

Review

# Methanol Mitigation during Manufacturing of Fruit Spirits with Special Consideration of Novel Coffee Cherry Spirits

Patrik Blumenthal<sup>1,2</sup>, Marc C. Steger<sup>1</sup>, Daniel Einfalt<sup>2</sup> , Jörg Rieke-Zapp<sup>1</sup>, Andrés Quintanilla Bellucci<sup>3</sup>, Katharina Sommerfeld<sup>4</sup>, Steffen Schwarz<sup>1</sup> and Dirk W. Lachenmeier<sup>4,\*</sup> 

<sup>1</sup> Coffee Consulate, Hans-Thoma-Strasse 20, 68163 Mannheim, Germany; patrik.blumenthal@live.de (P.B.); marcsteger2@googlemail.com (M.C.S.); joerg.rieke\_zapp@yahoo.de (J.R.-Z.); schwarz@coffee-consulate.com (S.S.)

<sup>2</sup> Yeast Genetics and Fermentation Technology, Institute of Food Science and Biotechnology, University of Hohenheim, Garbenstrasse 23, 70599 Stuttgart, Germany; daniel.einfalt@uni-hohenheim.de

<sup>3</sup> Finca La Buena Esperanza, Pasaje Senda Florida Norte 124, San Salvador, El Salvador; coffeelbe@gmail.com

<sup>4</sup> Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe, Weissenburger Strasse 3, 76187 Karlsruhe, Germany; katharina.sommerfeld@cvuaka.bwl.de

\* Correspondence: lachenmeier@web.de; Tel.: +49-721-926-5434

**Abstract:** Methanol is a natural ingredient with major occurrence in fruit spirits, such as apple, pear, plum or cherry spirits, but also in spirits made from coffee pulp. The compound is formed during fermentation and the following mash storage by enzymatic hydrolysis of naturally present pectins. Methanol is toxic above certain threshold levels and legal limits have been set in most jurisdictions. Therefore, the methanol content needs to be mitigated and its level must be controlled. This article will review the several factors that influence the methanol content including the pH value of the mash, the addition of various yeast and enzyme preparations, fermentation temperature, mash storage, and most importantly the raw material quality and hygiene. From all these mitigation possibilities, lowering the pH value and the use of cultured yeasts when mashing fruit substances is already common as best practice today. Also a controlled yeast fermentation at acidic pH facilitates not only reduced methanol formation, but ultimately also leads to quality benefits of the distillate. Special care has to be observed in the case of spirits made from coffee by-products which are prone to spoilage with very high methanol contents reported in past studies.

**Keywords:** alcoholic beverages; spirits; methanol; risk mitigation; legal limits; quality control



**Citation:** Blumenthal, P.; Steger, M.C.; Einfalt, D.; Rieke-Zapp, J.; Quintanilla Bellucci, A.; Sommerfeld, K.; Schwarz, S.; Lachenmeier, D.W. Methanol Mitigation during Manufacturing of Fruit Spirits with Special Consideration of Novel Coffee Cherry Spirits. *Molecules* **2021**, *26*, 2585. <https://doi.org/10.3390/molecules26092585>

Academic Editor: Claudio Ferrante

Received: 29 March 2021

Accepted: 23 April 2021

Published: 28 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Methanol is an alcohol that is typically found in almost all kinds of alcoholic beverages and some other fermented food products [1–5]. Methanol may occur in alcoholic beverages through two major pathways: a natural one (pectin degradation), as well as an artificial one (adulteration by illegal addition of the pure compound). Only the latter pathway (adulteration) is typically associated with major morbidity and mortality due to methanol poisoning [6–9]. While adulteration is still prevalent and incidences have increased due to alcohol shortages during the COVID-19 pandemic [10], this article will exclusively focus on the first pathway, the natural content of methanol in spirits and its mitigation. Regarding the mitigation of problems related to methanol addition, we have recently provided a separate review [11].

In the human body, methanol may be endogenously present in low concentrations [12,13], while in most alcoholic beverages such as beer and wine, the natural content of methanol is also quite low. This differs with fruit spirits, so that the major focus on methanol reduction measures lies on this kind of beverage.

Spirits are alcoholic beverages that use fruits or other sugar-containing plant parts as the raw material. They are produced by alcoholic fermentation followed by distillation [14].

In Central European countries and in Russia, but also in Asia and many American countries, home production or artisanal small-scale production of spirits has a long tradition, while typically the sugar-containing materials of the region are preferred. For instance, countries in Central Europe mainly utilize fruits such as cherries, apples, and plums while other regions focus on grains (Eastern Europe) or sugar cane materials (Central and Southern America). From all natural materials used for fermentation, fruits are associated with the highest concentrations of methanol in the end-product, because of their pectin content. Typically, stone fruits of the genus *Prunus* (cherries, plums) and pome fruits of the genera *Malus* and *Pyrus* (apples, pears) are associated with the highest methanol levels. More recently, coffee cherries (genus *Coffea*) were identified as fruits possibly leading to comparably high methanol levels in their spirits [15].

Methanol concentrations in spirits are closely linked to enzymatic activities in the fruits and during the alcoholic fermentation process. Pectin methylesterase activity (1) may derive endogenously from the fruits themselves but also during alcoholic fermentation by pectin methylesterase formed from yeast metabolism or from other microorganisms [16–18]. Pectin methylesterase activity may also be exogenously introduced by addition of certain pectolytic enzyme preparations. A negligible pathway may be thermic demethylation of pectins [19].



When methanol has been released from the fruits' pectin, it inevitably becomes part of the mash [20]. Its level is dependent on the degree of esterification of the pectin inside the fruits and the fruit-dependent ratio between sugar and pectin [5,21]. Another pathway suggested for methanol formation in protein-rich fruits such as jujube (Chinese date, *Ziziphus jujube* Mill.) was glycine deamination, followed by decarboxylation and reaction with nitrite from fertilizer use [22].

The European Union (EU) regulates maximum methanol contents in spirits dependent on the utilized raw materials [4,23,24]. For ethyl alcohol of agricultural origin, the maximum level of methanol is 30 g/hL of 100% vol alcohol (pure alcohol, pa), while for vodka it is 10 g/hL pa and the lowest level is defined for London gin with 5 g/hL pa. The limits are higher for fruit-based materials: for wine spirit 200 g/hL pa, for grape marc and cider 1000 g/hL pa, for fruit marc 1500 g/hL pa, for fruit spirits in general 1000 g/hL pa, except 1200 g/hL pa for apples, apricots, plum, mirabelle, peach, pear, blackberry and raspberry, and 1350 g/hL pa for quince, Williams pear and some other berries [23]. While these EU limits are set to reduce toxic effects on the human body, they were also judged as being rather low and, for some types of fruit, as challenging to be upheld by small artisanal distillers [25]. Lower limits in other countries such as the USA may also prohibit export of fruit spirits to these countries [26].

This article will review the possibilities to control and reduce the methanol content in fruit spirits and also describe some initial observations for the novel spirit made from coffee cherries.

## 2. Materials and Methods

A database research in January 2021 was conducted in Google Scholar and PubMed using the keyword combination “methanol, “reduction” and “spirits” or “alcoholic beverages”. It became quickly evident that the indexed international literature contains only few references about the topic. For that reason, the paper collection of the authors was screened for the key words to identify the gray literature mostly in German language industry magazines. The reference lists of all identified articles were screened for missing references. A narrative review was compiled from the available evidence.

## 3. Toxicity of Methanol in Alcoholic Beverages

Methanol is a colorless liquid and it is highly flammable. It is the simplest alcohol with a wide range of industrial applications. Methanol is also a natural ingredient in alcoholic

beverages and spirits. To ensure that the residual methanol content present in spirits is safe, methanol content has to be strictly monitored [2,27].

Methanol is one of the few compounds occurring in foods for which excellent human toxicity data is available. This data mostly originates from the experience with poisonings from methanol containing spirits that sadly still regularly occur worldwide in connection with unrecorded and illicit alcohol consumption [11]. Methanol is metabolized in the body to its toxic metabolites, formaldehyde and formic acid. The accumulation of formic acid may cause metabolic acidosis including damage to the retina, the central nervous system and other organs [2,28].

It must be directly noted that such poisonings typically occur from methanol addition to spirits (mostly found on the illicit market), while the natural content due to fermentation from fruits does not typically exceed levels causing acute toxicity [11].

Poisoning outbreaks were reported from all regions worldwide, the size of which ranging from a few to over 800 victims, with fatality rates of over 30% in some instances [29].

Paine and Dayan [2] reported that the low concentrations of methanol naturally occurring in most alcoholic beverages are not causing any harm. According to WHO [29], methanol concentration in typical ranges of 6–27 mg/L in beer and 10–220 mg/L in spirits are not harmful. Paine and Dayan [2] also reported that the daily tolerable, virtually safe dose of methanol for an adult is 2 g and the toxic dose is 8 g. For a drinking volume of 100 mL of a spirit at 40% vol, the tolerable concentration would be 2% vol methanol (i.e., 5000 g/hL pa). Hence, the EU general limit for naturally occurring methanol in fruit spirits of 1000 g/hL pa [23] offers a safety margin of about 5 for heavy consumers of fruit spirits. Compared to other toxic food constituents, this margin is rather low, so that the limits must be strictly controlled and adhered by industry. Considering the demand for precautionary public health protection, it is obviously prudent to lower the methanol content in fruit spirits as low as it is reasonably achievable (ALARA principle).

#### 4. Factors Influencing the Methanol Content of Fruit Spirits

Table 1 provides an overview of the major methods and approaches to reduce methanol in spirits. From their experience in practical work in spirits drinks control and distillation technology, the authors also provide a judgement about the applicability of the approaches, considering practical as well as economical aspects. The following sections are considering each approach in more detail.

**Table 1.** Summary of major methods to reduce methanol during production of fruit spirits.

Method	Methanol Reduction Potential <sup>1</sup>	Authors' Judgment about Applicability	References
Improvement of quality of raw material	up to 40%	Raw material is extremely important and the type and quality highly affects the methanol content. Removal of pectin-rich fruit parts such as skins may reduce methanol content.	[4,16,25,30,31]
Acidification of mash	up to 50%	Acidification of mash inhibits the activity of pectin methylesterase. It also inhibits spoilage microorganisms, which may produce pectin methylesterase.	[25,32–36]
Sterilization of mash	40–90%	Temperature treatment efficiently denaturizes pectin methylesterase enzymes. High energy requirement and not feasible for artisanal distillers.	[18,22,31,37–41]
Decreased storage time of fermented mash before distillation	up to 50%	Storage time should be avoided or being minimized as far as possible, because sharp methanol increases were reported during storage.	[26,32,33]

Table 1. Cont.

Method	Methanol Reduction Potential <sup>1</sup>	Authors' Judgment about Applicability	References
Selection of appropriate yeast strains	up to 25%	Yeasts with low capacity of producing pectin methylesterase to be preferred.	[4,30,42,43]
Decreased fermentation temperature	up to 25%	Lower temperatures and the use of cold fermentation yeast is recommended.	[26]
Improvement in distillation method and conditions	up to 80%	Methanol is enriched in tailings. Earlier cut (not below 50% vol). No recycling of tailings.	[4,14,20,22,30,32–34,44]
Demethanolization following distillation	50–90%	Effective in industry but not feasible for small artisanal distillers, high expenditure	[39,40,42,44–46]
Avoidance of liquefaction enzymes	up to 20%	Avoid pectin methylesterase enzymes which release methanol.	[4,22,26,34,39,42,47]
Application of alternative liquefaction enzymes	up to 88%	Substitute pectin methylesterase enzymes by pectin lyase enzymes to reduce the release of methanol	[48,49]

<sup>1</sup> Authors' estimation if several studies were available.

#### 4.1. Raw Materials, Mash Preparation and Fermentation

Prior to sensitization of industry regarding the methanol problem and the implementation of maximum limits by the EU in the first spirits regulation in 1989 [50], so-called liquefaction enzymes were often applied during mash preparation. In addition to the desired pectin hydrolysis activity, these enzymes also had pectin esterase activity, resulting in methanol formation of up to five to six times higher than in untreated fruit mash [17,51,52]. Such conventional, unspecific enzymes should only be used with caution—if at all—and only if methanol monitoring is implemented [51]. The use of commercial mash enzymes (i.e., pectolytic enzymes such as pectin methylesterase) always resulted in very high methanol contents (similar to the maximum methanol release potential) [25,53,54]. In the case of RubINETTE apples, methanol increases between 5.5% and 12% occur after addition of various pectin enzymes, which are used to liquefy the mashes without adding water, compared to the untreated sample [34]. In quince, the lowest methanol contents were measured in the mashes blended with 33% water [25]. The avoidance of conventional liquefaction enzymes alone can lead to a 20% reduction in methanol content [47]. However, thick fruit mashes usually require a more or less high addition of water for fermentation and distillation, which means time and increased energy input during distillation, and at the same time leads to lower alcohol yields [34]. If pectinolytic enzymes have to be applied, pure lyases should be preferred (see Section 4.1.4). Besides the scrutiny in use of enzymes the raw material quality, mash preparation and fermentation conditions have potential to mitigate the methanol release.

##### 4.1.1. Quality and Treatment of Raw Materials

The methanol content is directly related to the fruit type or types used in the fermentation process (mainly dependent on the sugar/pectin ratio) but there are also differences between cultivars and harvest years [18,19,26,30]. For example, in studying distillates of Bartlett pear between 1978 and 1995, the 1993 vintage was the year with a strikingly lower methanol content [44]. In addition to the fruit type, it is very evident that the fruit quality used affects the quantity of the methanol formation [4,25]. At what stage of fruit development and how it is harvested also effects the methanol content [30].

Early harvest or hard pears led to higher methanol levels [34]. For pears and apricots, other researchers corroborated this finding showing that overripe fruit led to the lowest

methanol contents [16]. In deviation of this finding, Adam reported an increase of methanol through advancing maturity of Williams Christ pears [44,47].

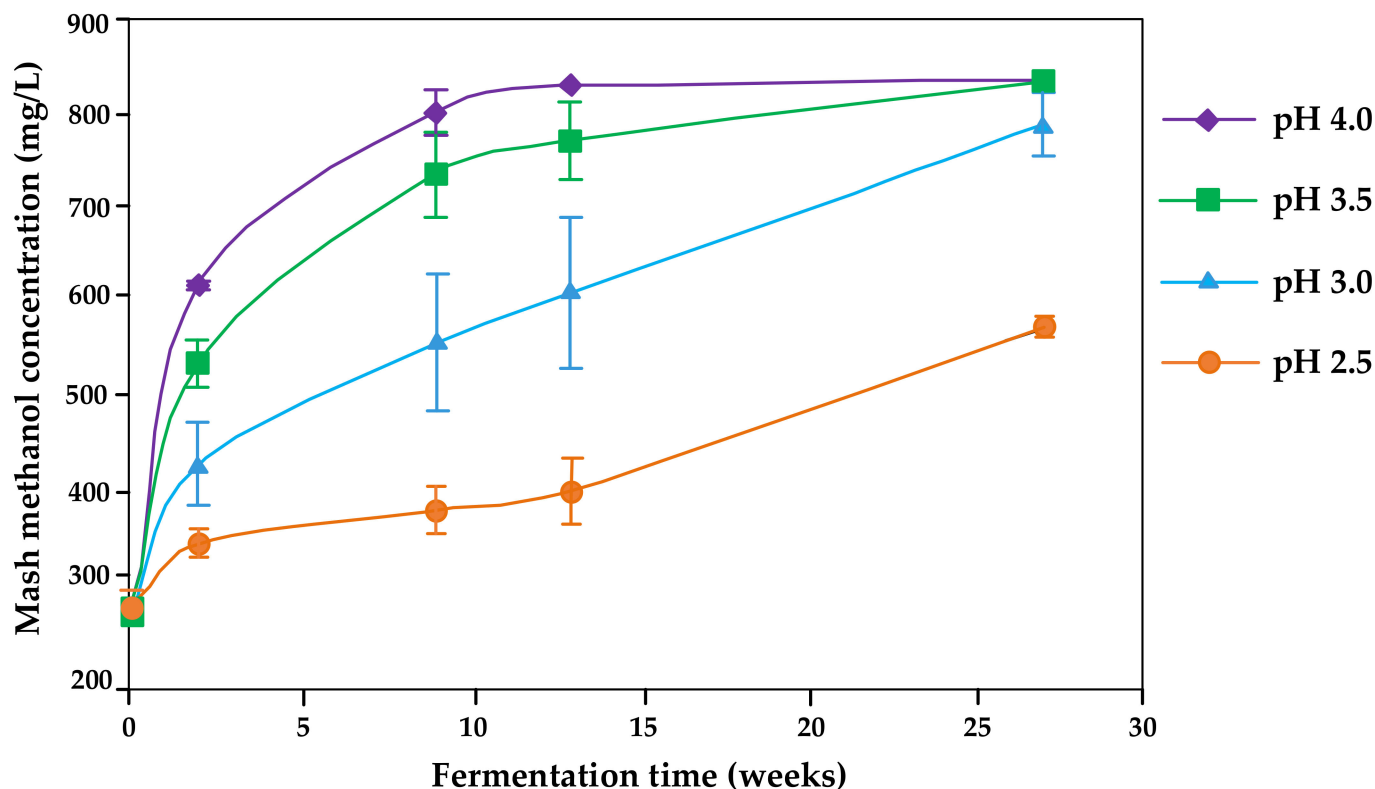
Utilization of plum juice leads to lower methanol contents than plum mashes [30]. On the other hand, destoned cherry mashes showed higher methanol contents than mashes with complete fruits including stones [55]. However, in another investigation of the same research group, destoned cherry mashes showed consistently lower methanol contents [56]. The conflicting results currently cannot be explained, other than confounding factors not controlled in the studies.

As pectins have a major occurrence in the skin layer, the removal of the fruit skins before fermentation may also reduce the methanol level by about 50% during production of wine spirits [31]. Cores and stems were also described to contain high levels of pectins [37]. Peeling and coring of pears, therefore, led to a methanol reduction of up to 42% [16]. However, this method is judged as not economically feasible for most spirits.

#### 4.1.2. Inhibition of Pectin Methyltransferase by Acidification of Mash

pH is one of the most important factors which highly affects the activity of enzymes. Pectin methyltransferase showed an optimum at pH 8 and 50 °C [57]. Other authors suggested pH 5–6 as optimum for pectin methyltransferase [37,38]. Pectin methyltransferases from yeast may have optimal pH values ranging from 3.75 to 6 [58].

Therefore, the proposed pH for fermentations to avoid pectin methyltransferase activity is 2.5 [32,34] (Figure 1). No large differences were reported between pH 2.8 and 3.3, however [47]. Denes et al. [59] stated a decrease to 1% of the enzyme activity by decreasing the pH to 4.5 (pectin methyltransferase from apples).



**Figure 1.** Kinetics of methanol formation in Bartlett pear mashes affected by the initial mash pH and fermentation time (redrawn from [32]).

There is a clear indication from several studies of an up to 50% reduction in methanol by acidification of fruit mashes [4,22,25,26,33–35].

There is not a clear preference about the kind of acid to be used. Gössinger et al. suggest ortho-phosphoric acid (85%) [26,53] while Pieper et al. suggested sulfuric acid [35]. Commercially available products for acidification often contain mixtures of several acids such as malic acid/hydroxypropionic acid or phosphoric acid/lactic acid.

Gerogiannaki-Christopoulou used citric acid resulting in a decrease of about 15% methanol in grape pomace distillate [36]. However, while some organic acids such as citric acid might be depleted during fermentation by their inclusion in metabolic pathways, inorganic acids appear to be more appropriate. Buffer systems ensuring a long-term stability of mash pH might be an interesting option for future investigation.

#### 4.1.3. Inhibition of Pectin Methyltransferase by Sterilization of Mash

A significant reduction of methanol by 40–90% [37,38] can be achieved by thermal deactivation of pectin methyltransferase (often referred to as “mash heating”). There are various suggestions for temperature/time combinations to achieve the enzyme’s denaturation.

Sterilization at temperatures higher than 70 °C was generally suggested to effectively prevent the production of methanol by inactivation of pectin methyltransferase [57,60]. Methanol can be reduced by targeted thermal deactivation of pectin methyltransferase by heating the mash to 80 °C up to 85 °C for a holding time of 30 min or to 60 °C for 45 min [31,37,38]. Pasteurization at 72 °C for 15 s prevented the production of methanol in fermented plant beverages containing *Morinda citrifolia* (noni fruit) [60]. In cider spirit, the pasteurization (30 min at 50 °C, then heated to about 85 °C) of the apple juice prior to fermentation reduced the methanol content by 34–46% [18]. Lower methanol levels were obtained in Williams and plums by heating the mash to 65 °C for 5 min, followed by re-cooling for fermentation [34].

Xia et al. [22] confirmed that autoclaving by steam injection of the mash of jujube reduced the methanol content in the spirit significantly by a factor of about eight. The authors also determined pectin methyltransferase activity confirming that their treatment method reduced the activity to one-fifth to half of that without treatment.

Further technological approaches for inactivation of methyltransferase are thermosonication (ultrasound plus temperature at 70° led to 30% methanol reduction in plum wine) or use of microwaves (70 °C for 1 min led to 70% methanol reduction in plum wine). The authors indicated an additional nonthermal effect of both ultrasonication and microwaving with improved sensory properties of the product [41].

#### 4.1.4. Inhibition and Substitution of Pectin Methyltransferase by Certain Additives

Pectinolytic enzymes (pectinase) are classified into esterase and depolymerase (lyase and hydrolase). Lyase produces oligo- or mono-galacturonate, while esterase produces pectic acid and methanol [61]. The addition of pectin lyase significantly ( $\alpha = 0.01$ ) reduced the resulting methanol contents in the mash of apricot and quince by 40–71% [25,26]. Lyase appears to inhibit the activity of the naturally contained pectolytic enzymes. The mechanism was speculated as being a cleavage of the pectin chains by the pectin lyase in such a fashion that the pectin fragments are not accessible as substrate for the pectin methyltransferase [26]. The effectiveness of lyase enzymes can be increased by dilution of the mashes with water [26]. Similarly, the addition of certain detergents (anionic surfactants) as well as polyphenols (tannins) has a reducing effect on the release of methanol by full or partial inhibition of pectin methyltransferases [19,34,35,41]. However, a large amount of agents is needed, which are rather expensive so that these methods were not widely implemented in practice [39].

Substituting the application of liquefying pectin methyltransferase enzymes by pectin lyase reduced the methanol concentrations in apple distillates by 40–88%. The combination of mash sterilization (Section 4.1.3) and pectin lyase liquefaction resulted in an average methanol reduction of  $94 \pm 4\%$  in the same distillates [48].

#### 4.1.5. Selection of Yeast Strains and Fermentation

Microbiological control of the process could also be used to prevent methanol formation in fermented beverages. For instance, pure culture inoculation using commercial yeast in contrast to spontaneous inoculation by wild yeasts should be practiced [43]. Mashs fermented without pure yeast cultures generally lead to higher methanol levels [34]. Yeast culture selection can reduce methanol contents in the distillates by up to 20% [34].

However, the reason why there are significant differences from yeast breed to yeast breed is hypothetically due to the fact that the individual breeds apparently differ in their ability to inhibit pectin esterase and thus the release of methanol from pectin [34]. Strains of *Saccharomyces* yeasts may produce all three types of pectinolytic enzymes (see Section 4.1.4) [61]. Selection of yeasts which do not form pectin methylesterase was suggested to contribute to reduction of methanol occurrence [33]. Selected mutant *Saccharomyces cerevisiae* S12 exhibited a methanol content during wine fermentations decreased by 73% compared to that of the wild-type strain [43]. On the other hand, Rodríguez Madrera et al. reported lower methanol concentrations in apple pomace spirits fermented with indigenous yeast than with commercial wine yeast [54].

In a comparison of three different yeast types (one newly developed strain with improved genetic and physiological performances and two commercial distillers' yeasts), the new yeast showed higher methanol contents in plum and pear mashs, but not in cherry mashs [62]. In another investigation with the same yeast types, the new yeast showed lower methanol contents in plum mashs but higher in cherry mashs [55]. In a third study with these yeast types, the new yeast showed consistently lower methanol values than the commercial yeast in cherry spirits [56]. These conflicting results were interpreted by other influences on methanol content rather than a yeast influence. Similarly, different strains of yeast were used in fermentations but no significant change in the quality or quantity was noticed over time [4].

Another microbiological method for the control of methanol in fermented beverages, might be the use of methylotrophic yeast such as *Pichia methanolica* [63] and *Candida boidinii* [64] which have the capacity of utilizing pectin or the methyl ester moiety of pectin and methanol, thus preventing the accumulation of methanol in fermented products [61]. However, the application of these microorganisms for fermentation of spirits has not been demonstrated so far.

#### 4.1.6. Fermentation Conditions

The activity of the pectin methylesterase enzyme is directly linked with the temperature [65]. Increasing the temperature of the mash increases the speed of reaction until the temperature reaches a very high level where the enzyme starts denaturizing (see Section 4.1.3). Lowering the fermentation temperature from 20 °C to 12 °C with use of cold fermentation yeast may result in a 10–24% reduction in methanol release in the mash [26], but not in all cases [25,26].

#### 4.2. Storage of Fermented Mash before Distillation

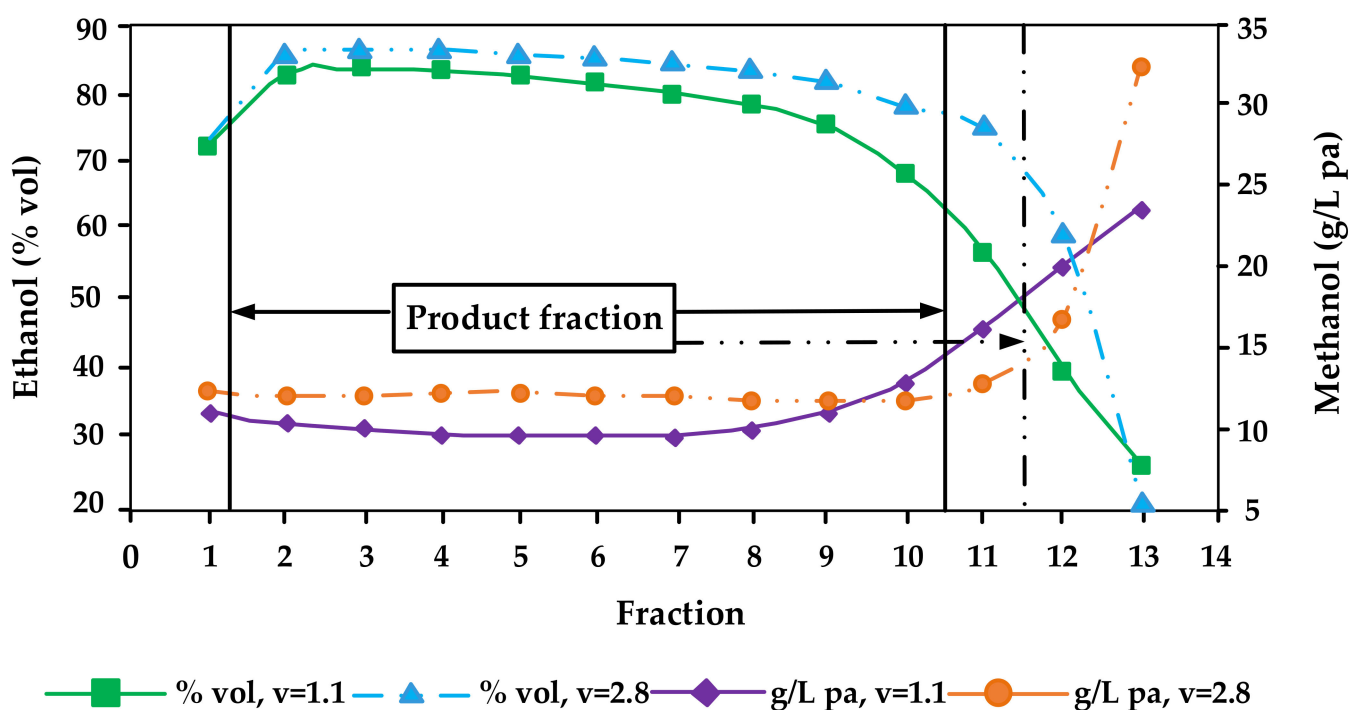
Generally, the storage time following fermentation has a major influence on the methanol release (Figure 1) [32]. Depending on the pH level, an almost 100% release can be expected after only some weeks of storage. During mash storage of 4 weeks, methanol contents increased, in some cases sharply by 15–50% [25,26]. Therefore, the optimal practice would be to conduct the distillation as soon as fermentation has been complete or at least to minimize storage time as far as possible [33].

#### 4.3. Distillation Method and Conditions

##### 4.3.1. Methanol Reduction during Pot Still Distillation

Methanol has a boiling point (64.7 °C) that is considerably lower than the ones of ethanol (78.5 °C) and water (100 °C). However, it is nevertheless difficult to separate methanol from the azeotropic ethanol-water mixture [14]. When the alcohol mixture is distilled in simple pot stills such as the ones used by most small-scale artisanal distilleries

throughout Central Europe, the solubility of methanol in water is the major factor rather than its boiling point. As methanol is highly soluble in water, it will distil over more at the end of distillations when vapours are richer in water. That means, methanol will appear in almost equal concentration in almost all fractions of pot still distillation in reference to ethanol (i.e., as g/hL pa), until the very end where it accumulates in the so-called tailings fraction (Figure 2) [4,5,14,20,32,37,40,47]. However, even today many professional distillers believe that methanol concentrates preferably in the first fractions (heads fractions). And that methanol is the reason that heads fractions smell and taste bad (which is caused by acetaldehyde and ethyl acetate but not by methanol). It is of note that single studies that suggested that methanol may be enriched in the first distillation fractions were not plausible and potentially erroneous (e.g., compare the abstract with the conclusion section in Xia et al. [22], which report completely conflicting information—from the data presented in the work it can be assumed that the study from China is in fact corroborating the studies from Europe and the United States that methanol is enriched in the tailings while the information in the abstract that it is enriched in the heads fractions is most probably a translation mistake).



**Figure 2.** Distillation characteristics of ethanol and methanol affected by different reflux ratios ( $v$ ) during distillation of Bartlett pear mashes (redrawn from [32]).

Various distillation tests carried out show that the methanol content in the product (hearts) fractions can hardly be influenced by different distillation techniques. Even in experiments with various “catalysts”, no groundbreaking findings have yet emerged. Only relatively expensive silver wool as adsorbent led to methanol reductions of up to 20% [34].

Therefore, the separation of tailings, which also has to be done for sensorial reasons, is so far the only option for a reduction of methanol during pot still distillation. The reduction of methanol contents of the product fractions in g/hL pa compared to mash may be between 20 and 30%. On the other hand, an extremely late separation of tailings can cause an increase of methanol contents of about 20% in the product fractions [39].

In general, it can be seen that the methanol content in the spirit increases with reflux ratio increases. That means the higher the reinforcement and the slower the distillation is, the higher the methanol content in the distillate [32,66] (Figure 2). Distillation parameters also had an influence on the methanol content of the distillates. Especially the dephlegmator



temperature showed a significant effect on the methanol content. Within the parameters tested using 150 L still, three trays and one dephlegmator, the decrease in methanol content varied between 16% and 36% [25].

On the other hand, Scherübel [20] suggests the following three measures to reduce methanol by improvements in pot still distillation:

- Perform double distillation: it is always advisable to carry out two subsequent distillations with regard to methanol separation
- Increase separation efficiency: The methanol separation can be increased by a simple optional parallel connection of a conventional spirits tube and a more separation-efficient column. If possible, this column should be at least partially cooled at the top to increase internal reflux and thus separation efficiency.
- Cooling at the head: When use of an additional column is not feasible, partial cooling of the spirits tube at the beginning of the second distillation can also increase the internal reflux and thus increase the separation efficiency.

In summary, there is still a bit of discrepancy regarding the influence of reflux ratios between the different studies in the literature. This can probably be explained by the wide variability of commercially available stills and legal differences (number of plates) for artisanal distilleries in different jurisdictions.

#### 4.3.2. Methanol Reduction during Large-Scale Distillation

In contrast to pot stills that typically consist of a small column (three or four plates), industrial-scale distilleries with 15 to 30 plates provide the possibility of continuous distillation and advanced regulation of distillation including processes of demethylation [39].

Methanol content can be decreased during the rectification by using demethanolization columns [33,40]. This process is efficient and successfully reduces the methanol content up to 40–90% in comparison to the starting amount. However, investment is only viable for rather big businesses with high capacity utilization [39].

A combined evaporation/condensation method to reduce methanol from distillates was patented by Capovilla [46]. The application of the method was found to reduce methanol in fruit spirits by 58–190 g/hL pa [42]. However, such methods may not be economically viable as they considerably reduce the alcohol content along with the methanol content [26]. The promised results of the evaporation/condensation method were also criticized as implausible with independent investigations showing lesser methanol reduction (9–92 g/hL pa) always connected with unacceptable losses of ethanol (up to 10% vol) [45]. All in all evaporation/condensation methods for demethanolization were judged as economically unviable specifically for smaller businesses.

#### 4.4. Storage of Distillate after Fermentation

Not much evidence is available regarding the methanol evolution during the distillates' storage and aging process. Botelho et al. [4] suggested a tendency for low amounts of methanol in advanced wood-cask aged spirits, attributable to methanol oxidation and subsequent acetalization reaction with the formation of diethoxymethane. On the other hand, methanol is expected to be quite stable in inert containers without the presence of oxygen. This is also in line with the authors' experience from validating methods for methanol determination, which suggested that methanol is a stable compound in bottled hydroalcoholic solutions [67].

Similar results were observed by Xia et al. [22]. The 270-day storage of jujube spirit in oak barrels significantly reduced its methanol content, while lower reductions were observed in plastic or stainless-steel containers. The authors explained the reduction by esterification reactions but were unable to provide explanation for the differences between container materials.

## 5. Discussion

### 5.1. Good Manufacturing Practice for Methanol Reduction Leading to Decreased Levels in Commercial Products

The only currently available review about methanol reduction possibilities has been provided by Botelho et al. [4] in the context of a more general review on quality of fruit spirits. While being less comprehensive and lacking the coverage of major studies only available in German language, the major areas influencing the methanol content in fruit spirits were in agreement with this review, namely, raw material quality, fermentation, storage, and distillation. Botelho et al. [4] concluded that the reduction of the time between fermentation and distillation being the most effective way to reduce the methanol content of the final beverage, with that suggestion to be classified as “good manufacturing practice”. This is also in agreement with the comprehensive book of Adam and Versini published by the European Commission [39].

The quality of the raw material used is a key factor which defines the quality of the spirit produced and its methanol content. Alcoholic beverages derived from materials low in pectin content (such as beer, wine or grain-based spirits such as whiskey) have typically a much lower concentration of methanol than fruit-based products. Mitigation efforts in the past were therefore focused on fruit spirits.

Previous results have shown that industry efforts and application of improved fermentation and distillation technology have led to lowered methanol levels in fruit spirits [1]. Due to the limits for methanol introduced uniformly throughout Europe in 1989, processes were developed to reduce this substance in spirits [1]. Methanol release during fermentation and distillation is not a univariate process, but a combination of several measures can effectively ensure methanol levels below legal limits.

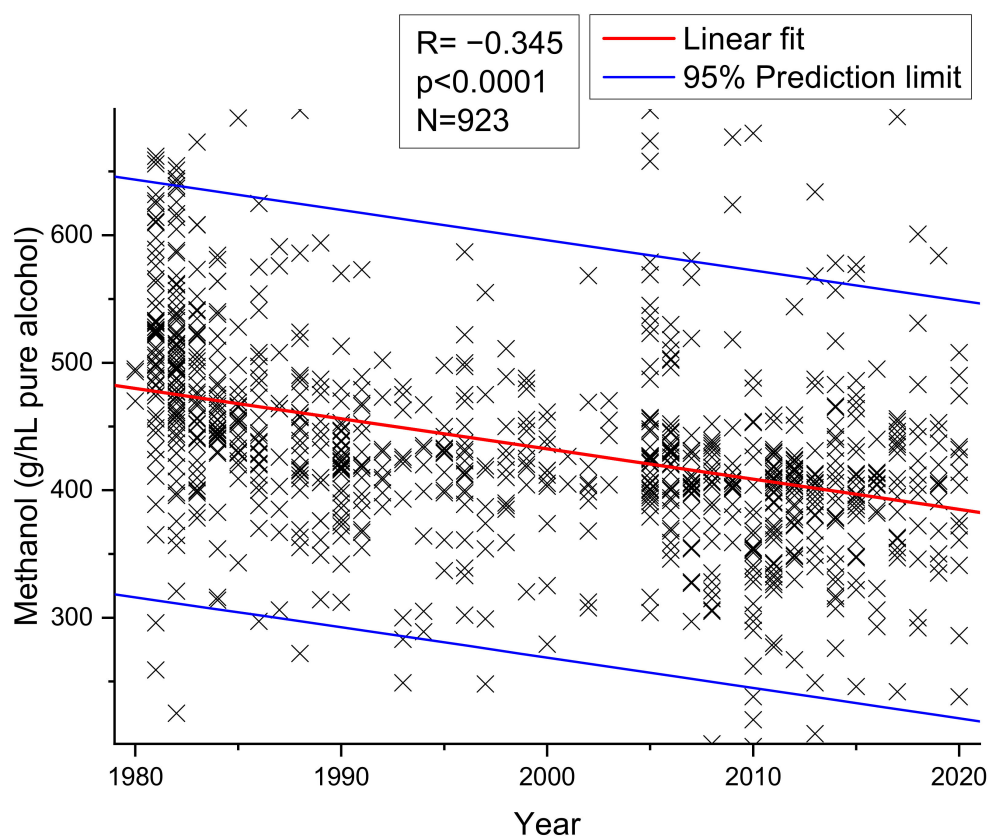
According to Glatthar et al. [32], the following mitigation measures are simple and can be applied even by small, artisanal distilleries:

- Adjust the mash pH before fermentation to pH 2.5–3.0
- Short fermentation using inoculation with yeasts followed by immediate distillation
- Do not recycle the tailings

Using these measures, a methanol content reduced by half, without changing the sensory quality of the products, can be expected.

Interestingly, all the measures discussed before may have led to considerably decreased levels of methanol in commercial products on the European market and can be seen as an excellent example of implementation of research results into practice. This may be evidenced by the efforts of the researchers to publish their results in addition to the usual peer-reviewed journals in trade journals in a format readable and understandable by distillers.

Adam and Postel [68] showed that cherry brandies tested in 1991 had almost 100 g/hL pa less methanol than cherry brandies produced before 1986. Adam and Versini [39] confirmed this trend in 1996. Own investigations of 923 cherry spirits (Figure 3), which is one of the most frequently tested product groups at the CVUA Karlsruhe as this product is traditionally a specialty of North Baden or the Black Forest, analyzed during the years 1980–2020 confirm a statistically significant linear decrease in methanol content ( $r = -0.345$ ,  $p < 0.0001$ ). Mean methanol contents decreased from an average of 500 g/hL pa in the early 1980s to an average of 400 g/hL pa at present (for methodology and details on samples 1980–2003, see [1]). None of the samples was found to exceed the EU limit of 1000 g/hL pa.



**Figure 3.** Methanol contents of 923 cherry spirits analysed between 1980 and 2020.

### 5.2. Coffee Spirits—A Special Case for Methanol Mitigation

Despite some anecdotal evidence that spirits derived from coffee cherries or coffee by-products were traditionally manufactured in some coffee-producing countries such as Nepal, there is not only extremely limited evidence on production methods [69] but also on chemical composition and specifically the methanol content of coffee cherry spirits. Especially the coffee pulp juice from wet-processing with about 3–5% of total sugars is an adequate substrate for production of ethanol [70]. For coffee mucilage from various *Coffea arabica* varieties, the pectin yield in the coffee fruit was 0.03–0.09% and methoxyl esterification degrees of 19–31% were reported [71]. Coffee pulp of *Coffea canephora* contains 2–3% pectin with a methoxyl esterification degree of about 6% [72], while higher contents were reported for *Coffea arabica* with 15% pectin in dried pulp with a methoxyl esterification degree of 63% [73]. Another study reported 11% pectin in *Coffea arabica* without specifying the esterification degree [74].

Depending on species and processing, the pectin content of *Coffea* by-products could be higher than the one in most other fruits used for spirits production, such as cherries (0.4%), apricots (1%), or apples (0.8%) [75], while the methoxyl degree of *Prunus avium* cherries was between 44% and 91% depending on extraction method and ripening stage [76]. Hence, the capacity for enzymatic methanol formation may be higher in coffee cherries than in conventional materials for fruit distillate production. From the few studies on spirits produced from coffee cherries or coffee-by products many did not investigate methanol contents [77–81], which is a bit puzzling because methanol is typically included in any standard spirits analysis [82].

Nevertheless, there are some studies on methanol in fermentations of coffee materials available (Table 2). Bonilla-Hermosa et al. [74] showed comparably low levels of methanol in coffee pulp mixed with coffee wastewater from the depulping and demucilage process of *Coffea arabica* beans. However, only the fermentation mash was analyzed in this case and no distillation was conducted. A study of spent coffee grounds fermented with

added sugar of 180 g/L also showed rather low levels of methanol. On the other hand, Somashekar and Appaiah [83] showed that solid substrate fermentation of coffee cherry husk from *Coffea canephora* with *Clavispora* and *Pichia* strains may lead to considerable levels of 7.2–10.8% methanol. The process was intended for technical alcohol production and appears as completely unsuitable for obtaining products for human consumption. While the production of technical alcohols from coffee by-products and waste-products could be an interesting valorization option, this study shows that extreme scrutiny has to be applied if spirits from coffee by-products are intended to be used as consumer products.

This concern was strengthened by the informative pilot study of Einfalt et al. [15] reporting results of coffee cherry spirit production. The mash was prepared using *Coffea arabica* cherries transported in frozen form from Thailand to Germany, where they were pulped. After lowering the pH to 3.1 using phosphoric acid/lactic acid addition, a commercial pectinase enzyme was added for liquefaction. After addition of commercial yeast, the mash was distilled after 17 days of fermentation. The methanol content in the hearts fractions was  $2600 \pm 400$  g/hL pa, which considerably exceeded the EU limit of 1000 g/hL pa and offers a safety margin of less than 2 for the level of acute toxicity of 5000 g/hL pa (see Section 3). The authors suggested that the application of pectinase and the long storage had an adverse effect on the methanol concentration [15], which is plausible considering our review results in Sections 4.1 and 4.2.

In a patented method by Bodmer and Ruder [84], whole coffee cherries were mashed with addition of 5% sugar, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid/lactic acid, and pitched with *Saccharomyces cerevisiae* yeast and diammonium phosphate. After a fermentation time of 7–14 days, the mash was double-distilled using pot still technique. The methanol contents of two coffee cherry spirits were 684 and 573 g/hL pa. While the production method with addition of sugar is not compliant with the EU regulation for fruit spirits, where the products' ethanol must exclusively originate from fruits [23], this also lowers the relative methanol content by increasing the ethanol content. Hence, it can be deduced from the results that a coffee cherry spirit production according to the patented method, excluding artificial sugar addition, would lead to a methanol limit exceedance similar to the results of Einfalt et al. [15].

In conclusion, apart from the lack of novel food approval [85], none of the coffee cherry spirits presented so far would have been compliant with the EU spirits regulation. It is clearly necessary to apply the gathered knowledge about methanol mitigation possibilities in further research of this interesting novel type of spirit, so that compliant coffee cherry spirits will hopefully be available in the future.

**Table 2.** Methanol content in spirits produced from coffee cherries and coffee by-products.

Raw Material	Methanol Content	Compliance with EU Regulation for Fruit Spirits <sup>1</sup>	References
Coffee cherry	$2600 \pm 400$ g/hL pa	no <sup>2</sup>	[15]
Coffee cherry + 5% sugar	573–684 g/hL pa	no <sup>3</sup>	[84]
Coffee cherry husk	7–11%	(non-food product)	[83]
Coffee pulp mixed with coffee wastewater (1:10)	40–128 µg/L (in mash)	(no distillation conducted) <sup>4</sup>	[74]
Spent coffee grounds + 18% sugar	$11 \pm 3$ mg/L ( $44 \pm 12$ g/hL pa <sup>5</sup> )	no <sup>4</sup>	[86]

<sup>1</sup> This does not suggest general compliance with EU food regulations. Novel food approval is needed in the EU for most coffee by-products and derivative products before being placed on the market [85]. <sup>2</sup> Exceedance of general methanol limit for fruit spirits of 1000 g/hL pa [23]. <sup>3</sup> The production method with added sugar is not compliant with EU regulations for fruit spirits; without sugar addition, the methanol limit of 1000 g/hL pa would have likely been exceeded. <sup>4</sup> Fruit spirit ethanol must exclusively originate from fresh fruits [23] and not from waste products such as spent coffee grounds or wastewater. Potential compliance in another spirit drinks' category or as a generic 'spirit drink' needs to be checked. <sup>5</sup> Recalculation (alcoholic strength at 40% vol).

## 6. Conclusions

The methanol content is among the key parameters for determining the regulatory compliance of spirits and other alcoholic beverages. The mitigation measures developed over the last decades allowed industry not only to conform to the EU standards but also to increase the margin of safety by generally lowering the methanol content in the category of fruit spirits.

Interestingly, coffee cherry pulp, which is produced in large quantities as a by-product of coffee manufacturing, was proposed as a material to produce spirits. Very high concentrations of methanol were found in coffee cherry spirit compared to other fruit spirits. Hence it is specifically necessary to mitigate the methanol content in these spirits to uphold the legal requirements and to protect public health from this potential hazard.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.W.L.; methodology, D.W.L.; formal analysis, D.W.L. and K.S.; investigation, P.B. and M.C.S.; resources, D.W.L.; data curation, D.W.L.; writing—original draft preparation, D.W.L.; writing—review and editing, P.B., M.C.S., D.E., J.R.-Z., A.Q.B., K.S., S.S.; visualization, D.W.L.; supervision, D.W.L. and S.S.; project administration, D.W.L. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** Aliazam7786/Fiverr is thanked for redrawing Figures 1 and 2.

**Conflicts of Interest:** S.S. is owner of and P.B., M.C.S. and J.R.Z. are consultants for Coffee Consulate, Mannheim, Germany. Coffee Consulate is an independent training and research center. A.Q.B. is owner of Finca La Buena Esperanza, a coffee plantation in El Salvador. Coffee Consulate and Finca La Buena Esperanza are currently researching the potential of coffee by-products for production of spirits. Neither of them are currently commercializing spirits produced from coffee by-products. Therefore, S.S., P.B., M.C.S., J.R.-Z., and A.Q.B. report no conflict of interest related to the work under consideration. The other authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lachenmeier, D.W.; Musshoff, F. Volatile congeners in alcoholic beverages. Retrospective trends, batch comparisons and current concentration ranges. *Rechtsmed* **2004**, *14*, 454–462. [[CrossRef](#)]
2. Paine, A.J.; Dayan, A.D. Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Hum. Exp. Toxicol.* **2001**, *20*, 563–568. [[CrossRef](#)]
3. Lachenmeier, D.W.; Rehm, J.; Gmel, G. Surrogate alcohol: What do we know and where do we go? *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2007**, *31*, 1613–1624. [[CrossRef](#)]
4. Botelho, G.; Anjos, O.; Estevinho, L.M.; Caldeira, I. Methanol in grape derived, fruit and honey spirits: A critical review on source, quality control, and legal limits. *Processes* **2020**, *8*, 1609. [[CrossRef](#)]
5. Bindler, F.; Voges, E.; Laugel, P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Addit. Contam.* **1988**, *5*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Belackova, V.; Janikova, B.; Vacek, J.; Fidesova, H.; Miovsky, M. “It can’t happen to me”: Alcohol drinkers on the 2012 outbreak of methanol poisonings and the subsequent prohibition in the Czech Republic. *Nord. Stud. Alcohol Drugs* **2017**, *34*, 385–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Neufeld, M.; Lachenmeier, D.; Hausler, T.; Rehm, J. Surrogate alcohol containing methanol, social deprivation and public health in Novosibirsk, Russia. *Int. J. Drug Policy* **2016**, *37*, 107–110. [[CrossRef](#)]
8. Davis, L.E.; Hudson, D.; Benson, B.E.; Jones Easom, L.A.; Coleman, J.K. Methanol poisoning exposures in the United States: 1993–1998. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **2002**, *40*, 499–505. [[CrossRef](#)]
9. Okaru, A.O.; Rehm, J.; Sommerfeld, K.; Kuballa, T.; Walch, S.G.; Lachenmeier, D.W. The threat to quality of alcoholic beverages by unrecorded consumption. In *Alcoholic Beverages. Volume 7: The Science of Beverages*; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 1–34. [[CrossRef](#)]
10. Neufeld, M.; Lachenmeier, D.W.; Ferreira-Borges, C.; Rehm, J. Is alcohol an “essential good” during COVID-19? Yes, but only as a disinfectant! *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2020**, *44*, 1906–1909. [[CrossRef](#)]
11. Lachenmeier, D.W.; Neufeld, M.; Rehm, J. The impact of unrecorded alcohol use on health: What do we know in 2020? *J. Stud. Alcohol Drugs* **2021**, *82*, 28–41. [[CrossRef](#)]
12. Haffner, H.T.; Graw, M.; Besserer, K.; Blickle, U.; Henssge, C. Endogenous methanol: Variability in concentration and rate of production. Evidence of a deep compartment? *Forensic Sci. Int.* **1996**, *79*, 145–154. [[CrossRef](#)]

13. Lindinger, W.; Taucher, J.; Jordan, A.; Hansel, A.; Vogel, W. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1997**, *21*, 939–943. [CrossRef] [PubMed]
14. Spaho, N. Distillation techniques in the fruit spirits production. In *Distillation—Innovative Applications and Modeling*; Mendes, M., Ed.; InTechOpen Limited: London, UK, 2017. [CrossRef]
15. Einfalt, D.; Meissner, K.; Kurz, L.; Intani, K.; Müller, J. Fruit spirit production from coffee cherries—Process analysis and sensory evaluation. *Beverages* **2020**, *6*, 57. [CrossRef]
16. Krapfenbauer, G.; Sämann, H.; Karner, M.; Gössinger, M. Effect of several parameters of harvesting and processing of fruit mashes on the methanol content and the sensory profile of distillates. *Mitt. Klosterneuburg* **2007**, *57*, 94–107. (In German)
17. Zhang, H.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D. Influence of pectinase treatment on fruit spirits from apple mash, juice and pomace. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1909–1913. [CrossRef]
18. Hang, Y.D.; Woodams, E.E. Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1396–1398. [CrossRef]
19. Tuszyński, T. Changes in the degree of pectin demethylation during fermentation of fruit musts. *Nahrung* **1989**, *33*, 183–189. [CrossRef]
20. Scherübel, P. *The Mystery of Methanol. A Constant Companion in Fruit Brandy?* Technische Universität Graz: Graz, Austria, 2018. (In German)
21. Pieper, H.J.; Bruchmann, E.-E.; Kolb, E. *Technologie der Obstbrennerei*; Ulmer: Stuttgart, Germany, 1993.
22. Xia, Y.; Ma, Y.; Hou, L.; Wang, J. Studies of boil treatment on methanol control and pilot factory test of jujube brandy. *Int. J. Food Eng.* **2017**, *13*, 20160095. [CrossRef]
23. European Parliament and Council. Regulation (EU) 2019/787 of the European Parliament and of the Council of 17 April 2019 on the Definition, Description, Presentation and Labelling of Spirit Drinks, the Use of the Names of Spirit Drinks in the Presentation and Labelling of Other Foodstuffs, the Protection of Geographical Indications for Spirit Drinks, the Use of Ethyl alcohol and Distillates of Agricultural Origin in Alcoholic Beverages, and Repealing Regulation (EC) No 110/2008. *Off. J. Europ. Union* **2019**, *L130*, 1–54.
24. Lachenmeier, D.W.; Schoeberl, K.; Kanteres, F.; Kuballa, T.; Sohnius, E.-M.; Rehm, J. Is contaminated alcohol a health problem in the European Union? A review of existing and methodological outline for future studies. *Addiction* **2011**, *106* (Suppl. 1), 20–30. [CrossRef]
25. Gössinger, M. Influence of Processing Methods on the Methanol Content in Fruit Distillates. 2003. Available online: [https://www.dafne.at/dafne\\_plus\\_homepage/index.php?section=dafneplus&content=result&come\\_from=homepage&&project\\_id=975&page=51&limit=20](https://www.dafne.at/dafne_plus_homepage/index.php?section=dafneplus&content=result&come_from=homepage&&project_id=975&page=51&limit=20) (accessed on 17 February 2021). (In German).
26. Gössinger, M.; Krapfenbauer, G.; Sämann, H.; Brandes, W.; Karner, M.; Hick, S.; Neururer, T. Tips for the distiller: Methanol. *Kleinbrennerei* **2006**, *58*, 8–11. (In German)
27. Lachenmeier, D.W. Advances in the detection of the adulteration of alcoholic beverages including unrecorded alcohol. In *Advances in Food Authenticity Testing*; Downey, G., Ed.; Woodhead Publishing, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 565–584. [CrossRef]
28. Kruse, J.A. Methanol poisoning. *Intensive Care Med.* **1992**, *18*, 391–397. [CrossRef] [PubMed]
29. WHO. *Information Note. Methanol Poisoning Outbreaks*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
30. Zhang, H.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D. Factors affecting the methanol content and yield of plum brandy. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, T79–T82. [CrossRef] [PubMed]
31. Kana, K.; Kanellaki, M.; Papadimitriou, A.; Koutinas, A.A. Cause of and methods to reduce methanol content of Tsicoudia, Tsipouro and Ouzo. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1991**, *26*, 241–247. [CrossRef]
32. Glatthar, J.; Senn, T.; Pieper, H.J. Investigations on reducing the methanol content in distilled spirits made of bartlett. *Deut. Lebensm. Rundsch.* **2001**, *97*, 209–216.
33. Nikicevic, N.; Tešević, V. Possibilities for methanol content reduction in plum brandy. *J. Agricult. Sci.* **2005**, *50*, 49–60. [CrossRef]
34. Bartels, W. Reduction of Methanol in Fruit Spirits with Special Reference to Williams-Christ, Plum and Grape Marc Spirits. 1998. Available online: <https://www.landwirtschaft-bw.info/pb/,Lde/Startseite/Service/Reduzierung+von+Methanol+in+Obstbraenden> (accessed on 17 February 2021). (In German)
35. Pieper, H.J.; Oplustil, E.; Barth, G. Reduction of methanol formation during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.* **1980**, *2*, 391–396. [CrossRef]
36. 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* **2004**, *38*, 225–230. [CrossRef]
37. Tanner, H. About the production of fruit spirits with low methanol content. *Schweiz. Z. Obst Weinbau* **1970**, *106*, 625–629. reprinted in *Alk. Ind.* **1972**, *85*, 27–29. (In German)
38. Tanner, H. On the use of mash heating to reduce the methanol content in fruit brandies. *Kleinbrennerei* **1971**, *23*, 95–96. (In German)
39. Adam, L.; Versini, G. *A Study on the Possibilities to Lower the Content of Methyl-Alcohol in Eaux-de-Vie de Fruits*; European Commission: Brussels, Belgium, 1996; Available online: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/0b908be6-2673-45a5-8c2f-b3b6abc1aa37> (accessed on 29 March 2021).

40. Adam, L.; Meinel, J. Methanol reduction in fruit spirits (II). Technological possibilities and their effects. *Kleinbrennerei* **1995**, *47*, 107–113. (In German)
41. Miljic, U.; Puskas, V.; Vucurovic, V. Investigation of technological approaches for reduction of methanol formation in plum wines. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 635–643. [[CrossRef](#)]
42. Scholten, G.; Kacprowski, M. Methanol in spirits—The problem and the solution. *Kleinbrennerei* **1998**, *50*, 6–8. (In German)
43. Liang, M.H.; Liang, Y.J.; Chai, J.Y.; Zhou, S.S.; Jiang, J.G. Reduction of methanol in brewed wine by the use of atmospheric and room-temperature plasma method and the combination optimization of malt with different adjuncts. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, M2308–M2314. [[CrossRef](#)]
44. Adam, L. Possibilities of methanol reduction in Bartlett pear distillates using traditional methods of production. *Riv. Sci. Aliment.* **1995**, *24*, 417–425.
45. Nusser, R.; Adam, L.; Engel, K.-H. Investigations into the reduction of methanol content in spirits using evaporation processes. *Kleinbrennerei* **2000**, *52*, 5–8. (In German)
46. Capovilla, V.R. Process for After-Treatment of Crude Distillate. European Patent EP0812607B1, 13 June 1997.
47. Adam, L. Methanol reduction in fruit spirits (I). Technological possibilities and their effects. *Kleinbrennerei* **1995**, *47*, 76–81. (In German)
48. Senn, T. The role of enzyme products—Less methanol in pome fruit mash and distillates. *Kleinbrennerei* **2017**, *69*, 4–7. (In German)
49. Einfalt, D. Process parameters for high quality in fruit brandy production. In Proceedings of the 1st International Conference & Exhibition—Spirit of Rakia, Pula, Croatia, 27–30 March 2019.
50. European Council. Council Regulation (EEC) No 1576/89 Laying Down General Rules on the Definition, Description and Presentation of Spirit Drinks. *Off. J. Europ. Comm.* **1989**, *L160*, 1–17.
51. Andraous, J.I.; Claus, M.J.; Lindemann, D.J.; Berglund, K.A. Effect of liquefaction enzymes on methanol concentration of distilled fruit spirits. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 199–201.
52. Tanner, H. About acid and enzyme treatment of distilling mashes. *Schweiz. Z. Obst Weinbau* **1980**, *116*, 357–360. (In German)
53. Gössinger, M.; Krapfenbauer, G.; Sämann, H.; Hick, S.; Karner, M. Influence of different mash and fermentation parameters on the resulting methanol contents in fruit mashes. *Mitt. Klosterneuburg* **2006**, *56*, 46–53. (In German)
54. Rodríguez Madrera, R.; Pando Bedrinana, R.; García Hevia, A.; Arce, M.B.; Suárez Valles, B. Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. *Food Bioprod. Proc.* **2013**, *91*, 623–631. [[CrossRef](#)]
55. Schehl, B.; Lachenmeier, D.W.; Senn, T.; Heinisch, J.J. Effect of the stone content on the quality of plum and cherry spirits produced from mash fermentations with commercial and laboratory yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8230–8238. [[CrossRef](#)]
56. Schehl, B.; Senn, T.; Lachenmeier, D.W.; Rodicio, R.; Heinisch, J.J. Contribution of the fermenting yeast strain to ethyl carbamate generation in stone fruit spirits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 843–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. 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.* **2005**, *29*, 367–380. [[CrossRef](#)]
58. Satora, P.; Tuszyński, T. Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 418–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Denes, J.M.; Baron, A.; Renard, C.M.; Pean, C.; Drilleau, J.F. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 385–393. [[CrossRef](#)]
60. Chaayasut, C.; Jantavong, S.; Kuratama, C.; Peerajan, S.; Sirilun, S.; Shank, L. Factors affecting methanol content of fermented plant beverage containing *Morinda citrifolia*. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 4356–4363. [[CrossRef](#)]
61. Ohimain, E.I. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: The microbial dimension. *SpringerPlus* **2016**, *5*, 1607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Schehl, B.; Müller, C.; Senn, T.; Heinisch, J.J. A laboratory yeast strain suitable for spirit production. *Yeast* **2004**, *21*, 1375–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nakagawa, T.; Yamada, K.; Fujimura, S.; Ito, T.; Miyaji, T.; Tomizuka, N. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology* **2005**, *151*, 2047–2052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nakagawa, T.; Miyaji, T.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Kato, N.; Tomizuka, N. A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4253–4257. [[CrossRef](#)]
65. Gonzalez, S.L.; Rosso, N.D. Determination of pectin methylesterase activity in commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potentiometric procedures. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2011**, *31*, 412–417. [[CrossRef](#)]
66. Ande, B. Possibilities of Aroma Enrichment and Aroma Improvement in Fruit Brandies with Simple Stills. Ph.D. Thesis, University of Hohenheim, Hohenheim, Germany, 2004. (In German).
67. Teipel, J.C.; Hausler, T.; Sommerfeld, K.; Scharinger, A.; Walch, S.G.; Lachenmeier, D.W.; Kuballa, T. Application of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy as spirit drinks screener for quality and authenticity control. *Foods* **2020**, *9*, 1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Adam, L.; Postel, W. A new type of cherry spirit? *Branntweinwirtschaft* **1992**, *132*, 110–114. (In German)
69. Lopes, A.C.A.; Eda, S.H.; Andrade, R.P.; Amorim, J.C.; Duarte, W.F. New alcoholic fermented beverages—Potentials and challenges. In *Fermented Beverages. Volume 5: The Science of Beverages*; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 577–603. [[CrossRef](#)]

70. Calzada, J.F.; Garcia, R.; Porres, C.; Rolz, C. Integrated utilization of coffee processing by-products and wastes. *Int. Biosyst.* **1989**, *2*, 41–51.
71. Garcia, R.; Arriola, D.; de Arriola, M.C.; de Porres, E.; Rolz, C. Characterization of coffee pectin. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1991**, *24*, 125–129.
72. Manasa, V.; Padmanabhan, A.; Anu Appaiah, K.A. Utilization of coffee pulp waste for rapid recovery of pectin and polyphenols for sustainable material recycle. *Waste Manag.* **2021**, *120*, 762–771. [[CrossRef](#)]
73. Reichembach, L.H.; de Oliveira Petkowicz, C.L. Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *245*, 116473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bonilla-Hermosa, V.A.; Duarte, W.F.; Schwan, R.F. Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresour. Technol.* **2014**, *166*, 142–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Baker, R.A. Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 225–229. [[CrossRef](#)]
76. Batisse, C.; Fils-Lycaon, B.; Buret, M. Pectin changes in ripening cherry fruit. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 389–393. [[CrossRef](#)]
77. Tehrani, N.F.; Aznar, J.S.; Kiros, Y. Coffee extract residue for production of ethanol and activated carbons. *J. Clean. Prod.* **2015**, *91*, 64–70. [[CrossRef](#)]
78. Bassoli, D.G. Spirits Prepared from Cold Brew Coffee Grounds. U.S. Patent 20190390147A1, 26 December 2019.
79. Navia, D.P.; Velasco, R.J.; Hoyos, J.L. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. *Vitae* **2011**, *18*, 287–294.
80. Gouvea, B.M.; Torres, C.; Franca, A.S.; Oliveira, L.S.; Oliveira, E.S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1315–1319. [[CrossRef](#)]
81. Lopes, A.C.A.; Andrade, R.P.; de Oliveira, L.C.C.; Lima, L.M.Z.; Santiago, W.D.; de Resende, M.L.V.; das Gracas, C.M.; Duarte, W.F. Production and characterization of a new distillate obtained from fermentation of wet processing coffee by-products. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 4481–4491. [[CrossRef](#)]
82. Lachenmeier, D.W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chem.* **2007**, *101*, 825–832. [[CrossRef](#)]
83. Somashekar, K.L.; Anu Appaiah, K.A. Coffee cherry husk—A potential feed stock for alcohol production. *Int. J. Environ. Waste Manag.* **2013**, *11*, 410–419. [[CrossRef](#)]
84. Bodmer, S.; Ruder, F. Coffee Cherries' Spirit and Its Process of Manufacture. European Patent EP1593735B1, 7 May 2004.
85. Klingel, T.; Kremer, J.I.; Gottstein, V.; Rajcic de, R.T.; Schwarz, S.; Lachenmeier, D.W. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods* **2020**, *9*, 665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Sampaio, A.; Dragone, G.; Vilanova, M.; Oliveira, J.M.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *LWT Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 557–563. [[CrossRef](#)]



Обзор

## Снижение содержания метанола при производстве фруктовых спиртных напитков с особым вниманием к новым кофейно-вишневым спиртным напиткам

Патрик Блюменталь<sup>1,2</sup>, Марк С. Стегер<sup>1</sup>, Даниэль Эйнфальт<sup>2</sup>, Йорг Рике-Цапп и<sup>1</sup>, Андрес Кинтанилья Белуччи<sup>3</sup>, Катарина Зоммерфельд<sup>1</sup>, Стеффен Шварц<sup>1</sup>, Дирк В. Лакенмайер<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Кофейное консульство, Hans-Thoma-Strasse 20, 68163 Мангейм, Германия; patrik.blumenthal@live.de (PB); marcsteger2@googlemail.com (MCS); joerg.rieke\_zapp@yahoo.de (JR-Z.); schwarz@coffee-consulate.com (CC)

<sup>2</sup> Генетика дрожжей и технология ферментации, Институт пищевой науки и биотехнологии, Университет Хоэнхайма, Гарбенштрассе 23, 70599 Штутгарт, Германия; daniel.einfalt@uni-hohenheim.de

<sup>3</sup> Finca La Buena Esperanza, Pasaje Senda Florida Norte 124, Сан-Сальвадор, Сальвадор; coffeelbe@gmail.com

<sup>4</sup> Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Карлсруэ, Weissenburger Strasse 3, 76187 Карлсруэ, Германия; katharina.sommerfeld@cvuaka.bwl.de

\* Переписка: lachenmeier@web.de; Тел.: +49-721-926-5434

**Резюме:** Метанол является натуральным ингредиентом, который в основном встречается в фруктовых спиртных напитках, таких как яблочный, грушевый, сливовый или вишневый, а также в спиртах, изготовленных из кофейной мякоти. Соединение образуется во время ферментации и последующего хранения затора путем ферментативного гидролиза природных пектинов. Метанол токсичен при превышении определенных пороговых уровней, и в большинстве юрисдикций установлены правовые ограничения.

Поэтому содержание метанола необходимо снижать и контролировать его уровень. В этой статье будут рассмотрены несколько факторов, влияющих на содержание метанола, включая значение pH затора, добавление различных дрожжей и ферментных препаратов, температуру ферментации, хранение затора и, что наиболее важно, качество сырья и гигиены. Из всех этих возможностей смягчения снижения значения pH и использование культивируемых дрожжей при затирании фруктовых субстанций уже сегодня являются общепринятой практикой. Кроме того, контролируемое дрожжевое брожение при кислом pH способствует не только снижению образования метанола, но в конечном итоге также приводит к улучшению качества дистиллята. Особую осторожность следует соблюдать в отношении спиртных напитков, изготовленных из побочных продуктов кофе, которые подвержены порче из-за очень высокого содержания метанола, о чем сообщалось в прошлых исследованиях.

**Ключевые слова:** алкогольные напитки; духи; метанол; снижение риска; правовые ограничения; контроль качества



Образец цитирования: Блюменталь, П.; Стегер, МС; Эйнфальт, Д.; Рике-Цапп, Дж.; Кинтанилья Белуччи, А.; Зоммерфельд, К.; Шварц, С.; Лакенмайер, Д.У.

Снижение содержания метанола при производстве фруктовых спиртных напитков с особым вниманием к новым кофейно-вишневым спиртным напиткам. Молекулы 2021, 26, 2585. <https://doi.org/10.3390/moleculы26092585>

Академический редактор: Клаудио Ферранте

Получено: 29 марта 2021 г.

Принято: 23 апреля 2021 г.

Опубликовано: 28 апреля 2021 г.

Примечание издателя: MDPI остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Copyright: © 2021 авторы.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе распространяется на условиях и условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Введение

Метанол — это спирт, который обычно содержится практически во всех видах алкогольных напитков и некоторых других ферментированных пищевых продуктах [1–5]. Метанол может попадать в алкогольные напитки двумя основными путями: естественным (разложение пектина) и искусственным (фальсификация путем незаконного добавления чистого соединения). Только последний путь (фальсификация) обычно связан с серьезной заболеваемостью и смертностью из-за отравления метанолом [6–9]. Хотя фальсификация по-прежнему распространена, а количество случаев увеличилось из-за нехватки алкоголя во время пандемии COVID-19 [10], эта статья будет посвящена исключительно первому пути, естественному содержанию метанола в спиртных напитках и его уменьшению. Что касается смягчения проблем, связанных с добавлением метанола, мы недавно представили отдельный обзор [11].

В организме человека метанол может эндогенно присутствовать в низких концентрациях [12,13], в то время как в большинстве алкогольных напитков, таких как пиво и вино, естественное содержание метанола также достаточно низкое. Это отличается от фруктовых спиртных напитков, поэтому основное внимание в мерах по снижению содержания метанола уделяется этому виду напитков.

Спиртные напитки - это алкогольные напитки, в которых в качестве сырья используются фрукты или другие сахаросодержащие части растений. Их получают путем спиртового брожения с последующей дистилляцией [14].

В странах Центральной Европы и в России, а также в Азии и во многих странах Америки домашнее или кустарное мелкосерийное производство спиртных напитков имеет давнюю традицию, при этом обычно предпочтение отдается сахаросодержащим материалам региона. Например, страны Центральной Европы в основном используют фрукты, такие как вишня, яблоки и сливы, в то время как другие регионы сосредоточены на зерне (Восточная Европа) или материалах из сахарного тростника (Центральная и Южная Америка). Из всех природных материалов, используемых для ферментации, фрукты связаны с самыми высокими концентрациями метанола в конечном продукте из-за содержания в них пектина. Обычно косточковые плоды рода *Prunus* (вишня, слива) и семечковые плоды родов *Malus* и *Pyrus* (яблоки, груши) связаны с самыми высокими уровнями метанола.

Совсем недавно кофейные ягоды (род *Coffea*) были идентифицированы как фрукты, которые, возможно, приводят к сравнительно высоким уровням метанола в их спиртах [15].

Концентрация метанола в спиртах тесно связана с активностью ферментов во фруктах и в процессе спиртового брожения. Активность пектинметилэстеразы (1) может происходить эндогенно из самих плодов, а также во время спиртового брожения под действием пектинметилэстеразы, образующейся в результате метаболизма дрожжей или других микроорганизмов [16–18].

Активность пектинметилэстеразы также может быть экзогенно введена добавлением некоторых препаратов пектолитических ферментов. Незначительным путем может быть термическое деметилирование пектинов [19].



Когда метанол высвобождается из пектина фруктов, он неизбежно становится частью мякоти [20]. Его уровень зависит от степени этерификации пектина внутри плодов и зависящего от плода соотношения сахара и пектина [5,21]. Другим предполагаемым путем образования метанола в богатых белком фруктах, таких как *Jeju* (китайский финик, *Ziziphus jujube* Mill.), было дезаминирование глицина с последующим декарбосилированием и реакцией с нитритом при использовании удобрений [22].

Европейский союз (ЕС) регламентирует максимальное содержание метанола в спиртах в зависимости от используемого сырья [4,23,24]. Для этилового спирта сельскохозяйственного происхождения максимальный уровень содержания метанола составляет 30 г/г 100% об. спирта (чистый спирт, год), а для водки – 10 г/г год, а самый низкий уровень определен для лондонского джина с 5 г/г в год. Пределы выше для материалов на фруктовой основе: для винного спирта 200 г/г в год, для виноградных выжимок и сидра 1000 г/г в год, для фруктовых выжимок 1500 г/г в год, для фруктовых спиртов в целом 1000 г/г в год, кроме 1200 г/г в год для яблок, абрикосов, сливы, мирабель, персика, груши, ежевики и малины и 1350 г/г в год для айвы, груши Вильямса и некоторых других ягод [23]. Хотя эти ограничения ЕС установлены для снижения токсического воздействия на организм человека, они также были сочтены довольно низкими и для некоторых видов фруктов сложными для соблюдения небольшими кустарными производителями спиртных напитков [25]. Более низкие ограничения в других странах, таких как США, также могут запрещать экспорт фруктовых спиртов в эти страны [26].

В этой статье будут рассмотрены возможности контроля и снижения содержания метанола в фруктовых спиртах, а также описаны некоторые первоначальные наблюдения за новым спиртом, приготовленным из кофейных ягод.

## 2. Материалы и методы

Исследование базы данных в январе 2021 года было проведено в Google Scholar и PubMed с использованием комбинации ключевых слов «метанол», «восстановление» и «спиртные напитки» или «алкогольные напитки». Вскоре стало очевидно, что проиндексированная международная литература содержит лишь несколько ссылок на эту тему. По этой причине бумажная коллекция авторов была проверена на наличие ключевых слов для выявления серой литературы, в основном в отраслевых журналах на немецком языке. Списки литературы всех идентифицированных статей были проверены на наличие отсутствующих ссылок. Описательный обзор был составлен на основе имеющихся доказательств.

## 3. Токсичность метанола в алкогольных напитках Метанол

представляет собой бесцветную жидкость и легко воспламеняется. Это простейший спирт с широким спектром промышленного применения. Метанол также является естественным ингредиентом алкогольных напитков.

напитки и спиртные напитки. Чтобы гарантировать, что остаточное содержание метанола, присутствующего в спирте, безопасно, необходимо строго контролировать содержание метанола [2,27].

Метанол является одним из немногих соединений, встречающихся в пищевых продуктах, для которых имеются отличные данные о токсичности для человека. Эти данные в основном основаны на опыте отравлений метанолсодержащими спиртами, которые, к сожалению, все еще регулярно происходят во всем мире в связи с неучтенным и незаконным употреблением алкоголя [11]. Метанол метаболизируется в организме до его токсичных метаболитов, формальдегида и муравьиной кислоты. Накопление муравьиной кислоты может вызвать метаболический ацидоз, включая поражение сетчатки, центральной нервной системы и других органов [2,28].

Следует прямо отметить, что такие отравления, как правило, происходят от добавления метанола к спиртным напиткам (чаще всего встречающимся на нелегальном рынке), в то время как естественное содержание в результате брожения из фруктов обычно не превышает уровней, вызывающих острую токсичность [11].

О вспышках отравлений сообщалось во всех регионах мира, число жертв которых варьировалось от нескольких до более 800 человек, а в некоторых случаях летальность превышала 30% [29].

Paine и Dayan [2] сообщили, что низкие концентрации метанола, встречающиеся в природе в большинстве алкогольных напитков, не причиняют никакого вреда. По данным ВОЗ [29], концентрация метанола в типичных пределах 6–27 мг/л в пиве и 10–220 мг/л в крепких спиртных напитках не является вредной.

Paine и Dayan [2] также сообщили, что суточная переносимая, практически безопасная доза метанола для взрослого человека составляет 2 г, а токсическая доза — 8 г. Для питьевого объема 100 мл спирта с концентрацией 40% по объему допустимая концентрация метанола составляет 2% по объему (т. е. 5000 г/г в год). Следовательно, общий предел ЕС для встречающегося в природе метанола в фруктовых спиртах в 1000 г/г в год [23] обеспечивает запас прочности около 5 для активных потребителей фруктовых спиртов. По сравнению с другими токсичными компонентами пищевых продуктов этот предел довольно низок, поэтому пределы должны строго контролироваться и соблюдаться промышленностью. Принимая во внимание потребность в предупредительной защите здоровья населения, очевидно, разумно снизить содержание метанола в фруктовых спиртах до разумно достижимого низкого уровня (принцип ALARA).

#### 4. Факторы, влияющие на содержание метанола в спиртных

напитках. В таблице 1 представлен обзор основных методов и подходов к снижению содержания метанола в спиртных напитках. Исходя из своего опыта практической работы в области контроля спиртных напитков и технологии дистилляции, авторы также дают суждения о применимости подходов с учетом как практических, так и экономических аспектов. В следующих разделах каждый подход рассматривается более подробно.

Таблица 1. Краткое изложение основных методов снижения содержания метанола при производстве фруктовых спиртов.

Метод	Снижение метанола 1 потенциал	Мнение авторов о применимости	Рекомендации
Улучшение качества сырья	до 40%	Исходный материал чрезвычайно важен, а его тип и качество сильно влияют на содержание метанола. Удаление богатых пектином частей фруктов, таких как кожура, может снизить содержание метанола.	[4,16,25,30,31]
Подкисление браги	До 50%	Подкисление браги тормозит активность пектинметилэстеразы. Он также ингибирует микроорганизмы, вызывающие порчу, которые могут продуцировать пектинметилэстеразу.	[25,32–36]
Стерилизация браги	40–90%	Температурная обработка эффективно денатурирует ферменты пектинметилэстеразы. Высокая потребность в энергии и нецелесообразно для кустарных дистилляторов.	[18,22,31,37–41]
Сокращено время хранения сброженной браги перед перегонкой.	До 50%	Время хранения следует избегать или свести к минимуму, насколько это возможно, поскольку сообщалось о резком увеличении содержания метанола во время хранения.	[26,32,33]

Таблица 1. Продолжение

Метод	Снижение метанола потенциал <sup>1</sup>	Мнение авторов о Применимость	Рекомендации
Выбор подходящих дрожжей штаммы	до 25%	Дрожжи с низкой производительностью предпочтительна пектинметилэстераза.	[4,30,42,43]
Снижение ферментации температура	до 25%	Низкие температуры и использование холода рекомендуются дрожжи для брожения.	[26]
Улучшение дистилляции метод и условия	до 80%	Метанол обогащается в хвостах. Ранее нарезка (не ниже 50% об.). Без переработки хвостов.	[4,14,20,22,30,32–34,44]
Деметанолизация после дистилляция	50–90%	Эффективен в промышленности, но не применим для небольшие кустарные дистилляторы, высокие расход	[39,40,42,44–46]
Предотвращение разжижения ферменты	до 20%	Избегайте ферментов пектинметилэстеразы которые выделяют метанол.	[4,22,26,34,39,42,47]
Применение альтернативных ферменты разжижения	до 88%	Заменитель пектинметилэстеразы ферменты ферментами пектинлиазы для уменьшить выделение метанола	[48,49]

<sup>1</sup> Оценка авторов при наличии нескольких исследований.

#### 4.1. Сырье, приготовление мезги и ферментация

До привлечения внимания промышленности к проблеме метанола и введения ЕС максимальных ограничений в первом регламенте по спиртным напиткам в 1989 г. [50], так называемые Ферменты-разжижители часто применялись при приготовлении затора. В дополнение к желаемой активности гидролиза пектина эти ферменты также обладали активностью пектинэстеразы, что приводило к образованию метанола в пять-шесть раз выше, чем в необработанном фруктовом сусле [17,51,52]. Такие обычные, неспецифические ферменты следует использовать с осторожностью — если вообще — и только при условии осуществления мониторинга метанола [51]. Использование коммерческих ферментов затора (т. е. пектолитические ферменты, такие как пектинметилэстераза) всегда приводили к очень высоким содержание метанола (аналогично максимальному потенциалу выделения метанола) [25,53,54]. в в случае с яблоками RubINETTE увеличение содержания метанола от 5,5% до 12% происходит после добавления различных пектиновых ферментов, которые используются для разжижения мезги без добавления воды, по сравнению с необработанным образцом [34]. В айве самое низкое содержание метанола было измерено в мешанках, смешанных с 33% воды [25]. Отказ от обычных Одни только ферменты сжижения могут привести к снижению содержания метанола на 20% [47]. Однако, густые фруктовые пюре обычно требуют более или менее большого добавления воды для брожения и перегонки, что означает время и повышенные энергозатраты при перегонке, а при в то же время приводит к снижению выхода спирта [34]. Если необходимо применять пектинолитические ферменты, следует отдавать предпочтение чистым лиазам (см. раздел 4.1.4). Помимо тщательного изучения использования ферментов качество сырья, приготовление затора и условия ферментации могут снизить выделение метанола.

##### 4.1.1. Качество и обработка сырья

Содержание метанола напрямую связано с типом или видами фруктов, используемых в процессе ферментации (в основном зависит от соотношения сахара и пектина), но есть и различия. между сортами и годами сбора урожая [18,19,26,30]. Например, при изучении дистиллятов груш Бартлетт между 1978 и 1995 годами, урожай 1993 года был годом с поразительно более низкое содержание метанола [44]. В дополнение к типу фруктов, совершенно очевидно, что фрукты используемое качество влияет на количество образующегося метанола [4,25]. На какой стадии плоды развитие и способ его сбора также влияют на содержание метанола [30].

Ранний урожай или твердые груши приводили к более высокому уровню метанола [34]. Для груш и абрикосов, другие исследователи подтвердили это открытие, показав, что перезрелые плоды приводят к самой низкой

содержания метанола [16]. В отличие от этого вывода, Адам сообщил об увеличении содержания метанола в результате созревания груш Вильямс Крист [44,47].

Использование сливового сока приводит к более низкому содержанию метанола, чем сливовое пюре [30]. С другой стороны, вишневое пюре без косточек показало более высокое содержание метанола, чем пюре с целыми плодами, включая косточки [55]. Однако в другом исследовании, проведенном той же исследовательской группой, вишневое пюре без косточек показало постоянно более низкое содержание метанола [56]. Противоречивые результаты в настоящее время не могут быть объяснены, за исключением смешанных факторов, не контролируемых в исследованиях.

Поскольку пектины в основном встречаются в кожуре, удаление кожуры фруктов перед ферментацией может также снизить уровень метанола примерно на 50% при производстве винных спиртов [31]. Также было описано, что сердцевинки и стебли содержат высокие уровни пектинов [37].

Таким образом, удаление кожуры и сердцевинки груш привело к снижению содержания метанола до 42% [16]. Однако этот метод считается экономически невыгодным для большинства спиртных напитков.

#### 4.1.2. Ингибирование пектинметилэстеразы подкислением месива

pH является одним из наиболее важных факторов, сильно влияющих на активность ферментов. Пектинметилэстераза показала оптимум при pH 8 и 50 °C [57]. Другие авторы предложили pH 5–6 как оптимальный для пектинметилэстеразы [37,38]. Пектинметилэстеразы дрожжей могут иметь оптимальные значения pH в диапазоне от 3,75 до 6 [58].

Следовательно, предлагаемый pH для ферментации, чтобы избежать активности пектинметилэстеразы, составляет 2,5 [32,34] (рис. 1). Однако не сообщалось о больших различиях между pH 2,8 и 3,3 [47]. Денес и др. [59] констатировали снижение до 1% активности фермента при снижении pH до 4,5 (пектинметилэстераза из яблок).

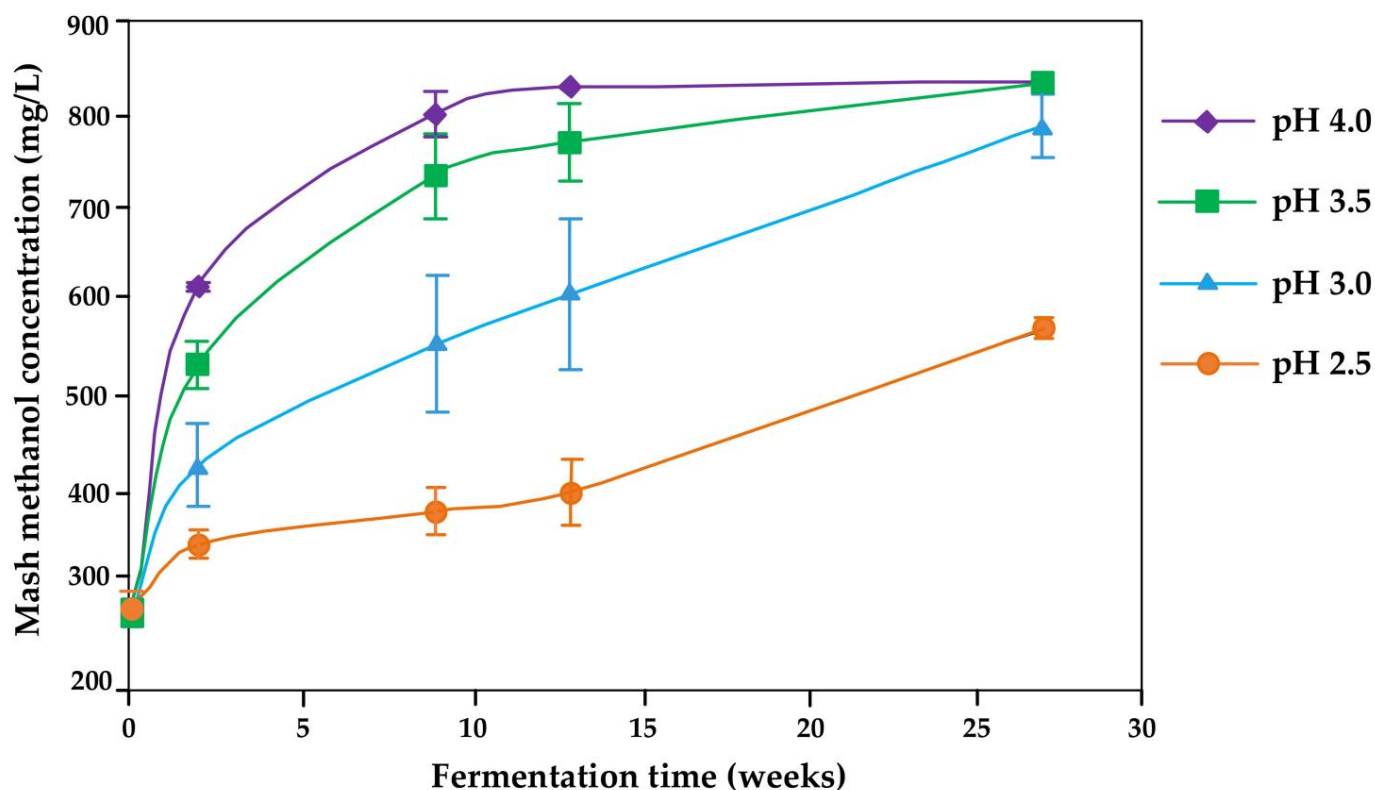


Рис. 1. Кинетика образования метанола в грушевом сусле Бартлетт в зависимости от исходного pH сула и времени ферментации (перерисовано из [32]).

В нескольких исследованиях есть четкое указание на снижение содержания метанола до 50% за счет подкисления фруктовой мезги [4, 22, 25, 26, 33–35].

Нет четкого предпочтения в отношении типа используемой кислоты. Гессингер и др. предполагают ортофосфорную кислоту (85%) [26,53], в то время как Pieper et al. предложил серную кислоту [35]. Коммерчески доступные продукты для подкисления часто содержат смеси нескольких кислот, таких как яблочная кислота/гидроксипропионовая кислота или фосфорная кислота/молочная кислота.

Герояннаки-Криstopулу использовал лимонную кислоту, что привело к снижению содержания метанола примерно на 15% в дистилляте виноградных выжимок [36]. Однако, в то время как некоторые органические кислоты, такие как лимонная кислота, могут истощаться во время ферментации из-за их включения в метаболические пути, неорганические кислоты кажутся более подходящими. Буферные системы, обеспечивающие долговременную стабильность pH затора, могут стать интересным вариантом для будущих исследований.

#### 4.1.3. Ингибирование пектинметилэстеразы при стерилизации месива.

Значительное снижение содержания метанола на 40–90% [37,38] может быть достигнуто путем термической деактивации пектинметилэстеразы (часто называемой «нагревом затора»). Существуют различные варианты комбинаций температуры и времени для достижения денатурации фермента.

Обычно предполагалось, что стерилизация при температуре выше 70 °C эффективно предотвращает образование метанола путем инактивации пектинметилэстеразы [57, 60]. Метанол можно уменьшить путем целенаправленной термической дезактивации пектинметилэстеразы путем нагревания затора до 80–85 °C в течение 30 мин или до 60 °C в течение 45 мин [31,37,38]. Пастеризация при 72 °C в течение 15 с предотвращала образование метанола в ферментированных растительных напитках, содержащих *Morinda citrifolia* (фрукты нони) [60]. В яблочном спирте пастеризация (30 мин при 50 °C, затем подогрев примерно до 85 °C) яблочного сока перед ферментацией снижала содержание метанола на 34–46 % [18]. Более низкие уровни метанола были получены в сортах Вильямса и сливы путем нагревания суслу до 65 °C в течение 5 минут с последующим повторным охлаждением для ферментации [34].

Ся и др. [22] подтвердили, что автоклавирование путем впрыскивания пара в сусло из мармелада значительно снизило содержание метанола в спирте примерно в восемь раз. Авторы также определили активность пектинметилэстеразы, подтвердив, что их метод обработки снизил активность от одной пятой до половины от активности без обработки.

Другими технологическими подходами для инактивации метилэстеразы являются термозвук (ультразвук плюс температура при 70 °C привели к снижению содержания метанола в сливовом вине на 30 %) или использование микроволн (70 °C в течение 1 мин привели к снижению содержания метанола в сливовом вине на 70 %). Авторы указали на дополнительный нетермический эффект как ультразвуковой, так и микроволновой обработки с улучшением сенсорных свойств продукта [41].

#### 4.1.4. Ингибирование и замена пектинметилэстеразы некоторыми добавками

Пектинолитические ферменты (пектиназы) подразделяются на эстеразы и деполимеразы (лиазы и гидролазы). Лиаза продуцирует олиго- или моногалактуронат, а эстераза продуцирует пектиновую кислоту и метанол [61]. Добавление пектинлиазы значительно ( $\alpha = 0,01$ ) снижало результирующее содержание метанола в браге из абрикоса и айвы на 40–71 % [25,26].

Лиаза ингибирует активность природных пектолитических ферментов. Предполагается, что этот механизм представляет собой расщепление пектиновых цепей пектинлиазой таким образом, что пектиновые фрагменты недоступны в качестве субстрата для пектинметилэстеразы [26]. Эффективность лиазных ферментов можно повысить, разбавляя суслу водой [26]. Точно так же добавление некоторых детергентов (анионогенных поверхностно-активных веществ), а также полифенолов (танинов) оказывает снижающее действие на высвобождение метанола за счет полного или частичного ингибирования пектинметилэстераз [19,34,35,41]. Однако необходимо большое количество агентов, которые достаточно дороги, поэтому эти методы не получили широкого применения на практике [39].

Замена применения разжижающих пектинметилэстеразных ферментов на пектинлиазы снизила концентрацию метанола в яблочных дистиллятах на 40–88%. Комбинация стерилизации мезги (раздел 4.1.3) и разжижения пектинлиазой привела к среднему снижению содержания метанола в тех же дистиллятах на  $94 \pm 4\%$  [48].

#### 4.1.5. Выбор штаммов дрожжей и ферментация

Микробиологический контроль процесса также может быть использован для предотвращения образования метанола в ферментированных напитках. Например, следует практиковать инокуляцию чистой культуры с использованием коммерческих дрожжей, в отличие от спонтанной инокуляции дикими дрожжами [43]. Затвор, сброженный без чистых культур дрожжей, обычно приводит к более высокому уровню метанола [34]. Селекция культуры дрожжей позволяет снизить содержание метанола в дистиллятах до 20 % [34].

Однако причина, по которой существуют значительные различия от породы дрожжей к породе дрожжей, гипотетически связана с тем фактом, что отдельные породы, по-видимому, различаются по своей способности ингибировать пектинэстеразу и, следовательно, высвобождение метанола из пектина [34]. Штаммы дрожжей *Saccharomyces* могут продуцировать все три типа пектинолитических ферментов (см. раздел 4.1.4) [61]. Предполагалось, что селекция дрожжей, не образующих пектинметилэстеразу, способствует снижению образования метанола [33]. У отобранных мутантов *Saccharomyces cerevisiae* S12 содержание метанола во время винного брожения снизилось на 73% по сравнению со штаммом дикого типа [43]. С другой стороны, Rodríguez Madrera et al. сообщили о более низких концентрациях метанола в спиртах из яблочных выжимок, сброженных местными дрожжами, чем с коммерческими винными дрожжами [54].

При сравнении трех различных типов дрожжей (один недавно разработанный штамм с улучшенными генетическими и физиологическими характеристиками и два коммерческих дрожжей для спиртовых напитков) новые дрожжи показали более высокое содержание метанола в сусле из сливы и груши, но не в сусле из вишни [62]. В другом исследовании с теми же типами дрожжей новые дрожжи показали более низкое содержание метанола в пюре из сливы, но более высокое в пюре из вишни [55]. В третьем исследовании с этими типами дрожжей новые дрожжи показали постоянно более низкие значения метанола, чем коммерческие дрожжи в вишневых спиртах [56]. Эти противоречивые результаты были интерпретированы другими факторами влияния на содержание метанола, а не влиянием дрожжей. Точно так же при брожении использовались разные штаммы дрожжей, но значительных изменений качества или количества не наблюдалось с течением времени [4].

Другим микробиологическим методом контроля содержания метанола в ферментированных напитках может быть использование метилотрофных дрожжей, таких как *Pichia methanolica* [63] и *Candida boidinii* [64], которые обладают способностью утилизировать пектин или метиловый эфир пектина и метанола, таким образом предотвращение накопления метанола в ферментированных продуктах [61]. Однако применение этих микроорганизмов для брожения спиртов до сих пор не доказано.

#### 4.1.6. Условия ферментации

Активность фермента пектинметилэстеразы напрямую связана с температурой [65]. Повышение температуры затвора увеличивает скорость реакции до тех пор, пока температура не достигнет очень высокого уровня, при котором фермент начнет денатурировать (см. Раздел 4.1.3). Снижение температуры брожения с 20 °C до 12 °C с использованием дрожжей холодного брожения может привести к снижению выделения метанола в затвор на 10-24% [26], но не во всех случаях [25,26].

#### 4.2. Хранение ферментированного затвора перед

дистилляцией Как правило, время хранения после ферментации оказывает большое влияние на выделение метанола (рис. 1) [32]. В зависимости от уровня pH можно ожидать почти 100% высвобождения уже через несколько недель хранения. При хранении браги в течение 4 недель содержание метанола возрастало, в ряде случаев резко на 15-50 % [25, 26]. Следовательно, оптимальной практикой было бы проведение дистилляции сразу после завершения ферментации или, по крайней мере, максимально возможное сокращение времени хранения [33].

#### 4.3. Метод и условия дистилляции 4.3.1.

Восстановление метанола при перегонке в перегонном

кубе Метанол имеет температуру кипения (64,7 °C), которая значительно ниже, чем у этанола (78,5 °C) и воды (100 °C). Однако выделить метанол из азеотропной смеси этанол-вода тем не менее затруднительно [14]. Когда спиртовая смесь перегоняется в простых перегонных кубах, таких как те, которые используются в большинстве небольших кустарных винокурен

во всей Центральной Европе основным фактором является растворимость метанола в воде, а не его температура кипения. Поскольку метанол хорошо растворим в воде, он будет перегоняться больше в конце перегонки, когда пары будут более насыщены водой. Это означает, что метанол будет появляться почти в одинаковой концентрации почти во всех фракциях кубовой дистилляции по отношению к этанолу (т. е. в г/г в год), вплоть до самого конца, где он накапливается в так называемой хвостовой фракции (рис. 2). [4,5,14,20,32,37,40,47]. Однако и сегодня многие профессиональные дистилляторы считают, что метанол концентрируется предпочтительно в первых фракциях (головных фракциях). И именно метанол является причиной неприятного запаха и вкуса головных фракций (что вызвано ацетальдегидом и этилацетатом, а не метанолом). Следует отметить, что отдельные исследования, в которых предполагалось, что метанол может быть обогащен фракциями первой перегонки, были неправдоподобными и потенциально ошибочными (например, сравните аннотацию с разделом выводов в Xia et al. [22], которые сообщают полностью противоречивую информацию — из данных, представленных в работе, можно предположить, что исследование из Китая фактически подтверждает исследования из Европы и США о том, что метанол обогащен в хвостах, в то время как информация в аннотации о том, что он обогащен в головных фракциях, является скорее всего ошибкой перевода).

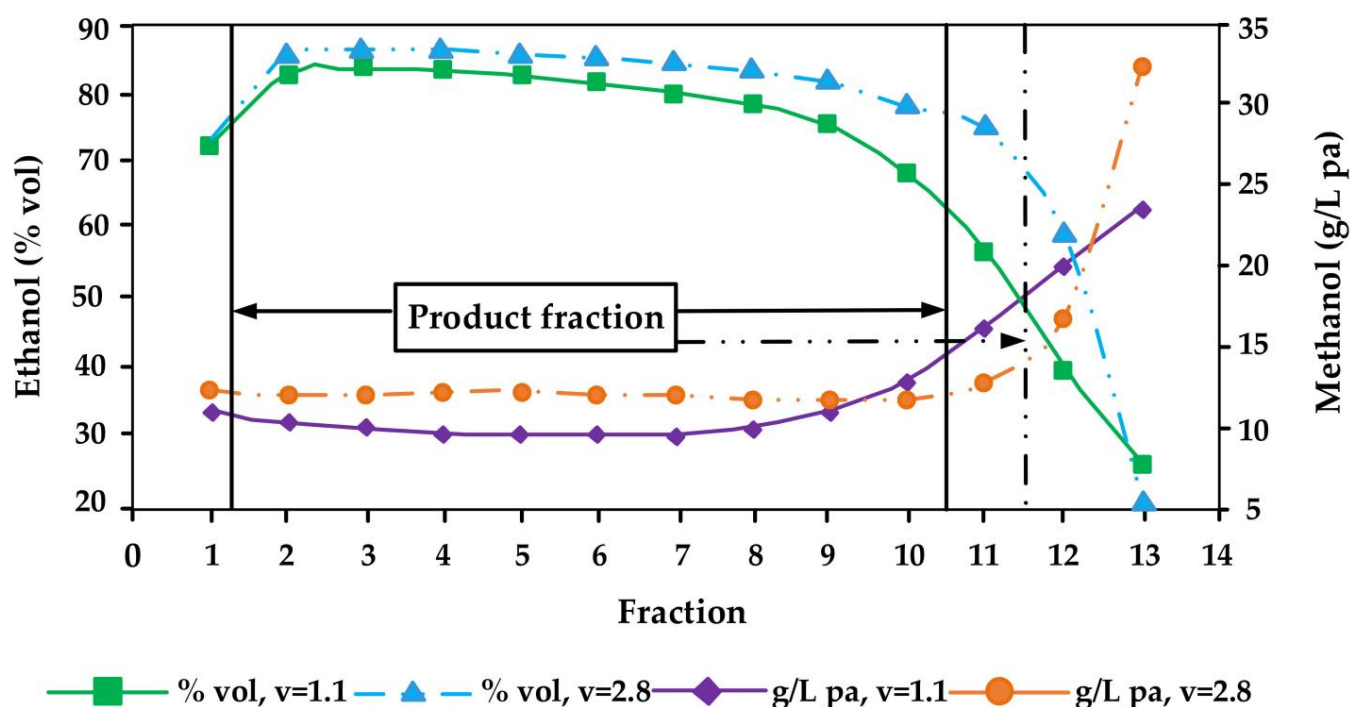


Рис. 2. Характеристики перегонки этанола и метанола под влиянием различных флегмовых коэффициентов ( $v$ ) при перегонке грушевого сула Бартлетта (перерисовано из [32]).

Различные проведенные тесты дистилляции показывают, что на содержание метанола во фракциях продукта (сердца) вряд ли можно повлиять различными методами дистилляции. Даже в экспериментах с различными «катализаторами» пока не было сделано никаких новаторских открытий. Только относительно дорогая серебряная вата в качестве адсорбента приводила к снижению содержания метанола до 20% [34].

Таким образом, отделение хвостов, которое также необходимо проводить по органолептическим причинам, пока является единственным вариантом снижения содержания метанола во время перегонки в кубовых дистиллятах. Снижение содержания метанола во фракциях продукта в г/г в год по сравнению с брагой может составлять от 20 до 30%. С другой стороны, слишком позднее разделение хвостов может привести к увеличению содержания метанола примерно на 20% во фракциях продукта [39].

В целом видно, что содержание метанола в спирте увеличивается с увеличением флегмового числа. Это означает, что чем выше армирование и чем медленнее дистилляция, тем выше содержание метанола в дистилляте [32,66] (рис. 2). Параметры дистилляции также влияли на содержание метанола в дистиллятах. Особенно дефлегматор.



температура показала значительное влияние на содержание метанола. В параметрах, протестированных с использованием перегонного куба объемом 150 л, трех тарелок и одного дефлегматора, снижение содержания метанола варьировало от 16 до 36 % [25].

С другой стороны, Scherübel [20] предлагает следующие три меры по снижению содержания метанола за счет усовершенствования перегонки в кубовом кубе: • Выполнение

двойной перегонки: всегда рекомендуется проводить две последовательные перегонки в отношении выделения метанола • Повышение эффективности разделения:

Отделение метанола можно увеличить за счет простого дополнительного параллельного соединения обычной спиртовой трубки и колонны с более эффективным разделением. Если возможно, эта колонна должна быть хотя бы частично охлаждена в верхней части, чтобы увеличить внутреннюю флегму и, таким образом, эффективность разделения.

• Охлаждение в головной части: если использование дополнительной колонны невозможно, частичное охлаждение спиртовой трубки в начале второй перегонки также может увеличить внутреннюю флегму и, таким образом, повысить эффективность разделения.

Подводя итог, можно сказать, что в литературе все еще существуют некоторые расхождения относительно влияния коэффициента рефлюкса между различными исследованиями. Вероятно, это можно объяснить широким разнообразием имеющихся в продаже перегонных кубов и юридическими различиями (количество тарелок) для кустарных винокурен в разных юрисдикциях.

#### 4.3.2. Восстановление метанола во время крупномасштабной дистилляции

В отличие от перегонных кубов, которые обычно состоят из небольшой колонны (три-четыре тарелки), спиртовые установки промышленного масштаба с 15-30 тарелками обеспечивают возможность непрерывной дистилляции и расширенного регулирования дистилляции, включая процессы деметилирования [39].

Содержание метанола можно уменьшить во время ректификации с помощью дезанализационных колонн [33,40]. Этот процесс эффективен и успешно снижает содержание метанола до 40–90% по сравнению с исходным количеством. Однако инвестиции целесообразны только для довольно крупных предприятий с высокой загрузкой мощностей [39].

Комбинированный метод испарения/конденсации для восстановления метанола из дистиллятов был запатентован Sarovilla [46]. Установлено, что применение метода снижает содержание метанола в фруктовых спиртах на 58–190 г/г в год [42]. Однако такие методы могут быть экономически невыгодными, так как они значительно снижают содержание спирта наряду с содержанием метанола [26].

Обещанные результаты метода испарения/конденсации также подвергались критике как недостоверные, поскольку независимые исследования показали меньшее снижение метанола (9–92 г/г в год), всегда связанное с неприемлемыми потерями этанола (до 10% об.) [45]. В целом испарительно-конденсационные методы дезанализации были признаны экономически невыгодными именно для малых предприятий.

#### 4.4. Хранение дистиллята после ферментации

Не так много данных об выделении метанола в процессе хранения и старения дистиллятов. Ботельо и др. [4] предположили тенденцию к низкому содержанию метанола в продвинутых спиртах, выдержанных в деревянных бочках, что связано с окислением метанола и последующей реакцией ацетализации с образованием диэтоксиметана. С другой стороны, ожидается, что метанол будет достаточно стабилен в инертных контейнерах без присутствия кислорода. Это также согласуется с опытом авторов по валидации методов определения метанола, который предполагает, что метанол является стабильным соединением в бутилированных водно-спиртовых растворах [67].

Аналогичные результаты были получены Xia et al. [22]. 270-дневное хранение спирта из мармелада в дубовых бочках значительно снизило содержание метанола, в то время как в контейнерах из пластика или нержавеющей стали наблюдалось меньшее снижение. Авторы объяснили восстановление реакциями этерификации, но не смогли объяснить различия между материалами контейнера.

## 5. Обсуждение

### 5.1. Надлежащая производственная практика по снижению содержания метанола, ведущая к снижению его уровня в коммерческих продуктах

Единственный доступный в настоящее время обзор возможностей снижения содержания метанола был предоставлен Botelho et al. [4] в контексте более общего обзора качества фруктовых спиртов. Несмотря на то, что этот обзор был менее полным и в нем не было отражено крупных исследований, доступных только на немецком языке, основные области, влияющие на содержание метанола в фруктовых спиртах, согласовывались с этим обзором, а именно качество сырья, ферментация, хранение и дистилляция. Ботелью и др. [4] пришли к выводу, что сокращение времени между ферментацией и дистилляцией является наиболее эффективным способом снижения содержания метанола в конечном напитке, и это предложение следует классифицировать как «надлежащую производственную практику». Это также согласуется с всеобъемлющей книгой Адама и Версини, опубликованной Европейской комиссией [39].

Качество используемого сырья является ключевым фактором, определяющим качество производимого спирта и содержание в нем метанола. Алкогольные напитки, полученные из материалов с низким содержанием пектина (например, пиво, вино или спиртные напитки на основе зерна, такие как виски), обычно имеют гораздо более низкую концентрацию метанола, чем продукты на фруктовой основе. Поэтому усилия по смягчению последствий в прошлом были сосредоточены на фруктовых спиртах.

Предыдущие результаты показали, что усилия промышленности и применение усовершенствованных технологий ферментации и дистилляции привели к снижению уровня метанола во фруктовых спиртах [1]. В связи с тем, что в Европе в 1989 г. были введены ограничения на содержание метанола, были разработаны процессы восстановления содержания этого вещества в спиртах [1]. Выделение метанола в процессе брожения и дистилляции не является однофакторным процессом, но сочетание нескольких мер может эффективно обеспечить уровень метанола ниже разрешенных пределов.

Согласно Glatthar и соавт. [32], следующие меры по смягчению последствий просты и могут применяться даже небольшими кустарными винокурнями:

- Отрегулировать pH сусле перед ферментацией до pH 2,5–3,0
- Кратковременное брожение с использованием инокуляции дрожжами с последующей немедленной дистилляцией
- Не перерабатывать хвосты

Используя эти меры, можно ожидать снижения содержания метанола наполовину без изменения органолептических свойств продуктов.

Интересно, что все рассмотренные ранее меры могли привести к значительному снижению содержания метанола в коммерческих продуктах на европейском рынке и могут рассматриваться как отличный пример внедрения результатов исследований в практику. Об этом могут свидетельствовать усилия исследователей публиковать свои результаты в дополнение к обычным рецензируемым журналам в отраслевых журналах в формате, читабельном и понятном для дистилляторов.

Адам и Постел [68] показали, что вишневые бренди, испытанные в 1991 г., содержали метанола почти на 100 г/гл в год меньше, чем вишневые бренди, произведенные до 1986 г. Адам и Версини [39] подтвердили эту тенденцию в 1996 г. Собственные исследования 923 вишневых спиртов (рис. 3.), которая является одной из наиболее часто тестируемых групп продуктов в CVUA в Карлсруэ, поскольку этот продукт традиционно является фирменным блюдом Северного Бадена или Шварцвальда, анализ за период с 1980 по 2020 год подтверждает статистически значимое линейное снижение содержания метанола ( $r = -0,345$ ,  $p < 0,0001$ ). Среднее содержание метанола снизилось в среднем с 500 г/гл в год в начале 1980-х годов до в среднем 400 г/гл в год в настоящее время (методику и подробности по пробам 1980–2003 гг. см. в [1]). Ни в одном из образцов не было обнаружено превышения лимита ЕС в 1000 г/гл в год.

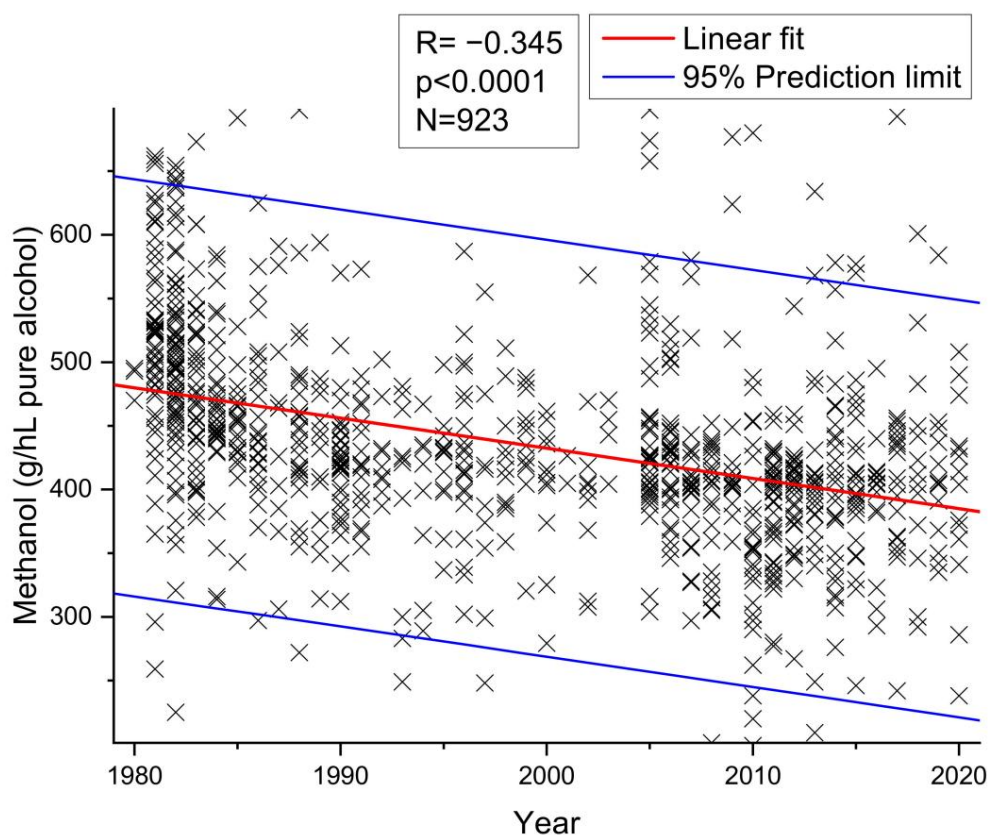


Рисунок 3. Содержание метанола в 923 вишневых спиртах, проанализированных в период с 1980 по 2020 год.

#### 5.2. Кофейные спиртные напитки — особый случай снижения выбросов метанола

Несмотря на некоторые неподтвержденные данные о том, что спирты, полученные из кофейных ягод или побочных продуктов кофе, традиционно производились в некоторых странах-производителях кофе, таких как Непал, существует не только крайне ограниченное количество данных о методах производства [69], но также о химическом составе и, в частности, о метаноле. содержание спиртов кофейной вишни. В частности, сок мякоти кофе от влажной обработки с содержанием сахара около 3–5% является подходящим субстратом для производства этанола [70]. Для кофейной слизи из различных сортов *Coffea arabica* выход пектина в плодах кофе составлял 0,03–0,09%, а степень метоксильной этерификации составляла 19–31% [71]. Кофейная мякоть *Coffea canephora* содержит 2–3% пектина со степенью метоксильной этерификации около 6% [72], в то время как *Coffea arabica* с 15% пектина в высушенной мякоти сообщает о более высоком содержании пектина со степенью метоксильной этерификации 63% [73]. В другом исследовании сообщается о 11% пектина в *Coffea arabica* без указания степени этерификации [74].

В зависимости от вида и обработки содержание пектина в побочных продуктах кофе может быть выше, чем в большинстве других фруктов, используемых для производства спиртных напитков, таких как вишня (0,4%), абрикосы (1%) или яблоки (0,8%) [75], в то время как степень метоксилирования вишни *Prunus avium* составляла от 44% до 91% в зависимости от метода экстракции и стадии созревания [76]. Следовательно, способность кофейных ягод к ферментативному образованию метанола может быть выше, чем у обычных материалов для производства фруктовых дистиллятов. Из нескольких исследований спирта, полученного из кофейных ягод или побочных продуктов кофе, многие не исследовали содержание метанола [77–81], что вызывает некоторое недоумение, поскольку метанол обычно включается в любой стандартный анализ спирта [82].

Тем не менее, есть некоторые исследования метанола при ферментации кофейных материалов (таблица 2). Бонилья-Эрмоса и др. [74] показали сравнительно низкие уровни метанола в кофейной пульпе, смешанной с кофейными сточными водами, образующимися в процессе депульпации и удаления слизи из зерен *Coffea arabica*. Однако в данном случае анализировали только суло брожения, а дистилляцию не проводили. Исследование отработанной кофейной гущи, ферментированной с

добавленный сахар 180 г/л также показал довольно низкие уровни метанола. С другой стороны, Somashekar и Appaiah [83] показали, что ферментация кофейной вишни на твердом субстрате шелуха *Coffea canephora* со штаммами *Clavispora* и *Pichia* может привести к значительным уровням 7,2–10,8 % метанола. Процесс предназначался для производства технического спирта и представляется совершенно непригодным для получения продуктов для потребления человеком. Пока производство технических спиртов из побочных продуктов кофе и отходов может быть интересным вариантом валоризации, это исследование показывает, что необходимо применять крайнюю проверку если спирты из побочных продуктов кофе предназначены для использования в качестве потребительских товаров.

Эта озабоченность была усилена информативным пилотным исследованием Einfalt et al. [15] отчетность о результатах производства спирта из кофейной вишни. Затвор был приготовлен с использованием *Coffea* вишни сорта арабика перевозили в замороженном виде из Таиланда в Германию, где они измельченный. После снижения pH до 3,1 с помощью добавления фосфорной/молочной кислоты для разжижения добавляли коммерческий фермент пектиназу. После добавления коммерческих дрожжей сусле перегоняли через 17 дней брожения. Содержание метанола в сердце фракций составлял  $2600 \pm 400$  г/г/л в год, что значительно превышало лимит ЕС в 1000 г/г/л в год и предлагает запас прочности менее 2 для уровня острой токсичности 5000 г/г/л в год. (см. раздел 3). Авторы предположили, что применение пектиназы и длительное хранение оказало неблагоприятное влияние на концентрацию метанола [15], что вполне вероятно, учитывая результаты нашего обзора приведены в разделах 4.1 и 4.2.

В запатентованном методе Бодмера и Рудера [84] целые кофейные ягоды превращались в пюре. с добавлением 5% сахара, доведенного до pH 3,0 с помощью фосфорной/молочной кислоты и забитого с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* и диаммонийфосфатом. После ферментации Через 7–14 дней брагу подвергали двойной перегонке в горшке. Метанол содержание двух спиртов кофейной вишни составляло 684 и 573 г/г/л в год. В то время как производство метод с добавлением сахара не соответствует регламенту ЕС для фруктовых спиртов, где этанол в продуктах должен происходить исключительно из фруктов [23], это также снижает относительное содержание метанола за счет увеличения содержания этанола. Следовательно, можно вывести из результатов, что производство спирта кофейной вишни по запатентованному методу, исключая добавление искусственного сахара, приведет к превышению лимита метанола, аналогичному результаты Einfalt et al. [15].

В заключение, помимо отсутствия одобрения новых пищевых продуктов [85], ни один из видов кофейной вишни не спиртные напитки, представленные до сих пор, соответствовали бы регламенту ЕС по спиртным напиткам. Это явно необходимо применить собранные знания о возможностях снижения выбросов метанола в дальнейших исследованиях этого интересного нового типа спирта, так что уступчивая кофейная вишня духи, надеюсь, будут доступны в будущем.

Таблица 2. Содержание метанола в спиртах, произведенных из кофейных ягод и побочных продуктов кофе.

Сырье	Содержание метанола	Соответствие требованиям ЕС Правила для фруктовых спиртных напитков	1	Рекомендации
Кофейная вишня	$2600 \pm 400$ г/г/л в год	573–	нет	<sup>2</sup> [15]
Кофейная вишня + 5% сахара	684 г/г/л в год		нет	<sup>3</sup> [84]
шелуха кофейной вишни	7–11%		(не пищевой продукт)	[83]
Мякоть кофе смешанная с кофе сточные воды (1:10)	40–128 мкг/л (в месиве)		(перегонка не проводилась)	4 [74]
Отработанная кофейная гуща + 18% сахара	$11 \pm 3$ мг/л ( $44 \pm 12$ г/г/л в год)	5)	нет	<sup>4</sup> [86]

<sup>1</sup> Это не предполагает общего соответствия пищевым нормам ЕС. В ЕС требуется одобрение новых пищевых продуктов для большинства побочных продуктов кофе. и производные продукты перед размещением на рынке [85]. <sup>2</sup> Превышение общего предела содержания метанола для фруктовых спиртов в 1000 г/г/л в год [23]. <sup>3</sup> Метод производства с добавлением сахара не соответствует правилам ЕС для фруктовых спиртов; без добавления сахара, метанол предел в 1000 г/г/л в год, вероятно, был бы превышен. <sup>4</sup> Этанол фруктового спирта должен быть получен исключительно из свежих фруктов [23], а не из отходы, такие как использованная кофейная гуща или сточные воды. Потенциальное соответствие в другой категории спиртных напитков или в качестве общего «спиртного напитка». <sup>5</sup> Пересчет (крепость спирта при 40% об.).

## 6. Выводы

Содержание метанола является одним из ключевых параметров для определения нормативного соответствия спирта и других алкогольных напитков. Меры по смягчению последствий, разработанные за последние десятилетия, позволили промышленности не только соответствовать стандартам ЕС, но и увеличить запас прочности за счет общего снижения содержания метанола в категории фруктовых спиртов.

Интересно, что в качестве материала для производства спирта была предложена мякоть кофейной вишни, которая производится в больших количествах как побочный продукт производства кофе. Очень высокие концентрации метанола были обнаружены в спирте из кофейной вишни по сравнению с другими фруктовыми спиртами. Следовательно, особенно необходимо снизить содержание метанола в этих спиртных напитках для соблюдения требований законодательства и защиты здоровья населения от этой потенциальной опасности.

Вклад авторов: Концептуализация, DWL; методология, ДВЛ; формальный анализ, DWL и KS; расследование, ПБ и МКС; ресурсы, DWL; курирование данных, DWL; написание — первоначальная черновая подготовка, DWL; написание-обзор и редактирование, ПБ, MCS, DE, JR-Z, AQB, KS, SS; визуализация, ДВЛ; надзор, ДВЛ и СС; администрирование проекта, DWL и SS Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Это исследование не получило внешнего финансирования.

Заявление о доступности данных: в этом исследовании не создавались и не анализировались новые данные. Обмен данными не применим к этой статье.

Благодарности: Aliazam7786/Fiverr выражает благодарность за перерисовку рисунков 1 и 2.

Конфликт интересов: SS является владельцем, а ПБ, MCS и JRZ являются консультантами Coffee Consulate, Мангейм, Германия. Coffee Consulate — это независимый учебный и исследовательский центр. AQB является владельцем кофейной плантации Finca La Buena Esperanza в Сальвадоре. Кофейное консульство и Finca La Buena Esperanza в настоящее время исследуют потенциал побочных продуктов кофе для производства спиртных напитков. Ни одна из них в настоящее время не занимается коммерциализацией спиртных напитков, произведенных из побочных продуктов кофе. Таким образом, SS, ПБ, MCS, JR-Z, и AQB сообщают об отсутствии конфликта интересов, связанного с рассматриваемой работой. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Рекомендации

1. Лакенмайер, Д.В.; Musshoff, F. Летучие конгенеры в алкогольных напитках. Ретроспективные тенденции, сравнения партий и текущие диапазоны концентраций. *Рехтсмед* 2004, 14, 454–462. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
2. Пейн, А.Дж.; Даян А.Д. Определение допустимой концентрации метанола в алкогольных напитках. *Гум. Эксп. Токсикол.* 2001, 20, 563–568. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
3. Лакенмайер, Д.В.; Рем, Дж.; Гмель, Г. Суррогатный алкоголь: что мы знаем и куда идем? *Алкоголь. клин. Эксп. Рез.* 2007 г., 31, 1613–1624. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
4. Ботельо Г.; Анжос, О.; Эстевино, Л.М.; Калдейра, И. Метанол в спиртах, полученных из винограда, фруктов и меда: критический обзор источника, контроль качества и установленные законом ограничения. *Процессы* 2020, 8, 1609. [\[CrossRef\]](#)
5. Биндлер Ф.; Фогес, Э.; Лаугель, П. Проблема допустимой концентрации метанола в перегнанных фруктовых спиртах. Пищевая добавка. *Контам.* 1988, 5, 343–351. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
6. Белачкова В.; Яникова, Б.; Вацек, Дж.; Фидесова, Х.; Миовски, М. «Это не может случиться со мной»: Алкоголики о вспышке отравления метанолом в 2012 г. и последующем запрете в Чешской Республике. *Норд. Стад. Алкогольные препараты* 2017, 34, 385–399. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
7. Нойфельд, М.; Лакенмайер, Д.; Хауслер, Т.; Рем, Дж. Суррогатный спирт, содержащий метанол, социальные депривации и общественное здоровье. в Новосибирске, Россия. *Междунар. Журнал «Наркополитика»*, 2016 г., стр. 37, стр. 107–110. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
8. Дэвис, ЛЕ; Хадсон, Д.; Бенсон, ВЕ; Джонс Исом, Лос-Анджелес; Коулман, Дж. К. Отравление метанолом в Соединенных Штатах: 1993–1998 гг. *Дж. Токсикол. клин. Токсикол.* 2002, 40, 499–505. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
9. Окару, АО; Рем, Дж.; Зоммерфельд, К.; Кубалла, Т.; Вальх, С.Г.; Лакенмайер, Д. В. Угроза качеству алкогольных напитков из-за неучтенного потребления. В *Алкогольных напитках*. Том 7: Наука о напитках; Грумезеску, А.М., Холбан, А.М., ред.; Издательство Woodhead: Кембридж, Массачусетс, США, 2019; стр. 1–34. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
10. Нойфельд, М.; Лакенмайер, Д. В.; Феррейра-Борхес, К.; Рем, Дж. Является ли алкоголь «основным товаром» во время COVID-19? Да, но только как дезинфицирующее средство! *Алкоголь. клин. Эксп. Рез.* 2020, 44, 1906–1909. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
11. Лакенмайер, Д.В.; Нойфельд, М.; Рем, Дж. Влияние незарегистрированного употребления алкоголя на здоровье: что мы знаем в 2020 году? *Дж. Стад. Алкогольные препараты* 2021, 82, 28–41. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
12. Хаффнер, Х.Т.; Гроу, М.; Бессерер, К.; Бликл, Ю.; Henssge, С. Эндогенный метанол: изменчивость концентрации и скорости производства. Доказательства глубокого отсека? Судебно-медицинская экспертиза. *Междунар.* 1996, 79, 145–154. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

13. Линдингер, В.; Таучер, Дж.; Джордан, А.; Гензель, А.; Фогель, В. Эндогенное производство метанола после употребления фруктов. *Алког. клин. Эксп. Рез.* 1997, 21, 939–943. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
14. Спахо, Н. Методы дистилляции в производстве фруктовых спиртов. In *Distillation — инновационные приложения и моделирование*; Мендес, М., изд.; InTechOpen Limited: Лондон, Великобритания, 2017 г. [\[CrossRef\]](#)
15. Эйффальт, Д.; Мейснер, К.; Курц, Л.; Интани, К.; Мюллер, Дж. Производство фруктового спирта из кофейных ягод - анализ процесса и органолептика. *оценка. Напитки* 2020, 6, 57. [\[CrossRef\]](#)
16. Крапфенбауэр Г.; Семанн, Х.; Карнер, М.; Гёссингер, М. Влияние нескольких параметров сбора и обработки фруктового пюре на содержание метанола и органолептический профиль дистиллятов. *Рукавица Кластернойбург* 2007, 57, 94–107. (На немецком)
17. Чжан, Х.; Вудамс, Э.Э.; Hang, YD Влияние обработки пектиназой на фруктовые спирты из яблочного пюре, сока и выжимок. *Процесс Биохим.* 2011, 46, 1909–1913. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
18. Повесить, ЙД; Woodams, EE Влияние сорта яблока и пастеризации сока на содержание метанола в твердом сидре и коньячной воде. *Биоресурс. Технол.* 2010, 101, 1396–1398. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
19. Тушинский Т. Изменение степени деметилирования пектина при брожении фруктового сула. *Нарунг* 1989, 33, 183–189. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
20. Шерюбель, П. Тайна метанола. Постоянный компаньон во фруктовом бренди? *Technische Universität Graz: Грац, Австрия*, 2018 г. (в Немецкий)
21. Пипер, Х.Дж.; Брухманн, Э.-Э.; Колб, Э. *Технология дер Обстбреннерей; Ульмер: Штутгарт, Германия*, 1993.
22. Ся Ю.; Может.; Хоу, Л.; Ван, Дж. Исследования обработки кипячением по контролю метанола и пилотные заводские испытания бренди из мармелада. *Междунар. Дж. Еда* 2017, 13, 20160095. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
23. Европейский парламент и Совет. Регламент (ЕС) 2019/787 Европейского парламента и Совета от 17 апреля 2019 г. об определении, описании, представлении и маркировке спиртных напитков, использовании наименований спиртных напитков при представлении и маркировке других пищевых продуктов, Защита географических указаний для спиртных напитков, использование этилового спирта и дистиллятов сельскохозяйственного происхождения в алкогольных напитках и отмена Регламента (ЕС) № 110/2008. *Выключенный. Дж. Европа. Союз* 2019, L130, 1–54.
24. Лахенмайер, Д.В.; Шоберл, К.; Кантерес, Ф.; Кубалла, Т.; Сониус, Э.-М.; Рем, Дж. Является ли загрязненный алкоголь проблемой для здоровья в Европейском Союзе? Обзор существующих и методологических набросков для будущих исследований. *Addiction* 2011, 106 (Приложение 1), 20–30. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
25. Гёссингер, М. Влияние методов обработки на содержание метанола в фруктовых дистиллятах. 2003. Доступно в Интернете: [https://www.dafne.at/dafne\\_plus\\_homepage/index.php?section=dafneplus&content=result&come\\_from=homepage& &project\\_id=975&page=51&limit=20](https://www.dafne.at/dafne_plus_homepage/index.php?section=dafneplus&content=result&come_from=homepage& &project_id=975&page=51&limit=20): (по состоянию на 17 февраля 2021 г.). (На немецком).
26. Гёссингер, М.; Крапфенбауэр, Г.; Семанн, Х.; Брандес, В.; Карнер, М.; Хик, С.; Neuurer, Т. Советы для дистиллятора: метанол. *Kleinbrennerei* 2006, 58, 8–11. (На немецком)
27. Lachenmeier, DW Успехи в обнаружении фальсификации алкогольных напитков, включая неучтенный алкоголь. В *достижениях в области проверки подлинности пищевых продуктов*; Дауни, Г., изд.; Издательство Woodhead, Elsevier: Амстердам, Нидерланды, 2016 г.; стр. 565–584. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
28. Крузе, Дж. А. Отравление метанолом. *Интенсивная терапия Мед.* 1992, 18, 391–397. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
29. ВОЗ. Информационная записка. вспышки отравления метанолом; Всемирная организация здравоохранения: Женева, Швейцария, 2014 г.
30. Чжан, Х.; Вудамс, Э.Э.; Ханг, Ю. Д. Факторы, влияющие на содержание метанола и выход сливовицы. *Дж. Пищевая наука.* 2012, 77, T79–T82. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
31. Кана, К.; Канеллаки, М.; Пападимитриу, А.; Кутинас А.А. Причины и способы снижения содержания метанола в цидуиди. *Ципуро и Узо. Междунар. Дж. Пищевая наука. Технол.* 1991, 26, 241–247. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
32. Глаттар, Дж.; Сенн, Т.; Пипер, Х. Дж. Исследования по снижению содержания метанола в дистиллированных спиртах, изготовленных из бартлетта. *Втор. Лебенсм. Рундш.* 2001, 97, 209–216.
33. Никичевич, Н.; Тешевич В. Возможности снижения содержания метанола в сливовице. *Дж. Сельское хозяйство. науч.* 2005, 50, 49–60. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
34. Бартельс, В. Снижение содержания метанола в фруктовых спиртных напитках с особой ссылкой на спиртные напитки Williams-Christ, Plum и Grape Marc. 1998. Доступно в Интернете: <https://www.landwirtschaft-bw.info/pb/Lde/Startseite/Service/Reduzierung+von+Methanol+in+ . Обстбраенден> (по состоянию на 17 февраля 2021 г.). (На немецком)
35. Пипер, Х.Дж.; Оплюстил, Э.; Барт Г. Уменьшение образования метанола во время спиртового брожения. *Биотехнолог. лат.* 1980, 2, 391–396. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
36. Герояннаки-Кристулу, М.; Кириакидис, Н.В.; Атанасопулос, П.Э. Влияние сорта винограда (*Vitis vinifera* L.) и условий ферментации виноградных выжимок на некоторые летучие соединения полученного дистиллята виноградных выжимок. *OENO One* 2004, 38, 225–230. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
37. Таннер Х. О производстве фруктовых спиртов с низким содержанием метанола. Швейцария. 3. Обст Вайнбау 1970, 106, 625–629. перепечатано в *Алк. Инд.* 1972, 85, 27–29. (На немецком)
38. Таннер Х. Об использовании нагревания сула для снижения содержания метанола во фруктовых бренди. *Kleinbrennerei* 1971, 23, 95–96. (В Немецкий)
39. Адам, Л.; Versini, G. Исследование возможностей снижения содержания метилового спирта в *Eaux-de-Vie de Fruits*; Европейская комиссия: Брюссель, Бельгия, 1996 г.; Доступно онлайн: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/0b908be6-2673-45a5-8c2f-b3b6abc1aa37> (по состоянию на 29 марта 2021 г.).

40. Адам, Л.; Мейнл, Дж. Снижение содержания метанола в фруктовых спиртах (II). Технологические возможности и их эффекты. Кляйнбреннерей 1995, 47, 107–113. (На немецком)
41. Милич, У.; Пушкаш, В.; Вукурович В. Исследование технологических подходов к снижению образования метанола в сливовых винах. Дж. Инст. Варить. 2016, 122, 635–643. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
42. Шолтен, Г.; Кацпровски, М. Метанол в спиртах - проблема и решение. Кляйнбреннерей 1998, 50, 6–8. (На немецком)
43. Лян, М. Х.; Лян, Ю.Дж.; Чай, Ю; Чжоу, СС; Цзян, Дж. Г. Снижение содержания метанола в сваренном вине с использованием метода плазмы при атмосферном давлении и комнатной температуре и оптимизация сочетания солода с различными добавками. Дж. Пищевая наука. 2014, 79, M2308–M2314. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
44. Адам, Л. Возможности снижения содержания метанола в дистиллятах груши Бартлетт с использованием традиционных методов производства. Рив. науч. Алимент. 1995, 24, 417–425.
45. Нассер Р.; Адам, Л.; Энгель, К.-Х. Исследования по снижению содержания метанола в спиртах с помощью процессов выпаривания. Кляйнбреннерей 2000, 52, 5–8. (На немецком)
46. Каповилья В.Р. Процесс доочистки сырого дистиллята. Европейский патент EP0812607B1, 13 июня 1997 г.
47. Адам Л. Снижение содержания метанола в фруктовых спиртах (I). Технологические возможности и их эффекты. Kleinbrennerей 1995, 47, 76–81. (В Немецкой)
48. Сенн, Т. Роль ферментных продуктов — меньше метанола в пюре и дистиллятах семечковых плодов. Kleinbrennerей 2017, 69, 4–7. (На немецком)
49. Эйффальт, Д. Параметры процесса для обеспечения высокого качества производства фруктового бренди. В материалах 1-й Международной конференции и выставки Spirit of Rakia, Пула, Хорватия, 27–30 марта 2019 г.
50. Европейский совет. Регламент Совета (ЕЭС) № 1576/89, устанавливающий общие правила определения, описания и Презентация алкогольных напитков. Выключенный. Дж. Европа. Комм. 1989, L160, 1–17.
51. Андраус, Дж.И.; Клаус, МДж; Линдемманн, ди-джей; Берглунд, К.А. Влияние ферментов сжижения на концентрацию метанола в дистилляте. фруктовые спирты. Являюсь. Дж. Энол. Витик. 2004, 55, 199–201.
52. Таннер Х. О кислотно-ферментативной обработке дистилляционных браг. Швейцария. З. Обст Вайнбау 1980, 116, 357–360. (На немецком)
53. Гёссингер, М.; Крапфенбауэр, Г.; Семанн, Х.; Хик, С.; Карнер, М. Влияние различных параметров затора и ферментации на итоговое содержание метанола во фруктовых заторах. Рукавица Клостернойбург 2006, 56, 46–53. (На немецком)
54. Родригес Мадрера, Р.; Пандо Бедринана, Р.; Гарсия Эвиа, А.; Арсе, МБ; Суарес Валлес, Б. Производство спиртных напитков из сушеных яблок выжимки и отборные дрожжи. Пищевые продукты Биопрод. проц. 2013, 91, 623–631. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
55. Шел, Б.; Лахенмайер, Д. В.; Сенн, Т.; Хайниш, Дж. Дж. Влияние содержания косточек на качество сливового и вишневого спиртов, полученных в результате ферментации суслу с использованием коммерческих и лабораторных штаммов дрожжей. Дж. Агр. Пищевая хим. 2005, 53, 8230–8238. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
56. Шел, Б.; Сенн, Т.; Лахенмайер, Д. В.; Родичио, Р.; Хайниш, Дж. Дж. Вклад штамма ферментирующих дрожжей в этилкарбамат генерация в спиртах из косточковых фруктов. заявл. микробиол. Биотехнолог. 2007, 74, 843–850. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
57. До Амарал, С.Х.; Де Ассис, ЮАР; Де Фариа Оливейра, ОММ Частичная очистка и характеристика пектинметилэстеразы из апельсина (*Citrus sinensis*) сорта. пера-рио. Дж. Пищевая биохимия. 2005, 29, 367–380. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
58. Сатора, П.; Тушинский, Т. Влияние местных дрожжей на ферментацию и профиль летучих веществ сливолиц. Пищевой микробиол. 2010, 27, 418–424. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
59. Денес, Дж. М.; Барон, А.; Ренар, см; Пин, К.; Дрилло, Дж. Ф. Различные модели действия метилэстеразы яблочного пектина при pH 7,0 и 4,5. углеводов. Рез. 2000, 327, 385–393. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
60. Чайясут, К.; Джантавонг, С.; Куратама, К.; Пираджан, С.; Сирилун, С.; Шэнк, Л. Факторы, влияющие на содержание метанола в ферментированном растительном напитке, содержащем *Morinda citrifolia*. фр. Дж. Биотехнология. 2013, 12, 4356–4363. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
61. Ohiain, EI Загрязнение метанолом алкогольных напитков традиционного брожения: микробное измерение. СпрингерПлюс 2016, 5, 1607. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
62. Шел, Б.; Мюллер, К.; Сенн, Т.; Heinisch, J) Лабораторный штамм дрожжей, пригодный для производства спирта. Дрожжи 2004, 21, 1375–1389. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
63. Накагава Т.; Ямада, К.; Фуджимура, С.; Ито, Т.; Мияджи, Т.; Томизука, Н. Использование пектина метилотрофными дрожжами *Pichia*. метанольный. Микробиология 2005, 151, 2047–2052. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
64. Накагава Т.; Мияджи, Т.; Юримото, Х.; Сакаи, Ю.; Като, Н.; Томизука, Н. В пектинах участвует метилотрофный путь. использование *Candida boidinii*. заявл. Окружающая среда. микробиол. 2000, 66, 4253–4257. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
65. Гонсалес, С.Л.; Росо, Н.Д. Определение активности пектинметилэстеразы в коммерческих пектиназах и изучение инактивации кинетики с помощью двух потенциометрических процедур. Сиенц. Текнол. Алимент. 2011, 31, 412–417. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
66. Анде Б. Возможности обогащения и улучшения аромата фруктовых бренди с помощью простых перегонных кубов. Кандидат наук. Диссертация, Университет Хоэнхайма, Хоэнхайм, Германия, 2004 г. (на немецком языке).
67. Тейпель, Дж. К.; Хауслер, Т.; Зоммерфельд, К.; Шарингер, А.; Вальх, С.Г.; Лахенмайер, Д. В.; Кубалла, Т. Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса  $^1\text{H}$  в качестве средства проверки спиртных напитков для контроля качества и подлинности. Foods 2020, 9, 1355. [\[CrossRef\]](#) [\[Пубмед\]](#)
68. Адам, Л.; Постель, В. Новый тип вишневого спирта? Branntweinwirtschaft 1992, 132, 110–114. (На немецком)
69. Лопес, АСА; Эда, СХ; Андраде, Р.П.; Аморим, Дж. К.; Duarte, WF Новые алкогольные напитки брожения — возможности и проблемы. В ферментированных напитках. Том 5: Наука о напитках; Грумезеску, А.М., Холбан, А.М., ред.; Издательство Woodhead : Кембридж, Массачусетс, США, 2019; стр. 577–603. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

70. Кальзада, Дж. Ф.; Гарсия, Р.; Поррес, К.; Рольц, К. Комплексное использование побочных продуктов и отходов переработки кофе. *Международ. Биосист.* 1989 г., 2, 41–51.
71. Гарсия Р.; Арриола, Д.; де Арриола, МС; де Поррес, Э.; Рольц, К. Характеристика пектина кофе. *Лебенсм. Висс. Технол.* 1991, 24, 125–129.
72. Манаса, В.; Падманабхан, А.; Ану Аппайя, К.А. Использование отходов кофейной пульпы для быстрого извлечения пектина и полифенолов для устойчивого вторичного использования материалов. *Управление отходами.* 2021, 120, 762–771. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
73. Райхембах, Л.Х.; де Оливейра Петкович, С.Л. Извлечение и характеристика пектина из мякоти кофе (*Coffea arabica* L.), обладающего желирующими свойствами. *углевод. Полим.* 2020, 245, 116473. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
74. Бонилья-Эрмоса, Вирджиния; Дуарте, ВФ; Шван, РФ Использование побочных продуктов кофе, полученных в процессе полувывытого кофе, для производство соединений с добавленной стоимостью. *Биоресурс. Технол.* 2014, 166, 142–150. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[Пубмед\]](#)
75. Бейкер, Р.А. Переоценка содержания пектина в некоторых фруктах и овощах. *Дж. Пищевая наука.* 1997, 62, 225–229. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
76. Батис, К.; Филс-Лиакон, Б.; Бурет М. Изменения пектина при созревании плодов вишни. *Дж. Пищевая наука.* 1994, 59, 389–393. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
77. Техрани, Н.Ф.; Аснар, Дж. С.; Кирос, Ю. Остаток кофейного экстракта для производства этанола и активированного угля. *Дж. Чистый. Произв.* 2015, 91, 64–70. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
78. Bassoli, D.G. Спиртные напитки, приготовленные из кофейной гущи холодного заваривания. Патент США 20190390147A1, 26 декабря 2019 г.
79. Навиа, Д.П.; Веласко, Р.Дж.; Ноуос, JL Производство и оценка этанола из побочных продуктов переработки кофе. *Биография* 2011, 18, 287–294.
80. Гувеа, Б.М.; Торрес, К.; Франка, АС; Оливейра, Л.С.; Оливейра, Э.С. Возможность производства этанола из кофейной шелухи. *Биотехнолог. лат.* 2009, 31, 1315–1319. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
81. Лопес, АСА; Андраде, Р.П.; де Оливейра, ЛСС; Лима, ЛМЗ; Сантьяго, Западная Дания; де Резенде, MLV; дас Гракас, CM; Duarte, WF Производство и характеристика нового дистиллята, полученного в результате ферментации побочных продуктов влажной обработки кофе. *Дж. Пищевая наука. Технол.* 2020, 57, 4481–4491. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
82. Lachenmeier, DW. Быстрый контроль качества спиртных напитков и пива с использованием многомерного анализа данных инфракрасного преобразования Фурье. *спектры. Пищевая хим.* 2007, 101, 825–832. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
83. Сомашекар, КЛ; Ану Аппайя, К.А. Шелуха кофейной вишни — потенциальное сырье для производства спирта. *Международ. Дж. Окружающая среда. Управление отходами.* 2013, 11, 410–419. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
84. Бодмер, С.; Рудер, Ф. Спирт кофейной вишни и процесс его производства. Европейский патент EP1593735B1, 7 мая 2004 г.
85. Клингель Т.; Кремер, Дж.И.; Готтштейн, В.; Райчич де, РТ; Шварц, С.; Лакенмайер, Д. В. Обзор побочных продуктов кофе, включая листья, цветки, вишню, шелуху, серебристую кожуру и отработанную гущу, как новых продуктов питания в Европейском Союзе. *Foods* 2020, 9, 665. [\[CrossRef\]](#) [\[Пубмед\]](#)
86. Сампайо, А.; Драгоне, Г.; Виланова, М.; Оливейра, Дж. М.; Тейшейра, Дж. А.; Муссатто, С.И. Производство, химическая характеристика и органолептический профиль нового спирта, полученного из отработанной кофейной гущи. *LWT Food Sci. Технол.* 2013, 54, 557–563. [\[Перекрестная ссылка\]](#)