

# Peyniraltı Suyundan Mikrobiyel Yağ Üretimi

Yrd. Doç. Dr. Arzu AKPINAR BAYİZİT - Yrd. Doç. Dr. Tülay ÖZCAN YILSAZ  
Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 16059 Görükle Bursa

## ÖZET

Günümüz biyolojik araştırmaları, mikroorganizmaların ticari amaçla kullanılabilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Tek Hücre Yağı (THY) olarak nitelenen mikrobiyel yağ üretimi için pek çok mikroorganizma düşünülebilirken, son yıllarda yapılan çalışmalar çoğunlukla mayalardan yararlanarak bu üretimin geliştirilebilmesine yöneliktir. Bu amaçla incelenen mayalar arasında *Candida curvata*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces starkeyii* ve *Cryptococcus albidis* sayılabilir.

Hücre bileşimlerinde yüksek miktarda yağ içeren (% 20 veya daha yüksek oranda) birçok maya bulunmaktadır, ki bu durum gelişme koşullarına bağlıdır. Hücre içinde yağ birikimi, organizmanın gelişmesi için gerekli olan bir besin maddesi (genellikle azot) tükendiği ve ortamda fazla miktarda kullanılabilir karbon bulunduğu zaman gerçekleşmektedir.

Mikrobiyel yağların ticari olarak dikkat çekmesi ancak mevcut bitkisel ve hayvansal yağlara benzer özelliklerde olmaları ile mümkündür.

Bunların yanı sıra, THY üretiminde kullanılan substratın ucuz, sürekli ve bol miktarda olması gerekmektedir. Peynir üretimi sırasında yan ürün olarak elde edilen ve gerekli besin maddelerince zengin olan peyniraltı suyu bu amaç için uygun bir substrattır.

**Anahtar Kelimeler:** Peyniraltı suyu, maya, mikrobiyel yağ

## Production of Microbial Lipids from Whey

### ABSTRACT

Present biotechnological research has concentrated on the commercial exploitation of microorganisms. Various microorganisms can be used as a source of microbial oils, known as Single Cell Oil (SCO); however, recent studies are based on development of SCO production using yeast technology. Among the yeasts *Candida curvata*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces starkeyii* and *Cryptococcus albidis* are attracting considerable attention. Certain yeast species can accumulate high amounts of lipid (20 % or more) in their cells, determined by culture conditions. Lipid accumulates in oleaginous microorganisms when there is an excess of carbon available to the cells during a period when another nutrient (usually nitrogen), which is required for cell proliferation, is exhausted from the medium.

For microbial oils to be considered for commercial production, these products should have similar properties to current supply of conventional plant and animal oils.

Moreover, for commercial consideration of SCO the substrate for microbial growth must be continuous, abundant and inexpensive. Whey, a by-product of cheese production, has sufficient growth nutrients in excess and, therefore, is an appropriate substrate for microbial synthesis.

**Key Words:** Whey, yeast, microbial lipid

## GİRİŞ

Mikrobiyel yağ konusu üzerindeki çalışmalar 2. Dünya Savaşı sırasında hızlanmış olmasına rağmen savaş sonrasında oldukça azalmıştır. Bununla birlikte, son yıllarda

mikroorganizmaların ticari anlamda geliştirilmesi ve yağ fiyatlarının sürekli olarak değişmesi bu konuya olan ilgiyi arttırmıştır [1,2].

Mikrobiyel bir ürünün ekonomik olması ancak substrat maliyetinin ucuz ve sürekli olduğu bir fermentasyon ile mümkündür. Mikrobiyel yağların pazar imkanı, üstün niteliklere sahip ise ya da üretim maliyeti diğer yağlara göre daha düşük ise oluşmaktadır [3,4,5]. Bir mikroorganizmanın "yağlı" olarak nitelendirilebilmesi için % 20 veya daha fazla miktarda yağ içermesi gerekmektedir. Organizmanın yağ içeriği gelişme koşullarına bağlıdır. Yağ birikimi, organizmanın gelişmesi için gerekli olan bir besin maddesi tükendiği ve ortamda fazla miktarda kullanılabilir karbon kaynağı bulunduğu zaman gerçekleşmektedir. Bu kısıtlayıcı madde genellikle azottur, fakat fosfat, potasyum, magnezyum, sülfat ve hatta demir de olabilir [1,4,6].

Mikrobiyel yağ çalışmalarında yararlanılabilecek yağlı (oleaginous) mikroorganizma sayısı çok fazladır [7,8]. Bu çalışmalarda asıl amaç, fermentasyon sonucu elde olunan ürünün yenilebilir bitkisel yağların yerine kullanılabilir nitelikte olmasıdır. Ratledge [8], mikrobiyel yağları incelediği bir çalışmada birçok yağlı mikroorganizma türünü açıklamıştır. Bazı maya türleri, kurumaddelerinin % 50'sinden fazlasını yağ olarak depolayabilmektedir, ki bunlar arasında *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* ve *Trichosporon* yer almaktadır. Ayrıca, bu mayalardan elde edilen yağların karışık trigliseritleri de içerdiği bulunmuştur.

Son yıllarda yapılan mikrobiyel yağ konusu üzerindeki çalışmalar özellikle mayaları kapsamaktadır; örneğin, *Candida curvata* [9,10,11], *Rhodotorula glutinis* [12], *Lipomyces starkeyii* [13] bu mayalara örnek olarak verilebilir. Rusya'da, bir grup araştırmacı yaptıkları çalışmada *Cryptococcus albidus*'un en iyi yağ üreticisi olduğunu ileri sürmüşlerdir [14].

Mikrobiyel yağ üretimi tek hücre proteini üretimine benzerdir. Buradaki işlem basamakları yeni değildir, tek fark yağ oranı yüksek olan bir mikroorganizmanın kullanılmasıdır. İşlem tasarımı ve geliştirilmesinde dikkat edilecek üç önemli nokta vardır: bunlar fermentör seçimi, hücre konsantrasyonu ve yağın ekstraksiyonudur.

Mayalardan yağın eldesi için kullanılan bir pilot üretim tesisinde gözlenen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

✍ Hücre içinde, maksimum oksijen isteğine ulaşmadan ve kullanılabilir azot bitmeden önce çok az yağ vardır.

✍ Yağ asidi kompozisyonu zaman içinde değişmektedir. En başlarda linoleik asit içeriği oldukça yüksek olan yağın büyük bir kısmı polar lipidlerden ve sterollerden oluşmaktadır. Trigliserit oluşumu gözlendikçe bu oran % 5'ten aza düşmekte ve yağ asidi içeriği değişmektedir. Linoleik asit oranı % 6'ya düşerken oleik asit oranı % 50'ye kadar çıkmaktadır.

✍ Kullanılabilir laktoz miktarı zamana bağlı olarak lineer şekilde azalmaktadır.

✍ Maksimum oksijen isteğine kullanılabilir azot bitmeden hemen önce ulaşılmıştır. Bu noktada CO<sub>2</sub> üretiminde azalma gözlenmektedir [15].

## MİKROBİYEL YAĞ ÜRETİMİ İÇİN PEYNİRALTI SUYUNUN KULLANILMASI

Mikroorganizmalar birçok karbon kaynağını kullanabilir ve yağ üretebilir. Bu tür bir üretimin ekonomik olabilmesi için

çeşitli küflerin ucuz endüstri atıklarından (petrol endüstrisi ürünleri, peyniraltı suyu, melas, vb.) yararlanma imkanları incelenmiştir [8].

Doğal niteliklerini kısa bir sürede kaybedebilen sütün değerlendirilmesi bakımından önemli bir ürün olan peynir, hayvansal protein gereksiniminin karşılanmasında önemli bir süt ürünüdür. Sütün sadece bir kısmını kullanabilen peynir endüstrisinde, yan ürünler içerisinde peyniraltı suyu ilk sırayı almaktadır [16,17].

Peyniraltı suyu, üretim sırasında pıhtıdan ayrılan, yeşilimsi sarı renkte ve protein, laktoz, mineral maddeler ve vitaminlerce zengin bir sıvıdır (Tablo 1) [17,18]. Süt kurumadnesinin % 50'si peyniraltı suyunda yer almakta, ve bu kurumadde de bulunan öğeler besin değerini arttırmakla birlikte, özellikle laktoz, protein ve mineral madde bileşimi ile peyniraltı suyu fermentasyon endüstrisi için uygun bir hammadde özelliği taşımaktadır [19,20,21,22]. Bu nedenle peyniraltı suyundaki bileşenlerin, özellikle laktozun değerlendirilmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

**Tablo 1.** Peyniraltı suyunun bileşimi (%) [17].

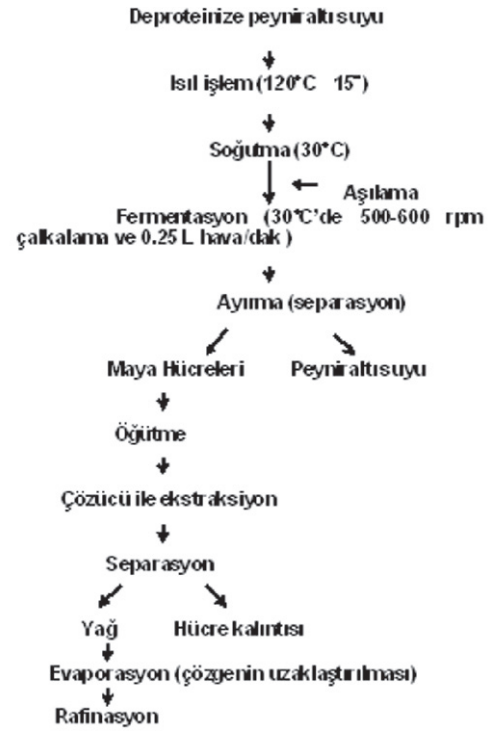
<b>Kurumadde</b>	6,20 - 7,00
<b>Laktoz</b>	4,40 - 5,00
<b>Protein</b>	0,80 - 1,50
<b>Yağ</b>	0,10 - 0,40
<b>Mineral Maddeler</b>	0,50 - 0,70
<b>Ca</b>	0,03 - 0,07
<b>P</b>	0,04
<b>K</b>	0,13 - 0,16

Mayalardan yağ üretiminde, peyniraltı suyunun kullanıldığı ticari üretimler için kesikli fermentasyon uygulanmaktadır, çünkü peyniraltı suyu süt üretimindeki değişimlere bağlı olarak nicelik ve kalite bakımından sürekli bir değişim göstermektedir [5,23]. Tüm peyniraltı sularında (rennetli, laktik, sülfirik ve cheddar) maksimum biyokütle ve yağ verimine ulaşılabilir. Bununla birlikte, aynı tür peyniraltı suyunun farklı partileri arasında yağ verimlerinin de farklı olduğu gözlenmiştir. Bu durum, her partide peptidler şeklinde bulunan azotun farklı oranlarda olmasına bağlanabilir [24,25].

Yapılan çalışmalarda üretim sırasında, peyniraltı suyu çeşidinin, fermentasyon pH'sının, havalandırma ve karıştırma oranı gibi parametrelerin değiştirilmesi biyokütle ve yağ verimi üzerinde etkili olmamıştır. Buna karşın fermentasyonun kesikli ya da sürekli olması elde edilen yağların yağ asidi bileşimlerini etkilediği için önem kazanmaktadır [26,27].

Mikrobiyel yağ üretimi sırasında izlenen işlem basamaklarını genel olarak şu şekilde gruplayabiliriz: Peyniraltı suyuna uygulanan ısıl işlemler, fermentasyon, hücrelerin konsantrasyonu, kurutma, hücre duvarlarının parçalanması, ekstraksiyon, yağ / çözgen fazından hücre kalıntısının ayrılması ve yağsız hücrelerin (peyniraltı suyu proteinlerinin) taşınması (Şekil 1). Peyniraltı suyuna uygulanan ısıl işlemler ile laktalbumin çökerken pastörizasyon da sağlanmış olur. Fazla miktarda üretimlerde enerji ihtiyacını minimize etmek için kullanılan fermentörler genellikle bakteriyel bulaşma etkenlerinin gelişmesini engelleyen pH 3.5'ta çalışmaktadır. Besi ortamından hücreler santrifüjlenerek ya da membran filtrasyon ile ayrıldıktan sonra % 35 kurumadde düzeyine kadar kurutulmaktadır. Çözücü ekstraksiyonunu daha etkin bir duruma getirmek için kuru hücrelerin parçalanması gerekmektedir. Çözücü düşen film evaporatörlerde uzaklaştırılır, fosfatidlerin ayrımı için musilaj giderme uygulanarak parlak sarı renkte ham maya yağı elde edilmiş olur [5].

**Şekil 1.** Peyniraltı suyundan mikrobiyel yağ üretim aşamaları [5].



Yağ ekstraksiyonu için en ekonomik olan mekanik yöntemlerin kullanılmasıdır. Bunlar arasında buhara tabi tutarak, homogenizasyon ile, öğütme ve solvent ekstraksiyonu ile birlikte preslemenin kullanılması sayılabilir.

Tüm yağlı hücrelerde olduğu gibi, mayalar için de genel kural, çözücülerin yağı etkin şekilde ekstrakte edebilmeleri için maya hücre duvarının önceden parçalanmasıdır [1,28]. Maya hücre duvarlarının parçalanması için otoliz [29], enzim hidrolizi [30], asit veya alkali uygulaması ve mekanik parçalama [31,32,33] uygulanabilir. Bununla birlikte, Moon ve Hammond [9], Candida curvata'nın yağ ekstraksiyonunda etanol / hekzan ve metanol / benzen çözücü karışımlarının kullanılmasının olumlu sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, yağ ekstraksiyonu için etanol / hekzan / kloroform çözücü karışımının kullanılmasının iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Eğer, üretilen bu yağ insan tüketimine sunulacak ise o zaman kullanılacak çözücü etanol, izopropil alkol, aseton ya da hekzan ile sınırlandırılmaktadır [5].

#### **MAYALARDAN ELDE EDİLEN YAĞIN ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM ALANLARI**

Literatürde mikroorganizmalardan elde edilen yağların, ticari olarak değerlendirilmeleri göz önüne alınarak, özellikleri ve yenilebilirliği hakkında fazla bilgi yoktur. Çalışmalarda yalnızca, Candida curvata ile Rhodotorula glutinis'den elde edilen yağın özelliklerinin tam olarak belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır [5,12,15,34].

Candida curvata'dan elde edilen yağın serbest yağ asitleri düzeyi % 2'ye ayarlandığı zaman, ham yağ şeklinde sabun yapımında direkt olarak kullanılabilir. Ayrıca, hayvan besleme ve tekstil yağı olarak da değerlendirilebilir. Hammond ve ark. [34], Candida curvata'dan elde edilen yağın erime noktasının trigliserit düzeyinde kakao yağı benzeri yağlara yakın olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca, Candida curvata'dan elde edilen bu yağ, palmiye ağacı yağının düşük erime noktasına sahip olan "palm olein" fraksiyonuna benzer özellik göstermektedir. Palm olein balık köftesi, patates cipsi, parmak patates ve diğer hafif yemeklerin kızartılmasında kullanılmaktadır [5].






Mayalardan elde edilen yağın palm oleini yerine kullanılması konusunda iki önemli problem vardır. Bunlardan birincisi, palmiye ağacının çok yaygın ekiminden dolayı yüzünün sonuna doğru çok fazla miktarda palmiye yağı ürününün piyasada bulunmasıdır. Bu durumda, maya yağı palmiye okyanusu içinde bir zerrecik gibi kalacaktır. İkinci problem ise, mayalardan elde edilen yağın yenilebilir olduğuna dair uluslararası onay alması gerekmektedir. Bu amaçla, çeşitli hayvan denemeleri yapılarak maya yağının toksik etkisinin olup olmadığı belirlenmelidir [15].

Mayalardan elde edilen yağın rafinasyonu diğer tüm yenilebilir yağlara uygulanan standart rafinasyon teknolojisi ile (müsilaj giderme, nötralizasyon, renk açma ve koku giderme) aynıdır. Rafinasyon sonrasında istenen özelliklere ulaşılabilmektedir. Rafine edilmiş yağlar temiz, kokusuz ve berrak parlak sarı renktedir ve peroksit değerleri kabul edilebilir düzeydedir [15].

**Tablo 2.** Rafine edilmiş maya yağının özellikleri [15].

<b>Nem ve yabancı madde</b>	Maksimum % 0,1
<b>Serbest yağ asitleri</b>	Maksimum % 0,1 (oleik asit cinsinden)
<b>Erime noktası</b>	20 - 23°C
<b>İyot sayısı</b>	50 - 55
<b>Özgül ağırlık (25 °C)</b>	0,91 - 0,92
<b>Peroksit sayısı</b>	Maksimum 4,0 meq / kg
<b>Koku</b>	Yabancı tat ve koku yok
<b>Renk (Lovibond değeri)</b>	Maksimum 30 Y 30 R

Mayalardan elde edilen yağın kullanım alanının genişlemesi, yağın stabilize olması ve saflaştırılması ile mümkündür. Bu özellikler rafinasyon işlemleri ile sağlandığı zaman, uygulama alanlarını şu şekilde sıralayabiliriz [15].

-  Kozmetik krem ve losyonları,
-  Gıda yağları (palm oleini, kakao yağı gibi),
-  Gıda yapı düzenleyicileri,
-  Karıştırma yağları,
-  Yenilebilir yağlar - margarin, kızartma yağı, vb.

## SONUÇ

Maya yağı üretiminin ticari olarak geliştirilmesi peyniraltı suyu kaynağının işletmeye yakınlığına ve miktarına bağlıdır. İşletmeye gelen peyniraltı suyunun miktarı ve bileşimi sütün değerlendirme şekillerine göre değişmektedir. Kullanılan substrat elde edilen yağın yağ asidi bileşimini direkt olarak belirlemektedir. Bu nedenle farklı peynirlere ait peyniraltı sularından elde edilen mikrobiyel yağlar da farklı özellikler göstermektedir.

Elde edilen yağ insan beslenmesi için kullanılacak ise nötralizasyon, renk açma ve koku giderme gibi rafinasyon işlemlerine de gerek vardır.

Bu tür bir üretimde ikinci bir ürün, yaklaşık % 20 oranında gerçek protein (amino asit içeriği / yağsız kuru hücre, % olarak) içeren yağsız maya hücreleridir. Peyniraltı suyu permeate yerine bütün peyniraltı suyunun kullanılmasıyla, ısı ile çöken peyniraltı suyu proteinlerinin bu yağsız hücrelere ilave edilmesi ile gerçek protein oranı % 40-45'e çıkarılabilmektedir. Ayrıca, peyniraltı suyunun tamamının kullanılması prosesi daha ekonomik hale getirmektedir.

Bu işlemler arasında en fazla harcamalar fermentörlerin havalandırılması, yağ mayanın kurutulması ve kullanılan çözücünün büyük bir kısmının kayıp olması nedeni ile yağ ekstraksiyonu basamaklarında olmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Ratledge, C., 1982a. Single Cell Oil, Enzyme and Microbial Technology 4: 58-60.
2. Powell, K.A., Rogers, B.L.F., 1984. In *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics*. (ed. C.T.HOU) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp 119-144.
3. Ratledge, C., 1979. The Possibilities of Single Cell Oil. In *Microbiology Applied to Biotechnology, Proceedings of the XII. International Congress of Microbiology*, Munich, pp 165-180.
4. Ratledge, C., 1991. Microorganisms for Lipids. *Acta Biotechnologica* 11: 429-438.
5. Davies, R. J., 1992. Scale Up of Yeast Oil Technology. In *Industrial Applications of Single Cell Oils*. (eds. Wiseman, A ) pp 196-218.
6. Akpınar, A., 1997. Transformations of Fatty Acids in Filamentous Fungi. Ph.D. Thesis, University of Hull, Hull. UK. 321 p.
7. Weete, J.D., 1980. *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms*. Plenum Press, London.
8. Ratledge, C., 1982b. Microbial Oils and Fats: an Assessment of their Commercial Potential. *Progress in Industrial Microbiology* 16: 119-206.
9. Moon, N.J., Hammond, E.G., Glatz, B.A., 1978. Conversion of Cheese Whey Permeate to Oil and Single-Cell Protein. *Journal of Dairy Science* 61: 1537-1547.
10. Floetenmeyer, M.D., Glatz B.A, Hammond E.G.,1985. Continuous Culture Fermentation of Whey Permeate to Produce Microbial Oil. *Journal of Dairy Science* 68: 633-637.
11. Evans, C.T., Ratledge, C., 1983. A Comparison of the Oleaginous Yeast, *Candida curvata*, Grown on Different Carbon Sources in Continuous and Batch Cultures. *Lipids* 18 (9): 623-639.
12. Mırsal, S., Grosh, A., Dutta, J., 1984. Production and Composition of Microbial Fat from *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 59-65.
13. Yamauchi, H., Mori, H., Kobayashi, T., Shimizu, S. 1983. Mass Production of Lipids by *Lipomyces starkeyi* in Microcomputer-Aided Fed-Batch Culture. *Journal of Fermentation Technology* 61: 275-280.
14. Zhelifonova, V.P., Krylova, N.I., Dedyukhina, E.G., Eroshin, V.K. 1983. The Study of Oleaginous Yeasts Grown in a Medium With Ethanol. *Mikrobiologiya* 52:219-224.
15. Davies, R.J.1988. Yeast Oil from Cheese Whey - Process Development. In *Single Cell Oil*, (ed. R. S. Moreton), Longmans Publishing Company, England, pp 99-146.
16. Kurt, A.1990. Süt teknolojisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 257.Erzurum.398 s.
17. Özcan, T., Ovalı, B. B.1997. Bursa'da Tüketime Sunulan Lor Peynirlerinin Bileşiminin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* 68 (4): 63-65.
18. Özcan, T., Erbil, F., Kurdal, E.1996. Peyniraltı Suyundan Laktozun Geri Kazanım Aşamaları. *Süt Teknolojisi Dergisi* 1 (2): 55-57.
19. Anonim, -. *Dairy Handbook*. Alfa-Laval. 333 s.
20. Gürsel, A., Avcı, S. 1989. Peyniraltı suyu içecekleri. *Sütçülük Dergisi* 2 (6): 27-30.
21. Hugunin, A.G. 1980. Whey. An Opportunity for the Baking Industry. *Bakers' Digest* 54 (4): 8.
22. Topal, Ş. 1982. Çeşitli Tarımsal Artıklar ve Gıda Sanayii Artıklarının Mikrobiyolojide Besiyeri Olarak Kullanılabilir Olanaklarının Araştırılması. TÜBİTAK MAE Yayın No: 58, Gebze.
23. Zadow, J.G. 1986. Utilisation of Milk Components: Whey. *Modern Dairy Technology. Vol 2, Advances in Milk Products*. (ed. Robinson, R. K.)Elsevier Applied Science Publ. Ltd., London. 313-365 p.
24. Davies, R.J. 1983. Microbial Oil from Whey. Report of the Department of Scientific and Industrial Research, New Zealand. No: IPD7TSO/2011 DSIR.
25. Davies, R.J.1984. Oil from Whey. *Food Technology in New Zeland*. June: 33-37.
26. Davies, R.J., Gordon, T.1984. Continuous Production of Yeast Oil from Whey. *Proceedings 5<sup>th</sup> Australian Biotechnology Conference, Brisbane*. September 5-7 : 127-134.
27. Ratledge, C. 1989. Biotechnology of Oils and Fats. In *Microbial Lipids, Vol 2*, (eds. Ratledge C. & Wilkinson, S.G.), Academic Press, London. pp 567-651
28. Kaneko, H., Hasohara, M., Tanaka, M, Itoh, T. (1976) Lipid Composition of 30 Species of Yeast. *Lipids* 11(12): 837-847.
29. Reed, G., Peppler, J.H. 1973. *Yeast Technology*. AVI Publishers, Westport, Connecticut. 1082 p.
30. Asenjo, J.A., Dunhill, P. 1981. The Isolation of Lytic Enzymes from Cytophaga and their Application to the Rupture of Yeast Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 23 : 1045-1056.
31. Limon-Lason, J., Howard, M., Osborn, C.B., Doyle, D.J., Dunnill, P. 1979. Reactor Properties of a High Speed Bead Mill for Microbial Cell Rupture. *Biotechnology and Bioengineering*. 21 (5): 745-774.
32. Engler, C.R. and .Robinson. C.W. 1981. Disruption of *Candida utilis* Cells in High Pressure Flow Devices. *Biotechnology and Bioengineering* 23 : 765-780.
33. Shulte, H., Kroner, K.H., Hustedt, H., Kula, M.R. 1983. Experiences with a 20 liter Industrial Bead Mill for the Disruption of Microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 5 : 143-148.
34. Hammond, E.G., Glatz, B.A, Choi, Y., Teasdale, M.T. 1981. *AOCS Monograph No. 9* (eds. E.H.Pryde, L.H.Princen and K.D.Mukherjee) Champaign Illinois, 171-187.