve petrol eterde az çözünür (Römpp, 1962). Fermantasyon yan ürünü olup fehlengi indirger. Su ile kuvvetli seyreltmede veya birada küfümsü ve boğucu bir koku ve küflü - odunumsu bir tad verir (Drews ve ark. 1965).

2,3 - Butandiol

CH_3 . CHOH. CHOH. CH_3 yapısında 2,3 - bütandiol denir, hemen hemen renksiz kristallerdir. Yoğunluğu $D = 1.0$, donma noktası $23 - 27^{\circ}C$, kaynama noktası $179 - 182^{\circ}C$ dir. Su, alkol ve eterle karışabilir (Römpp, 1962). Saf halde tipik glikol kokusuna sahiptir. Su ile kuv-

vetli seyreltmede veyahutta birada çoğuniukla asetoinde olduğu gibi küflü ve boğucu koku ve aynı şekilde sınır değeri çok aşıldığında hoşta gitmeyen, sonradan acılık bırakan bayat bir tad verir (Drews ve ark. 1965).

Diasetil ve onun redüksiyon ürünleri asetoin ve 2,3 - butandiol'den başka birada önemli olan ve bu maddelerle aynı devrede birada oluşan diğer önemli bir madde de 2,3 - pentandion'dur (Haukeli ve Lie 1975). Bu maddenin oluşumunun sözü edilen diğer fermantasyon ürünlerinin oluşumu zamanına rastlaması ve aynı etkenlere bağlı olması, ayrıca diasetil'den sonra birada en zararlı etkiyi göstermesi ve mevcut diasetil'in enfeksiyondan ileri gelip gelmediğinin saptanmasına yardımcı olması nedeniyle son yıllarda bu maddenin önemi çok artmıştır.

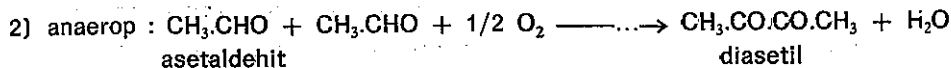
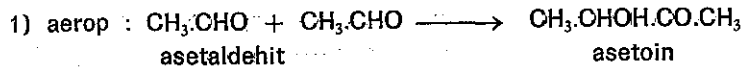
2,3 - Pentandiol

CH₃. CH₂. CO. CO. CH₃ yapısında olup 2,3 - diketopentan, metiletilgliokzal olarak da adlandırılır. Molekül ağırlığı 100.11, yoğunluğu D = 0.955 dir. —52°C'de erir, 108°C'de kaynar (Bennett, 1947). Renksiz bir sıvı olup, birada batıcı kokuya sahiptir ve böylece biraya fena bir koku verir (Scherrer 1972).

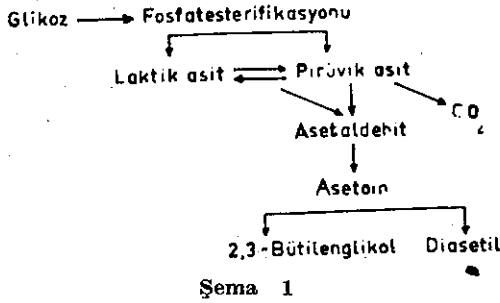
Böylece biraya fena tad ve aroma kazandıran ve sınır değerlerinin üzerine çıktığında biraya içilemez bir özellik kazandıran bu maddeleri kısaca tanıdıktan sonra, bunların birada oluşumunu, bu oluşuma etki eden faktörleri yakından incelemek yerinde olur.

Birada diasetil ve benzeri maddelerin var olduğu ve bunların biranın kalitesini olumsuz yönde etkilediği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Önceleri bu maddelerin ve özellikle diasetil'in birada enfeksiyon sonucu oluştuğu görüşü hakimdi. Bu maddenin oluşumunun ise bira sarsınası olarak tanımlanan kok şeklindeki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği

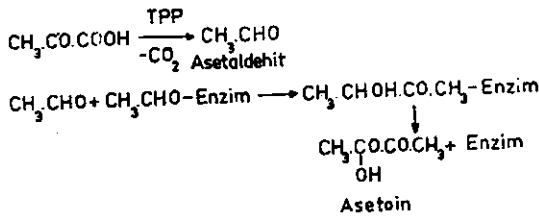
de yine önceleri kabul edilen bir görüştü. Fakat son senelerde yapılan araştırmalar aerop bir mikroorganizma olan sarsınaların oldukça anaerop bir ortam teşkil eden biralarda faaliyet gösteremeyeceğini ortaya koyarken, biralardan hemen daima yine kok şeklinde mikroorganizmalar olan pediyokokların izole edilmesi, bu bakterilerin yanlış tanımlandığını, dolayısıyla yukarıdaki görüşlerin de yanlış olduğunu ortaya koymuştur. Fakat meselenin asıl önemli olan yanı Gjertsen ve arkadaşlarının (1964) da belirttikleri gibi Shimwel ve Kirkpatrick'in 1939'da maya fermantasyonunun normal bir yan ürünü olduğunu ortaya koymalarıdır. İşte adı geçen araştırmacıların çalışmalarından sonra birada bulunan diasetil ve benzeri diğer maddelerin kesinlikle bir enfeksiyona dayanmayıp, fermantasyon sırasında bira mayaları tarafından da oluşturulabileceği saptanmış ve maya seçiminde bu maddeleri daha az oluşturanların alınmasına öncelik verilmeye başlanmıştır. Son senelerde bu maddelerin gerek mayalar gerekse bakteriler tarafından ne şekilde oluşturulduğu geniş araştırmalara yol açmış ve bu konuda çok sayıda araştırmaların yapılmasına sebep olmuştur. Bu maddelerin oluşumu üzerinde çeşitli araştırmacılar arasında zaman zaman farklı görüşler ortaya çıkmıştır. Örneğin Kockova - Kratochvilova ve arkadaşları 1956'da yaptıkları araştırmada bu durumu belirtmişler, ayrıca C₄ - bileşiklerinin oluşumuna ait görüşlerin hepsinin, bu oluşumda pirüvik asitin vaz geçilemeyecek ara ürün olduğunda birleştiklerini ifade etmişlerdir. Kockova - Kratochvilova ve arkadaşları (1956) diasetil, asetoin ve 2,3 - bütillenglikolün kökeninin asetaldahit olduğunu tahmin etmektedirler. Bunlara göre diasetil asetoinin oksidasyon ürünüdür. Aynı araştırmacılar, bu araştırmalarından Beynum ve Pette'e dayanarak asetoin ve diasetil'in anaerop ve aerop şartlarda ayrı şekillerde oluştuğunu belirtmişler ve bunu şöyle formülize etmişlerdir.



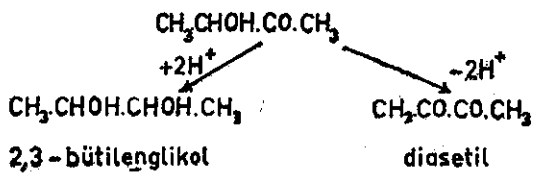
Bu araştırmacıların belirttiklerine göre pedi yokoklarda fermentasyon şeması şu şekildedir: (Şema 1)



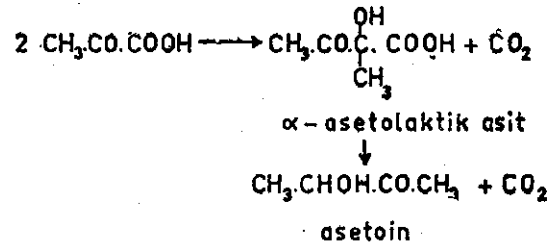
Drews ve arkadaşları 1962'de yaptıkları araştırmada yine; biradaki diasetilin daha önceki görüşlerin aksine yalnız enfeksiyon etkenleri tarafından değil, bira mayaları tarafından da oluşturulduğunu belirtmişler ve mayalar tarafından diasetil oluşumunda özellikle solunumu aksayan bira mayası mutantlarını sorumlu tutmuşlardır. Drews ve arkadaşları (1962)'na göre mayalarda asetoin şöyle oluşmaktadır: Önce pirüvik asit, pirüvik asit dekarboksilazı olarak etkiyen koenzim Thiaminpyrophosphat (TPP) etkisiyle asetaldehide dönüşmekte, asetaldehit - Enzim kompleksi ile bu asetaldehit reaksiyona girerek kolayca asetoin ve Enzim'e ayrılan asetoin - Enzim kompleksini oluşturmaktadır. (Şema 2)



Bu araştırmacılar göre oluşan asetoin Neuberg'in şemasına göre diasetil ve 2,3 - bütüilengliko'e okside veya redükte olmaktadır. (Şema 3)

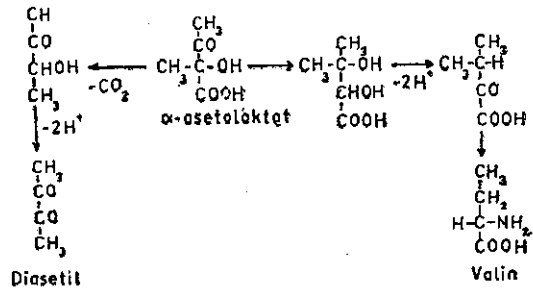


Bu araştırmacılar bakterilerde asetoinin ortaya çıkışının temelden başka olduğunu belirtmişler ve daha önce bakterilerde, bir molekül CO₂ çıkışı ile iki molekül pirüvik asidin kondanse olarak α-asetolaktat oluştuğuna ait ifadeleri kabullenmişlerdir. Devam eden bir basamakta ise α-asetolaktik asit asetoina dekarboksile edilir. (Şema 4)



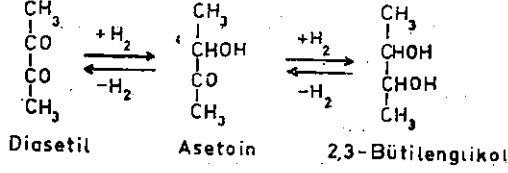
Bakterilerde bu reaksiyonları katalize eden enzimler büyük bir biyokimyasal önem taşır. Bu mikroorganizmalarda karbonhidratların parçalanmasının büyük bölümü Drews ve arkadaşları (1962)'na göre asetoin üzerinden olduğu gibi, asetoinin oksidasyon ürünü diasetil ve redüksiyon ürünü 2,3 - bütüilenglikol karbonhidrat parçalanmasının son ürünleri olarak kabul edilir.

Drews ve arkadaşları (1962) α-asetolaktik asit üzerinden giden yola valin biosentezi sırasında ara basamak olarak mayalarda da rastlandığını belirtmişlerdir. Burada α-asetolaktat bir taraftan valin ana ürününe, diğer taraftan ise asetoin ve diasetil yan ürününe dönüşmektedir. (Şema 5)



Yine Drews ve arkadaşları 1965'teki araştırmalarında asetoin ve bunun oksido - redüksiyon ürünleri üzerinde durmuşlar, diasetil, asetoin ve 2,3 - bütüilenglikolün üçlü bir redoks

sistemi oluşturduklarını açıklamışlardır. (Şema 6)



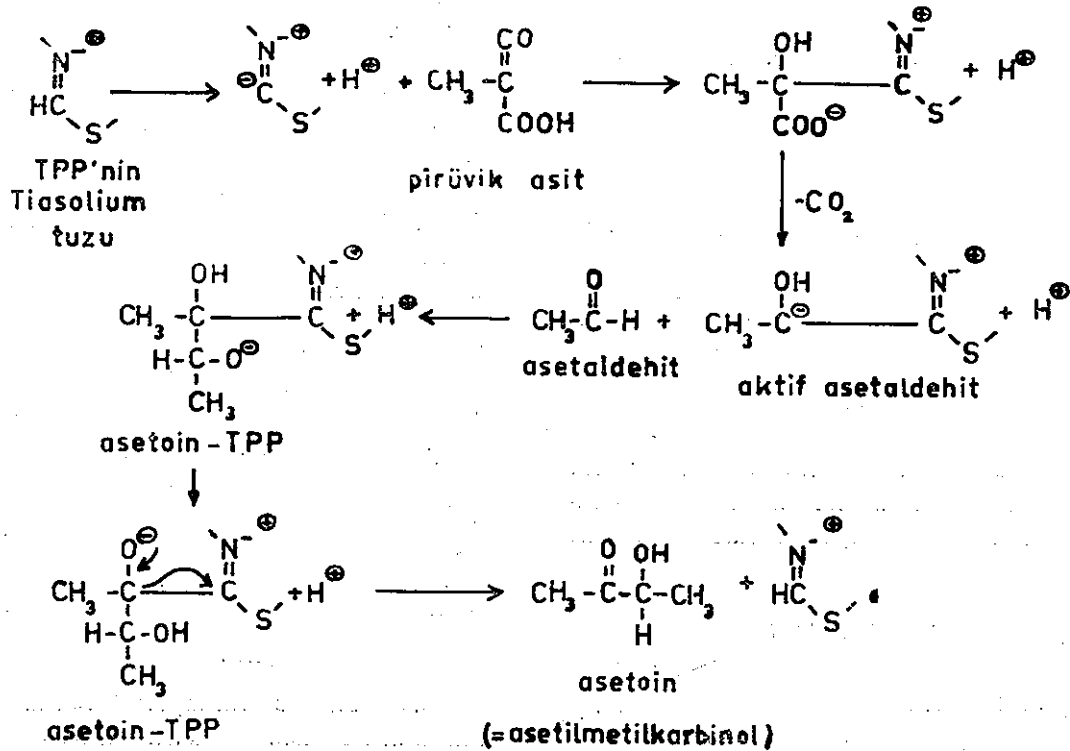
Şema 6

Bunlara göre C_4 - gövdesi ilk sentez yolunda mayanın alkol fermantasyonu yani onun anaerob enerji - madde mübadelesinde bir yan ürün olarak ortaya çıkar. Buradaki biyokimyasal olay ise şöyledir: Asetaldehit, pirüvikasit dekarboksilyasyonunda ortaya çıkan aktif asetaldehit ile kondanse olarak asetoini oluşturur. Pirüvikasidin dekarboksilaz olarak etkiyen TPP' ta bağlanması olasılıklıdır. Çünkü bunun Tiasolium tuzunun C-2 deki hidrojen atomu asit olarak etkir ve bir karbon iyonunun bağlanmasını mümkün kılar. Bu yan reaksiyonun alkol fermantasyonunun entansitesi ile bağlı olduğu

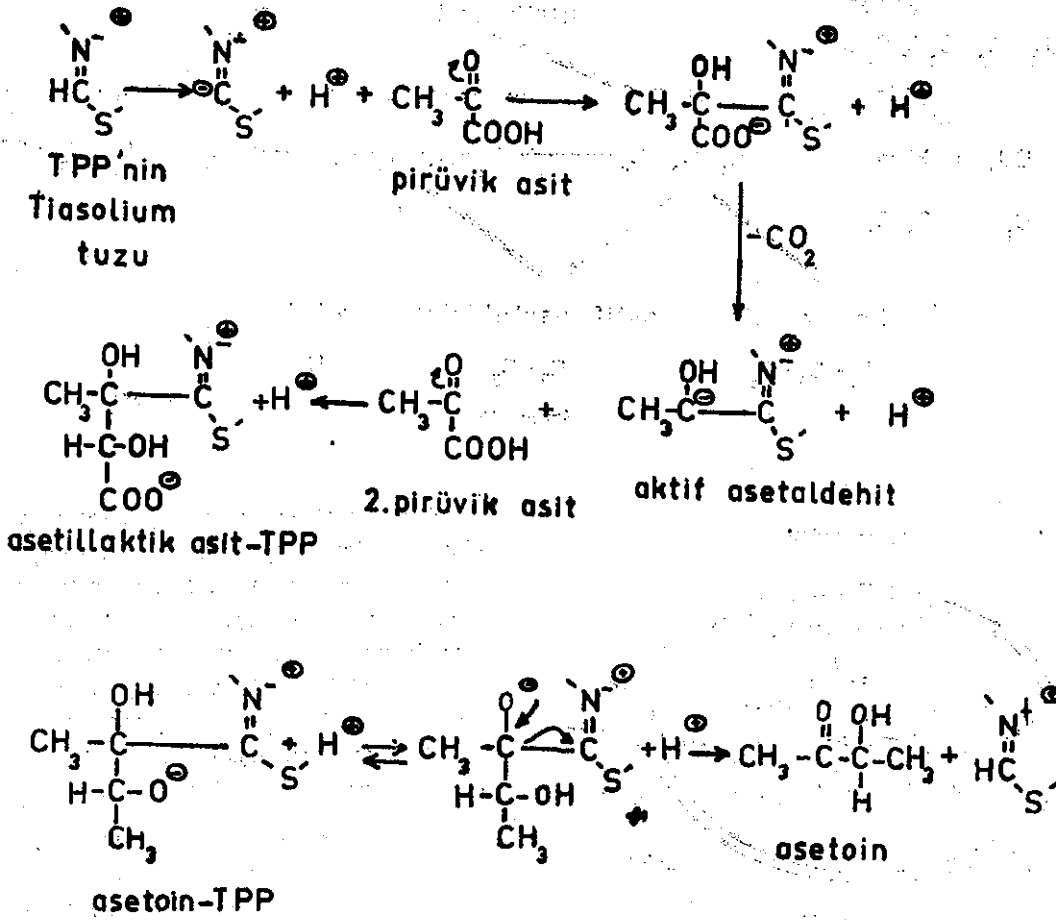
kabul edilir. Araştırmacılar bütün bu olayları şu şekilde resimlendirmişlerdir. (Şema 7)

Asetoinin ikinci sentez yolu yine bu araştırmacılara göre şöyledir. Valin ve lösin amino asidlerinin sentezinde pirüvik asit, aktif asetaldehidle α - asetolaktat'a kondanse edilir ve bu da bir yan reaksiyonla asetoina dekarboksile edilir. Bu durumda asetoin mayanın amino asit yani yapı maddesi oluşumunun artık ürünü olmuş olur ve bu durumda valin ilâvesi asetoin oluşumunu etkiler. Buradaki mekanizma ise şöyledir: (Şema 8)

Drews ve arkadaşları (1965)'na göre her iki şekilde de oluşan asetoin üçlü redoks sisteminin orta ürününü teşkil eder ve mayanın hidrojen nakledici fermenti olan bütillenglikol dehidrogenazı asetoini 2,3 - bütillenglikole indirger. Asetoin + $\text{NADH}_2 = 2,3$ - bütillenglikol + NAD. Öte yandan mayada mevcut olan asetoin dehidrogenazı asetoini reverzibl olarak diasetile dönüştürür. Asetoin + NAD = Dia-



Şema 7

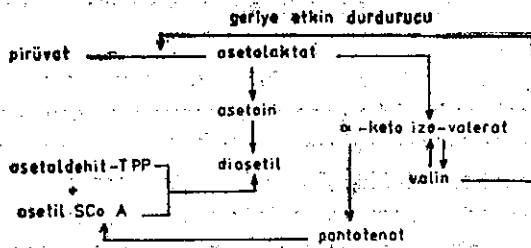


Şema 8

setil + NADH₂. Fakat bu oksidasyon işi hava oksijeni ile olursa irreverzibildir.

Levis 1968'de diasetil üzerine yapılan yeni araştırmaları özetleyen derlemesinde asetoinin ikinci oluşum şeklini şöyle resimlendirmiştir. (Şema 9)

Busse ve Kandler 1961'de radyoaktif işaretlenmiş şekerlerle yaptıkları denemede Leuc. citrovorum için asetoin oluşumunu şu şekilde



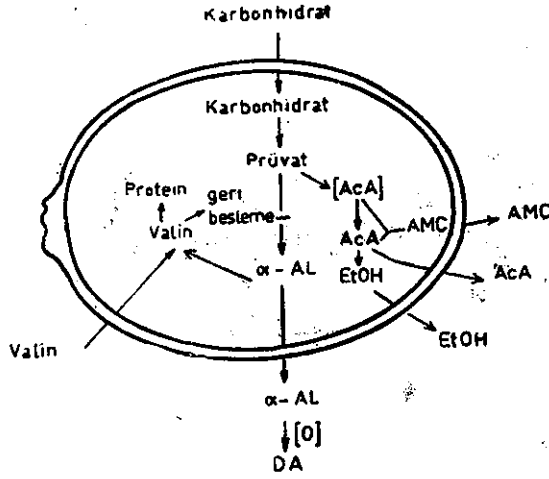
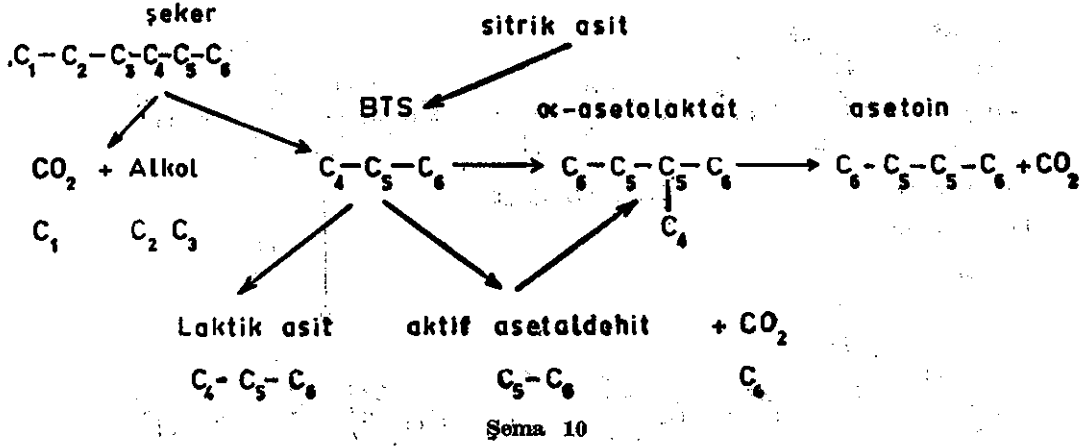
Şema 9

izah etmişlerdir. Burada da yine α-asetolaktat ara üründür. (Şema 10)

Yine Lewis (1968) biraz önce sözü edilen derlemesinde Kuriowa'ya göre maya hücresi modelinde bunu şöyle resimlendirmiştir. (Şekil 1)

Bütün bu araştırmaların görüşlerine göre öncelikle asetoin oluşmakta, daha sonra bunun oksidasyonu ile diasetil, redüksiyonu ile 2,3 - butandiol ortaya çıkmaktadır.

Bu görüşlere karşın Portno ve Biol (1966) yaptıkları araştırmada biraya 20 mg/l asetoin ilâve edip, 4 gün müddetle yüzeyden hava akımına maruz bırakmışlar ve bu müddet sonunda gaz kromatografisi ile yaptıkları analizlerde asetoin ilâve edilen örnekte kontrol örneğine oranla fazla diasetil olmadığını saptamışlardır. Bu durum cetvel 1'de görülmektedir.



AcA = asetaldehid

AMC = asetoin

α -AL = α -asetolaktat

DA = diasetil

EtOH = etilalkol

Şekil - 1 (Lewis, 1968)

Cetvel 1 : Asetoin ilâvesinin diasetil oluşumu üzerine etkisi

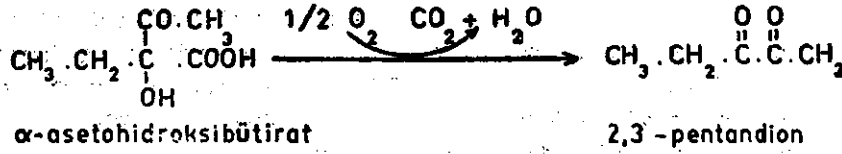
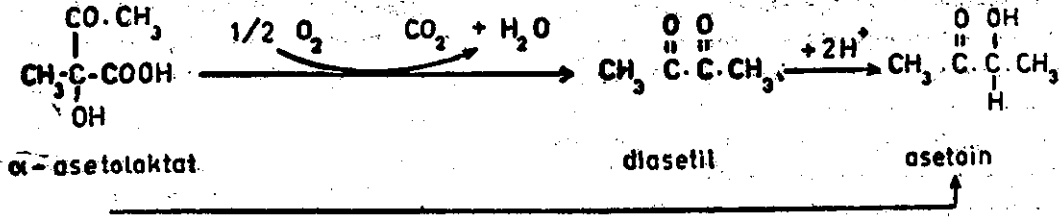
Örnekler	Diasetil mg/l
Muamele görmemiş bira	0,18
Bira + 20 mg/l asetoin	0,19
Su + 50 mg/l asetoin (oksijen verilmiş)	0,11
Su + 50 mg/l asetoin (asetoin CO_2 verilmiş)	0,13

Aynı araştırmacılar 50 mg/l asetoin ilave edilmiş sudan oksijen ve CO_2 geçirmişler, oksijenin diasetil oluşuna etkisi olmadığını saptamışlardır (Cetvel 1). Bunun üzerine araştırmacılar fermantasyon sırasında diasetilin artmasının, asetoinin direkt oksidasyonuna bağlı olmadığını belirtmişlerdir. Böylece asetoin ve diasetil arasındaki ilişkinin daha önce düşünüldüğünden az olduğu anlaşılmıştır.

Haukeli ve Lie 1971'de yaptıkları araştırmada diasetilin, asetoinin oksidasyonundan oluştuğu fikrinin yanlış olduğunu, mayaların bu mekanizmadan diasetil oluşturma yeteneğinde olmadıklarını belirtmişler ve benzer diketonlar oluşturma yeteneğinde olmadıklarını belirtmişler ve benzer diketonlar denenen diasetil ve 2,3-pentandion'un 2-asetohidroksi asitlerden oluştuğunu belirtmişlerdir. Bunlara göre 2-asetohidroksi asitler oldukça labildirler ve kolayca diketonlara dönüşürler. (Şema 11)

Haukeli ve Lie (1971) aynı araştırmalarında çalkalanan ve çalkalanmayan şişelerde α -asetolaktatın $60^\circ C$ 'de diasetile dönüşümünü ve ayrıca yine $60^\circ C$ 'de α -asetolaktat ve α -asetohidroksibütiratın birada benzer diketonlara dönüşümünü şekillerle göstermişlerdir (Şekil 2-3).

Haukeli ve Lie 1975'deki diğer bir çalışmalarında, daha önce yayınlanmış olan çalışmalarda bakteri ve mayalarda farklı iki mekanizma ileri sürüldüğünü belirttikten sonra; bakterilerin iki molekül prüvik asidi kondanse edip α -asetolaktik asidin oluşumunu sağladıklarını, takip eden reaksiyonda da bunu asetoina dekar-



boksile ettiklerini belirtmektedirler. Yine bu araştırmacılar serbest asetaldehidin bakteriyel parçalanmaya karıştırılmadığını saptamışlardır. Mayalarda ise asetoinin iki şekilde oluştuğunu; birinci yolda aktif asetaldehidin serbest ase-

taldehidle kondanse olduğunu, ikinci yolda ise valin biyosentezinde ara ürün olarak α -asetolaktat oluştuğunu ve bununda asetoina dönüşüğünü belirtmişlerdir.

Buraya kadar yapılan incelemelerden de anlaşılacağı gibi, bütün bu çabalar diasetil, asetoin ve 2,3-bütüilenglikolün oluşumunu tek bir görüşte birleştirmeyi başaramamıştır. Görüş ayrılıkları ise daha çok α -asetolaktat üzerinden seyreden oluşumdadır. Mayalarda ilk yol olarak nitelenen asetaldehidin aktif asetaldehidle kondensasyonunda tüm araştırmacılar birleşmişlerdir.

Bu maddelerin birada oluşumunu etkileyen nedenler :

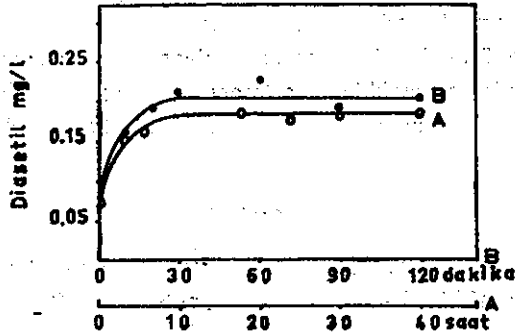
1) Aşılama nisbeti

Diğer koşullar aynı kaldığı ve yalnız aşılama oranının değiştiği durumlarda oluşan diasetil konsantrasyonunun artan aşılama oranına uygun olarak arttığı saptanmıştır. Portno ve Biol (1966'a) laboratuvar ve pilot tesislerde yaptıkları araştırmalarda bu durumu rakamlarla açık olarak ortaya koymuşlardır (Cetvel 2).

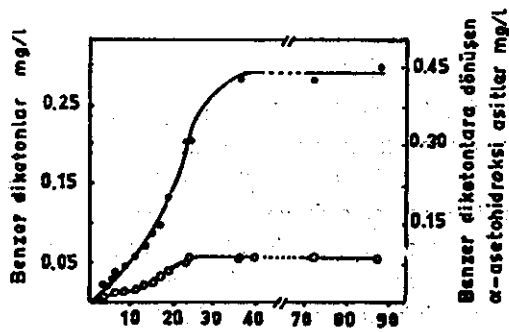
Cetvel 2

Aşılama oranının diasetil konsantrasyonuna etkisi

Aşılama oranı (lb/barrel)	Diasetil konsantrasyonu (mg/l)
1	0,27
2	0,40
3	0,48
8	0,65



Şekil 2 — Sentetik α -asetolaktatın 60°C'de çalkalanmayan (●) ve çalkalanmayan (○) şişelerde diasetile dönüşümü (Haukeli and Lie, 1971).

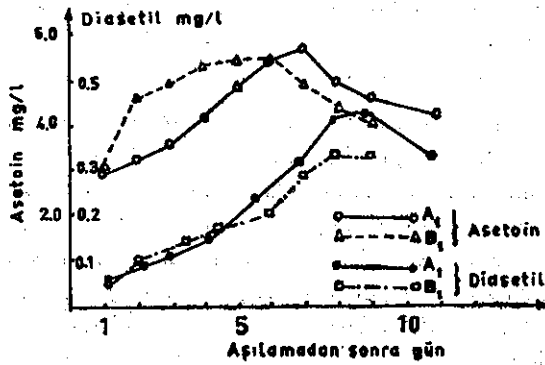


Şekil 3 — 60°C'de çalkalanmayan şişelerde α -asetolaktat ve α -asetohidroksibütiratın dönüşümü (Haukeli and Lie, 1971).

Cetvelden de görüleceği gibi, aşılama oranı daima iki katı artırıldığında aynı oranla olmakla beraber diasetil miktarı da daima artmaktadır. Aşılama oranının bu etkisi, oran arttıkça ortamdaki amino asitlerin indirgenmesi nedeniyle mayanın amino asit, dolayısıyla valin sentezine yönelmesine bağlanabilir (Portno ve Biol 1966a).

2) Maya

Farklı bira mayası suşları diğer koşullar aynı kalmak şartıyla değişik konsantrasyonlarda diasetil oluştururlar. Drews ve ark. 1965'te yaptıkları araştırmada normal ve yavaş fermentasyon yapan A₁ ve B₁ mayaları ile oluşan diasetil ve asetoin miktarlarının farklı olduğunu grafiklerle ortaya koymuşlardır (Şekil 4).



Şekil 4 — (Derws et al., 1965)

A₁ mayası, yavaş fermentasyon yapan B₁ mayasına göre daha yüksek konsantrasyonda diasetil ve asetoin oluşturmuştur. Portno ve Biol (1966a) yaptıkları araştırmada buldukları sonuçları bir cetvele yerleştirerek, farklı bira mayası suşlarının farklı konsantrasyonlarda diasetil oluşturduklarını göstermeye

Cetvel 3

Farklı bira mayası suşları ile aynı şırada oluşan diasetil konsantrasyonu

Maya N.C.Y.C. No:	Birada diasetil konsantrasyonu mg/l
1005	0,54
1026	0,42
1046	1,07
1057	1,51
1068	0,67
1082	0,44

muvaffak olmuşlardır (Cetvel 3). Ayrıca Mandl (1967) diasetil ve asetoin oluşumunun mayaya yakından bağlı olduğunu belirtmiştir.

Haukeli ve Lie (1972) aynı şekilde çeşitli maya suşları ile yaptıkları denemede ise yine bu görüşü doğrular sonuçlar elde etmişlerdir (Cetvel 5)

Bu cetvelden de diasetil ve asetoin miktarlarının mayaya göre çok değiştiği ve bir alt fermentasyon mayasında her iki fermentasyon yan ürününün en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. Zaten Tran (1966)'da diasetil ve asetoin oluşumunda mayanın rolünü araştırmış ve bu sonuçlara benzer sonuçlar ortaya koymuştur.

3) Sıcaklık

Fermentasyon sırasında diasetilin gerek oluşumunda ve gerekse parçalanmasında sıcaklık önemli bir etkidir. Spaeth ve Trabattori (1967) sıcaklığın diasetilin indirgenmesinde önemli bir etken olduğunu belirtirlerken, Portno ve Biol (1966a) yaptıkları denemede şıranın aşılama sıcaklığının artması ile oluşan diasetil konsantrasyonunun da arttığını saptamışlardır (Cetvel 4)

Cetvel 4

Aşılama şırının sıcaklığı (F°)	Birada diasetil konsantrasyonu (mg/l)
55	0,26
60	0,29
65	0,42
70	0,51
75	0,66

4) Oksijen

Ötedenberi bira fermentasyonunda zamansız yapılacak havalandırmanın, bira kalitesini olumsuz yönde etkilediği görüşü belirtilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çok çalışma ile bira fermentasyonunda oksijen etkisi derinlemesine incelenmiş ve elde olunan sonuçlar bu görüşü doğrulamıştır. Nitekim Portno ve Biol (1966b) şıranın başlangıçta hava ile doyurulmasının oluşan diasetil miktarına etkili olmadığını, diğer özellikleri aynı fakat ayrı hava ve karbondioksitle doyurulmuş iki şıra numune-

Cetvel 5 12°C'deki aktif fermentasyon sırasında benzer diketonlar ve α -asetohidroksi asitlerin miktarları

Maya türü	Diasetil mg/l	2,3-Pentandion mg/l	α -aseto-laktat mg/l	α -aseto-hidroksi-bütirat mg/l	Asetoin mg/l
S. cerevisiae NCYC 240	0,077	0,024	0,30	0,03	10,75
S. cerevisiae CBS 2246	0,051	iz	0,99	0,16	8,05
S. cerevisiae ekmek mayası	0,048	0,014	0,85	0,36	14,00
S. cerevisiae var. ellipsoideus	0,100	0,038	0,45	0,24	10,25
S. carlsbergensis No: 249	0,088	0,041	0,26	iz	14,35
S. carlsbergensis No: 20	0,176	0,080	0,48	0,03	24,10
S. carlsbergensis suş H	0,323	0,169	0,51	iz	39,85
S. diastaticus CBS 1782	0,027	iz	0,08	iz	6,55
S. sake, CBS 1198	0,021	iz	0,26	0,05	2,35

sinin aynı maya ile fermentasyonundan elde ettikleri sonuçlarla saptamışlardır (Cetvel 6).

Cetvel 6

Şıranın ön mumelesi	Elde olunan birada diasetil miktarı (mg/l)
Hava ile doyurulmuş A	0,20
" " " B	0,14
CO ₂ ile doyurulmuş A	0,19
" " " B	0,18

Buna karşın aynı çalışmalarında araştırmacılar fermentasyon sırasında sıvı içinden hava geçirilmesinin karbondioksit geçirilmesine oranla mayanın gelişmesini 4 misli diasetil miktarını ise 6 misli artırdığını saptamışlardır (Cetvel 7).

Cetvel 7

Fermentasyon sırasında oksijenin diasetil oluşumuna etkisi

Fermentasyon sırası içinden geçirilen gaz	Birada diasetil (mg/l)	Birada maya (g/l)
Hava	2,04	20,2
CO ₂	0,36	4,4

Şayet hava fermente olan şıranın içinden değilse sadece yüzeyinden geçirecek olursa diasetil ve maya miktarındaki artış CO₂ geçirilmesine karşın iki misli olmaktadır (Cetvel 8).

Cetvel 8

Yüzeyden geçirilen havanın fermentasyon sırasında diasetil oluşumuna etkisi.

Yüzeyden geçirilen gaz	Birada diasetil mg/l	Birada maya mg/l
Hava	0,93	8,1
CO ₂	0,52	4,6

Görülüyorki sıvı içinden veya yüzeyinden fermentasyon sırasında yapılacak havalandırma diasetil miktarını aşırı ölçüde artırır. Spaeth ve Trabattoni (1967) aşılardan bir kaç saat sonra mayanın ortamdaki oksijeni harcadığını, bundan sonra oksijenle meydana gelecek temasın diasetil sentezini artıracığını belirtmektedir. Yine Johanides (1967) mayanın aerob şartlara kolay adapte olmasından dolayı son senelerde gittikçe daha sıcak ve çabuk fermentasyon sistemlerinin geliştiğini, bu sebepten birada diasetil miktarında klâsik yöntemle oranla fazla olduğunu belirtmektedir. Håkeli ve Lie (1971) α -asetohidroksi asitlerin benzer ditionlara dönüşümünde oksijenin önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Moffat (1972) fermentasyon sırasında havalandırmanın diasetil miktarını aşırı derecede artırdığını, hatta Haukeli ve Lie 1975'te yaptıkları araştırmada iz haldeki oksijenin dahi bu artışı sağlayacağını belirtmektedir. Nihayet 1975'te White ve Wainwright bunu bir kere daha doğrulamışlardır.

Bütün bu araştırmalardan, havalandırmanın denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır .

5) Şıranın tipi ve bileşimi

Biradaki diasetil, asetoin ve benzeri diğer maddeler şıra tipi ve bileşimine yakından bağlıdır. Daha önce belirtildiği gibi diasetil veya asetoinin mayalar tarafından oluşturulma yollarından birinde ara ürün olarak ortaya çıkan α -asetolaktat aynı zamanda ve aslında «valin» amino asitinin biyosentezinde ortaya çıkan bir ara ürünüdür ve bir çok araştırmacının birleştiği husus ortama valin ilâvesinin bu sentezi durdurduğudur. Şırada bulunan valin miktarı ise şıranın bileşimine yani proteinlerin malt yapma ve mayşeleme sırasında yeter derecede amino asitlere parçalanmasına bağlıdır. Yine burada şıranın elde olunması sırasında proteince fakir, karbonhidratça zengin ham hububat kullanılıp kullanılmaması da önemli rol oynar. Ham hububatin bu önemi daha çok şıranın karbonhidrat/azotlu madde oranının karbonhidrat yönüne bozulmasından ileri gelmektedir. Nitekim Gjertseu ve ark. 1964 deki araştırmalarında diasetil oluşumuna etkiyen nedenlerin tam olarak bilinmediğini belirtirlerken muhtemel etkenler olarak

mayayı ve ham hububat kullanılmasını saymışlardır. Portno ve Biol (1966a) valinin diasetil oluşumuna etkisini araştırmışlar ve sonuçta şıraya valin ilâvesinin birada diasetil oluşumunu geciktirdiğini veya durdurduğunu saptamışlardır (Cetvel 9).

Cetvel 9

Şıradaki valin konsantrasyonu (μ mol/ml)	Diasetil oluşumu başlangıç zamanı (aşılardan sonra saat)	Birada diasetil konsantrasyonu (mg/l)
07	6	0.62
1.4	17	0.25
2.1	25	0.07
2.8	31	0.02

Görülüyorki Portno ve Biol (1966a)'un sonuçlarına göre valin ilâvesi hem artan nisbetle orantılı olarak zamanı geçiktirmekte, hemde oluşan diasetil miktarını çok düşürmektedir. Bu araştırmacılara göre diğer amino asitler, örneğin Lösin ve izolösin diasetil oluşumuna etkin olmamıştır. Fakat Haukeli ve Lie (1971)'ye göre izolösinin biyosentezi sırasında, biranın kalitesini diasetilden sonra en fazla etkileyen 2,3- pentandion'un oluşmasında ara ürün olarak rol oynayan α -asetohidroksi bütirat oluşmaktadır. Demek oluyor ki bu maddenin oluşumu da şıranın bileşimi ile yakından ilgilidir. 1969'da Liebs ve Wolter ortama 0,005 mol/l valin ilâvesinin diasetil oluşumunu kontrol numunesine göre % 50 azalttığını saptamışlardır. Scherrer ise 1972 de yaptığı araştırmasında şıraya valin ilâvesinin mayalarda diasetil oluşumunu etkilediğini, fakat bakterilerde bir etki göstermediğini saptamış, ayrıca şıraya izolösin ilâvesinin mayada 2,3-pentandion oluşumunu önlediğini belirtmiştir. Yine Portno ve Biol 1966 a yılındaki aynı araştırmalarında şıra tipinin de önemini belirtmek için açık renkli ve koyu maltlardan hazırlanan şıralarla deneyi tekrarlamışlar, valin miktarları farklı olan bu iki şırada farklı konsantrasyonlarda diasetil saptamışlardır (Cetvel 10).

Çetvel 10

Şıra tipi	Yoğunluk	Renk (E.B.C.)	Toplam amino asit (μ mol/ml)	Valin μ mol/ml	Diasetil son seviye mg/l
malt şırası					
Renkli	1040	8.5	9.48	0.37	1.04
malt şırası					
Açık	1040	2.5	12.60	0.70	0.77

Demek oluyorki koyu renkli malt yapılması sırasında amino asitlerin şekerlerle melanoidine dönüşmesinde valin seviyesi takriben yarı yarıya azalmakta, bu maltlardan elde olunan biralarda oluşan diasetil seviyeleride farklı olmaktadır. Adı geçen araştırmacılar, aynı araştırmalarında şıraya glikoz ve ham hububat ilâve ederek şeker/amino asit oranının bozulması nedeniyle diasetil oluşumunun arttığını belirtmektedirler (Çetvel 11)

Çetvel 11

Şıraya glikoz ilâvesinin diasetil oluşumuna etkisi

Katkı maddesi	Yoğunluk	Şıradaki valin konsantrasyonu (μ mol/ml)	Biradaki diasetil konsantrasyonu (mg/l)
% 100 açık malt (kontrol)	1040	—	0.28
% 95 malt + % 5 glikoz	1040	—	0.28
% 90 malt + % 10 glikoz	1040	—	0.49

Görülüyorki ilâve edilen glikoz miktarı iki misline çıkarılınca biradaki diasetil konsantrasyonunun takriben 0.1 mg/l gibi küçümsenmeyecek bir artışına sebep olmaktadır.

Burada özellikle kontrol numunesine karşın % 25 buğday unu ilâve edildiğinde, diasetil seviyesindeki artış çok önemlidir ve buradaki artış birada diasetil için kabul edilen sınır değeri 0.20 mg/l ye çok yakındır (Çetvel 12)

Çetvel 12

Ham hububatın diasetil oluşumuna etkisi

Katkı maddesi	Yoğunluk	Şıradaki valin konsantrasyonu (μ mol/ml)	Biradaki diasetil konsantrasyonu (mg/l)
% 100 açık malt (kontrol)	1040	0.71	0.30
% 75 malt + % 25 buğday unu	1040	0.55	0.48
% 50 malt + % 50 buğday unu	1040	0.34	0.55

Son olarak 1972'de Moffat'ın bira üretiminde diasetil oluşumunu kontrol etmek için önerdiği tedbirlerden biri şıradaki valinin ve şeker/aminoasit oranının kontrol edilmesidir denmekte; ilâveten bu oranda ham hububat kullanılmasının önemi belirtilmektedir.

Şıra tipi ve bileşiminin diasetil oluşumuna etkisi bütün araştırmacıların sonuçlarına göre valin miktarına dayanmakta olup, 2,3-pentandion oluşumu için izolösin aynı rolü oynamaktadır.

6) pH

Ortam pH'sinin fermantasyon sırasında diasetil oluşumu üzerine etkisi bazı araştırmacılarca bir çok kereler belirtilmiştir. Örneğin Rardler (1963) diasetil oluşumunun ortamın bileşimine ve pH'sına bağlı olduğunu belirtmesinden sonra, 1971 de Haukeli ve Lie fermantasyonda oluşan α -asetolat'ın diasetile dönüşmesinde pH'nın önemli olduğunu grafiklerle göstermiştir.

Bu araştırmacılar pH 3.7-5.3 arasında bu dönüşümün optimal olduğunu, pH 2.0 de ise α -asetolat'ın takriben yarısının diasetile dönüştüğünü saptamışlardır. Yine pH'nın etkisi üzerine 1975'te White ve Wainwright yaptıkları denemede şıranın başlangıç pH'larını 2.N HCl ile 5.2 (kontrol), 4.8 ve 4.4 e ayarlamışlar ve bunların fermantasyon sırasında diketonların ve α -asetohidroksi asitlerin konsantrasyonunu saptamışlardır. Her ne kadar fermantasyonun başlamasından 36 saat sonra α -asetohidroksi asitlerin pikinde başlangıç pH'sına paralel olarak azalma olursada serbest diketonların

yüksek konsantrasyonu, düşük başlangıç pH'sı olan şıranın fermantasyonunda bulunmuştur. Yalnız bu sonuncu araştırmada düşük olarak tanımlanan 4.4 pH, Haukeli ve Lie (1971) nin araştırmasında belirtilen optimum pH sınırları içinde kalmaktadır. Ve sonuçlar tam bir uyum göstermiştir. Şahin (1975) Türkiye Şaraplarında Rastlanan Laktik Asit Bakterileri Üzerine yaptığı araştırmada bu bakterilerin diasetil veya aseton oluşturmalarında pH'nın önemli rol oynadığını saptamıştır.

7) rH'nın (redoks-potansiyel) etkisi

rH 1969'da Mandl'in belirttiği gibi elde edilecek biranın karakterinde küçümsenemeyecek etkiye sahiptir ve fermantasyon sırasında lüzsüz yer rH'nın yükseltilmesinden kaçınmak gerekir. 1975'te White ve Wainwright aşılama şıraya 100 mg/l ferri klorür veya 200 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ilâve ederek yaptıkları denemede saptadıkları sonuca göre ferri klörür ilâvesi diketonların artışına yansıyan α -asetohidroksi-asitlerin parçalanması nisbetini artırmıştır. Aksine metabisülfid ilâvesi bu parçalanmayı azaltır.

Aşılama 24 saat sonra ilâve edilen ferri klorür α -asetohidroksiasitleri ve diketonları dramatik bir şekilde artırırken, aynı zamanda verilecek olan metabisülfid sadece α -asetohidroksiasitlerle diketonların oluşumunu durdurmakla kalmaz fermantasyonu tamamen durdurur.

8) Metal iyonları

100 mg/l F^{***} iyonunun etkisi rH da olduğu gibidir. White ve Wainwright (1975) 20 mg/l ZnSO_4 ilâvesinin çok cüzi etkileri olduğunu; 20 mg/l CuSO_4 ise fermantasyonu yavaşlatmakla kalmaz, α -asetolaktat oluşumu nisbetinde yavaşlatır.

Diasetil, asetoin ve benzeri diğer maddelerin fermantasyon sırasında oluşma seviyesi, dinlendirme sırasında parçalanması, bu maddelerin sınır değerleri ve biradaki önemi :

Bu maddelerin sınır değerleri ve birada oluşma seviyeleri üzerindeki görüşler de oluşumunda olduğu gibi farklıdır. Özellikle oluşma seviyelerindeki farklı görüş, değişik mayaların

kullanılmasından ileri gelmektedir. Örneğin Drows ve ark. 1962 de yaptıkları araştırmada bir toz maya ile fermantasyonun 12. gününde 1.65 mg/l, topak maya ile aynı müddet sonunda 0.97 mg/l diasetil maksimumuna ulaşmışlar 19. günde her ikisinde 0.45 mg/l ye düştüğünü saptamışlardır.

Adı geçen araştırmacılar aynı çalışmalarında çabuk fermantasyon yapan mayada 5. günde 0.56 mg/l diasetil bulmuşlar. 18 gün sonra bunun 0.03 mg/l ye düştüğünü saptamışlardır. Normal fermantasyon yapan bir mayada 6. günde 0.39 mg/l olduğu halde 40 gün sonra diasetil kalmamıştır. Yavaş fermantasyon yapan bir maya ile 8. günde 0.20 mg/l olan diasetil seviyesi ancak 51 gün sonra ortamdaki kaybolmuştur. Araştırmacıların çıkardığı sonuca göre hızlı fermantasyon yapan bir maya oldukça yüksek konsantrasyonda diasetil oluşturduğu halde kısa zamanda bunu parçalar, yavaş fermantasyon yapan maya ise düşük seviyede diasetil oluşturmaya karşın bunu indirgemeleri de oldukça uzun sürer. Araştırmacılar infeksiyonla oluşan diasetilin 0.35-3.0 mg/l arasında olduğunu belirtmişlerdir. Onlara göre Amerikada sınır değer olarak diasetilde önceleri 0.45 mg/l sonra ise 0.35 mg/l kabul edilmiştir. Halbuki bu değeri saptamak için yapılan bir denemede degüstatörlerin 2/3 si 0.15 mg/l diasetili sıfır numunesine göre ayırd etmişler 0.20 mg/l de ise hepsi bu yabancı tadı fark etmişlerdir. 1964 'de ise Gjertsen ve ark. müsaade edilen azami değer olarak 0.5 mg/l yi gösterirken 0.15 mg/l nin hissedildiğini, 0.20 mg/l den fazla diasetilin birada olmaması gerektiğini savunmuşlardır.

Drows ve ark. (1965) asetoin için maksimum değeri bir toz mayada 5.70 mg/l bulmuşlardır. Toprak mayada 3. günde 5.0 mg/l, 6. günde 5.46 mg/l ye çıkmış sonra azalmıştır. Adı geçen araştırmacılar saf topak mayada 6. günde diasetili 0.64 mg/l, 10. günde 0.34 mg/l, 20. günde 0.2 mg/l, 37. günde 0.05 mg/l, asetoini ise 7. günde 5.63 mg/l, 10. günde 4 mg/l, 37. günde ise 1.96 mg/l olarak saptamışlardır.

Yani özellikle fermantasyonun kuvvetli olduğu günlerde sınır değerinin çok üstünde diasetil, sınır değerine yakın miktarda asetoin oluştuğu haldede dinlendirmede maya bu maddeleri

tekrar indirgeyerek zararsız seviyeye getirir veya tamamen yokeder, bunun için de dinlendirilmede kâfi miktarda maya hücrelerinin süspansiyon halinde birada olması gerekmektedir. Drews ve ark. 1965'te yaptıkları bu araştırmada beyaz ve pilsen tipi biralar için diasetil sınır değerini 0.02 mg/l aseton sınır değerini 6 veya 10 mg/l ve 2.3-Butandiol (Bütillenglikol) sınır değerini ise takriben 400-500 mg/l olarak belirtmiş, bunların muhtelif biralardaki bulunma sınırlarını ise şöyle saptamışlardır. Beyaz birada: diasetil 0-0.07 mg/l, aseton, 1.61 - 4.08 mg/l 2.3-Butandiol 80-100 mg/l. Pilsen tipi birada : diasetil 0-0.13 mg/l, aseton 1.94-5.68 mg/l ve 2.3-Butandiol 90-120 mg/l dir. Stark (kuvvetli) birada diasetil 0 - 0.17 mg/l, aseton 2.15-4.94 mg/l ve 2.3-Butandiol 140-165 mg/l dir. Araştırmacılara göre bu üç maddenin üçlü redoks sistemindeki yüzde oranları : diasetil % 0-0.1, aseton % 2.0-5.0, 2.3-Butandiol % 94.9-98 dir. Portno ve Biol (1966a) muhtelif mayalarda diasetil oluşma seviyesini 0.44-1.51 mg/l arasında saptamışlardır. 1967'de Johanides daha önce 1962'de Drews ve ark. tarafından belirtilen infekte olmuş biralardaki diasetil seviyesini doğrulamakta, fakat bu miktarlar için infeksiyon derecesini üç gruba ayırmaktadır. Aşırı infeksiyon 3 mg/l diasetil, ölçülü infeksiyon, 1.23 mg/l ve zayıf infeksiyon 0.35 mg/l diasetil. 1967'de Spaeth ve Trabattoni, son fermentasyon veya dinlendirilmede diasetil ve benzeri diğer maddelerin azalmasını mayanın topaklanması ile ilgili olduğunu belirtmekte, geç topaklanan mayalarda bu parçalanmanın daha çabuk olduğunu ifade etmektedir. Yine bu araştırmacılar sıcaklığın burada önemli rol oynadığı görüşündedirler.

Liëbs ve Wolter (1969) birada 0.2 mg/l nin üzerindeki diasetilin arzulanmadığını belirtirken, 1972'de Haukeli ve Lie kullandıkları bir mayanın fermentasyon sırasında 1.7 mg/l diasetil, 40 mg/l aseton ve 0.8 mg/l, 3. hidroksi 2. pentanon seviyesine ulaştığını belirtmişlerdir.

1971'de Narssiz ve Hellich diasetil miktarının azalmasında sadece birada bulunan maya miktarının değil, biraya verilen mayanın fizyolojik durumunun da önemli olduğunu ve bu mayaların optimum diasetil redüksiyon aktivi-

tesine sahip olması gerektiğini belirtmişlerdir. Diğer bir faktör olarak araştırmacılar sıcaklığı vermekte ve yaptıkları denemeye göre 2.5 mg/l diasetil miktarını sınır değer altına düşürmek için 30° C de 4 gün, 20°C de 7 gün gerekirken, 0° ve 7°C de 5-6 hafta gibi uzun bir zaman gerektiğini saptamışlardır. Buradan da biranın 0°C civarında en az 5-6 hafta dinlendirilmesi gereği ortaya çıkmaktadır.

1972'de Scherrer yaptığı araştırmada açık renkli birada 0.1 mg/l den itibaren diasetilin hissedildiğini ileri sürmüş, 2.3 - pentandion için bu değer 1.5 mg/l ve aseton için 30 mg/l olduğunu savunmuştur. Scherrer'e göre lakto-basiller 2.3 - pentandion oluşturmazlar, pediyokoklar iz halde oluşturur. Mayalar ise diasetille mukayese edilebilecek kadar çok 2.3-pentandion oluşturur ve böylece bir birada saptanacak fazla konsantrasyondaki diasetilin mayalar tarafından mı yoksa infeksiyondan mı geldiğini anlamak için 2.3 pentandion seviyesinin tayini yeterlidir.

Nihayet White ve Wainwright bu konuda 1975'de yaptıkları araştırmada fermentasyon sırasında α -asetolaktatın 1.1 mg/l, α -asetohidroksibütiratın 0.6 mg/l'yi aştığı fakat 160 saat sonra 0.1 mg/l'nin altına düştüğünü saptamışlardır. Diketonlar aşılamadan 36 saat sonra yavaş yavaş artar ve diasetil 0.1 mg/l'ye 2.3-pentandion 0.05 mg/l'ye ulaşır.

Bütün bunlar normal bir şırada fermentasyon sırasında mayaalar tarafından özellikle diasetilin sınır değerinin üzerinde oluşturulduğunu, fakat yeterli bir dinlendirme veya son fermentasyonla bunun tekrar sınır değerinin altına düştüğünü göstermektedir. Bu maddelerin sınır değerinin üzerine çıkması halinde ise biranın içilemez, hatta kanunen satılamaz durum alması, bu maddelerin bira için önemini belirtmeye yeterlidir.

Memleketimizde ham hububat olarak pirincin biracılıkta belirli oranda kullanılmasına yasal olarak izin verilmiş olması ve bazı işletmelerde ayrıca toz şeker kullanılması arzusu, bira endüstrimiz için yukarıda açıklanmaya çalışılan konunun önemini daha da artırmaktadır.

L İ T E R A T Ü R

- Bennett, H., 1974.** Concise Chemical and Technical Dictionary. Chemical Publishing Com. Inc. Brooklyna - New York.
- Busse, M. und O. Kandler, 1961.** Über die Biosynthese des Acentoins bei *Leuconostoc Citrovorum*. Zbl. Bakt. Abt II. 114, 675-682.
- Drews, B.; H. Specht, H-J. Ölscher und F-M. Thürauf, 1962.** Diacetyl im Bier. Monatsch. 15, 109-113.
- Drews, B.; H. Specht, H-J. Ölscher und C. Trénel, 1965.** Über Acetoin und seine Umwandlungsprodukte im Bier. Monatsch. 18, 259-264.
- Gjertsen, P.; S. Undstrup und B. Trolle, 1964.** Diacetyl im Bier. Ref. Monatsch. 17, 232.
- Haukeli, A.D. and S. Lie, 1971.** The influence of 2-actohydroxy acids on the determination of vicinal diketones in Beer and during Fermentation. J. Inst. Brew. 77, 538-543.
- Haukeli, A.D. and S. Lie, 1972.** Production of Diacetyl, 2-acetolactate and Acetoin by yeast during fermentation. J. Inst. Brew. 78, 229-232.
- Haukeli, A.D. and S. Lie, 1975.** Formation and removal of acetoin during yeast fermentation. J. Inst. Brew. 81, 58-64.
- Johandes, V., 1967.** Einfluss der Hefeführung auf die Bierqualitaet. Ref. Brauwiss. 20, 501.
- Kockova «-Kratochvilova», Anna; Alena Vavručkova; Dr. Vopa'tkova - Nona'kova, 1956.** Der mikrobielle Ursprung von Diacetyl und Acetoin im Bier. Brauwiss 9, 73-82.
- Lewis, M.J., 1968.** Recent research on Diacetyl. Brew. Digest 43, 74-81, 129.
- Liebs, P. und Wolter, 1969.** Diacetylbildung. Ref. Brauwiss. 22, 116.
- Maendl, B., 1967.** Gaerungsprobleme und biologische Kontrolle. Brauwelt 107, 921-928.
- Maendl, B., 1969.** Die gaerungstechnologische Bedeutung verschiedener Hefestamm-Eigenschaften für die Bierqualitaet. Brauwelt 109, 742-751.
- Moffat, J.M., 1972.** Diacetyl, seine Synthese, Bestimmung und Kontrolle im Bier. Ref. Brauwiss. 25, 113.
- Narziss, L. und P. Hellich, 1971.** Ein Beitrag zur wesentlichen Beschleunigungen der Gaerung und Reifung des Bieres. Brauwelt 111, 1491-1500.
- Portno, A.D., B.Se., M.I. Biol, 1966. a.** Some factors affecting the concentration of Diacetyl in Beer. J. Inst. Brew. 72, 193-196.
- Portno, A.D., B. Se., M.I. Biol, 1966 b.** The influence of oxygen on the production of Diacetyl during fermentation and conditioning. J. Inst. Brew. 72, 458-461.
- Radler, F., 1963.** «Über die Milchsaeurebakterien des Weines und des biologischen Saeureabbau. Übersicht III. Methoden zur Veraenderung des Saeuregehaltes im Wein». Vitis 4, 62-72.
- Römpp, H., 1962.** Chemie Lexikon, 5. auflage. Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Scherrer, A., 1972.** Zur Problemkreis Diacetyl. Ref. Brauwiss. 25, 16.
- Spaeth, G. und E. Trabattom, 1967.** Variationen des Brauprozesses und ihre Auswirkungen auf den Diacetylgehalt des Bieres. Ref. Brauwiss. 20, 459.
- Şahin, İ., 1974.** Türkiye Şaraplarında Rastlanan Laktik Asit Bakterileri ve Şarapçılığımızdaki Önemi Üzerinde Araştırmalar. Ankara (Doçentlik Tezi) 123 s.
- Tran, H.A., 1966.** Diacetyl in der Brauerei. Schweiz. Brauerei - Rundsch. 77, 365-370.
- White, F.H. and T. Wainwright, 1975.** Occurrence of Diketones and alfa - actohydroxyacids in Fermentations. J. Inst. Brew. 81, 46-52.

