

Birada Diasetil ve İlişkili Diğer Bileşiklerin Oluşumu ve Bu Oluşumu Etkileyen Etmenler

Dr. Efe HOŞRIK

Anadolu Endüstri Holding, Bira ve Malt Gurubu — İSTANBUL

Diasetil ve 2.3 - Pentanedion tüm biracılık fermentasyonlarında oluşur (32). Bu bileşiklerin biradaki miktarları direkt olarak kullanılan maya suşu ile ilgilidir (12).

Alt fermentasyon biralarında Visinal Dike-tonların (VDK) oluşmadığı durumlar da bulunmuştur (14).

1. Asetohidroksi Asitlerden Oluşum

Diasetil ve bununla ilişkili bileşiklerin fermentasyon sırasında oluşumlarına ilişkin birçok teoriler tartışılmıştır. Bugün için kabul edilen durum şudur; Maya, asetohidroksi asit oluşturur, diasetil 2 -asetolaktat'dan, 2-3 Pentanedion ise 2 -asetohidroksibütirat'dan oksidatif dekarboksilasyon yoluyla oluşurlar (15, 13, 28). Bu reaksiyonların ayrıntısı halen bilinmemektedir.

Diasetil ve 2.3 Pentanedion oluşumlarından moleküler oksijen gerekli değildir. Cu^{+2} , Al^{+3} veya Fe^{+3} gibi. Elektron vericileri diasetil oluşumunu artırırlar.

Maya hücresi asetohidroksi asitleri kullanmaz, fakat bunları diasetil ve 2.3 pentanedion'a redükler. Bu reaksiyonların hızı ve süresi maya suşuna, mayanın yaşına ve dinlendirme ko-

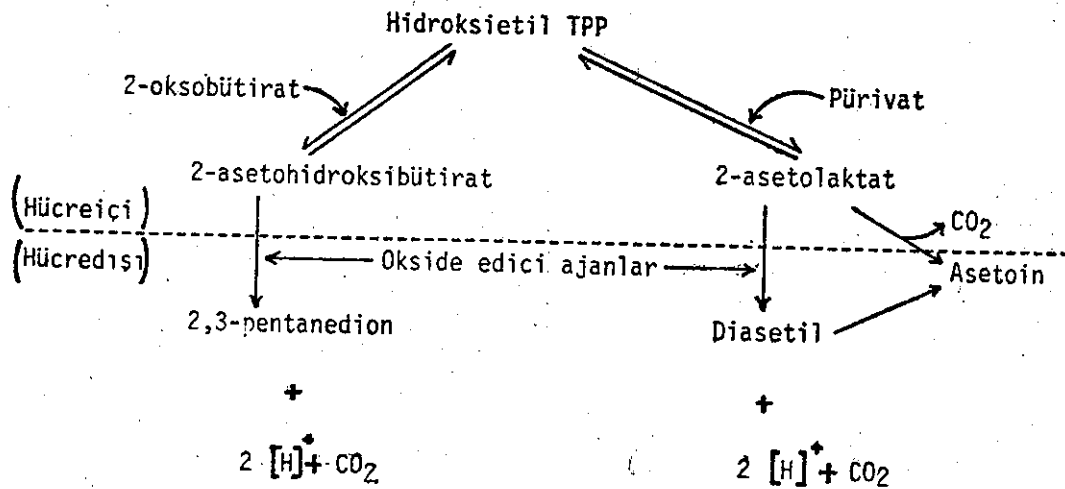
şullarına bağlıdır. 2 -asetolaktat'dan diasetil oluşumu, asetoin ve daha sonra oluşan 2.3 butanedion'un ortamda artmasıyla yavaşlar. Asetoin direkt olarak dekarboksilasyon ile 2 -asetolaktat'dan oluşabildiği gibi, diasetil'den de redüklenme ile oluşabilir. Diasetil problemi, asetolaktatın yıkımı sırasında oluşan diasetil'i redükleyecek yeterli maya olmazsa ortaya çıkar.

2. Fermentasyon ve Dinlendirme Koşullarının Etkisi :

Daha önce de bahsedildiği gibi diasetil oluşumu ve yıkımında maya suşunun etkisi çok fazladır. Değişik maya suşları birada farklı diasetil düzeylerine neden olur (8, 12, 31).

Değişik maya suşlarının diasetil oluşumuna ve yıkımına etkisi maya bankasından alınan M1, M2, M3 maya suşlarıyla aynı koşullarda silindrikonikal fermentasyon tankında 7 günlük fermentasyon ile denenmiştir. Sonuçlar tablo 1'deki gibidir (10).

Fermentasyon ısısının artırılmasıyla fazla miktarda asetohidroksiasitlerin oluştuğu bulunmuştur (16). Bu oluşumun bir nedeni, değişik fermentasyon ısılarında, değişik amino asitlerin ortamdaki yok olmaları olabilir.



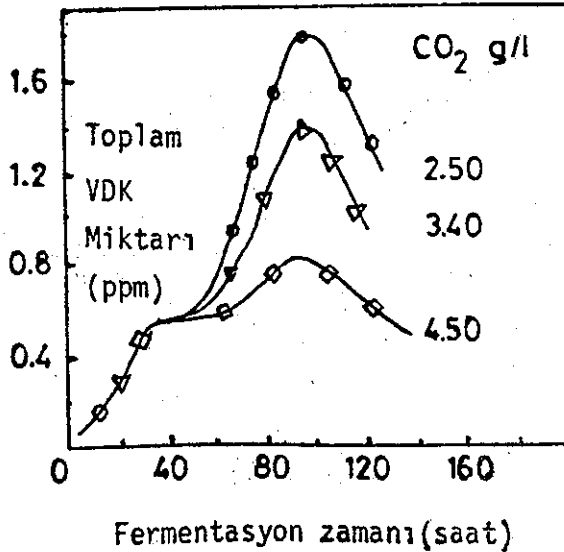
Şekil 1. 2 -asetohidroksiasitlerin ve bunlardan Pentanedion ile Diasetil'in oluşmaları, (Hücre içindeki reaksiyonlar enzimlerle, hücre dışındaki reaksiyonlar enzim-siz oluşmaktadır.)

Fermentasyon tankının doldurulduğu gün	mg/l Diasetil Miktarları		
	M1	M2	M3
Ferm.nun 1. günü	0.10	0.15	0.15
• • 2. •	0.36	0.27	0.25
• • 3. •	0.57	0.30	0.45
• • 4. •	0.65	0.28	0.83
• • 5. •	0.56	0.26	0.89
• • 6. •	0.45	0.23	0.81
• • 7. •	0.30	0.20	0.70

Tablo 1. Fermentasyonda değişik maya suşlarında Diasetil'in oluşumu ve yıkımı.

Yapılan bir araştırmalarda maya suşunun ve fermentasyon koşullarının VDK düzeyine bir etkisinin olmadığı görüşüne varılmıştır (21). Bununla birlikte diğer bazı araştırmacılar, fermentasyon ısısı ile değişik maya sularının, değişik derecelerde sonuçlara neden olduklarını ileri sürmüşlerdir (8).

Genel kural olarak, yüksek fermentasyon ısısı fazla miktarda VDK oluşturur. Fakat yüksek hızda da yıkılmalarını sağlar. Fermentasyon ısısının diasetil oluşumu ve yıkımına etkisi, fermentasyon ısısı hariç, tüm koşulların aynı olduğu kontrollü bir çalışmada denenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur (Tablo 2) (10).



Şekil 2. Fermentasyonda çözülmüş CO₂ miktarının toplam VDK miktarlarına etkisi

Tablo'da görüldüğü gibi yüksek ısıda (12°C) diasetilde hızlı bir yükselme ancak o oranda da hızlı bir redüklenme olmuştur.

Böylece yüksek fermentasyon ısısı fazla diasetil oluşturmadan Asetolaktat'ın ortamdaki uzaklaştırılmasını hızlandırmış olur (30).

Oluşan diasetil miktarları (mg/l)

Fermentasyon ısıları (°C)

Fermentasyon tankının dolduğu gün	9	10	12
	Ferm.'nun 1. günü	0.12	0.12
• • 2. •	0.16	0.19	0.37
• • 3. •	0.25	0.39	0.75
• • 4. •	0.31	0.55	0.55
• • 5. •	0.26	0.45	0.39
• • 6. •	0.22	0.34	0.30
• • 7. •	0.19	0.28	0.24
• • 7. •	0.16	0.23	0.18

Tablo 2. Silindrokonal fermentasyon tankında diasetil düzeyine fermentasyon ısılarının etkisi.

Maya ile uzun süreli temas diasetil düzeyinin düşmesini sağlar. Diasetil düşüşü için gerekli olan süre yüksek fermentasyon ısılarında, düşük fermentasyon ısılarına oranla daha az gözükmektedir. Düşük diasetil düzeyini elde etmek, hızlı bira üretim yöntemlerinde zor olabilmektedir. Burada, yeterli süre maya ile temas olmadığından, oluşan asetolaktat'dan diasetil'e dönüşüm olur.

Fermentasyon sırasındaki basınç, asetolaktat oluşumunu azaltır ve hızlı diasetil redüklenmesine neden olur (27). Basıncı fermentasyonda hızlı diasetil redüklenmesi Liebs ve arkadaşları tarafından gözlenmiştir (20).

Nakatani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda fermentasyon sırasında çözülmüş karbondioksit miktarı ile toplam VDK'ların ilişkisi incelenmiştir ve şu eğri elde edilmiştir (Şekil 2) (23).

Şekil 2'de de görüldüğü gibi yaklaşık toplam 140 saatlik fermentasyon süresinde 2.50 g/l, 3.40 g/l ve 4.50 g/l olmak üzere üç farklı çözülmüş CO₂ konsantrasyonlarında toplam VDK'ların ulaştıkları değerler elde edilmiştir. Yaklaşık fermentasyonun 100. saatinde her üç çözülmüş CO₂ konsantrasyonlarında toplam VDK'ların konsantrasyonları en yüksek düzeye ulaşmakta ve daha sonra düşmektedirler. Ancak 2.50 gr/l, 3.40 gr/l ve 4.50 gr/l çözülmüş CO₂ miktarlarına karşılık gelen toplam VDK'ların fermentasyon ortamındaki yoğunlukları fermentasyonun 40. saatinden sonra belirgin farklılıklar göstermektedir. Düşük çözülmüş CO₂ ortamında ise toplam VDK'lar düşük olmaktadır.

Ayrıca, maya dozlama hızı asetohidroksiasitlerin oluşumuna etkili olmaktadır, fakat bu etkili oluşu maya suşuna bağlıdır (8). Sommer'e göre yüksek oranda dozlanan maya, hızlı fermentasyon'a dolayısıyla yüksek asetolaktat konsantrasyonuna neden olur. Ancak bu oranda da hızlı diasetil redüklenmesi olur (27).

Diasetil'in maya tarafından indirgenmesi için özel «diasetil indirgenme fazı» bira yapım yöntemine ilave edilebilir (20). Meilgaard'a göre birçok Kuzey Amerika biracıları bugün 2. fermentasyon (dinlendirme) den başka bir de 24 - 72 saatlik diasetil indirgenme fazı olarak adlandırılan bir dönemi kullanmaktadırlar (22).

3. Şıra Kompozisyonunun ve Yapımının Etkisi :

Maya dozlanması sırasında kullanılan şıradaki, kaynatma kazanında kimyasal reaksiyon sonucu oluştuğu tahmin edilen eser miktarda diasetil bulunur. Bulunan bu diasetil'in miktarı, maya dozlanmasından sonraki ilk 12 - 24 saat arasında yaklaşık 0.01 ppm düzeyinde olmaktadır (11, 13, 15, 32).

Normalden fazla ve az havalandırılmış olan şıralardaki asetohidroksit asit düzeyleri, normal havalandırılmış şıralardakinden yüksek bulunmuştur (8, 21).

Yapılan çalışmalara göre şıranın oksijen miktarının yaklaşık 8 mg/l düzeyinde olması en olumlu sonucu vermektedir (10). Şıra Oksijen miktarının fermentasyonda oluşan diasetil miktarına etkisi Silindirik konikal fermentasyon tanklarında 0.8 mg/l ve 8.0 mg/l oksijen kon-

santrasyonlarında incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3'de gösterilmiştir.

	Oluşan Diasetil Miktarları (mg/l)	
	0.8 mg/l O ₂	0.8 mg/l O ₂
Fermentasyon tankının dolduğu gün	0.03	0.15
Ferm.'nun 1. günü	0.25	0.22
» » 2. »	0.44	0.36
» » 3. »	0.60	0.45
» » 4. »	0.74	0.43
» » 5. »	0.85	0.40
» » 6. »	0.90	0.32
» » 7. »	0.80	0.20

Tablo 3. Fermentasyonda oluşan Diasetil miktarına Şıra oksijeninin etkisi.

Fermentasyon şırasının redoks potansiyeli, 2 - asetohidroksiasitlerin yıkımının kontrolünde önemli bir faktördürler (13, 32). Sodyum metabisülfid gibi redükleyici ajanların maya dozlaması sırasında ortalama ilavesi asetohidroksiasitlerin yıkım hızını yavaşlatabilir. Bu nedenle fermentasyon sonunda ortamdaki asetohidroksiasitlerin konsantrasyonu artar (32).

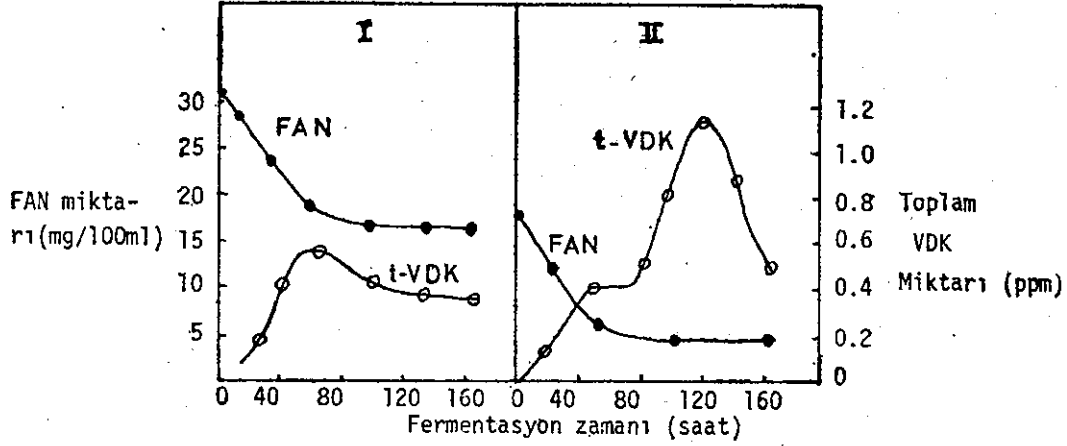
2 - asetohidroksi asitlerin diasetil ve pentanedion'un oluşumu valin ve lösin aminoasitleriyle ilgilidir. Aminoasitlerin eksikliği hidroksiasitlerin miktarının artmasına neden olabilmektedir. Şıranın aminoasit kompozisyonu fermentasyon hızını ve biranın tat karakteristiğini etkiler. Örneğin şıradaki amino asitlerin düzeyi arttırılırsa fermentasyon hızlanır ve pürivat oluşumu uyarılmış olur (25). Dolayısıyla asetolaktat ve diasetil oluşumu da artar. Enari'nin sonuçlarına göre ise şıradaki yüksek alfa - amino azot düzeyi çeşitli maya suşları ile fazla miktarda diasetil öncüllerinin - 2 - asetolaktat gibi - oluşmasına neden olur (17).

Latimer ve arkadaşlarının araştırmalarına göre biracılıkta kullanılan ekstrakt verici katkı maddelerinin oranı % 50 ve daha fazla olursa ve bunların özellikle azot düzeyleri düşükse diasetil problemi ortaya çıkacak demektir. Şıradaki valin konsantrasyonu normal olarak 200 mg/l düzeyinde olmalıdır. Yüksek oranda katkı kullanılırsa bu düzey düşer ve diasetil oluşumu

artar. Belirtilen bu valin düzeyi % 100 malt kullanımı ile rahatlıkla elde edilebilir (18, 19).

Nakatani ve arkadaşlarının araştırmalarında şıradaki FAN düzeyinin fermentasyonda olu-

şan VDK'larla ilişkisi araştırılmış, şıradaki FAN konsantrasyonunun fermentasyon süresince oluşan toplam VDK'lar üzerine etkileri iki değişik durumda incelenmiştir (Şekil 3) (23).



Şekil 3. Fermentasyon'da toplam VDK'ların FAN miktarına göre değişimleri.

Toplam VDK'ların fermentasyon sırasındaki oluşumları iki tipik durumda incelenmiştir. Birinci durumda, fermentasyon yüksek FAN'lı (30 mg/100 ml) ortamda başlatılmış. İkinci durumda ise fermentasyon birinciye oranla daha düşük FAN'lı (~ 18 mg/100 ml) ortamda başlatılmıştır. Birinci durumda yüksek FAN düzeyi fermentasyonun başlamasıyla hızlı bir düşüş göstermekte ve fermentasyonun ~ 80. saatine kadar bu durum sürmektedir. Bundan sonra fermentasyonun sonuna kadar (160 saat) sabit kalmaktadır. Buna karşın toplam VDK'lar fermentasyonun başlamasıyla artmaya başlamakta, 50. saat civarında en üst düzeye ulaşmakta, daha sonra yavaş bir hızla azalmaktadırlar.

İkinci durumda da düşük FAN düzeyi ile başlayan fermentasyonda, FAN konsantrasyonu birincide olduğu gibi fermentasyonun 80. saatine kadar hızlı bir düşüş gösterip ondan sonra sabit kalmaktadır. Toplam VDK'lar ise fermentasyonun başlamasıyla birlikte birincide olduğu gibi artmakta, yine 50. saat civarında üst bir düzeye ulaşmakta bir süre bu düzeyde gittikten sonra çok hızlı bir artış göstererek 120. saat civarında 1.1 ppm'den farklı bir değere ulaşmaktadırlar. Daha sonra da aynı hızla düşmektedirler. Ancak ulaştıkları son değer birinci durumdakinden yüksek olmaktadır. Total

VDK miktarının kontrol edilebilmesi için ikinci durumda fermentasyonun sonuna doğru ortaya çıkan yüksek toplam VDK'ın düşürülmesi gereklidir.

Asetohidroksiasitlerin VDK'lara dönüşümü pH derecesine de bağlıdır. Reaksiyon, bira pH'sında optimum işler (11). White ve Wainwright düşük şıra pH'larında 2-asetohidroksi asitlerin konsantrasyonunun diketon konsantrasyonunun artışına uygun olmaksızın azaldığını bulmuşlardır (32). Düşük pH dereceleri maya tarafından hem asetolaktatların hızlı yıkımına, hem de diasetil'in hızlı indirgenmesine neden olmaktadır (4).

Bu sonuçlar diğer bazı araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır. Onlara göre biranın dinlendirme ve olgunlaştırma zamanının kısaltılması şıra pH'sının düşürülmesi ile gerçekleşmektedir (24). Ancak, biradaki düşük pH dereceleri, tat stabilitesi açısından olumsuz etki yapabilmektedir (9).

4. Enfeksiyonun Etkisi :

Pediococcus veya *Lactobacillus*'lar ile oluşan enfeksiyon sonucu bira'da arzu edilmeyen düzeyde yüksek diasetil oluşabilir. *Pediococ-*

cus cerevisiae bira mayasının yaptığı gibi diasetil ve pentanedion'u indirgemez, böylece bunların konsantrasyonu en üst düzeyde kalır (2). Bazı *Lactobacillus* suşları *P. cerevisiae*'dan çok daha fazla diasetil oluştururlar. *Lactobacilli* 2.3 pentanedion oluşturmaz. *P. cerevisiae* ise eser miktarda oluşturur.

Ayrıca şişelenmiş biranın uzun süre beklemesi ve tünel pastörizasyon işlemi sonucu diasetil düzeylerinde değişimler gözlenmiştir. Şişelenmiş biranın, beklemesi esnasında bazı tat verici maddelerin miktarı artar ve bazı yeni

bileşikler oluşabilirler. Örneğin, 2 - aseto laktat'ın dekarboksilasyonu sonucu diasetil miktarı artar (1, 5, 6, 7).

Tünel pastörizasyon sırasında tatda bazı kayıplar olabilmektedir. Bu olay «pastörizasyon tadı» olarak tanımlanır. Bu bozulmada şişedeki hava miktarı önemlidir. Hava arttıkça tatdaki olumsuz değişim de artmaktadır (29). Pastörizasyon sırasında bazı tat maddelerinde bazı değişiklikler olduğu gibi diasetil miktarında da artış gözlenmiştir (3, 26).

KAYNAKLAR

1. Arbogast, M., Maillard, A.Ch. and Urien, E. (1966) *Brass, Malt, Belg.* 16, 48.
2. Barwald, G., Kesselschlaeger, J. and Dellweg, H. (1960) *Naturwiss.* 56, 285.
3. Blockmans, C. (1971) *Petit. J. Brass.* 79, 107.
4. Cabane, B., Jeunehamme, C., Lapage, N. and Masschelein, C.A. (1973) *Proc. Ann. Meet. A.S.B.C.* p. 94
5. De Clerck, E. and Delaunoy, A. (1966) *Bull. Ass. Anciens. Etud. Brass. Louvain* 62, 1.
6. Engan, S. (1970) *Brygmesteren* 27, 123.
7. Engan S. (1971) *Proc. E.B.C. Congr., Estoril*, p. 407.
8. Geiger, E. and Pendl, A. (1975) *Brewer's Digest* 50 (8), 50.
9. Grigsby, J.H. Palamand, S.R., Davis, D.P. and Hardwick, W.A. (1972) *Proc. Ann. Meet. A.S.B.C.* p. 87.
10. Hoffmann, S. (1985) *Brauwelt. Int.* 1985/1 p. 59.
11. Haukeli, A.D. and Lie, S. (1971) *J. Inst. Brew.* 77, 538.
12. Haukeli, A.D. and Lie, S. (1972) *J. Inst. Brew.* 78, 229.
13. Inoue, T., Masugama, K., Yamamoto, Y., Okada, K. and Kusoiwo, Y. (1968) *Proc. Ann. Meet. A.S.B.C.* p. 158.
14. Inoue, T. and Yamamoto, Y. (1969) *Arch. Biochem Biophys.* 135, 454.
15. Inoue, T. and Yamamoto Y. (1970) *Proc. Ann. Meet. A.S.B.C.* p. 198.
16. Inoue, T. (1974) *Rep. Res. Lab. Kirin Brewing Co., Yokohama* 17, 25.
17. Jones, M. (1974) *E.B.C. Monograph. Zeist* p. 90.
18. Kneen, E. (1964) *Am. Brewer.* (1), 25.
19. Latimer, R.A., Glenister, P.R., Koeppele, K.G. and Dollos, F.C. (1969) *Tech. Quart., M.B. A.A.* 6, 24.
20. Liebs, P., Krüger, M. and Wolter, H.C. (1970) *Nahrung* 14, 33.
21. Maendl, B., Geiger, E. and Pendl, A. (1974) *Brauwissenschaft* 27, 57.
22. Meilgaard, M.C. (1976) *Tech. Quart. M.B. A.A.* 13, 78.
23. Nakatani, K., Takahashi, T., Nagami, K. and Kumada, J. (1984) *Tech. Quart. M.B. A.A.* 21, 73.
24. Pajunven, E. and Maekinen, V. (1975) *Proc. E.B.C. Congr. Nice*, p. 525.
25. Portno, A.D. (1966) *J. Inst. Brew* 72, 193.
26. Shigematsu, N., Kitazawa, Y. and Yabuchi, Y. (1964) *Bull. Brewing Sci., Tokyo.* 10, 45.
27. Sommer, G. (1975) *Tagersz. Brau.* 72, 468.
28. Suomalainen, H. and Ronkainen, P. (1968) *Nature, London*, 220, 792.
29. Van Gheluwe, J.E.A., Valyl, Z. and Ondir, M. (1970) *Brewers' Digest* 45 (11), 70.
30. Wainwright, T. (1974) *The Brewer* 60, 638.
31. Wellhoener, H.J. (1966) *Brauwelt* 106, 813.
32. White, F.H. and Winwright., I. (1975) *J. Ints. Brew.* 81, 46.