Effect Of Manufacturing Processes On The Methanol Content For Some Industrial Fermentations

Dr.Ramez Mohammad*
Dr.Sheiam Sulaeman**
Yahia Esmail***

(Received 26 / 11 / 2021. Accepted 14 / 3 /2022)

□ ABSTRACT □

Methanol is one of the most important dangerous toxins its formed in the fermentation medium, as a result of the enzymatic hydrolysis of pectin by the enzyme pectin methylesterase (PME), especially in uncontrolled fermentation industries. This research aims to determine the effect of storage cooled time for grapes on (0±1) ℃ and the nature of the mash as well as the initial microbial load on the methanol concentration in the fermented mash. Where 33 samples were analyzed using the chromaticity method (as a reference method), which is based on measurement in the visible ray field with a wavelength (575 nm) using a spectrophotometer. Where coold storage of the fruits led to the formation of methanol at a rate of 75.95 mg/100 ml after 90 days of storage, and severe mashing of the fruits led to an increase in the methanol concentration of 25.6% compared to traditional mashing, this is in the fermentation products, and the methanol concentration was also affected by the initial load of yeasts and fungi. The concentration increased with the increase in the general census.

Keywords: pectin methyl esterase PME, spectrophotometer, methanol.

* **Professor,Department of food Science,faculty of Arriculture, TishreenUniversity,Lattakia,Syria.dr.gobranramz@gmail.com**
** **Assistant Professor, Department of food Science,faculty of Arriculture, Tishreen University,Lattakia,Syria.**
*** **Postgraduate Student, Department of food Science,faculty of Arriculture, Tishreen University,Lattakia,Syria**

تأثير خطوات التصنيع على محتوى الميثانول لبعض الصّناعات التّخميريّة

د.رامز محمد*

د. شيم سليمان**

يحيى اسماعيل***

(تاريخ الإيداع 26 / 11 / 2021. قبل للنشر في 14 / 3 / 2022)

□ ملخّص □

يُعتبر الميثانول من أهم السّموم الخطرة التي تتشكل في وسط التّخمير، نتيجة للّتحلل الأنزيمي للبكتين بواسطة أنزيم بكتين ميثيل استراز PME، وخصوصاً في الصّناعات التّخميريّة غير مضبوطة الظّروف. حيثُ يهدف هذا البحث إلى تحديد مدى تأثير مدة التخزين للعنب المبرد (1±0) °C وطبيعة الهرس وكذلك الحمولة الميكروبية الأولية على تركيز الميثانول في المهروس المخمر، حيث تمَّ تحليل 33 عينة باستخدام الطريقة اللونية (كطريقة مرجعية) التي تعتمد على القياس بمجال الأشعة المرئية عند طول موجة (575 nm) باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer)، حيث أدى التخزين المبرد للثمار إلى تشكل الميثانول وبنسبة وصلت إلى 75.95مغ/100مل بعد 90 يوم من التخزين، وأدى الهرس الشديد للثمار إلى زيادة في تركيز الميثانول مقدارها 25.6% بالمقارنة بالهرس التقليدي وذلك في ناتج التخمير، وتأثر تركيز الميثانول أيضاً بالحمولة الأولية من الخمائر والفطريات، حيثُ زاد التركيز بزيادة التعداد العام لها.

الكلمات المفتاحية: أنزيم بكتين ميثيل استراز PME، الطيف الضوئي، الميثانول.

*أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزارعة، جامعة تشرين، اللاذقية ،سورية.dr.gobranramz@gmail.com

**مدرسة، قسم علوم الأغذية، كلية الزارعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

***طالب ماجستير في قسم علوم الأغذية، كلية الزارعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مقدمة:

يعتبر كحول الميثانول من السموم الخطرة جداّ، وذلك لتعدد طرق التسمم الناتجة من التعرض له حيث يمكن أنّ يحدث التسمم عن طريق الاستنشاق وعن طريق التلامس مع مادة حاوية على الميثانول (دهانات ورنيش) ويبلغ معدّل امتصاص الميثانول من خلال الجلد 0.192 مغ/سم^2/دقيقة (Dutkiewicz, *et al,.* 1980)، كذلك يحدث التسمم عن طريق تناول مادة تحتوي تركيز مرتفعة منه، حيثُ يُعدّ تناول كميّة قليلة من الميثانول حوالي 8 غ بغياب المعالجة كافياً لإحداث العمى، وتناول1غاكغ من الميثانول قد تسبّب الموت.(Scrimgeour *et al.*, 1980) ، ويزداد الأمر خطورة في المشروبات الكحولية بشكل خاص لصعوبة كشفهِ فيها وكونها تخضع لعملية تخمير عادةً تكون غير مضبوطة الظروف، يعد مستوى الميثانول في المشروبات الكحولية أحد أهم عوامل الجودة والسلامة، حيث حددت جميع الدول المنتجة للمشروبات الكحولية الحدود المسموح بها من الميثانول، وهيئة المواصفات في سورية حددت وفق المواصفة القياسية السورية للعرق رقم2478 لعام 2003م الحد الأقصى المسموح به من الميثانول وهو 200مغ/100مل كحول مطلق.

كذلك نظم الاتحاد الأوروبي (EU) الحد الأقصى لمحتويات الميثانول في المشروبات الروحية اعتمادًا على المواد الخام المستخدمة، بالنسبة للكحول الإيثيلي ذي الأصل الزراعي (من دبس السكر والحبوب)، يكون الحد الأقصى لمستوى الميثانول هو 30 مغ/لتر، بينما بالنسبة للفودكا هو 10مغ/لتر، وأقل مستوى محدد لمشروب الجن في لندن بـ 5 مغ/لتر، تكون الحدود أعلى بالنسبة للمواد التي أساسها الفاكهة، بالنسبة لروح النبيذ 200 مغ/لتر، ولتفل العنب وعصير التفاح 1000 مغ/لتر، ولتفل الفاكهة 1500 مغ/لتر، لأرواح الفاكهة بشكل عام 1000 مغ/ لتر، باستثناء 1200 مغ/لتر للتفاح، والمشمش، والخوخ، والدراق، والكمثرى، والتوت الأسود، و1350 مغ/ لتر للسفرجل . (Blumenthal et al., 2021)

أما بالنسبة للمشروبات الكحولية التركية وفقًا للائحة (2005/11)، يجب أن يحتوي الراكي التركي على مستوى ميثانول أقل من 150 مغ/لتر. (Cabaroglu, Yilmaztekin, 2011)

وفقًا لنظام تحليل المخاطر ونقاط التحكم الحرجة (HACCP) في صناعة النبيذ، يعد محتوى الميثانول أحد معايير نقاط التحكم الحرجة التي يجب التحكم فيها أثناء مرحلة التخمير الكحولي لإنتاج نبيذ آمن للاستهلاك البشري (Cabaroglu، 2005).

يرتبط تركيزات الميثانول في المشروبات الروحية ارتباطًا وثيقًا بالأنشطة الأنزيمية في الفاكهة وأثناء عملية التخمير الكحولي. حيث إنَ نشاط البكتين ميثيل استيراز قد يُشتق داخليًا من الثمار نفسها أو أثناء التخمير الكحولي أيضًا بواسطة بكتين ميثيل استيراز المتكون من الخميرة أو من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى. قد يتم أيضًا إدخال البكتين ميثيل استيراز خارجيًا عن طريق إضافة بعض المستحضرات الإنزيمية البكتينية. (Blumenthal *et al.,* 2021)

هناك العديد من الأحياء الدقيقة المستخدمة في عمليات التخمر الكحولي التي تتميز بأهميتها الصّناعية في صناعة الكحول ومنها: خميرة *S. cerevisiae* وهو عبارة عن كائنات حية دقيقة وحيدة الخلية وتتبع في تصنيفها رتبة الفطريات التي تعتبر غيرية التغذية ولا تحتوي على الكلوروفيل (كائنات رمية تحيا وتتكاثر على البقايا العضوية حيث تقوم بتحليلها وتحرير الطاقة باستخدامها في النمو والتكاثر)، وخلايا *S.cerevisiae* مستديرة إلى بيضوية يحيط بها غشاء رقيق يغلفه جدار سميك، وتحتوي على نواة حقيقية وميتوكوندريا تسبح في وسط سايتوبلازمي، وتقضي معظم حياتها بشكل خلية واحدة، وتتكاثر بالّتبرع أو بالانشطار قطرها 5–10 ميكرون. فيما يتعلق بمتطلبات درجة الحرارة

ودرجة الحموضة للتخمير الكحولي، تنمو الخمائر في البيئات الدافئة والحمضية مع نمو معظم سلالات *S. cerevisiae* بين (20ـ30)℃ وَ (4.5 ـ 6.5)PH . الحد الأدنى للنشاط المائي0.65 ,.Walker and Stewart (2016: Sicard *et al.*, 2011: Pretorios, 2000).

وتنتج *S. cerevisiae* الإيثانول مع كميات متفاوتة من المواد الأخرى، مثل الميثانول والألدهيدات والكحوليات الأعلى (كحول Fusel) والأحماض العضوية (حمض الأسيتيك وحمض اللاكتيك)، تقلل هذه المنتجات المشتركة من جودة الإيثانول وتعزز تكلفة تقطير الإيثانول (Arshad *et al.,* 2008).

يتواجد الميثانول في الغذاء والفواكه والخضار الطازجة إمّا بشكل ميثانول حر، أو بشكل ميثيل استر للأحماض الدسمة، أو على شكل مجموعة ميتوكسي للبولي سكاريدات كالبكتين، (Lindinger *et al.*, 1997) ويختلف محتوى العصائر والفواكه الطازجة من الميثانول، كما يتشكل الميثانول عند طهي الأطعمة عالية المحتوى من البكتين، حيث تم تحديد محتوى عصائر الفواكه من الميثانول وتراوح تركيزه بين 12 –640 مغ/اللتر وبمتوسط قدره 140 مغ/اللتر، ;1981 (Stegink *et al* Kave *et al.*, 1990) .

تم الكشف عن الميثانول في الفاصولياء والبازلاء والعدس بمستويات تتراوح بين 1.5–7.9 مغ/كغ(WHO,1997) ، وتم العثور على الميثانول في البندق المحمص والملفوف والجزر والبصل والبازلاء والبطاطا، (WHO, 1997) بالإضافة لوجود الميثانول الحر في الخضار والفواكه فإنّ المزيد من الميثانول يمكن أن ينطلق نتيجة لتفكك البكتين في الجهاز الهضمي.(WHO, 1997)

تتفاوت مستويات الميثانول في المشروبات الكحولية المختلفة حيث تتراوح من 6–27 مغ/لتر في البيرة وفي النبيذ من 96–321مغ /لتر في حين أن المشروبات الكحولية المقطرة احتوت على10–220مغ/ لتر ,Greizerstein) 1981; WHO, 1997) حيث يصل محتوى المشروبات الروحية من الميثانول إلى 1500مغ/لتر ,.Taucher *et al* (1995)، والكونياك الفرنسي يحتوي على ميثانول من 410–700 مغ/لتر، نواتج التقطير الإسبانية بشكل عام 180–500 مغ/لتر، ونواتج التقطير الألمانية (Weinbrands)، 390–920 مغ/لتر. أبلغ Reinhard أنَّ متوسط محتوى الميثانول لشركة Weinbrands مع نسبة كحول 38–41% v/v هي 298–520 مغ/لتر وذلك لعدة دول. (Kana *et al.*, 1991)

إنَّ تخفيض محتوى الميثانول في مشروبات الفاكهة المخمرة والمشروبات الكحولية القوية الأخرى هي المشكلة التي تمت دراستها في أجزاء مختلفة من العالم، حيثُ هناك العديد من الدراسات التي اهتمت بالميثانول ولقد بينت الدراسات والأبحاث أنَّ تركيز الميثانول خلال التخمير يتباين بدرجة كبيرة، ولأسباب عديدة ونذكر من هذه الأبحاث ما يلي:

بيَّن (2005) ,.Nikićevićl *et al* أنَّ اختلاف تركيز الميثانول في المنتج النهائي يكون سببه اختلاف أنواع الخمائر المسببة للتخمر، كذلك أشار إلى أنَّ تركيز الميثانول يزداد عند زيادة الفترة الزمنية بين التخمير والتقطير. وأشارَ Satora & Tuszynski, (2010) إلى أنَّ البكتين ميثيل استراز المنتج من الخميرة يمتلك قيم PH مثالية تتراوح من 3.75 إلى 6.

بيّنَ Do.Amaral *et al.,* (2005) إنَّ الرقم الهيدروجيني يعتبر من أهمِّ العوامل الّتي تؤثّر بشكل كبير على نشاط الإنزيمات، حيثُ أظهر البكتين ميثيل استيراز حدًا مثاليًا عند pH 8 و50 ℃.

يتم تحميض وسط التخمير لتقليل تحرر الميثانول أثناء التخمير، ولا يوجد تفضيل حول نوع الحمض الذي سيتم استخدامه، يقترح (2006) ,.Gössinger et al. حمض الفوسفوريك (85%)، بينما يقترح ,.Pieper et al

(1980) حمض الكبريتيك، غالبًا ما تحتوي المنتجات المتاحة تجاريًا للتحمض على مخاليط من عدة أحماض مثل حمض الماليك/حمض الهيدروكسي بروبيونيك أو حمض الفوسفوريك/حمض اللاكتيك.

استخدمGerogiannaki-Christopoulou, (2004) حامض الستريك مما أدى إلى انخفاض حوالي 15% من الميثانول في نواتج تقطير تفل العنب.

وبينَّ Gössinger et al., (2006). أنَّ زيادة درجة حرارة الهريس تؤدي إلى زيادة سرعة التفاعل حيث يبدأ الإنزيم في تغيير طبيعة الهريس (إسالة)، وإنَّ خفض درجة حرارة التخمير من 20 درجة مئوية إلى 12 درجة مئوية واستخدام خميرة التخمير الباردة قد يؤدي إلى انخفاض بنسبة 10-24% في إطلاق الميثانول في الهريس.

وفي دراسة أجراها H. Zhou *et al.* (2000) بينَّ أنَّ نشاط أنزيم بكتين استراز PE يستمر أثناء التخزين البارد، بينما ينخفض نشاط أنزيم بكتين كالاكتيورونيز PG، وأظهرت هذه الدراسة أن نشاط PE يبقى مستقر جدًا وبنفس المستوى من النشاط في درجات حرارة منخفضة، أثناء تخزين الفاكهة.

أهمية البحث وأهدافه:

يصعب على المستهلكين تحديد جودة المنتجات التي يتناولونها فيما يتعلق بالقيمة الغذائية والتغيرات التي تؤدي لإنخفاضها وأحياناً أخرى لتلاشيها بحيث تصبح هذه المنتجات سامة، ويعتبر كحول الميثانول من السموم الخطرة جداً وخصوصاً في المشروبات الكحولية لصعوبة كشفهِ فيها، وهذا ما يؤكد ضرورة إخضاع إنتاجها للمراقبة الشديد وإجراء التحاليل الكيميائية على المنتج النهائي لضمان جودة المنتج.

أهمية البحث:

على اعتبار أنّ الميثانول من أخطر السموم التي تتشكل نتيجة التحلل الأنزيمي للبكتين، حيث إنَّ لمستويات الميثانول المرتفعة في المشروبات الكحولية تأثيراً مباشراً على صحة المستهلك، ونظراً لزيادة استهلاك الأغذية المتخمرة وبخاصة المشروبات منها، ولتكرار حالات التسمم بمادة الميثانول حيث كان لحادثة طرطوس عام 2003 التي تعرض فيها 43 فرداً من مختلف الأعمار للتسمم الكحولي الحاد، أهيمه بالغة لإدراك حجم المشكلة ومنع تكرار هكذا حوادث.

أهداف البحث:

-دراسة تأثير التخزين المبرد لثمار العنب على تركيز الميثانول المتشكل في الثمار.

-دراسة تأثير طريقة الهرس على تركيز الميثانول المتشكل في المهروس المتخمر.

-تحديد الحمولة الأولية لكل من الخمائر والفطريات والبكتيريا، ودراسة تأثير التعداد العام لها على تركيز الميثانول المتشكل في المهروس المتخمر

-دراسة تأثير التخزين في شرطين (داخل البراد وخارجهِ) على الناتج النهائي من مرحلة التقطير، واختيار الشرط الأكثر ملائمة لحفظ المنتج النهائي

طرائق البحث ومواده:

3-1- مواد البحث:

تم استعمال صنف واحد خلال العملية التصنيعية *(vitis vinifera)* صنف أجنبي تصنيعي، العنقود أسطواني الشكل، كثيف جداً، الحبات كروية الشكل، لونها أصفر، اللب عصيري، غير ملون.

تم في هذه الدراسة استخدام الأجهزة المتوفرة في مخابر كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية وتضم هذه التجهيزات ميزان حساس ذو حساسية 0.0001 غ، مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer (Jasco v-530) ، حمام مائي، براد، ميزان حرارة، المبخر الدوار Rotavapor، مقياس الPH، مجهر ضوئي Microscope، اوتوغلاف Autoclave

واستخدمت المواد الكيميائية التالية: الملح الصودي لحمض الكروموتروبي، برمنغنات البوتاسيوم، ميتا بيسلفيت الصوديوم، ميثانول عياري، حمض الكبريت، حمض الفوسفور، إيثانول، ديكرومات البوتاسيوم، كبريتات الحديد النشادرية، سيانيد الحديد، كاشف أورثو فينانثرولين، ماء مقطر، آغار مغذي، آغار دكستروز البطاطا.

لدراسة تأثير عمليّة التّبريد للثّمار على تشكّل الميثانول، أخذت عيّنات من الثّمار خلال فترة التّبريد بمعدّل عيّنة كل عشرة أيام لمدة ثلاثة أشهر.

ولدراسة تأثير طريقة الهرس على محتوى الميثانول المتشكّل خلال مرحلة التّخمير تمّ المقارنة بين طريقتين للهرس إحداها باستخدام خلاط كهربائيّ والثّانية باستخدام الهرس بالأرجل (تقليديّة).

ولدراسة تأثير الحمولة الميكروبية الأولية من خمائر وفطريات وبكتيريا، تم المقارنة بين ثلاث عينات تختلف في حمولتها الأولية من الميكروبات.

3-2- طرائق البحث:

-تحديد نسبة الإيثانول في العينات باستخدام طريقة الأكسدة الكيميائية:

المواد الكيميائية المطلوبة:

1. حمض كبريت H_2SO_4 (5N)
2. ديكرومات ثنائية البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$
3. كبريتات الحديد النشادرية الثنائية $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$
4. كاشف أورثو فينانثرولين $C_{36}H_{24}FeN_6^{+2}$

تمَّ استخدام طريقة الأكسدة الكيميائية لحساب نسبة الإيثانول في العينات حيث تعتمد هذه الطريقة على تقطير الإيثانول في العينات واستقبال الناتج المقطر في وسط محمض (بواسطة حمض الكبريت) وحجم معلوم من ديكرومات ثنائية البوتاسيوم حيث يتأكسد الايثانول الى حمض استيك

$$EtOH \rightarrow HOAc$$

ثم يتم تقدير الحجم غير المتفاعل من الديكرومات بالمعايرة بواسطة كبريتات الحديد النشادرية الثنائية (محلول مور) بوجود كاشف أورثو فينانثرولين. يمكن حساب تركيز الإيثانول% بتطبيق المعادلة التالية: (Caputi, *et al.,* 1968).

$$\%EtOH\ by\ vol. = 25.00 - (25 \times sample\ titer/blank\ titer).$$

-تحديد نسبة الميثانول في العينات باستخدام الطريقة اللونية:

المواد الكيميائية المطلوبة:

1. الملح الصودي لحمض الكروموتروبي $C_{10}H_6Na_2O_8S_2.2H_2O$
2. برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$
3. ميتا بيسلفيت الصوديوم$NaHSO_4$
4. حمض الكبريت H_2SO_4
5. ميثانول عياري CH_3OH
6. ماء مقطرH_2O.
7. حمض الفوسفور H_3PO_4

تُستخدَم الطّريقة اللّونيّة لتحديد الميثانول والّتي تعتمد على استخدام جهاز Spectrophotometer وقياس الامتصاصيّة عند طول موجة 575 نانومتر، ثمّ يتمُّ حساب تراكيز الميثانول مقدَّرة بالغرام/100ليتر كحول مطلق بطريقتين إحداها باستخدام سلسة عياريّة من الميثانول في حالات عدم معرفة تركيز الإيثانول% في العيّنة بشكل دقيق والطّريقة الأخرى بتطبيق المعادلة التّالية . (Dhar et al., 2013)

(Indian standard alcoholic drinks methods of test, 2005)

$$\textbf{Methanol}_{\text{(gr/100L of absolute ethanol))}} = \frac{A2 \times C \times D \times 1000 \times 100}{A1 \times S} \times 100$$

حيث:

A_2 :امتصاصية محلول العينة القياسية .

C : تركيز محلول الميثانول القياسي مقدراً بالغرام / مل .

D : معامل التمديد للعينة .

A_1 :امتصاصية محلول الميثانول القياسي.

S: النسبة المئوية للإيثانول في العينة (v/v)

-تعداد عام للخمائر والفطريات:

لإجراء هذا الاختبار تمَّ استخدام بيئة آغار الدكستروز والبطاطا (PDA)، حيث تمَّ تحضير البيئة وفق الخطوات والشروط الموضوعة من قبل الشّركة الصّانعة، وعُقِّمَت في الأوتوكلاف عند حرارة 121C° لمدّة عشرين دقيقة، وتمَّ تحضير تخفيفات (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}) من عصير التّمار في ظروف معقمة وبالقرب من اللهب باستخدام ماصات 1 مل وأنابيب اختبار تحتوي 9 مل من الماء المقطر المعقم سابقاً باستخدام الأوتوغلاف، بعد تحضير البيئة وتبريدها حتى حرارة 45C° باستخدام حمام مائي، تمَّ صب حوالي 15-20 مل من البيئة بأطباق البتري المضاف لها 1 مل من التّخفيفات المحضّرة سابقاً وحُرِّكت الأطباق حركة رحوية لضمان التوزع المتجانس للقاح بالبيئة، وتُركت أطباق الآغار حتى تتصلّب ثمَّ وضعت الأطباق بشكل مقلوب في الحاضنة عند حرارة 27C°، وبعد 48 ساعة تمَّ عدّ المستعمرات النّامية في الأطباق.

-التعداد العام للبكتريا:

لإجراء هذا الاختبار تمَّ استخدام بيئة آغار مغذّي Agar ، حيث تمَّ تحضير البيئة وفق الخطوات والشّروط الموضوعة من قبل الشّركة المُصنِّعة، بعد ذلك تمَّ نقل البيئة إلى الأوتوكلاف للتّعقيم عند حرارة 121C° لمدّة عشرين دقيقة، وتمَّ

تحضير تخفيفات (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}،) من عصير الفاكهة في ظروف معقمة وبالقرب من اللهب باستخدام ماصات 1 مل وأنابيب اختبار تحتوي 9 مل من الماء المقطر المعقم سابقاً باستخدام الأوتوغلاف، بعد تحضير البيئة وتبريدها حتى حرارة 45°C باستخدام حمّام مائي، تمَّ صب حوالي 15–20 مل من كل بيئة بأطباق البتري المُضاف لها 1 مل من التّخفيفات المحضَّرة سابقاً وحركت الأطباق حركة رحوية لضمان التّوزع المتجانس للقاح بالبيئة، وتركت أطباق الآغار حتى تتصلّب ثمَّ وضعت الأطباق بشكل مقلوب بالحاضنة عند حرارة 37°C، وبعد 48 ساعة تمَّ عد المستعمرات النّامية في الأطباق.

-التحليل الإحصائي للتجربة:

حُلِّلَت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج Excel وبرنامج SPSS النّسخة 20، واستخدم في البحث الاختبارات الآتية:

-اختبار Kolmogorov – Smirnov للتّحقق من مطابقة البيانات للتّوزيع الطّبيعيّ.

-اختبار Levene's Test للتّحقق من تجانس البيانات.

-اختبار تحليل التّباين Anova: Two-Factor With Replication وذلك عند مستوى المعنوية $\alpha = 0.05$.

- One Way Anova وذلك عند مستوى المعنويّة $\alpha = 0.05$.

حيث تمَّ حساب متوسّطات المكرّرات الثّلاثة لكل عيّنة، وحساب جدول تحليل التّباين، للوقوف على معنويّة الفروق بين المعاملات عن طريق حساب أقل فرق معنوي LSD.

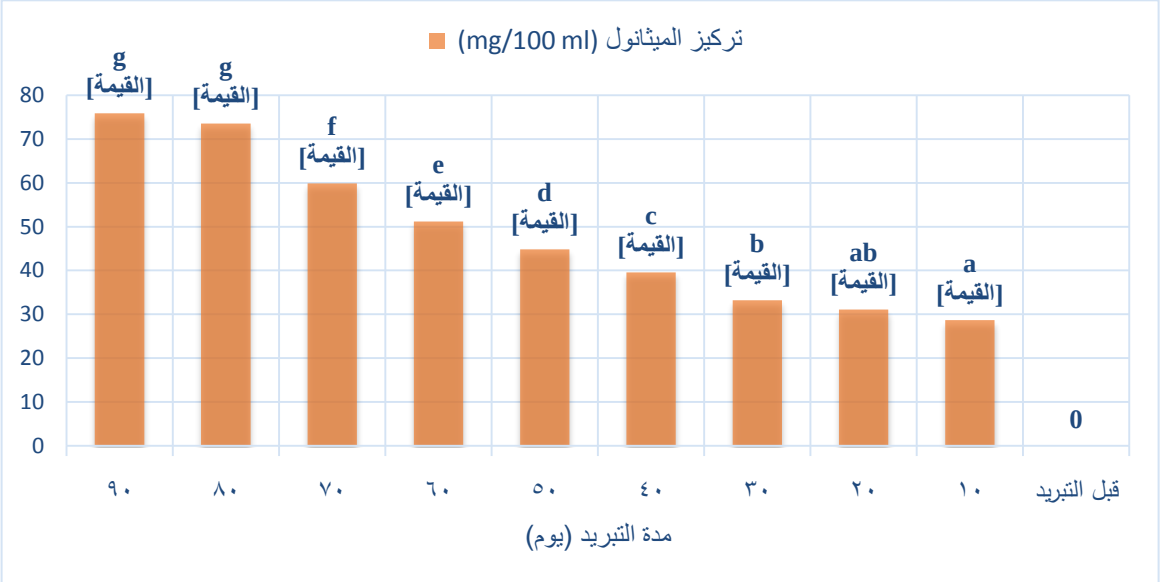
النتائج والمناقشة:

-تحديد تركيز الميثانول خلال تبريد الثمار:

من خلال النتائج تبين أنّ تركيز الميثانول بعد 10 أيام من التخزين كان 28.7 مغ/100مل كحول مطلق، واستمر بالارتفاع إلى اليوم 90 حيث بلغ التركيز عند هذا الفترة من التخزين 75.95 مغ/100مل كحول مطلق، ويوضّح الشّكل (1) متوسّطات تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق في عيّنات أخذت خلال التّخزين المبرَّد للثّمار، وذلك خلال فترات زمنيّة مختلفة، وتوضّح البيانات أنَّ الميثانول يتشكّل خلال تخزين الثّمار على حرارة (0 ± 1)°C ، ويزداد محتوى الميثانول بإطالة فترة التّخزين، أظهرت النَّتائج أنّه يوجد ارتباط قوي بين تركيز الميثانول المتشكّل ومدّة التّبريد ومقدار معامل الارتباط R=0.96 وهو معنوي عند مستوى دلاله α =0.01، ويعود السّبب في تشكّل الميثانول خلال تخزين الثّمار إلى استمرار نشاط أنزيم بكتين استيراز أثناء التّخزين في درجات الحرارة المنخفضة، وهذا يتّفق مع (H.Zhou *et al.*, 2000) حيثُ إنَّ نشاط أنزيم البكتين استيراز لا يتأثَّر بدرجات الحرارة المنخفضة 0°C، ويبقى بنفس المستوى من النّشاط وذلك عند تخزين الفاكهة (H.Zhou *et al.*, 2000)، وتظهر النّتائج أنَّ الفروق بين متوسِّطات تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق غير معنويّة في مراحل التّخزين الأولى، حيث تبيّنَ عدم معنويّة الفروق في تركيز الميثانول بين عيّنة اليوم 10 وعيّنة اليوم 20، وكذلك عدم معنويّة الفروق بين عيّنة اليوم 20 وعيّنة اليوم 30 من التّخزين وكانت الفروق معنويّة عند مقارنة عيّنة اليوم 10 مع عيّنة اليوم 30.

حيث تبيّن وجود فروق معنويّة بين متوسّطات العيّنات بدءً من اليوم 40 حتى اليوم 80 من التّخزين، وكانت الفروق غير دالّة إحصائيّاً في مراحل التّخزين الأخيرة أي لا يوجد فروق معنويّة بين تركيز الميثانول في عيّنة اليوم 80 وتركيز الميثانول عيّنة اليوم 90 من التّخزين.

يُلاحَظ من النتائج حدوث زيادة معنويّة في تركيز الميثانول بعد شهر من تخزين العنب، ويعود السّبب إلى زيادة نشاط PME بسبب زيادة تركيز غاز الإيثلين النّاتج من ثمار التّفاح الموجودة في نفس غرفة التّبريد، حيث أنَّ ثمار التّفاح تستمر في النّضج خلال التّخزين ويترافق هذا النّضج مع زيادة في تركيز غاز الإيثلين في جو التّبريد وبالتّالي يزداد نشاط الأنزيم ومنه زيادة تركيز الميثانول، وهذا يتّفق مع Gertman&Fuchs (1974) أمّا في مرحل التّخزين الأخيرة تمَّ سحب كمية من التفاح الموجود في البراد وبالتالي انخفاض بتركيز غاز الإيثلين المنتج في جو التبريد، مما ينعكس بدوره على نشاط PME.



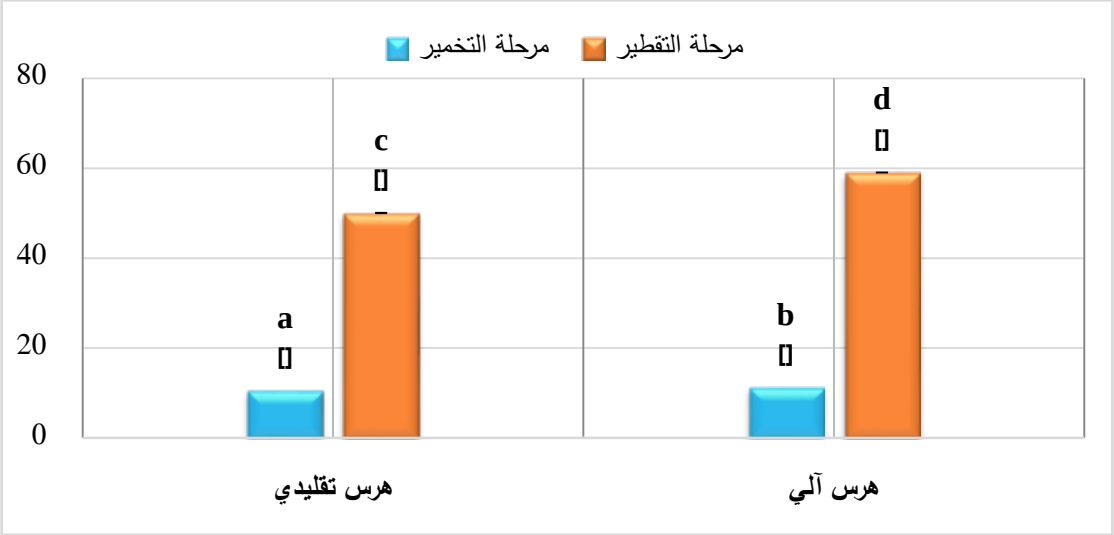
الشّكل (1) تركيز الميثانول المتشكّل (مغ/100مل كحول مطلق) خلال تبريد الثّمار. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

$\sigma_{10} = 0.28, \sigma_{20} = 0.85, \sigma_{30} = 1.48, \sigma_{40} = 0.85, \sigma_{50} = 1.06, \sigma_{60} = 0.92, \sigma_{70} = 0.35, \sigma_{80} = 0.56, \sigma_{90} = 0.77$

-تحديد تركيز الإيثانول والميثانول باختلاف طريقة الهرس:

من خلال النتائج تبين أنّ تركيز الإيثانول%v/v النّاتج من تخمير العنب المهروس بطريقة الآلة لمدة 40 يوم (0.14±11.12) وتركيز الإيثانول النّاتج من تخمير العنب المهروس بالطّريقة التقليديّة (0.12±10.41)، ويوضّح الشّكل (2) تأثير عمليّة الهرس على متوسّط تركيز الإيثانول%v/v بعد تخمير المهروس لمدّة 40 يوم وفي ناتج التّقطير، وبالتّحليل الإحصائي تبيّنَ وجود فروق معنويّة بين تركيز الإيثانول النّاتج من تخمير العنب المهروس بطريقة الآلة، وتركيز الإيثانول النّاتج من تخمير العنب المهروس بالطّريقة التقليديّة، حيثُ تفوّقت عيّنة العنب المخمّر المهروس باستخدام الآلة معنوياً على عيّنة العنب المخمّر المهروس تقليديّاً، ويمكن تفسير ذلك بسبب طريقة الهرس الّتي أُجريت حيث تمَّ استخدام آلة هرس كهربائيّة حوّلت الثّمار إلى مهروس ناعم وبالتّالي زادت من السّطوح النّوعية للمهرس وبالتّالي زيادة فعاليّة الإنزيمات يؤدّي ذلك لزيادة التّخمير وزيادة الإيثانول المتشكّل، أمّا بالنّسبة لناتج التّقطير يُلاحظ زيادة في تركيز الإيثانول بسبب عمليّة التقطير، وبالتّحليل الإحصائي تبيّنَ وجود ارتباط قوي بين مرحلتي التّخمير والتّقطير بلغت قيمة معامل الارتباط R=0.96 وهو معنوي عند مستوى دلالة α=0.01، أي أنَّ تركيز الإيثانول في ناتج التّقطير مرتبط بشكل مباشر بنسبة الإيثانول الّتي تتشكّل خلال مرحلة التّخمير.

وسُجِّلت فروق معنويّة بين تركيز الإيثانول في ناتج تقطير عيّنة العنب المهروس بطريقة الآلة وتركيز الإيثانول في ناتج تقطير عيّنة العنب المهروس بالطّريقة التقليديّة، ويعود السّبب في هذه الزيادة إلى ارتفاع تركيز الإيثانول المتشكّل في مرحلة التّخمير لعيّنة العنب المخمّر المهروس بطريقة الآلة، نستنتج أنَّ لطريقة الهرس المتبعة تأثير معنوي على تركيز الإيثانول حيث زاد التركيز بمقدار 6.4% في ناتج التّخمير عند إجراء هرس باستخدام آلة كهربائية مقارنة بالهرس باستخدام الأرجل في الطّريقة التقليديّة.



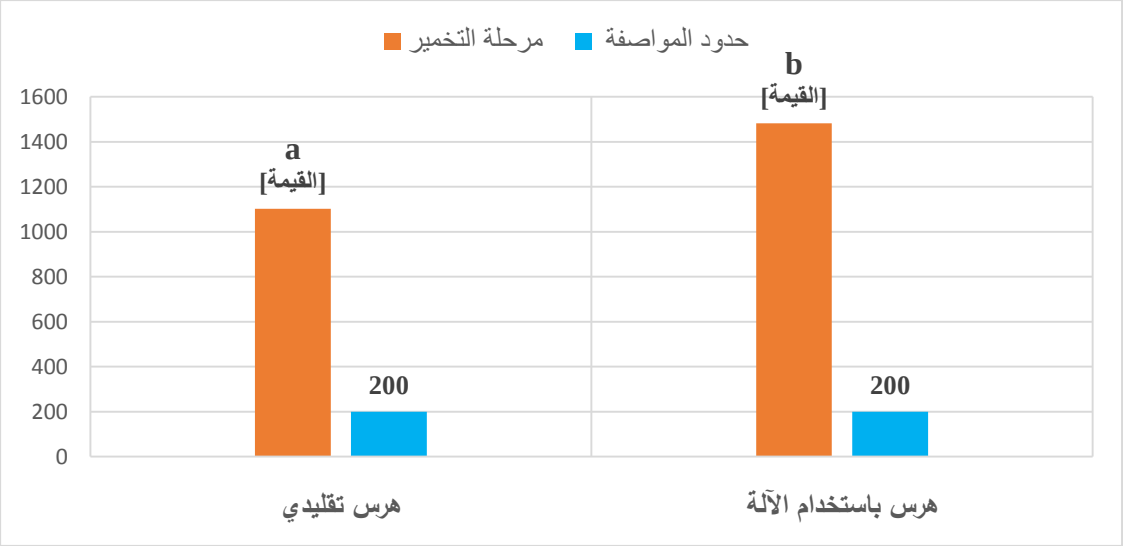
الشّكل (2) تركيز الإيثانول%v/v خلال مراحل التّصنيع بالنّسبة لطريقتين من الهرس. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة $\propto = 0.05$

$\sigma_{\text{تخمير آلة}} = 0.14$, $\sigma_{\text{تقطير آلة+تقليدي}} = 0.1$ $\sigma_{\text{تخمير تقليدي}} = 0.12$,

أمّا بالنّسبة لتركيز الميثانول فيوضّح الشّكل (3) أنَّ تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق تجاوز في المعاملتين الحد الأعلى للمواصفة القياسيّة السوريّة لعام 2003 وتأثر تركيز الميثانول معنوياً بطريقة الهرس للثّمار، حيث كان تركيز الميثانول في المهروس المخمّر لمدة 40 يوم أكبر في عيّنة العنب المهروسة باستخدام الآلة (31.65±1481.8) مقارنة بعيّنة العنب المهروسة بالطّريقة التقليديّة (33.25±1101.83)، ويعود السّبب لآليّة الهرس حيث تسبّب الهرس باستخدام الآلة الكهربائيّة لزيادة الفعاليّة الأنزيميّة نتيجة زيادة الأسطح النّوعية للمهروس، وزيادة تحطُّم جدران خلايا الثّمار بشكل أكبر والّتي تحتوي على البكتين المؤستر بالميثانول ومنه كميّة بكتين أعلى في المهروس وبالتالي تركيز ميثانول أعلى، وهذا يتّفق مع (Kana *et al*,.2007) .

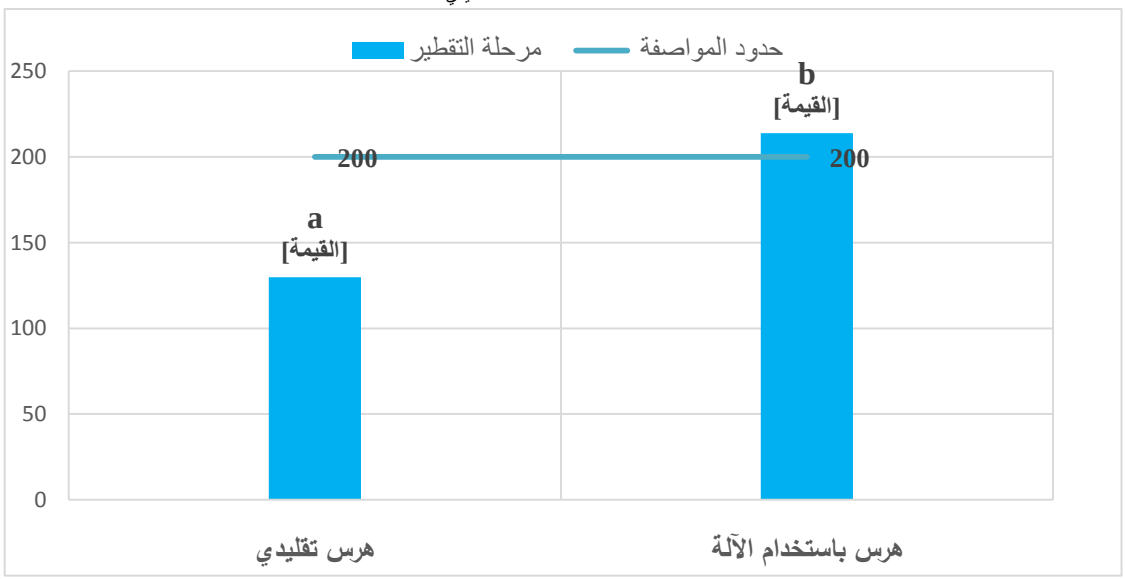
أمّا تركيز الميثانول في ناتج التّقطير، يظهر الشّكل (4) انخفاض التّركيز في ناتج التّقطير لكلا المعاملتين مقارنةً بمرحلة التّخمير، وهذا أمكن تفسيره باختلاف القطبيّة بين الإيثانول والميثانول حيث أنَّ الإيثانول الأقل قطبيّة والأكثر درجة غليان (78,3 °C) يتقطَّر أولاً بينما الميثانول الأكثر قطبيَّة والأقل درجة غليان (64,8 °C) يبقى مع الماء (Spaho،2017)، كذلك بيَّن Alcarde *et al* (2011) أنَّ محتوى الميثانول يقلُّ بتكرار عمليّة التّقطير، حيثُ تجاوزت عيّنة التّقطير النّاتجة من تخمير العنب المهروس باستخدام الآلة الحد الأعلى للمواصفة السوريّة لعام 2003، وكان تركيز الميثانول في ناتج تقطير عيّنة العنب المخمّر المهروس آليّاً(3.82±129.73) أقل من تركيزه في ناتج تقطير عيّنة العنب المخمّر المهروس تقليديّاً (6.33±213.8)، وبالتّحليل الإحصائي تبيّنَ وجود فروق معنويّة بين تراكيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) في العيّنتين وذلك في مرحلة التّخمير والتّقطير حيث تفوّقت طريقة هرس

العنب باستخدام الآلة معنويّاً على طريقة الهرس التقليديّة، بمعنى أنَّ الهرس الشّديد باستخدام الآلة أدَّى إلى زيادة في تركيز الميثانول في المهروس المخمّر بمعدّل 25.6% مقارنة بالمهروس المخمّر النّاتج بالطّريقة التقليديّة، وهذا يتّفق مع (Bindler *et al* ., 2009)



الشّكل (3) تركيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) خلال مرحلة التّخمير بالنّسبة لطريقتين لهرس العنب. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة $\propto = 0.05$

$$\sigma_{\text{تقليدي}} = 33.25, \quad \sigma_{\text{آلة}} = 31.65$$



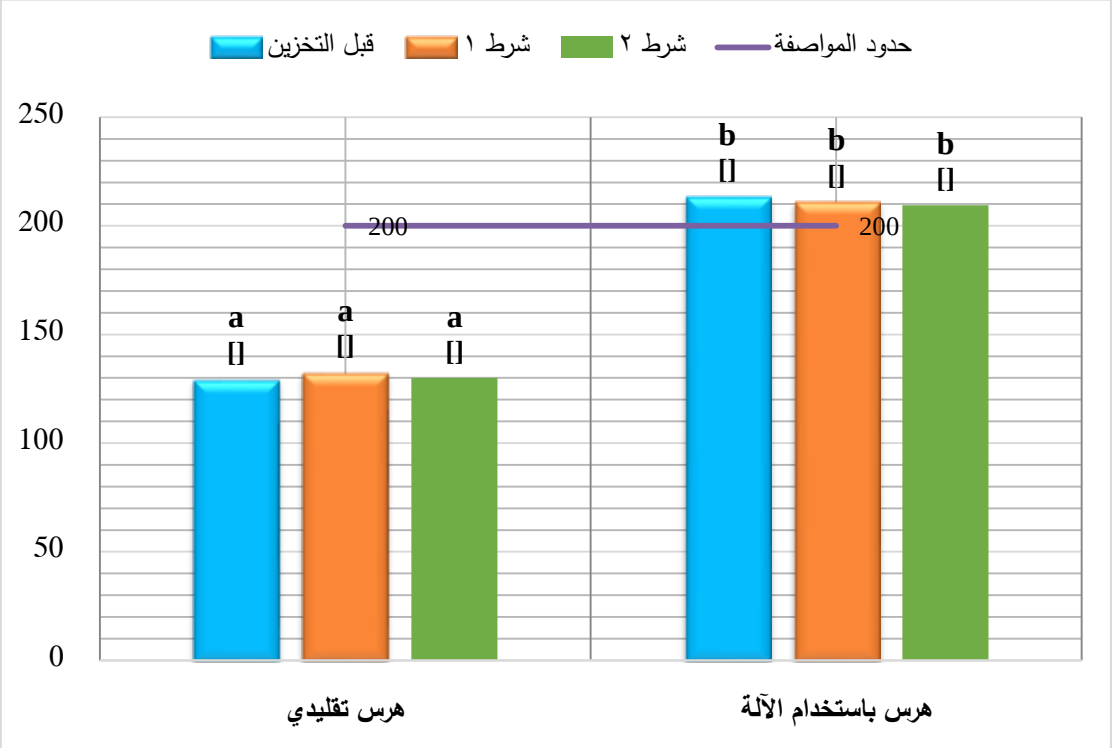
الشّكل (4) تركيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) خلال مرحلة التّقطير بالنّسبة لطريقتين لهرس العنب. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة $\propto = 0.05$

$$\sigma_{\text{تقليدي}} = 3.82, \quad \sigma_{\text{آلة}} = 6.33$$

-تحديد نسبة الميثانول والإيثانول بعد التخزين في الشرطين:

كان تركيز الميثانول في عيّنة المنتج المقطَّر النّاتج من العنب المهروس آليّاً خلال التخزين داخل البراد (9.3±211.2) وخلال التخزين خارج البراد (10.2±209.5)، أمّا بالنّسبة لتركيز الميثانول في عيّنة المنتج المقطَّر النّاتج من العنب المهروس تقليديّاً خلال التخزين داخل البراد (2.14±132.8) وخلال التخزين خارج البراد

(130.1±6.77)، ومن خلال النتائج المتحصل عليها من تخزين المنتج المقطَّر النّاتج من العنب المهروس بطريقتي الهرس (تقليدي–آلة) في شرطي التّخزين يُلاحظ من الشّكل (5) أنَّ ظروف التّخزين في الشّرطين (داخل البراد وخارجة) لا تؤثّر على تركيز الميثانول، وأنَّ تركيز الميثانول لم يتأثّر معنويّاً بشروط التّخزين في كلا العيّنتين، ولا يوجد فروق معنويّة ناتجة عن التّأثير المتبادل بين شروط التّخزين وطريق الهرس، ومنه لا يوجد أي تأثير للتّخزين في الشّرطين على محتوى الميثانول في المنتج النّهائي، وهذا يتّفق مع (Teipel *et al,.* 2020) إلى أن الميثانول مركّب مستقر في المحاليل المائية الكحوليّة المعبّأة.



الشّكل (5) تركيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) بعد التّخزين للمنتج النّهائي في الشّرطين 1–2 بالنّسبة لطريقة الهرس. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

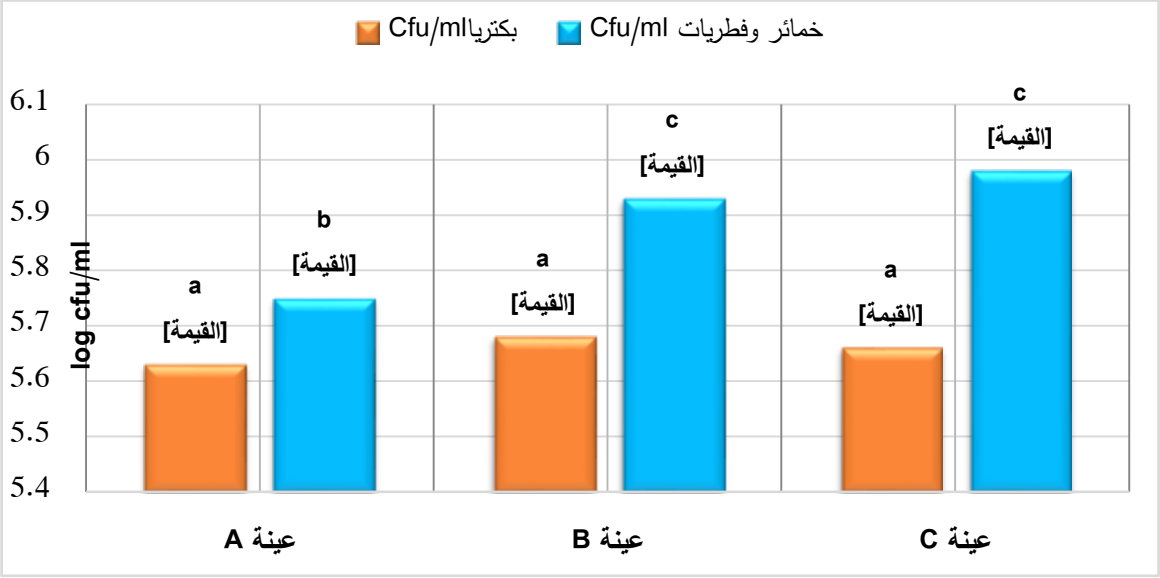
–تحديد التعداد العام للخمائر والفطريات والبكتيريا وتركيز الميثانول المتشكل:

كانت التعداد العام للخمائر والفطريات الأولية بالنسبة للعينة A log CFU/ml5.75 والعينة B log CFU/ml5.93 أما بالنسبة للعينة C كان التعداد العام log CFU/ml 5.98 ، وكان التعداد العام للبكتيريا الأولية بالنسبة للعينة A log CFU/ml5.63 والعينة B log CFU/ml5.68 أما بالنسبة للعينة C كان التعداد العام log CFU/ml 5.66 ويُلاحظ من الشّكل (6) الحمولة الميكروبيّة الأولية الّتي تنطلق بالتّخمير في العيّناتA,B,C، حيث يلاحظ وجود فروق معنوية بينَ التّعداد العام للخمائر والفطريّات في العيّنة A وبينَ التّعداد العام للخمائر والفطريّات في العيّنة B ولا يوجد أي فروق معنوية بيّنَ العيّنتين بالنسبة للتّعداد العام للبكتيريا، ويلاحظ أيضاً وجود فروق معنوية في التّعداد العام للخمائر والفطريّات بينَ العيّنة A والعيّنة C، ولا يوجد أي فروق معنوية في التّعداد العام للبكتيريا بينَهما، كما يلاحظ عدم معنوية الفروق في التّعداد العام للخمائر والفطريّات والتّعداد العام للبكتيريا بينَ العيّنة C والعيّنة B، ومنة يمكن إرجاع الفروق المعنوية كما يظهر الشّكل (7) بين تركيز الميثانول في العيّنة A وتركيز الميثانول في العيّنة B إلى

التّعداد الأولي للفطريّات والخمائر وليس إلى التّعداد الأولي للبكتيريا، وكذلك بيّن تركيز الميثانول في العيّنة A وتركيز الميثانول في العيّنة C إلى التّعداد الأولي للفطريّات والخمائر وليس إلى التّعداد الأولي للبكتيريا.

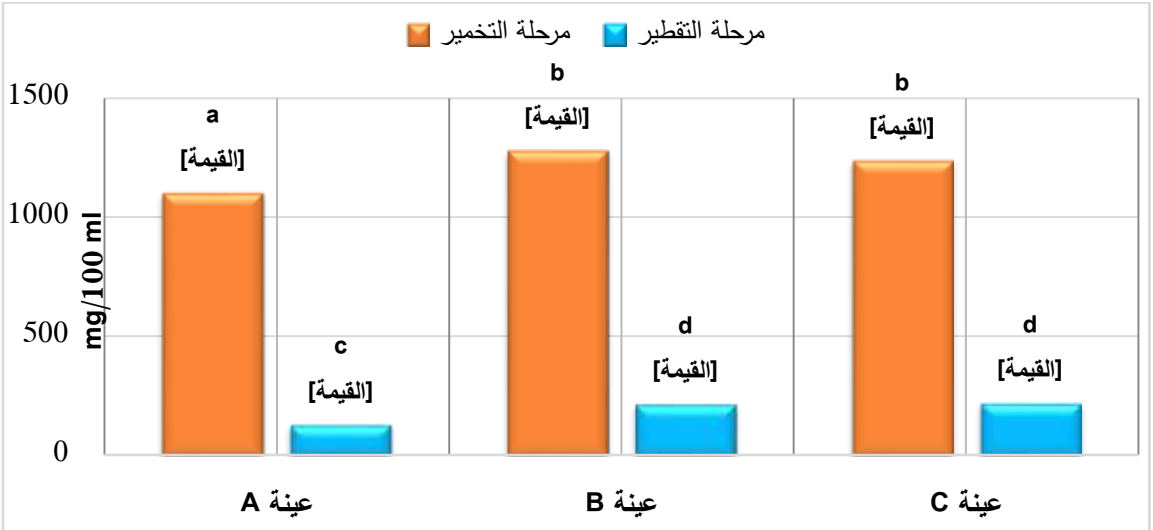
كما يلاحظ من الشكل (7) عدم معنوية الفروق بين تركيز الميثانول في العيّنة B والعيّنة C، يعود إلى عدم وجود فروق في الحمولة الأولية للفطريّات والخمائر والبكتيريا.

ومنة نستنتج أنَّ التعداد الأولي للخمائر والفطريات في المهروس المعد للتخمير له تأثير معنوي على تركيز الميثانول حيث لوحظَ زيادة تركيز الميثانول في العينات التي يزداد فيها التعداد الأولي للخمائر والفطريات، وهذا يتفق مع Arshad *et al.* (2008) حيثُ ينتج البكتين ميثيل استيراز من خلايا الخميرة ويعد متحمل لدرجات الـPH المنخفضة أيضاً (Satora & Tuszynski, 2010) .



الشكل (6) يوضح التعداد الميكروبي(log cfu/ml). اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة$\propto = 0.05$

$A\ \sigma_{ب} = 0.07, \sigma_{ف} = 0.21 - B\ \sigma_{ب} = 0.06, \quad \sigma_{ف} = 0.05 - C\ \sigma_{ب} = 0.13, \quad \sigma_{ف} = 0.07$



الشكل (7) تركيز الميثانول في العينات المدروسة. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة$\propto = 0.05$

$\sigma_A = 33.25, \quad \sigma_B = 18.5, \quad \sigma_C$=35.25 تخمير

$\sigma_A = 3.82, \quad \sigma_B = 3.8, \quad \sigma_C$=17.4 تقطي

ر

الاستنتاجات والتوصيات:

- **الاستنتاجات:**

-يتشكّل الميثانول في درجة الحرارة المنخفضة 0 درجة مئوية نتيجة لنشاط PME ويزداد تركيزهُ عند تخزين الثّمار في برّاد يحتوي على ثمار أُخرى تنتج غاز الإيثلين الّذي يزيد نشاط PME .

-تعتبر طريقة الهرس عامل مهم في تحديد محتوى الميثانول في المشروبات الكحوليّة حيث زاد تركيز الميثانول نتيجة الهرس باستخدام خلاط كهربائيّ عن الحد الأعلى للمواصفة السوريّة لعام 2003.

-لم يُلاحظ أيّ تأثير للتّخزين داخل البرّاد أو خارجه على محتوى الميثانول بالنّسبة للمنتج النّهائي المقطّر.

-لوحظ زيادة تركيز الميثانول في المهروس المخمر بزيادة الحمولة الأولية من الخمائر والفطريات.

- **التوصيات:**

-يوصى بالتّقليل من هرس العنب قدر المستطاع لأن هذه العمليّة تسهم في زيادة تركيز الميثانول المتحرر من نشاط PME .

-يوصى بتطبيق نظام مراقبة الجودة وخصوصاً في هكذا منتجات تخضع للتّخمير.

References:

1-ALCARDE, A.; SOUZA, P.; EDUARDO, A.; BELLUCO, S. *Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still*. Ciência e Tecnologia de Alimentos. vol 31, 2011, 355-360.

2-ARSHAD, M.; KHAN Z.; REHMAN, K.; SHAH, F.; RAJOKA, M. *Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale.* The Authors Journal compilation. vol 47, 2008, 410–414.

3-BINDLER, F.; VOGES, E.; LAUGEL, P. *The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits*. Food Additives and Contaminants. vol 5, No3, 2009, 343-351.

4-BLUMENTHAL, P.; STEGER, M.; EINFALT, D.; ZAPP, J.; BELLUCCI, A.; SOMMERFELD, K.; SCHWARZ, S.; LACHENMEIER, D. *Methanol mitigation during manufacturing of fruit spirits with special consideration of novel coffee cherry spirits*. *Molecules*, vol 26, 2021, 2-16.

5-BUREAU OF INDIAN STANDARDS. Indian standard alcoholic drinks methods of test. second *revision*. 2005

6-CABAROGLU, T. *Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing*. Food Control, vol 16, 2005, 177–181

7-CABAROGLU1, T.; YILMAZTEKIN, M. *Methanol and Major Volatile Compounds of Turkish Raki and Effect of Distillate Source*. Journal of the institute of brewing. vol 104, 2011, 98-105.

8-CAPUTI, A.*;* WRIGHT, D. *Collaborative Study of the Determination of Ethanol in Wine by Chemical Oxidation*. JOURNAL OF THE AOAC. Vol. 52, No. 1, 1969, 85-88.

9-DUTKIEWICZ, BOZENA.; KOFICZALIK, JERZY.; KARWACKI.; WIESLAW. *Skin Absorption and Per Os Administration of Methanol in Men*. Int Arch Occup Environ Health, 47, 1980, 81-88

10-DO AMARAL, S.H.; DE ASSIS, S.A.; DE FARIA OLIVEIRA, O.M.M. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. pera-rio. J. Food Biochem. 29, 2005, 367-380.
11-DHAR, P.; DAS, C.; BANERJEE, S.; MAZUMDER, S. *Production of banana alcohol and utilization of banana residue*. IJRET. vol 2, 2013, 466-470.
12-GAO, YU.; J. ZIETSMAN, ANSCHA J.; A. VIVIER, MELANÉ.; P. MOORE, JOHN. *DeconstructingWine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology*. Molecules. 24, 2019, 165.
13-GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; KYRIAKIDIS, N.V.; ATHANASOPOULOS, P.E. *Effect of grape variety (Vitis vinifera L.) and grape pomace fermentation conditions on some volatile compounds of the produced grape pomace distillate*. OENO One. 38, 2004, 225-230.
14-GERTMAN, EITAN.; FUCHS, YORAM. *Changes in pectinmethylesterase (PME) activity caused by ethylene applied at different temperatures*. Plant & Cell Physiol, 15, 1974, 501-505 .
15-GÖSSINGER, M.; KRAPFENBAUER, G.; SÄMANN, H.; BRANDES, W.; KARNER, M.; HICK, S.; NEURURER, T. *Tips for the distiller: methanol*. Kleinbrennerei. 58, 2006, 8-11.
16-GREIZERSTEIN, H. *Congener contents of alcoholic beverages.* Journal o.f Studies on Alcoho. vol 42, No 11, 1981, 1030-1037.
17-HONG-WEI, ZHOU.; BEN-ARIE, RUTH.; LURIE, SUSAN. *Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions.* Phytochemistry, 55, 2000, 191-195
18-KANA, K.; KANELLAKI, M.; Papadimitriou, A.; Koutinas, A. *Cause of and methods to reduce methanol content of Tsicoudia, Tsipouro and Ouzo.* InternalionalJournal of Food Scienceand Technology, Greece. vol 26, 1991, 241-247.
19-KAVE, R.; NAUSS, K. *The toxicity of inhaled methanol vapors*. Crit Rev Toxicol. 21, 1990, 21-50.
20-LINDINGER, W.; TAUCHER, J.; JORDAN, A.; HANSEL, A.; VOGEL, W. *Endogenous production of methanol after the consumption of fruit*. Alcohol Clin Exp Res. 21, 1997, 939-943.
21-NIKIĆEVIĆ1, N.; TEŠEVIĆ, V. *Possibilities for methanol content reduction in plum brandyn*. *Journal* of Agricultural Sciences. vol 50, 2005, 49-62.
22-PRETORIOS, I. *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast. vol 16, 2000, 675-729.
23-PIEPER, H.J.; OPLUSTIL, E.; BARTH, G. *Reduction of methanol formation during alcoholic fermentation*. Biotechnol. Lett, 2, 1980, 391-396.
24-SATORA, P.; TUSZYNSKI, T. *Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies.* Food Microbiol. vol 27, 2010, 418-424.
25-STEGINK, L.; BRUMMEL, M.; MCMARTIN, K.; MARTIN-AMAT, G.; FILER, J.; BAKER, G.; TEPHLY, T. *Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame*. Toxicol Environ Health. **7**, 1981, 281-290.
26-SICARD, D.; LUC LEGRAS, J. *Bread, beer and wine: Yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex.* C. R. Biologies. vol **334,** 2011, 229–236.
27-SCRIMGEOUR, M. *Outbreak of Methanol and Isopropanol Poisoning in New Britain, Papua New Guinea*. Med.J. Aust, 2, 1980, 36–38.

28-SPAHO, N. *Distillation techniques in the fruit spirits production. In Distillation-Innovative Applications and Modeling, Mendes*, M., Ed.; InTechOpen Limited: London, UK, 2017,129-152.
29-TAUCHER, J.; LAGG, A.; HANSEL, A.; VOGEL, W.; LINDINGER, W. *Methanol in human breath.* Alcohol Clin Exp Res. vol 19, 1995, 1147-1150.
30-TEIPEL, J.C.; HAUSLER, T.; SOMMERFELD, K.; SCHARINGER, A.; WALCH, S.G.; LACHENMEIER, D.W.; KUBALLA, T. Application of 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy as spirit drinks screener for quality and authenticity control Foods**,** 2020, 9, 1355.
31-Turkish Food Codex, No: 2005/11. Distilled Alcoholic Beverages, Turkish Ministry of *Agriculture*, 2005.
32-WALKER, GRAEME M.; E. HILL, ANNIE. *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Whisk(e)y*. www.mdpi.com/journal/beverages. 8, 2016, 2-38.
33-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health and Safety Guide Methanol. No 105, 1997, 20 feb 2021.
<http://*apps*.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41944/9241511052_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>