

İspirto Mayaları

Yard. Doç. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Ank. Üniv. Ziraat Fak. Gıda Bilimi ve Tekn. Anabilim Dalı — ANKARA

1. GİRİŞ

«İspirto mayası» fermentasyon yoluyla ve damıtılmak suretiyle elde edilen etanolün üretiminde kullanılan mayalara pratikte verilen bir isimdir. Endüstriyel amaçla en yaygın olarak *Sacchomyces cerevisia* suşları kullanılır. *Sacchomyces cerevisiae*'nin en belirgin özellikleri; fermentasyondaki yüksek hız ve ürün, geniş pH aralığı, yüksek etanol toleransı ve üretimde maya kitlesinin teknik yönden kolay işlenebilmesidir.

Sacchomyces cerevisiae dışında etanol fermentasyonunda kullanılan diğer mayalar; peynir altı suyundan etanol üretiminde *Kluyveromyces fragilis (lactis)*, rom üretimi için *Shizosaccharomyces pombe*, viski üretimi için karışık kültürde *S. cerevisiae* ile birlikte kullanılan *S. uvarum* veya *S. carlsbergensis*'lerdir.

Endüstriyel bir etanol prosesinde arzulan özellikler fermentasyonda kullanılan mayanın seçimine oldukça bağlıdır. Alkol fermentasyonunda kullanılacak mayadan istenen başlıca özellikler şunlardır (2, 6, 12) :

- etkili substrat kullanımı,
- hızlı fermentasyon,
- yüksek etanol verimi ve toleransı,
- düşük pH'ya dayanıklılık,
- yüksek sıcaklığa dayanıklılık,
- hücrelerin yüksek oranda canlılığı,
- maya kitlesinin teknik yönden kolay işlenebilmesi,
- enfeksiyonlara karşı dayanıklılık,
- damıtık alkollü içki üretiminde iyi aromalı ürün vermesi.

Etanol üretiminde kullanılacak mayalar, uygulanan fermentasyon prosesine ve hammaddenin bileşimine göre bu faktörleri optimize edebilmelidirler.

İspirto mayaları (*S. cerevisiae* türleri) 46°C ye kadar dayanıklı, pH 3 - 10 aralığında, hacim olarak % 0 - 15 alkol varlığında ve

% 0.1 - 25 şeker konsantrasyonlarında çalışabilen, etkin, küçük biyokimyasal faktörler olarak tanımlanmışlardır. İspirto mayasının 1 g kuru ağırlığında $3.2 - 4.6 \times 10^{10}$ hücre bulunur. Böylece bir tek hücre ağırlığı yaklaşık 2.5×10^{-11} g veya 25 picogram'dır (1).

2. İSPİRTO MAYASININ ÇOĞALTILMASI

İspirto mayasının çoğaltılması;

- spontan fermentasyon,
- havalı fermentasyon,
- özel ekşi fermentasyon,
- ekmek mayası üretim tekniği ve
- diğer bazı modern çoğaltma yöntemleriyle yapılmaktadır.

Örneğin ALKO (Finish State Alcohol Company)'da uygulanan modern bir işlem Şekil 1' de görülen aşamaları içermektedir (6).

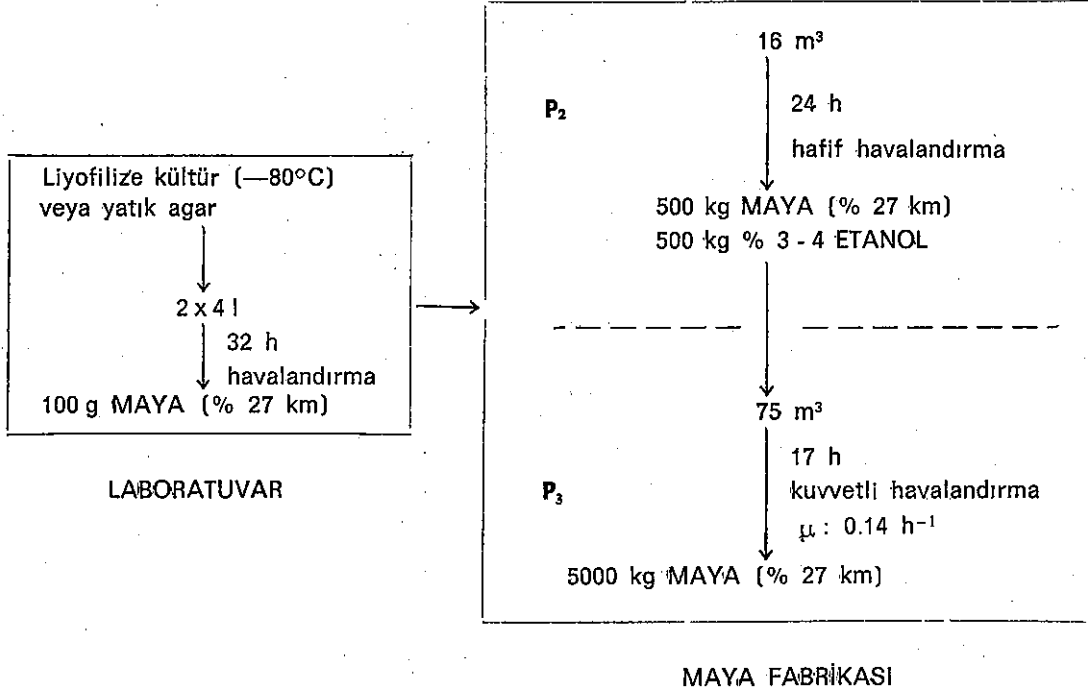
Bu yöntemin en önemli özelliği; P₂ aşamasında oluşan % 3 - 4 oranındaki alkolün P₃ aşamasında hücre kitlesi oluşumu için kullanılmasıdır. P₃ aşamasında etanol miktarı % 0.7 den % 0.01'e düşmektedir. Bu aşamada maya gelişme hızı (μ) 0.14 h⁻¹ dir. Elde olunan mayanın azot içeriği tipik olarak 7.5 g/100 g maya kuru maddesidir. Büyük ölçekteki aşamalarda (P₂ ve P₃) ortalama verim, % 50 sakkaroz içeren 100 kg pancar melası için 65 kg (% 27 kuru maddeli) mayadır (6).

3. İSPİRTO MAYASININ ÖZELLİKLERİ

İspirto mayasının özellikleri; mayanın sıcaklık, pH, oksijen, substrat ve diğer besin maddelerine, ayrıca etanol, karbondioksit, yüksek alkoller v.b. ana ve yan ürünlere karşı duyarlılığı ile belirlenir (2, 6).

3.1. Sıcaklık

Bir mikroorganizma için optimum çalışma sıcaklığı kinetiği belirleyen 4 terim üzerine etkisiyle açıklanır. Bunlar;



Şekil 1. ALKO'da ispiro mayası çoğaltılması (6).

- özgül gelişme hızı, μ (h⁻¹)
- hücre konsantrasyonu, X (g.l⁻¹)
- özgül ürün verimliliği, V (g.g⁻¹h⁻¹)
- ürün konsantrasyonu P (g.l⁻¹)'dur.

Korhola ve ark. (1985) yüzden fazla ispiro mayası suşunun en yüksek gelişme sıcaklıklarını, katı yüzeyde, Şekil 2'deki dağılıma uygun olarak saptamışlardır (6).

Şekil 2 de popülasyonun çok homojen olduğu, suşlar arasındaki en yüksek gelişme sıcaklığı farkının 6°C'yi aşmadığı görülmektedir. Suşların çoğu 39 - 40°C de, hatta bazıları 41°C de bile belişebiliyor, fakat daha yüksek sıcaklıklarda hiçbiri gelişemiyor (6).

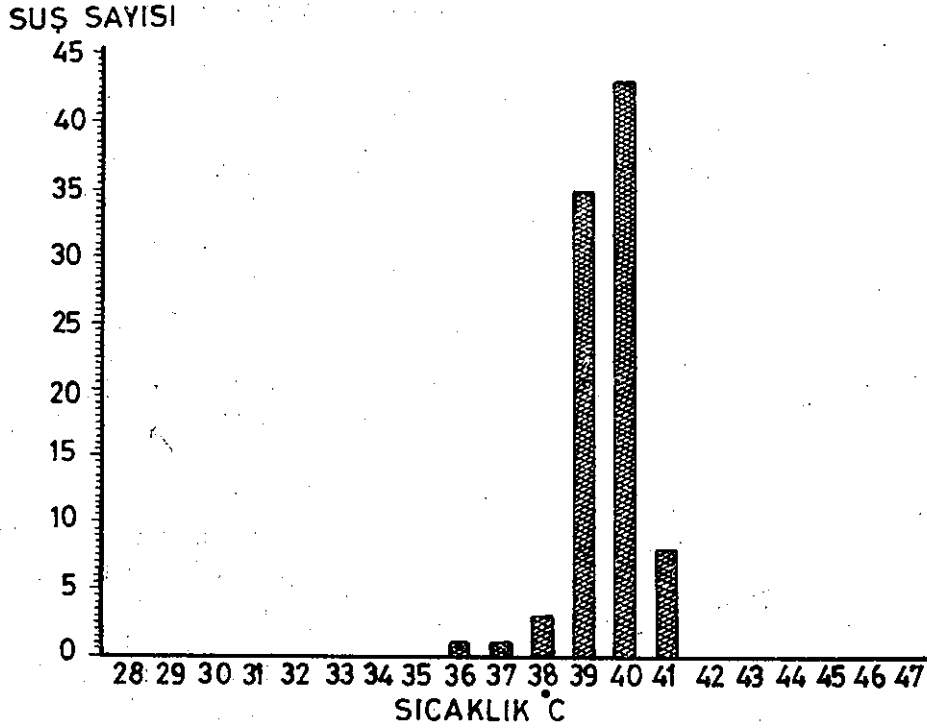
Literatürde mayalar için belirtilen en yüksek gelişme sıcaklığı *Kluyveromyces marxianus*'a ait olup 49°C dir (5).

Pamir (1978) etanol üretiminde maya çoğaltma sıcaklığının 25 - 27°C, fermentasyon sıcaklığının ise 33 - 34°C olması gerektiğini, daha yüksek sıcaklıklarda mayanın gücünün zayıfladığını belirtmektedir (10).

Korhola ve ark. (1985)'na göre ispiro mayaları için en uygun fermentasyon sıcaklığı 30°C civarındadır (Şekil 3). Bu endüstriyel uygulamalarla uyum içerisindedir. Hücre gelişmesi inkübasyon sıcaklığındaki artışla birlikte hemen hemen doğrusal bir biçimde azalmaktadır (6).

Şekil 3 den anlaşılacağı gibi, «toplam yüksek alkol» miktarı 35°C fermentasyon sıcaklığında en yüksek düzeydedir (6). Yüksek alkol oluşumunun sıcaklıkla olan bu ilişkisi belki de, damıtık alkollü içkilerde flavor gelişmesinin kontrolüne olanak verecektir. Örneğin viski endüstrisinde bu durumdan yararlanılabilir.

Fermentörün soğutulması masraflarından kaçınmak amacıyla yüksek sıcaklıklarda çalışabilen bir ispiro mayasının seçilmesi istenir. Hesaplamalar fermentasyon sıcaklığının 30°C den 40°C ye çıkartılmasının elde edilecek etanolün toplam üretim masraflarında % 2 lik bir tasarrufa neden olabileceğini göstermiştir (6).



Şekil 2. İspirto mayalarının, katı ortam üzerinde, en yüksek gelişme sıcaklıklarına göre dağılımı (6).

Bu nedenle sıcağa dayanıklı bir maya suşu elde etmek amacıyla yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Federal Alman Starcosa GmbH firması, şeker pancarı melasında optimum fermentasyon sıcaklığı 40-42°C olan «HETT 80» (High Ethanol and Temperature Tolerance) mayasını piyasaya tanıtmıştır. Sözü edilen maya bu sıcaklıklarda % 92 lik teorik verimle % 10 (H) etanol üretmektedir. Hücrenin yeniden kullanılmasıyla verim % 95 in üzerine çıkartılabilmektedir (6).

Alkol fermentasyonunda verimlilik (Qp ve Vp) ve verim, maya suşu ve fermentasyon sıcaklığının yanısıra diğer parametrelere de çok bağlıdır. Örneğin, substrattaki şeker ve besin maddeleri konsantrasyonu, ortam pH'sı, pH daki değişmelere karşı tamponlama ve fermentasyon süresi verimj önemli ölçüde etkiler. Verim genellikle 2 yolla hesaplanır :

- 1) Toplam şeker üzerinden verim
- 2) Kullanılan şeker üzerinden verim

Endüstriyel uygulamalarda hammadde kaybını gözardı etmemek için bu birinci hesaplama şekli daha yaygındır. 2. yol laboratuvar deneylerinde, daha anlamlı rakamlar verdiği için tercih edilir.

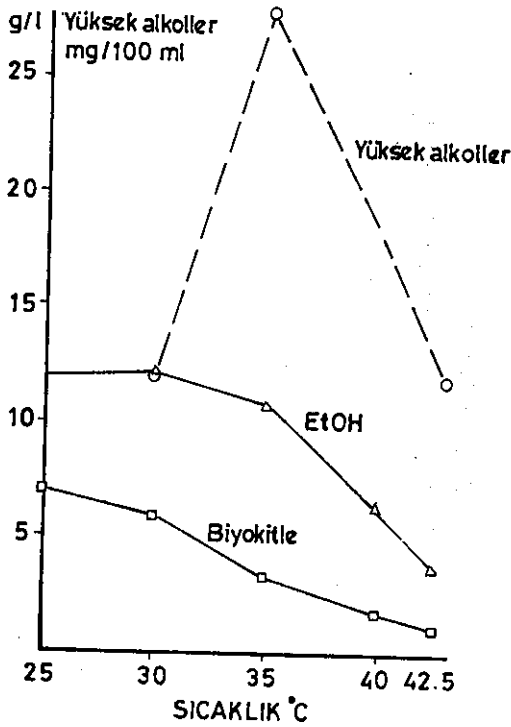
3.2. pH nın Etkisi

Mayanın iç pH sınır oldukça sabit olduğuna inanılır. Fakat değişik teknikler kullanılarak yapılan hücre pH sı ölçümleri farklılıklar gösterebilir.

Kültür ortamının pH sı gelişme ve etanol verimliliği üzerinde acık bir etkiye sahiptir (Şekil 4).

Şekil 4 de görüldüğü gibi, pH 3.5 de hücre gelişmesi ve hacimsal etanol verimliliği düşük, fakat etanol verimi yüksektir. Endüstriyel alkol fermentasyonlarında yaygın olarak kullanılan pH değerleri (pH 4-6) iyi gelişme ve kabul edilebilir etanol verimi arasında uyumlu bir denge sağlamaktadır (6, 9, 13).

Düşük pH larda (< pH 5) hücre gelişmesinin zayıf olmasına karşın, özellikle melas



Şekil 3. *S. cerevisiae* MK 270 suşunun çeşitli sıcaklıklarda, 72 saat fermentasyon sonunda ürettiği hücre kitlesi, etanol ve yüksek alkol konsantrasyonları (6).

fermentasyonunda, maya çoğaltmak amacıyla ekşi mayşe kullanmanın asıl nedeni bakteriyel kontaminasyonu önlemektir. Bu amaçla limit değer olarak laktik asit bakterilerinin iyi gelişemediği pH 3.3 esas alınmalıdır (8).

3.3. Oksijenin Etkisi

Saccharomyces mayasının, etanol üretiminde istenen iki farklı işlevi hücre çoğalması ve fermentasyondur. Hücre çoğalması, doymuş oksijen ve sınırlayıcı besin maddelerinin (örneğin karbon kaynağı) sağlanmasıyla birlikte tümüyle oksidatif koşullarda, en üst düzeyde meydana gelir. Ekmek mayası ve iştirto mayası üretiminde bu durumdan yararlanır.

Fermentasyon, karbon kaynağı düzeyine bağlı olarak aerobik ve anaerobik koşullarda gerçekleşir. Eğer şeker konsantrasyonu yüksek ise, maya mevcut oksijen miktarını dikkate almaksızın fermentasyona yönelir. Eğer şeker konsantrasyonu düşük ise, maya yalnızca düşük oksijen konsantrasyonlarında fermentasyon yapar. % 0.1 in üzerindeki şeker konsantras-

yonu oksidatif metabolizmayı baskılayacaktır (3).

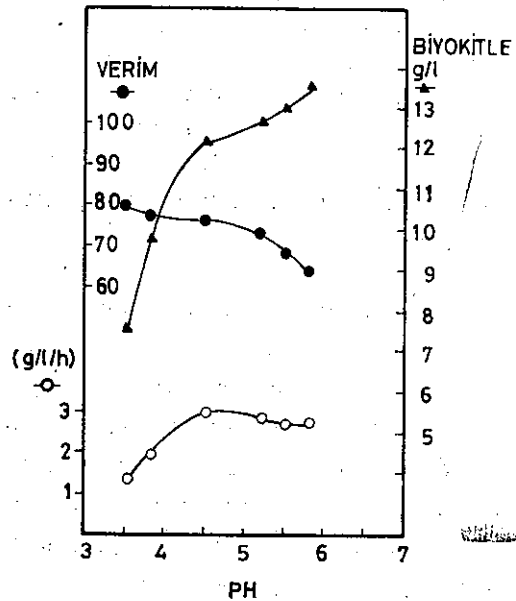
Oksijen; maya hücresinin canlılığına, hücre kütlesi ve etanol verimliliğine ve etanol toleransına etki eder. Bu etkilerin çoğu, oksijenin hücre duvarındaki sterollerin ve doymamış yağ asitlerinin biyosentezi üzerine etkisiyle açıklanabilir (6).

Oksijene olan gereksinme % 10 oranında, havalı koşullarda geliştirilmiş inokulant kullanmakla veya yeterince havalandırılmış mayşe kullanmakla kolaylıkla çözümlenebilir.

3.4. Mayşe (Şeker) Konsantrasyonu

«Osmotolerans» mayanın önemli bir karakteristiğidir. Osmotik basınç fermentasyon ortamındaki şeker, tuz v.b. çözünebilir maddelerin yüksek konsantrasyonlarıyla oluşur. Farklı mayaların osmotoleransları, sorbitol ve mannitol gibi mayalar tarafından kullanılmayan şeker alkollerinin bulunduğu ortamda hücrelerin fermentasyon hız ve derecelerinin ölçülmeleriyle saptanır (6).

Yüksek şeker konsantrasyonlarında, gelişmenin fermentasyon hızına oranla daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (2, 6).



Şekil 4. *S. cerevisiae* MK 270 suşunun değişik pH'larda hücre kitlesi, hacimsel etanol verimliliği ve etanol verimi (6).

3.5. Diğer Besin Maddelerinin Etkisi

Mayanın kuvvetli gelişebilmesi ve fermentasyon yapabilmesi için çok sayıda makro ve mikrobeseinlere gereksinimi vardır. Makrobeseinler karbon, azot ve fosfor bileşiklerini içerir. Bunların ilave edilip edilmemesi hammaddeye bağlıdır. Hammaddeler genellikle, maya için yeterli miktarda iz element ve vitamin içerirler (2).

3.6. Yüksek Alkoller (Fuzel Yağları) Oluşumu

Yüksek alkoller kısmen karbon kaynaklarından kısmen de deaminasyon ve bunu takiben bazı aminoasitlerin dönüşümleriyle oluşurlar (6).

Oluşan fuzel yağlarının miktarı, maya suşuna ve fermentasyon koşullarına önemli ölçüde bağlıdır. Maya 30-35°C de, ortamda kolay kullanılabilen amino asitlerin ve çözünebilen katı maddelerin varlığında ve ortam karıştırıldığında daha fazla miktarda fuzel yağı oluşturur (2, 6, 9).

3.7. Etanolün Gelişme ve Fermentasyon Üzerine Etkisi

Etanolün maya üzerindeki olumsuz etkileri;

- canlılık
 - özgül gelişme hızı (μ ; h^{-1})
 - özgül fermentasyon hızı (V ; $g\ g^{-1}\ h^{-1}$),
 - özgül şeker kullanım hızı (S_{in}),
 - özgül aminoasit kullanım hızı
- üzerindedir (6).

Etanol inhibisyonunun derecesi, dışardan etanol ilavesinden sonra, tüm gelişme süresince veya gelişmenin logaritmik fazında, gelişme ve fermentasyon hızını izlemek suretiyle ölçülür.

Goslich (1972)'e göre; % 5 alkol konsantrasyonunun altında 1 g maya kuru maddesi 2-3 g şeker, yaklaşık 1 saatte fermente etme yeteneğindedir. Bu fermentasyonun başla-

masından sonra 4 saat içerisinde % 5 alkol konsantrasyonuna ulaşılabileceğini ifade eder. Bunu izleyen 4 saat içerisinde % 7 alkol konsantrasyonuna, devam eden 3 saat sonra % 8 lik alkol konsantrasyonuna ulaşılabilir. Bu alkol konsantrasyonunda 1 g maya kuru maddesi 1 saatte 1 g dan daha az bir şekeri fermente edebilir. Daha sonra maya alkol konsantrasyonunu yalnızca % 1 artırmak için % 8-9 alkolü mayşe içinde yaklaşık 14 saat kalmak zordur (4).

Bu nedenle etanol toleransı yüksek olan bir maya kullanmanın pratikteki önemi çok büyüktür.

3.8. Flokulasyon

Flokulasyon özelliği gösteren mayaların immobilize hücre reaktörleri gibi kullanılması konusunda oldukça yaygın çalışmalar yapılmaktadır (7, 11).

Flokulant özellikteki mayalar fermente olmuş ortamdaki çökerek, kolaylıkla ayrılabilir, seperasyon veya membrana gerek kalmaksızın hücreler yeniden kullanılabilirler.

4. İSPİRTO MAYALARINDA SUŞ GELİŞTİRME YÖNÜNDEKİ YENİ ÇALIŞMALAR

Suş geliştirme çalışmalarındaki yönelim daha çok verim geliştirme, sonra fermentasyon karakteristiklerini geliştirme yönünde yoğunlaştırılmıştır.

Verim geliştirme; ya yan ürün (gliserin, yüksek alkoller, asitler) miktarını, ya da biyokitle oluşumunu azaltmak veya da mayalar tarafından kullanılacak substrat çeşidini artırmak suretiyle sağlanabilir.

Fermentasyon karakteristiklerini geliştirmek; fermentasyon hızını, mayanın sıcaklık ve etanol toleransını artırma yönünde olmaktadır. Bu konudaki yeni gelişmeler ve çeşitli tekniklere ilişkin örnekler Tablo 1 de özetlenmiştir (6).

Tablo 1 : İspirto mayalarında olası gelişmeler (6).

Karakteristik	Enzim veya gen	Teknik
Etanol verimliliği	Çeşitli	Seleksiyon 1) Melezleme 2)
Etanol toleransı	Çeşitli (Mebran)	Seleksiyon Melezleme
Yan ürünleri azaltma		Rekombinant DNA Seleksiyon
— gliserol	Gliserol 3 - fosfat dehidrojenaz Çeşitli	
— yüksek alkoller	Çeşitli	
Hammadde kullanımı		Rekombinant DNA Melezleme
— Nişasta	α - amilaz glukoamilaz	
— pentoz (ksiloz)	ksiloz izomeraz ksiloz oksidoredüktazlar	
— melibiyoz	α - malaktozidaz, MEL	

1) Doğal veya teşvik edilmiş mutantların seleksiyonu

2) Seksüel çaprazlama veya protoplast füzyonu

KAYNAKLAR

- 1 — de BECZE, G. I., 1964. Reproduction of distiller's yeast, *Biotechnol. Bioeng.* 6, 191 - 221.
- 2 — FİDAN, I. ve İ. ŞAHİN, 1983. Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi, Ank. Üniv. Ziraat Fak. Yayın No: 863, A.Ü. Basımevi, Ankara, 304 S.
- 3 — FURUKAWA, K., E. HEINZLE and I. J. DUNN, 1983. Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 2293 - 2317.
- 4 — GOSLICH, V., 1972. Versuche zur entwicklung eines verfahrens zur kontinuierlichen vergarung von melasse. *Branntweinwirtschaft* 112, 285 - 294.
- 5 — HUGHES, D. B., N. J. TUDROSEN and C. Y. MOYE, 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letters.* 6, 1 - 6.
- 6 — KORHOLA, M., I. SUOMALAINEN, E. VALSANEN and H. TUOMPO, 1986. Distiller's Yeast. *GIAM VII Symposium*, August 14 - 15, 1985, Helsinki, Finland. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 4, 29 - 61.
- 7 — KURIYAMA, H., Y. SEIKO, T. MURAKAMI, H. KOBAYASHI and Y. SONODA, 1985. Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculant yeast. *J. Ferment. Technol.* 63, 159 - 165.

- 8 — LAFON . LAFOURCADE, S., E. CARRE and P. RIBEREAU . GAYON, 1983. Occurance of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol. 46, 874 - 880.
- 9 — ÖZÇELİK, F., 1982. Melastan alkol üretiminde bazı etkenlerin verime ve ham ispiroto bileşimine etkileri üzerinde araştırmalar. Basılmamış doktora tezi, Ankara 88 S.
- 10 — RAMÍREZ, M. and M. S. BOUDERAL, 1983. Continuous production of ethanol on beet juice by a flocculant strain of *Saccharomyces cerevisiae* Biotechnol. Letters 5, 659 - 664.
- 11 — REHM, H. J. and G. REED, 1983. Biotechnology, Volume 3, Weinheim. 642 S.
- 12 — ŞAHİN, İ. ve F. ÖZÇELİK, 1979. Melasın Etil Alkol Fermantasyonu Sırasında Önemli Bazı Etkenler. Ank. Üniv. Ziraat Fak. Yılığ 29, 439 - 448.

SAN
MATBAACILIK
VE KAĞITÇILIK
KOLLEKTİF ŞİRKETİ

SERİ

TEMİZ
TİTİZ
NEFİS
SERİ

SAN
MATBAASINDA

RÜZGARLI SOKAK 45/1-3
TELEFON : 119819 - 104003