

## PEYNİR ALTI SUYUNDAN ETİL ALKOL ÜRETİMİNDE pH VE SICAKLIĞIN FERMENTASYON ÜZERİNE ETKİSİ<sup>1</sup>

### EFFECTS OF pH AND TEMPERATURE ON ETHANOL FERMENTATION FROM WHEY

Shiva Shams MOLAVI, Filiz ÖZÇELİK

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü- ANKARA

**ÖZET:** Bu çalışmada *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140, *Kluyveromyces lactis* H-8583 ve *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 maya suşları kullanılarak, peynir altı suyundan etil alkol üretiminde uygun pH ve fermentasyon sıcaklığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Peynir altı suyu çözeltisi 4,0; 4,5; 5,0 gibi farklı pH'larda ve 30°C, 35°C, 40°C gibi farklı sıcaklıklarda etil alkole fermente edilerek pH ve sıcaklığın fermentasyon üzerine etkileri belirlenmiştir.

*Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 ve *Kluyveromyces lactis* H-8583 mayaları için en uygun fermentasyon pH'sı 4,5, en uygun fermentasyon sıcaklığı ise 30°C olarak saptanmıştır. *Kluyveromyces marxianus* NCYC-587 mayası için en uygun fermentasyon pH'sının yine 4,5 olarak saptanmasına karşın, en uygun fermentasyon sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir.

**SUMMARY:** The main object of this research was to determine the optimum fermentation pH and temperature for ethanol production from whey by using three yeast strains of *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140, *Kluyveromyces lactis* H-8583 and *Kluyveromyces marxianus* NCYC-587. The effects of pH and temperature on ethanol fermentation from whey were determined by fermenting whey powder solutions, with different pH values (4.0, 4.5 and 5.0) at different temperatures (30°C, 35°C and 40°C).

The optimum pH and temperature values for *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 and *Kluyveromyces lactis* H-8583 were found to be 4.5 and 30°C, respectively. The optimum pH value for *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 was also found to be 4.5, but the optimum temperature was 40°C.

## GİRİŞ

Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı (DPT) tarafından 1991 yılı çiğ süt üretimi 10.200.000 ton olarak tahmin edilmiştir (ANONYMOUS, 1990). Bu hesapla, ülkemizde yılda üretilen çiğ sütün %20'sinin peynire işlendiği düşünülerek, yaklaşık 2.000.000 ton sütün peynir yapımında kullanıldığı ve yaklaşık 1.750.000 ton peynir altı suyunun açığa çıktığı söylenebilir.

Peynir üretimi sırasında sütteki kazeinin peynir mayası yardımıyla çöktürülmesi sonucu kalan sıvı olan peyniraltı suyu %4,5-5,0 laktoz, %1 azotlu madde ve %0,5 mineral madde içerdiğinden fermentasyon endüstrisi için uygun bir hammadde özelliği taşımaktadır (TOPAL, 1982).

Son yıllarda, peynir altı suyundaki laktozun etil alkole fermentasyonu ile ilgili çeşitli araştırmalar yayınlanmıştır. Çok az mayanın laktozu fermente edebilme yeteneğinde olması nedeniyle, araştırmaların bir kısmı uygun mikroorganizma seçimi ile ilgilidir (MOULIN ve Ark., 1980; BOTHAST ve Ark., 1986).

Çalışmaların önemli bir kısmı ise prosesin verimliliğini geliştirme yönündedir. CHERYAN ve WEHAIA (1983), *Kluyveromyces fragilis* suşu ile ve yeni geliştirilmiş membran reaktör kullanarak laktozun etil alkole fermentasyonunu gerçekleştirmişler, kesikli fermentasyona oranla 80 kez yüksek verimlilik değerine (240 g etanol/l.h) ulaşmışlardır.

Peynir altı suyundan etil alkol üretiminde prosesin verimi, laktoz üzerinden teorik olarak elde edilecek miktarın yaklaşık % 80'dir. Bir litre % 100 etil alkol üretimi için, yaklaşık 42 litre % 4,4 laktoz içeren peynir altı suyu gerekmektedir (KOSARIC ve Ark., 1983).

Çeşitli kaynaklar peynir altı suyundan etil alkol üretiminde, fermentasyon pH'sına ilişkin farklı değerler vermektedirler. MOULIN ve Ark. (1980)'na göre pH 4,0, WANG ve Ark. (1987)'na göre pH 4,5 en uygun fermentasyon pH'sı olarak verilirken, MARWAHA ve KENNEDY (1984) en uygun fermentasyon pH'sının 5,5 olduğunu belirtmişlerdir. TU ve Ark. (1985) etil alkol üretimi ve laktoz tüketiminin pH 5,9'a

<sup>1</sup> Bu çalışma Shiva Shams MOLAVI'nin master tezinin bir bölümüdür. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No:92-25-00-18).

kadar yükselen pH değerleri ile beraber arttığını ifade etmişlerdir. AKPAN ve Ark. (1988), GIBBONS ve WESTBY (1988), ZAKREWSKI ve ZMARLICKI (1988) ise peynir altı suyunu 4,5 pH'da fermente etmişlerdir.

Peynir altı suyundan etil alkol üretiminde en uygun fermentasyon sıcaklığını MOULIN ve Ark. (1980) 30-32°C, MARWAHA ve KENNEDY (1984) 30°C, TU ve Ark. (1985) 30-35°C, WANG ve Ark. (1987) 30°C, AKPAN ve Ark. (1988) 30°C, GIBBONS ve WESTBY (1988) 28-32°C, ZAKREWSKI ve ZMARLICKI (1988) ise 35°C olarak ifade etmişlerdir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada kullanılan peynir altı suyu tozu ENKA Süt ve Gıda Mamülleri Sanayii ve Ticaret Anonim Şirketi Süt Fabrikasından sağlanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan mayalardan *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y 1140 ve *Kluyveromyces lactis* H-8583 suşları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü koleksiyonundan, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 suşu ise Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilmiştir.

### Yöntem

Tartımla belirli miktarda alınan peynir altı suyu tozu damıtık su ile uygun oranda seyreltikten sonra sıcak su banyosunda kaynatılıp, deproteinize edilmiştir. Çözelti soğuduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek tortusu çöktürülmüş, berrak kısım alınarak gerek maya çoğaltma, gerekse fermentasyon denemelerinde kullanılmıştır.

Kolleksiyonda YPG-Agar (Maya özütü, 10 g/l; Bactopeptone, 10 g/l; Glikoz, 20 g/l; Agar, 20 g/l) üzerinde muhafaza edilmiş olan maya suşları gittikçe artan oranlarda peynir altı suyu içeren ortamlarda geliştirilerek laktoza alıştırmıştır. Peynir altı suyuna, dolayısıyla laktoza alıştıran mayalar aynı besiyerinde +4°C'de muhafaza edilmiş ve her iki haftada bir yenilenmiştir.

Fermentasyon pH'sının etkisini belirlemek amacıyla yapılan denemelerde yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan ve % 5 laktoz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisi 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak, partiler halinde 4,0; 4,5 ve 5,0 pH'ya asitlendirilip, 110°C'de 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Aşılama, % 10 oranında 24 saat geliştirilmiş kültür ile gerçekleştirilmiş; 30°C'de fermentasyona bırakılan örneklerdeki fermentasyonun gidişi, sabah akşam günde iki kez yapılan tartımlarla saptanan ağırlık azalması ile izlenmiştir.

Fermentasyon sıcaklığının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde, belirtilen şekilde hazırlanan ve % 5 laktoz içeren peynir altı suyu çözeltisi, her maya için daha önceden belirlenen en uygun pH değerine ayarlanmış ve 110°C'de 20 dakika süre ile sterilize edilip, aşılanmıştır. Örnekler 30, 35 ve 40°C'lerde inkübasyona bırakılmış, fermentasyonun gidişi sabah akşam günde iki kez yapılan tartımlarla saptanan ağırlık azalmasıyla izlenmiştir.

### Analizler

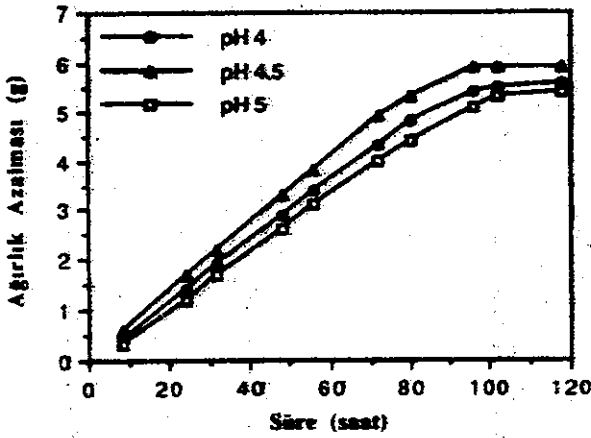
Peynir altı suyu tozunun kuru madde, kül ve protein tayinleri YÖNEY (1973)'e göre, indirgen şeker tayini değiştirilmiş Miller yöntemine göre DNS (Dinitrosalisilik asit) kullanılarak spektrofotometrik olarak (FOROUCHI ve GUNN, 1983), fermentasyonu tamamlamış örneklerdeki alkol tayini AKMAN (1962)'a göre yapılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

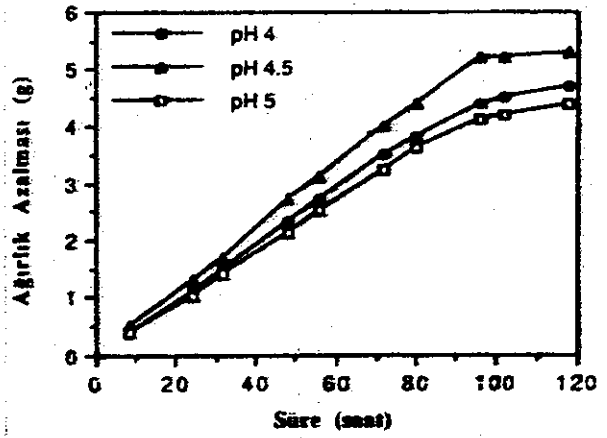
Denemelerde kullanılan peynir altı suyu tozunda kuru madde % 94,32; laktoz % 68,70; protein %13,10; kül ise % 11,20 olarak saptanmıştır.

### pH'nin Fermentasyon Üzerine Etkisi

Deneme kapsamında alınan 3 maya en iyi çalışabilecekleri pH istekleri bakımından kendi aralarında belirgin farklılıklar göstermemişlerdir. Aynı mayanın değişik pH'larda denenmesinde fermentasyon sonunda oluşan alkol miktarı bakımından küçük farklılıklar gözlemlenmiş, aynı zamanda mayalar farklı pH değerlerinde farklı fermentasyon hızı göstererek değişik zamanlarda fermentasyonu tamamlamışlardır. Mayanın çabuk fermentasyona başlayıp, fermentasyonu hızlı bir biçimde tamamladığı pH değeri o mayaya özgü en uygun pH değeri olarak belirlenmiştir. Mayaların değişik pH'lardaki fermentasyon durumları, Şekil 1, 2 ve 3'de görülmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi, peynir altı suyundan etil alkol üretiminde, deneme kapsamındaki üç maya için de en uygun pH değeri 4,5 olarak saptanmıştır.



Şekil 1. *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-1140 mayası ile farklı pH'lardaki % 5 laktöz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinin etil alkole fermentasyonu



Şekil 2. *Kluyveromyces lactis* H-8583 mayası ile farklı pH'lardaki % 5 laktöz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinin etil alkole fermentasyonu

Mayaların yine değişik pH'larda ürettikleri alkol konsantrasyonları ve % teorik verimleri Çizelge 1'de verilmiştir.

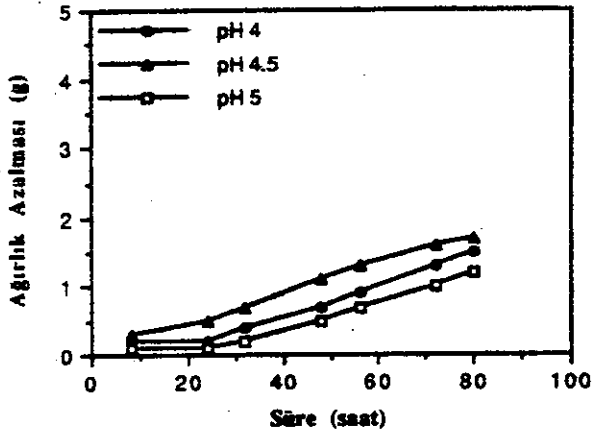
Çizelge 1. Farklı pH'lardaki % 5 Laktöz İçeren Peynir Altı Suyu Tozu Çözeltisinin Etıl Alkole Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etıl Alkol Konsantrasyonu ve Verim Değerleri

	<i>K.lactis</i> NRRL-Y-1140			<i>K.lactis</i> H-8583			<i>K.marxianus</i> NCYC 587		
	pH	Alkol Miktarı (% ml/ml)	% Teorik Verim	pH	Alkol Miktarı (% ml/ml)	% Teorik Verim	pH	Alkol Miktarı (% ml/ml)	% Teorik Verim
	4,0	2,5	73	4,0	2,3	68	4,0	0,5	14
	4,5	2,7	80	4,5	2,5	73	4,5	1,0	29
	5,0	2,3	68	5,0	2,2	65	5,0	0,5	14

Elde edilen sonuçlara göre; denemeye alınan *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140, 4,5 pH'da, 96 saatte, son alkol konsantrasyonu % 2,7 (ml/ml) olacak şekilde fermentasyonu bitirmiş ve etil alkol verimi teorik verimin % 80'i olarak gerçekleşmiştir.

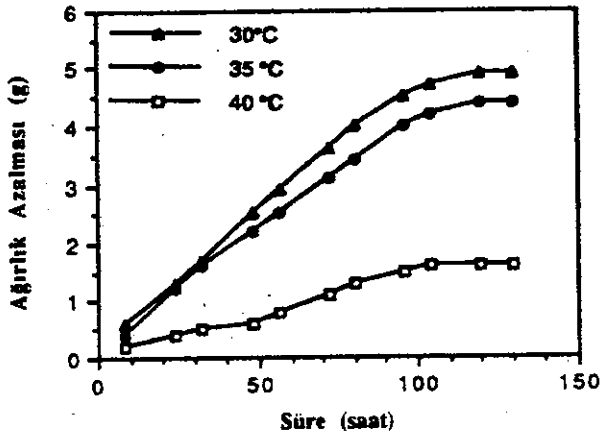
*Kluyveromyces lactis* H-8583, 4,5 pH'da yaklaşık 100 saatlik fermentasyon sonunda % 2,5(ml/ml) alkol üretmiş ve alkol verimi teorik verimin % 73'ü olarak gerçekleşmiştir.

*Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 mayası ise % 5 şeker içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinde, her üç pH değerinde de, çok yavaş fermentasyon hızı göstermiştir. En uygun olarak görülen pH 4,5'de bile, 80 saatlik fermentasyon süresi sonunda, teorik verimin %29'u oranında bir üretim gerçekleştirilmiştir.

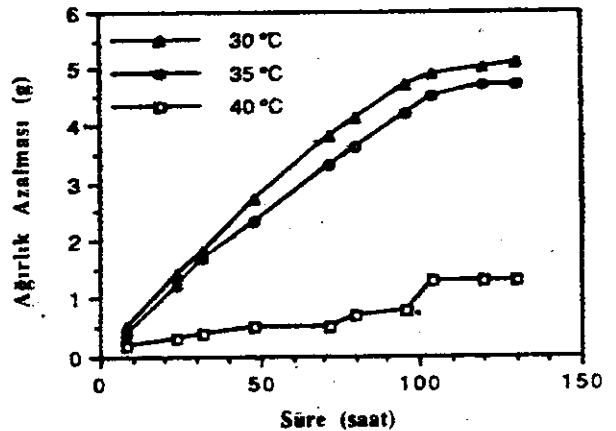


Şekil 3. *Kluveromyces marxianus* NCYC 587 mayası ile farklı pH'lardaki % 5 laktöz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinin etil alkole fermentasyonu

fermentasyona bırakılmıştır. Mayaların farklı sıcaklıklardaki fermentasyon grafikleri Şekil 4, 5 ve 6'da son alkol konsantrasyonları ve % teorik verimleri ise Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 4. *Kluveromyces lactis* NRRL-Y-1140 mayası ile, pH 4,5'de, % 5 laktöz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinin farklı sıcaklıklarda etil alkole fermentasyonu



Şekil 5. *Kluveromyces lactis* H-8583 mayası ile, pH 4,5'de, % 5 laktöz içeren peynir altı suyu tozu çözeltisinin farklı sıcaklıklarda etil alkole fermentasyonu

Çizelge 2. pH 4,5'de, % 5 Laktöz İçeren Peynir Altı Suyu Tozu Çözeltisinin Farklı Sıcaklıklarda Etil Alkole Fermentasyonu Sonucu Elde Edilen Etil Alkol Konsantrasyonu ve Verim Değerleri

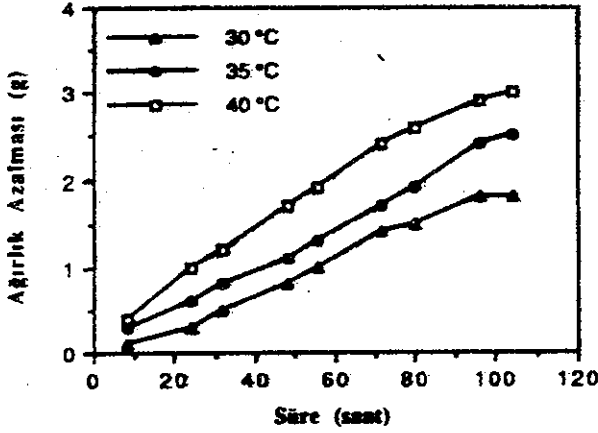
Sıcaklık	<i>K. lactis</i> NRRL-Y-1140			<i>K. lactis</i> H-8583			<i>K. marxianus</i> NCYC 587		
	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C
Alkol miktarı (% ml/ml)	2,6	2,2	0,0	2,7	2,3	0,0	0,9	1,4	1,5
% Teorik Verim	77	65	-	80	68	-	26	41	44

Çizelge 1'den de görüleceği gibi, *Kluveromyces lactis* NRRL-Y-1140 diğer iki maya ile kıyaslandığında, daha yüksek verim değeri elde edilmiştir.

Bu araştırmada her üç maya için de en uygun fermentasyon pH'sı olarak saptanan pH 4,5 değeri WANG ve Ark. (1987), AKPAN ve Ark. (1988), GIBBONS ve WESTBY (1988) ve ZAKREWSKI ve ZMARLICKI (1988)'nin bulguları ile uyum içerisindedir. Peynir altı suyundan etil alkol üretiminde, diğer araştırmacıların kullandıkları değişik pH değerlerini, araştırmalarda kullanılan mayaların farklı olmalarından kaynaklandığı şeklinde açıklamak mümkündür.

#### Sıcaklığın Fermentasyon Üzerine Etkisi

Peynir altı suyundan etil alkol üretiminde fermentasyon sıcaklığının etkisini saptamak için yapılan denemelerde, örnekler 30, 35, 40°C'lerde



Şekil 6. *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 mayası ile, pH 4,5'de, % 5 laktoz içeren peynir altı suyu tozu çözeltilisinin farklı sıcaklıklarda etil alkolle fermentasyonu

*Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 mayası en uygun fermentasyon sıcaklığı olarak saptanan 30°C'de, yaklaşık 110 saat sonra, % 77 teorik verim gerçekleştirerek fermentasyonu tamamlamıştır. Bununla birlikte, *Kluyveromyces lactis* H-8583 mayası yine en uygun fermentasyon sıcaklığı olarak saptanan 30°C'de, yaklaşık 110 saat sonra fermentasyonu bitirmiş ve % 80 teorik verimi gerçekleştirmiştir.

Denemeler sırasında *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 mayası çok düşük fermentasyon hızı göstermiş ve deneme süresi içinde fermentasyonu tamamlayamamıştır. Bu maya ile fermentasyonun çok yavaş seyretmesine ve tamamlanmasına rağmen, Şekil 6'dan da görüleceği gibi, 40°C'lik fermentasyon sıcaklığında fermentasyon hızı, diğer sıcaklık derecelerine kıyasla, daha yüksektir.

Bu çalışmada *Kluyveromyces lactis* NRRL-Y-1140 ve *Kluyveromyces lactis* H-8583 mayaları için en uygun olarak saptanan 30°C'deki fermentasyon sıcaklığı, ZAKRESKI ve ZMARLICKI (1988) tarafından belirtilen hariç, diğer literatür verileri ile uyum içerisinde dir.

## KAYNAKLAR

- AKMAN, A.V., 1962. Şarap Analiz Metodları, Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları No:33, Ank. Üniv. Basımevi, Ankara, 111 sayfa.
- AKPAN, L., M. İKENE BOMEN, N. URALIH, C. O. OBUEKWE, 1988. Production of Ethanol from Cassava Whey. *Acta Biotech.*, 8:39-45.
- ANONYMOUS, 1990. DPT, Hayvancılık İstatistikleri Hakkında Komisyon Tahmini Raporu, Ankara.
- BOTHAST, R.J., C.R. KURTZMAN, M.D. SALTARELLI, P.J. SLININGER, 1986. Ethanol Production by 107 Strains of Yeast on 5, 10 and 20 % Lactose. *Biotech. Letters*, 8:593-596.
- CHERYAN, M., M.A. MEHALA, 1983. A High-Performance Membrane Bioreactor for Continuous Fermentation of Lactose. *Biotech. Letters*, 5:519-524.
- FOROUCHE, D.J. GUNN, 1983. Some Effects of Metal Ions on the Estimation of Reducing Sugars in Biological Media. *Biotech. Bioeng.*, 25:1905-1911.
- GIBBONS, W.R., C.A. WESTBY, 1988. Processing Cereal Grains, Thin Stillage and Cheese Whey to Fuel Ethanol in a Farm-Scale Plant. *Biomass*, 15:25-43.
- KOSARIC, N., A. WIECZOREK, G.P. COSENTINO, R.J. MAGEE, J.E. PRENOSIL, 1983. Ethanol Fermentation. "in, *Biotechnology*, Vol 3. Eds H.J. Rehm and G. Reed", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida-Basel, 642 sayfa.
- MARWAHA, S.S., J.F. KENNEDY, 1984. Alcohol Production from Whey Permeate by Immobilized and Free Cells of *Kluyveromyces marxianus* NCYC-179. *Process Biochem.*, 19:79-80.
- MOULIN, G., M. GUILLAUME, P. GALZY, 1980. Alcohol production from Whey. *Biotech. Bioeng.*, 22:1277-1281.
- TOPAL, Ş. 1982. Çeşitli Tarımsal Artıklar ve Gıda Sanayii Artıklarının Mikrobiyolojide Besiyeri Olarak Kullanılabilir Olanaklarının Araştırılması. TÜBİTAK MAE Yayın No:58, Gebze.
- TU, C.W., Y. JAYANATA, R. BAJPAI, 1985. Factors Affecting Ethanol Production from Cheese Whey. *Biotech. Bioeng. Symp.* No:15, 295-305.
- WANG, C.J., Y. JAYANATA, R. BAJPAI, 1987. Effect of Multiple Substrates in Ethanol Fermentations from Cheese Whey. *J. Ferment. Technol.*, 65:249-253.
- YÖNEY, Z., 1973. Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metodları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları No:491. Ank. Üniv. Basımevi, Ankara, 182 sayfa.
- ZAKRESKI, E., S. ZMARLICKI, 1988. Ethanol Fermentation in Whey and Whey-Molasses Mixtures. I-Influence of Concentration and Type of Whey on the Rate of Fermentation. *Milchwissenschaft*, 43:435-437.