

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİCARİ KURU MAYALARIN ETANOL ÜRETİMİ ÜZERİNDE
BAZI BESİNLERİN ETKİLERİ**

FERDA ÇETİNTAŞ ASLAN

KOCAELİ 2014

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİCARİ KURU MAYALARIN ETANOL ÜRETİMİ ÜZERİNDE
BAZI BESİNLERİN ETKİLERİ

FERDA ÇETİNTAŞ ASLAN

Yrd.Doç.Dr. Rezan ALKAN
Danışman, Kocaeli Üniv.

Prof.Dr. Fazıl ÖZEN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Prof.Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Jüri Üyesi, Ankara Üniv.


.....

.....

.....

Tezin Savunulduğu Tarih:16.06.2014

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kuru ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* türünün etil alkol fermentasyonu üzerine bazı besinlerin etkileri incelenmiştir.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Rezan Alkan'a teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında yanımda olan ve karşılaştığım problemlere benimle çözüm arayan arkadaşım Candan Yılmaz'a da teşekkür ederim.

Özellikle alkol distilasyonu konusunda beni bilgilendiren ve pratik yapma fırsatı veren ayrıca gerekli besin maddelerinin sağlanması konusunda destek olan Pakmaya çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Çalışma verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesine yardımcı olan Araş.Gör. Muzaffer Bilgin'e ve Doç.Dr. Deniz Bingöl'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın başından sonuna kadar moral vererek destek olan sevgili eşim Varan Aslan'a ve kardeşim Seda Çetintaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan bebeğim Aslı Beren'e ve benim bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran - 2014

Ferda ÇETİNTAŞ ASLAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLOLAR DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Maya Fermentasyonunun Tarihçesi	4
1.2. Etil Alkol	5
1.2.1. Etil alkolün kullanım alanları	6
1.2.2. Etil alkolün fiziksel özellikleri	7
1.2.3. Etil alkol üretimi ve hammadde seçimi	8
1.2.4. Fermentasyon yöntemi	9
1.3. Etil Alkol Fermentasyonu	11
1.3.1. Glikoliz	12
1.3.2. Etil alkol oluşumu	13
1.4. Fermentasyon Ürünleri	14
1.5. Fermentasyon Yöntemleri	15
1.5.1. Kesikli fermentasyon	15
1.5.1.1. Lag faz (Uyum fazı)	15
1.5.1.2. Logaritmik faz	16
1.5.1.3. Durgun faz	16
1.5.1.4. Ölüm fazı	16
1.5.2. Kesikli beslemeli (fed-batch) fermentasyon	17
1.5.3. Sürekli (Continuous) fermentasyon	17
1.6. Etil Alkol Fermentasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar	17
1.7. Maya Hücrelerinin Genel Özellikleri	18
1.7.1. Mayalar hakkında teknolojik bilgiler	18
1.7.2. Maya hücresi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	19
1.7.3. Mayaların bileşimi ve fizyolojik yapısı	20
1.7.4. Maya gelişimini düzenleyici etkiler	23
1.8. Ticari Maya Tipleri	24
1.8.1. Kuru maya	24
1.8.1.1. Aktif kuru maya	24
1.8.1.2. Instant kuru maya	25
1.8.2. Kuru maya kullanımının önemi	26
1.9. Fermentasyonu Etkileyen Faktörler	26
1.9.1. Maya türü ve suşu	26
1.9.2. Şeker konsantrasyonu	27
1.9.3. Havanın bileşimi	27
1.9.4. Sıcaklık	28
1.9.5. pH	28

1.9.6. Maya konsantrasyonu	28
1.9.7. Alkol konsantrasyonu	29
1.9.8. Besiyeri bileşimi	29
1.9.9. Fermentasyon sıvısının hareketi.....	29
1.9.10. Bakteri gelişiminin önlenmesi ve sterilizasyon.....	30
1.10. Mayaların Gelişimi ve Fermentasyonunu Etkileyen Etmenler	30
1.10.1. Basınç	30
1.10.2. Radyoaktif ışınlar	30
1.10.3. Zaman.....	30
1.10.4. Kimyasal maddelerin etkileri	30
1.10.5. Su	31
1.10.6. Metabolizma ürünleri	31
1.10.7. Mayaların beslenmesi	32
1.10.7.1. Karbonlu gıda maddeleri.....	32
1.10.7.2. Azotlu gıda maddeleri.....	33
1.10.7.3. Mineral maddeler	34
1.10.7.4. Vitaminler	36
1.10.7.5. Eser elementler.....	37
1.11. Fermentasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Etil Alkol Üretimine Etkileri	37
1.11.1. Maya fermentasyonunda en çok kullanılan besinler	38
1.11.1.1. Tampon maddeler	38
1.11.1.2. KH_2PO_4	38
1.11.1.3. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	38
1.11.1.4. Biotin.....	39
1.11.1.5. Maya ekstraktı (Yeast ekstrakt)	39
1.11.1.6. NH_4 tuzu.....	39
2. MATERYAL VE YÖNTEM	41
2.1. Laboratuvar	41
2.2. Mikroorganizma ve Hazırlanışı	41
2.3. Kullanılan Alet ve Ekipman.....	41
2.4. Ön Deneyler ile Uygun Fermentasyon Ortamının Belirlenmesi.....	42
2.5. Üreme Ortamının Hazırlanışı.....	42
2.6. Farklı Besin Konsantrasyonlarının Denenmesi	43
2.7. Analizler.....	44
2.7.1. İvert şeker analizi	44
2.7.1.1. Malzemeler	45
2.7.1.2. Standart eğri hazırlanması.....	45
2.7.1.3. Deneyin yapılışı	46
2.7.2. Fermentasyon ortamında etil alkol analizi	47
2.7.2.1. Kimyasal maddeler	47
2.7.2.2. Etil alkol standartlarının hazırlanması	47
2.7.2.3. Deneyin yapılışı	48
2.7.2.4. Mayşe numunelerinde etil alkol analizi:	48
2.8. Değişen Maya Miktarının Etkisinin Belirlenmesi	50
2.9. Uygun Konsantrasyonları Seçilen Besinlerle Fermentasyon.....	51
2.9.1. Besin ilavesinin şeker kullanımına etkisinin belirlenmesi	51
2.9.2. Besin ilavesinin etil alkol üretimine etkisinin belirlenmesi	52
2.9.3. Besin ilavesinin pH değişimine etkisinin belirlenmesi	52
2.10. Çalışma Sonuçlarının İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi	52

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
3.1. pH Etkisi	53
3.2. Sıcaklık Etkisi	54
3.3. Maya Miktarının Etkisi	55
3.4. Kullanılan Besinlerin Etkileri	57
3.4.1. Farklı azot kaynaklarının etkisi	57
3.4.2. Kullanılan besin konsantrasyonlarının etkileri	58
3.4.3. Sakkaroz konsantrasyonunun etkisi	59
3.4.3.1. Kontrol ve karışım gruplarında pH değerleri değişimine etkisi	60
3.4.3.2. Kontrol ve karışım gruplarında kalan invert şeker miktarına etkisi	62
3.4.3.3. Kontrol ve karışım gruplarında etil alkol miktarına etkisi	63
3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları	67
3.5.1. Tukey testi sonuçları	67
3.5.2. Regresyon analizi sonuçları	71
4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Etil alkolün açık formülü	6
Şekil 1.2.	Etil alkolün moleküler yapısı	6
Şekil 1.3.	Dünya etil alkol tüketiminin sektörlere göre dağılımı	6
Şekil 1.4.	Etil alkol üretiminde temel basamaklar.....	9
Şekil 1.5.	Glikoliz şeması.....	13
Şekil 1.6.	Etil alkol fermentasyonu	14
Şekil 1.7.	Kesikli kültürde hücre büyümesinin kinetiği	16
Şekil 1.8.	Maya hücrelerinin biyoteknolojik kullanımı.....	19
Şekil 1.9.	Maya hücresinin şematik görünümü	20
Şekil 1.10.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ' nın SEM görüntüsü.....	22
Şekil 1.11.	Etil alkol fermentasyonu boyunca <i>S. cerevisiae</i> 'da potansiyel stresler	23
Şekil 1.12.	Ticari maya tiplerinin sınıflandırılması.....	24
Şekil 1.13.	Kuru maya görüntüsü.....	24
Şekil 1.14.	Instant maya görüntüsü	25
Şekil 2.1.	Su banyosundaki fermentasyon şişeleri	43
Şekil 2.2.	Alınan numunelerin santrifüj işlemi.....	43
Şekil 2.3.	İnvert şeker analizinde renk değişimi.....	46
Şekil 2.4.	İnvert şeker standart eğrisi	47
Şekil 2.5.	Etil alkol distilasyon düzeneği	49
Şekil 2.6.	Etil alkol analizinde renk değişimi.....	49
Şekil 2.7.	Etil alkol kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 3.1.	Etil alkol fermentasyonunda zamana bağlı pH değişimi.....	53
Şekil 3.2.	Fermentasyon süreci.....	54
Şekil 3.3.	Maya miktarının ortamda kalan invert şeker miktarına etkisi.....	56
Şekil 3.4.	Maya miktarının pH değişimine etkisi.....	56
Şekil 3.5.	Besin konsantrasyonlarının pH değerleri değişimine etkisi.....	58
Şekil 3.6.	Besin konsantrasyonlarının kalan invert şeker miktarına etkisi.....	59
Şekil 3.7.	Kontrol grubunda sakkaroz miktarının pH değerleri değişimine etkisi	61
Şekil 3.8.	Karışım grubunda sakkaroz miktarının pH değerleri değişimine etkisi	61
Şekil 3.9.	Kontrol grubunda sakkaroz miktarının kalan invert şeker miktarına etkisi.....	62
Şekil 3.10.	Karışım grubunda sakkaroz miktarının kalan invert şeker miktarına etkisi.....	63
Şekil 3.11.	Kontrol grubunda sakkaroz miktarlarının etil alkol miktarına etkisi	64
Şekil 3.12.	Karışım grubunda sakkaroz miktarlarının etil alkol miktarına etkisi	64
Şekil 3.13.	5 g/l yeast ekstraktın pH değeri kalan invert şeker ve etil alkol miktarına etkisi.....	65
Şekil 3.14.	Karışım ve yeast ekstrakt (5g/l) deney sonuçlarının karşılaştırılması	66

Şekil 3.15. Karışım grubunda zaman ve sakkaroz miktarına bağlı kalan invert şeker değişimi	72
Şekil 3.16. Kontrol grubunda zaman ve sakkaroz miktarına bağlı kalan invert şeker değişimi	72
Şekil 3.17. Kontrol grubunda pH değişimi.....	73
Şekil 3.18. Karışım grubunda pH değişimi	73
Şekil 3.19. Karışım grubundaki etil alkol değişimi.....	74
Şekil 3.20. Kontrol grupta etil alkol değişimi	74
Şekil 3.21. Zamana bağlı kontrol ve karışım grupta etil alkol miktarı değişimi	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Etil alkolün fiziksel özellikleri	7
Tablo 1.2. İdeal Pasteur alkol fermentasyonunda elde edilen parametreler	10
Tablo 1.3. 100 gr glikozun maya ile fermentasyonu sonucu elde ürünlerin edilmesi gereken konsantrasyon sınırları	10
Tablo 1.4. Fermentasyon ürünleri	15
Tablo 1.5. Ekmek mayasının taksonomisi.....	20
Tablo 1.6. Ekmek mayasının yaklaşık (% kuru madde) olarak bileşimi.....	22
Tablo 1.7. Yeast ekstrakt özellikleri.....	39
Tablo 2.1. Kullanılan besin konsantrasyonları	44
Tablo 2.2. Besinlerin seçilen konsantrasyonları.....	51
Tablo 3.1. Kontrol ve karışım gruplarında sakkaroz miktarının pH değişimine etkisi.....	60
Tablo 3.2. Kontrol ve karışım gruplarında sakkaroz miktarının etil alkol miktarına etkisi.....	63
Tablo 3.3. Eş zamanlı Tukey testi sonuçları.....	67
Tablo 3.4. Etil alkol miktarı bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar	68
Tablo 3.5. Kalan invert şeker miktarı bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar	68
Tablo 3.6. pH değeri bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar	68
Tablo 3.7. Kontrol ve karışım gruplarının etil alkol miktarlarının şeker miktarına bağlı olarak gruplandırılması	69
Tablo 3.8. Grup birimlerinde etil alkol miktarı gruplandırma bilgisi.....	69
Tablo 3.9. Grup birimlerinde kalan invert şeker miktarı gruplandırma bilgisi.....	69
Tablo 3.10. Seçilen faktör seviyeleri ve değerleri	70
Tablo 3.11. Etil alkol miktarı için varyans analizi sonuçları.....	70
Tablo 3.12. Kalan invert şeker miktarı için varyans analizi sonuçları	70
Tablo 3.13. pH değişimi için varyans analizi sonuçları	71
Tablo 3.14. Karışım grupları için genel regresyon analizi	71
Tablo 3.15. Kontrol grupları için genel regresyon analizi.....	71

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

C_2H_5OH	: Etil alkol
$CuSO_4$: Bakır sülfat
g	: Gram
H_2SO_4	: Sülfürik asit
K	: Kelvin
$K_2Cr_2O_7$: Potasyum dikromat
K_2HPO_4	: Dipotasyum fosfat
kg	: Kilogram
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
kHz	: Kiloherzt
l	: Litre
m	: Metre
mg	: Miligram
$MgSO_4$: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mN	: Milinewton
mPa	: Megapascal
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat
NH_3	: Amonyak
nm	: Nanometre
psi	: Bir inç kare başına düşen basınç
rpm	: Dakika başına devir sayısı (Revolutions per minute)
V	: Hacim
Wt%	: Ağırlıkça yüzde
$(NH_4)_2SO_4$: Amonyum sülfat
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
μW	: Mikrowatt
$^{\circ}C$: Santigrad derece

Kısaltmalar

ANOVA	: Analysis Of Variance (Varyans Analizi)
DKO	: Düzeltilmiş Kareler Ortalaması
DKT	: Düzeltilmiş Kareler Toplamı
KM	: Kuru Madde
KT	: Kareler Toplamı
SD	: Serbestlik Derecesi

TİCARİ KURU MAYALARIN ETANOL ÜRETİMİ ÜZERİNDE BAZI BESİNLERİN ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışmada, ticari kuru maya *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol fermentasyonunda bazı besinlerin şeker kullanımı ve etanol üretimine etkisi araştırılmıştır.

İlk olarak 0,1 g/l maya, 200 g/l sakkaroz ve yeast ekstrakt, MgSO₄, KH₂PO₄ ve biotinün değişik konsantrasyonları ile ayrı ayrı fermentasyon ortamı hazırlanmıştır. 6, 24, ve 48. saatlerde pH ve kalan invert şeker miktarları ölçülmüştür. Uygun pH değişimi ve en fazla şeker kullanımını sağlayan besin konsantrasyonları belirlenmiştir.

Sonraki aşamada maya miktarının etkisini araştırmak için, 200 g/l sakkaroz ve farklı maya konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Böylece, son aşamada kullanılacak maya miktarı belirlenmiştir.

En sonunda, seçilen besin konsantrasyonları ve tüketilen 1 g sakkaroz için 5 mg (NH₄)₂SO₄ ile, farklı sakkaroz konsantrasyonlarında fermentasyon ortamları hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamlarında; pH, kalan invert şeker ve etanol konsantrasyonu ölçülmüştür.

Çalışma sonuçları Tukey metodu ve Regresyon analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Besin karışımı ve kontrol grupları arasında farkın $p < 0,05$ için anlamlı olduğu görülmüştür. Regresyon analiziyle etil alkol miktarını etkileyen parametreler karşılaştırılmış ve denklemler elde edilmiştir.

Sonuçlara göre, en yüksek (%6,38) etanol seviyesine %15 sakkaroz konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Sakkaroz kullanımı kontrol grupta %90,4 iken karışım grubunda %96,08 seviyesine ulaşmıştır. Fermentasyon performansı ve etanol verimini geliştirmede en iyi bileşenin yeast ekstrakt olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Beslenme, Etanol Fermentasyonu, Kuru Maya, *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast Ekstrakt.

THE EFFECT OF SOME NUTRIENTS ON ETHANOL PRODUCTION OF COMMERCIAL DRY YEAST

ABSTRACT

In this study, influence of some nutrients to sugar utilization and ethanol production was investigated on ethanol fermentation with commercial dry yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Firstly, fermentation medium was separately prepared with 0.1 g/l yeast, 200 g/l saccharose and the different concentrations of yeast extract, MgSO₄, KH₂PO₄ and biotin. After 6, 24, and 48 hours; pH and residual invert sugar were measured. Concentrations of nutrients that are providing appropriate pH change and maximum utilization of saccharose were determined.

Next stage, 200 g/l saccharose and different concentrations of yeast was studied to investigate the effect of yeast amount. Thus, the amount of yeast to be used in final stage of study was determined.

At last, fermentation media were prepared at different concentrations of saccharose with the selected nutrient concentrations and 5 mg (NH₄)₂SO₄ for 1 g consumed saccharose. pH, residual invert sugar, ethanol concentration were measured in the fermentation media.

Results of the study were analyzed statistically with Tukey method and regression analysis. The difference between nutrient mixture and control groups was found to be significant for $p < 0.05$. The parameters affecting the amount of ethanol were compared and equations were obtained by regression analysis.

According to results, the highest ethanol level (6,38%) was achieved at 15% saccharose concentration. In nutrient mixture group reached to level 96,08% while utilization of saccharose was 90,4 % in control group. Yeast extract was determined as the best component in improving fermentation performance and ethanol yield.

Keywords: Nutrition, Ethanol Fermentation, Commercial Dry Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast Extract.

GİRİŞ

Günümüzde dünya nüfusunun giderek artması ve daha çok ülkenin endüstrileşmeye başlamasıyla enerji tüketimi de artmaktadır. Enerji tüketiminin yüksek boyutlara ulaşmasıyla dünya petrol rezervlerinin hızla azalması bilim adamlarını yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılmasına yöneltmiştir.

Son 150 yıldır, insanoğlunun faaliyetleri ile dünya atmosferinin dengesinde değişikliklere neden olan fosil yakıtlar, çevre için önemli ve geri dönüşümü olmayan tehlikeler yaratmaktadır. Hem tükenebilir enerji kaynaklarıdır hem de küresel ısınmayı arttırmaktadırlar. Bu yakıtlar, sera gazları olarak adlandırılan CO₂, metan, ozon vb. gazların atmosferdeki miktarında hızlı bir artışa neden olmakta ve küresel ısınmayı tetiklemektedir (Sun ve Cheng, 2002; Galbe ve Zacchi, 2002). Bu da araştırmacıları farklı enerji kaynakları bulmaya ve küresel ısınmayı önleme arayışına yöneltmiştir. Küresel ısınmayı kontrol altına almak için alınabilecek bazı önlemleri; enerji tüketimini azaltmak, daha düşük karbon içeren yakıtlara geçiş yapmak, fosil yakıtların kullanımını azaltmak, sera gazlarının atmosfere dağılımını azaltmak, CO₂ emisyonunu azaltan, temiz ve yenilenebilir alternatif enerji kaynaklarını kullanmak ve CO₂ üretimi için biyokütle gibi doğal kaynaklardan elde edilen biyoyakıtları kullanmak şeklinde sıralamak mümkündür (Balat, 2011).

1900'lerdeki enerji krizinden beri, etil alkol gibi düşük maliyetli yenilenebilir ve devamlı enerji kaynakları bilimsel araştırmalarda ana konu olmuştur (Asli, 2010). Dünyanın birçok ülkesinde etil alkol; motor yakıtlarına ilave edildiğinde yakıtların kirliliğini ve sera gazlarının emisyonunu azalttığı için Avrupa Komisyonu etil alkolün %5 oranında motor yakıtlarına ilave edilebileceğine izin vermiştir (URL-1).

Bugün dünyada milyarlarca galon etil alkol üretilmektedir. Artan enerji ihtiyacına karşılık 1980'lerde 0,18 milyar galon seviyesindeyken 2006 yılında 4,89 seviyesine ulaşmıştır (Bai ve diğ., 2002).

Yıllardır maya fermentasyonu ile etil alkol üretimi önemli bir endüstri alanı olmuştur. Etil alkol etilenden sentetik olarak üretilmektedir. Ancak sentetik alkolde insan sağlığına zararlı yan ürünler ve safsızlıklar bulunabileceğinden gıda ve ilaç sanayinde fermentasyon ürünü alkol kullanma zorunluluğu vardır.

Fermentasyon işlemini yürütmeye kullanılan mikroorganizmalar da substrat kadar önemlidir ve birçok araştırmada hedef olmuştur. Bira ve ekmek mayası olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae*, fırıncılık ve biracılık endüstrilerinden dolayı fermentasyon endüstrisinde en geniş çapta kullanılan mikroorganizmadır (Asli, 2010).

Fermentasyonun ilerlemesi için maya derişimi önemlidir. Bu nedenle fermentasyonda çözücünün düşük zehirlilikte olması ve maya gelişimini engellememesi gerekir. Mayalar diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında etil alkole oldukça dayanıklıdır (Kırbaşlar ve diğ., 2000).

Fermentasyonla etil alkol üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda, genellikle fermentasyon koşullarını değiştirerek verim artırılmaya çalışılmıştır. Etil alkol fermentasyonunda kullanılan mayaların etil alkol toleransının fizyolojik durumundan bağımsız genetik bir özellik olduğu düşünülmüş, yapılan çalışmalarda besiyerinin bileşiminin değiştirilmesi ile etil alkol veriminin artırılacağı ve aynı yöntemle yüksek alkol konsantrasyonlarında fermentasyon yapabilen daha stabil mayaların sağlanabileceği bildirilmiştir. Etil alkol fermentasyonunda, ortama ilave edilen yeast ekstrakt veya diğer besinlerin etki mekanizmaları uzun süre tartışılmış yeast ekstrakt yanında, amino asit karışımları, diğer azot kaynakları ve bazı minerallerin fermentasyonu uyarıcı olduğu gözlenmiştir (Arı ve Dönmez, 2000).

Ayrıca; sıcaklık, etil alkol konsantrasyonu, azot asimilasyonu, besinler, oksijen ve inhibitörlerin etkileri konusunda birçok çalışma bulunmaktadır. Araştırma çalışmalarında etil alkol fermentasyonunun önemine odaklanılmış, optimum fermentasyon şartları, reaktör tasarımı, optimum hücre büyümesi için en iyi besinler, ucuz kaynaklardan maya suşlarının geliştirilmesi, geliştirilmiş maya suşlarının kullanımı gibi çeşitli alanlar ilgi çekmektedir (Pramanik ve Rao, 2005; Asli, 2010).

Bu çalışmada da ticari kuru mayanın etil alkol fermentasyonu için optimum Şartlar sağlanmış ve ortama eklediğimiz bazı besinlerin etil alkol üretimine etkisi incelenmiştir. Etil alkolün maksimum seviyede üretimi ve fermentasyon sresinin kısaltılması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Maya Fermentasyonunun Tarihçesi

Binlerce yıldır mikroorganizmaların rol aldığı biyolojik olaylar ve oluşturdukları ürünler bilinmektedir. Beklenen meyve sularını içen insanların keyif almalarıyla başlayan bu süreç, toprak ve ağaç kaplarda, meyve kabuklarında, tulumlarda ilk fermentasyon tekniklerinin doğmasına başka bir deyişle mikrobiyolojik esasa dayalı bir tekniğin ilk defa ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Arkeologlara göre, üzüm suyundan şarabın eldesi aşağı Mısır ve arasında kalan bölgede en az 10000 yıldan beri biliniyordu. Şarabın Avrupa'ya yayılması ise, Roma İmparatoru Marcus Aurelius Probus (M.Ö. 282-276) zamanında gidilen yerlere asma kültürünün de götürülmesiyle gerçekleşmiştir.

Tarihi kayıtlardan, Babil'de 20 çeşit bira benzeri içkinin yapıldığı ve Hamurabi Kanunları'ndan bu içkileri içenler ve satanlar hakkında ceza hükümleri getirildiği bilinmektedir.

M.S. 9. yüzyılda, Arap kimyagerleri hurma şarabından alkol elde etmek için metod geliştirmişler ve elde ettikleri ürüne de "En Asil" anlamına gelen "Alkol" (El-Kuul) adını vermişlerdir.

1595'te Libavius, ilk defa fermentasyon ve kokuşma olaylarının ayrı şeyler olduğunu belirtmiştir. Bundan 100 yıl kadar sonra, Becker şeker içeren sıvıların fermente olduğunu ve sonuçta alkol oluştuğunu savunmuştur. 1648'de Helmont, fermentasyon sırasında gaz çıktığını, Wren ise bu gazın CO₂ olduğunu göstermiştir.

Daha sonra Lavosier 1789'da, şekerin fermentasyon yoluyla tamamen etil alkol ve CO₂'e parçalandığını göstermiş, 1810 yılında ise Gay-Lussac, etil alkol fermentasyonunun kimyasal reaksiyonunu ortaya koymuştur. Bu reaksiyon ile 1 molekül sakkarozdan, 4 molekül CO₂ ve 4 molekül etil alkol meydana gelmektedir.

Buna göre,



1828' de Dumas bu eşitliği aşağıdaki şekilde ifade etmiştir,



Antonius Van Leeuwenhoeck kendi yaptığı mikroskopla, çeşitli ortamları inceleyerek ilk defa mikroorganizmaların resimlerini çizmiş ve onlara 'Küçük Hayvancıklar' adını vermiştir. Bu buluş fermentasyon mikrobiyolojisinde önemli adımlar atılmasına yol açmıştır.

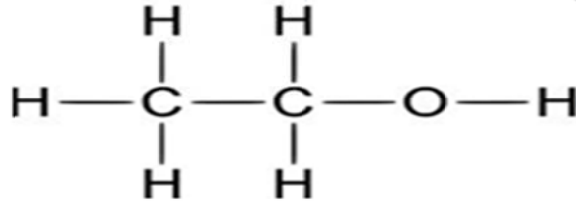
Schwann, 1937'de fermentasyon reaksiyonlarında maya hücrelerinin önemli rol oynadığını söylemiştir. Meyen ise, bu organizmaya 'Şeker Mantarı' anlamına gelen *Saccharomyces* adını vermiştir.

Pasteur bir çalışmasında, besin maddelerinin ısı etkisiyle sterilize edilebileceğini göstermiştir. Böylece ilk defa sterilizasyon tekniğinin ilkeleri ortaya konmuştur. Pasteur denemeleriyle etil alkol fermentasyonunun canlı varlıklar tarafından yapıldığını ortaya koymuş, fermentasyonun kimyasal bir parçalanma olayı değil, biyokimyasal bir olay olduğunu ispatlamıştır.

İlk defa 1958 yılında Traube, fermentasyona maya hücresinde bulunan, ferment adı verilen bir maddenin sebep olduğunu ortaya koymuştur. Buchner, hücre zarını parçalayarak, şekeri parçalayabilen bir sıvı elde etmiş ve buna 'Zimas' (Zymase) adını vermiştir (Pamir, 1985).

1.2. Etil Alkol

Etil alkol, renksiz ve yanıcı bir kimyasal bileşik olup etil alkol veya bitkisel alkol de denilmektedir. Alkollü içkilerin büyük bir kısmında bulunur. Kimyasal formülü C_2H_6O olup EtOH ya da C_2H_5OH olarak da ifade edilmektedir (URL-2).



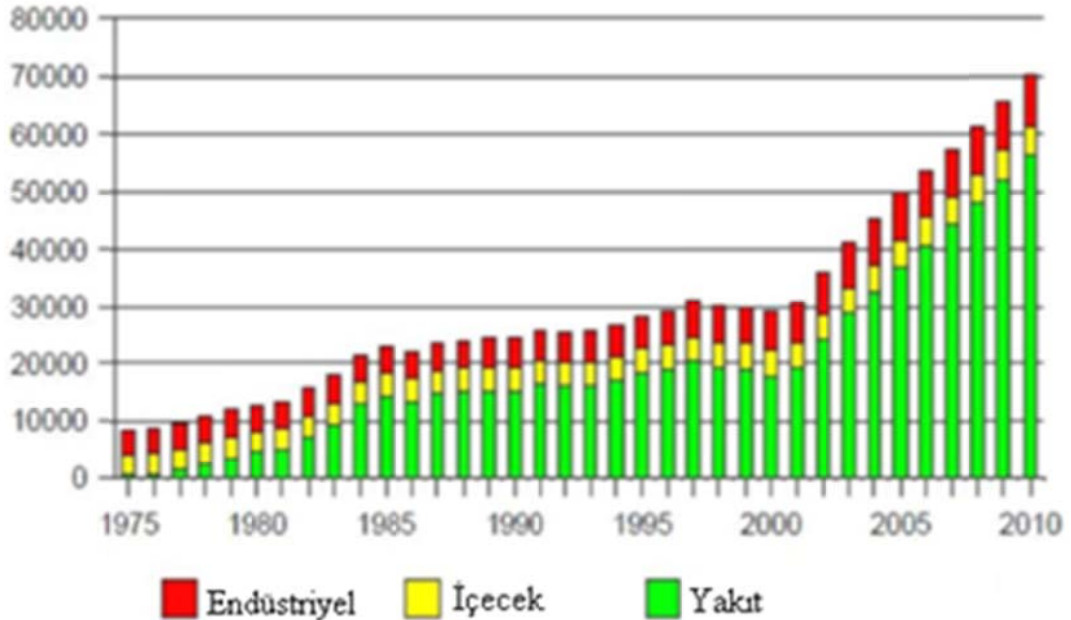
Şekil 1.1. Etil alkolün açık formülü (URL-3)



Şekil 1.2. Etil alkolün moleküler yapısı (URL-4)

1.2.1. Etil alkolün kullanım alanları

Geniş çapta üretilen endüstriyel etil alkol gerek yakıt olarak gerekse teknikte yaygın olarak kullanımı nedeniyle eşsiz bir organik bileşendir. Etil alkol; alkollü içkiler, yakıt için ana madde ve kimyasal ürünlerin hammaddesi olmak üzere üretilmektedir.



Şekil 1.3. Dünya etil alkol tüketiminin sektörlere göre dağılımı (URL-5)

Alkollü içkilerde şekerin fermentasyonu sonucu etil alkol oluşur. Bunun yanında etil alkol çözügen olarak, önemli proseslerde sudan sonra ikinci sırada bulunur.

Etil alkol; çözügenler, ekstrantlar, boyalar, germisidler, farmasotikler, kayganlaştırıcılar, yapıştırıcılar, deterjanlar, pestisidler, yumuşatıcılar, yüzey kaplama maddeleri kozmetikler, nitroselüloz, patlayıcı maddeler, suni ipek gibi sentetik liflerin yapılmasında kullanılan reçineler ve diğer organik maddelerin sentezinde substrat olarak kullanılır. Ayrıca asetaldehit, etil asetat, asetik asit, etilen di bromür, glikoller ve etil klorür gibi kimyasal maddelerin hammaddesini etil alkol oluşturur. 2. Dünya Savaşı'ndan sonra lastik üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır.

1.2.2. Etil alkolün fiziksel özellikleri

Etil alkolün fiziksel özellikleri aşağıdaki Tablo 1.1'de belirtilmiştir.

Tablo 1.1. Etil alkolün fiziksel özellikleri (Üstün, 1997)

Molekül Ağırlığı	46.7 g.mol ⁻¹
Donma noktası	-114.15 °C
Kaynama noktası	78.32 °C
Füzyon ısısı	4.64 kJkg ⁻¹
Buharlaştırma ısısı 70 °C'de	855.66 kJkg ⁻¹
80 °C'de	900.83 kJkg ⁻¹
100 °C'de	799.05 kJkg ⁻¹
Spesifik ısısı (16-21 °C)	2.415 Jg ⁻¹ K ⁻¹
Isıl iletkenlik (20 °C)	18 µW.m ⁻¹ K ⁻¹
Yanma ısısı (sabit hacimde)	1370.82 kJ/mol
Viskozite (20 °C)	1.17 mPa
Yüzey gerilimi (20 °C)	22.03 mN/m
Kırılma indeksi	1.36048
Yoğunluk	0.78942
Havada alevlenme sınırı -en düşük	%3.5 (v)=67 g/m ³
Havada alevlenme sınırı -en yüksek	%15 (v)=290 g/m ³
Tutuşma noktası (autoignition)	425 °C
Alevlenme noktası (flash point)	13 °C

1.2.3. Etil alkol üretimi ve hammadde seçimi

Etil alkol, şeker içeren materyallerin fermentasyonu sonucu oluşmaktadır. Etil alkol üretiminde kullanılabilen hammaddeler;

- Şeker içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, melas, çeşitli meyveler) mikroorganizmalar tarafından doğrudan kullanılabilir. (Üstün, 1997).
- Nişastalı hammaddeler (tahıllar; mısır, malt, arpa, çavdar, buğday, pirinç, yulaf, patates ve kassava vb.) fermentasyondan önce malt enzimleri veya küflerden elde edilen enzimlerle hidrolize edilmek zorundadırlar.
- Selülozlu hammaddeler (ağaç, tarımsal atıklar, kağıt hamuru ve kağıt fabrikasından elde edilen atık sülfat sıvısı) kullanımdan önce mineral asitlerle fermente olabilen şekerlere dönüştürülürler (Üstün, 1997).

Bugün fermentasyon endüstrisinde, substratlar özel yetiştirilmiş olabileceği gibi gıda üretimi sırasında açığa çıkmış atıklar veya bozulmuş ürünler de olabilir. Bu substratlara örnek olarak; hububat sap ve samanları ile hububat kepekleri, şeker melası ve küspesi, meyve-sebze artıkları, peynir altı suyu, nişasta artıkları veya yan ürünleri ile üretim fazlası meyve ve sebzeler verilebilir. Alkol üretiminde tarımsal ve endüstriyel atıkların substrat olarak kullanılmasındaki amaç; hızla artan ihtiyacı karşılamak ve çevre kirliliğine çözüm getirmek, sonuçta ekonomik değeri olan bir ürün elde etmektir (URL-6).

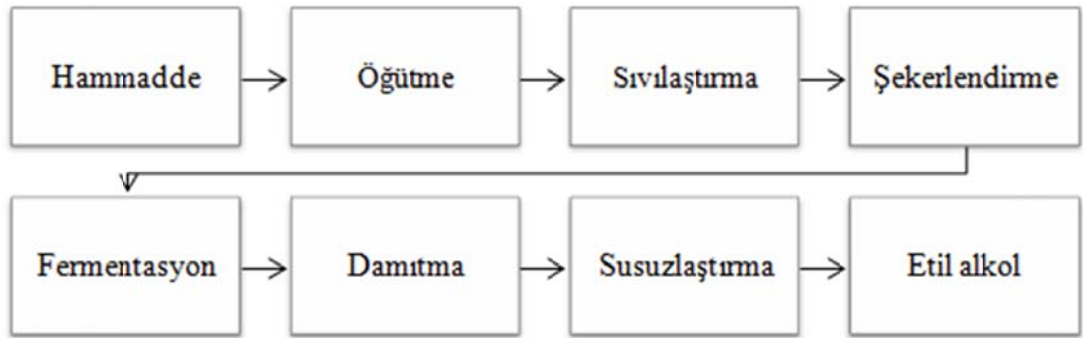
Etil alkol üretiminde kullanılan hammaddelerden biri olan şeker pancarı melası, kaliteli, kolay bulunabilen, ucuz karbon kaynağıdır. Fermentasyon teknolojisinde biyokatalist olarak yaygın bir şekilde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*, uygun koşullar altında melastan etil alkol üretimine elverişlidir. Ülkemizde 4 şeker fabrikasında (Erzurum, Eskişehir, Malatya, Turhal) alkol üretim birimi bulunmaktadır. Şeker üretim artığı olan ve %50 şeker içeren melastan, bu tesislerde elde edilen etil alkol içki üretiminde değerlendirilmektedir. Ayrıca Petrol Ofisi tarafından mısır ve buğdaydan biyoetanol üretilerek “yurtsever yakıt” adı altında piyasaya verilmiştir. Bu yakıt kurşunsuz benzine %2 oranında katılarak 25-50 milyon dolarlık bir ithalat tasarrufu sağlanmıştır (URL-7).

1.2.4. Fermentasyon yöntemi

Fermentasyon, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri yardımıyla bitkilerde bulunan karbohidratlar gibi bazı baskın organik bileşikler kullanarak karmaşık dönüşümlerle alkol veya organik asit oluşumunu sağlayan reaksiyon zincirleridir. Fermentasyonun basit tanımı; mikroorganizmaların faaliyetiyle yüksek molekül ağırlıklı organik maddelerin, daha basit maddelere parçalanmasıdır. Egzotermik bir olaydır. Fermentasyon reaksiyonlarında, mikroorganizma hücresi ya da mikroorganizmanın ürettiği enzimleri içeren bir biyokatalizör kullanılır. Kullanılan enzime göre son ürünler değişir.

Etil alkol üretimi sırasında kullanılan yöntemlerin temel prensipleri aynıdır. Etil alkol üretiminde biyokütle, dört ana basamaktan geçerek etil alkole dönüşür. Bu basamaklar Şekil 1.4'te gösterilmiştir. Bunlar;

- Fermente olabilir şekerin açığa çıkması için hammaddenin ön işlemler ile fermentasyona hazırlanması,
- Saf maya ya da bakteri eklenerek fermentasyonla şekerin etil alkol ve karbondioksit'e dönüşmesi,
- Etil alkolün distilasyon yöntemi ile diğer bileşenlerden ayrılması,
- Dehidrasyon ve rektifikasyon (zenginleştirme) işlemleriyle etil alkolle karışık bulunan suyun ve yan ürünlerin uzaklaştırılmasıdır (Güven ve Güneser, 2007).



Şekil 1.4. Etil alkol üretiminde temel basamaklar (Güven ve Güneser, 2007)

Fermentasyon mekanizması ilk olarak Gay-Lussac tarafından, heksoz şekerin etil alkol ve karbondioksit'e stokiometrik olarak tanımlanmıştır.

Buna göre 100 kg heksoz şeker = 51,1 kg etil alkol + 48,9 kg karbondioksit ağırlıkça %51,1 lik kazanç Gay-Lussac katsayısı olarak bilinir ve dönüşümün verimini ifade eden temel bilgidir.

Bu mekanizmanın anlaşılmasında, bir adım da Louis Pasteur tarafından atılmıştır. Tablo 1.2 de etil alkol fermentasyonunda elde edilen parametreler verilmiştir.

Tablo 1.2. İdeal Pasteur alkol fermentasyonunda elde edilen parametreler (URL-6)

Parametreler	% Ağırlık
Etil alkol	48,4
Karbondioksit	46,6
Gliserol	3,3
Suksinik asit	0,6
Hücre materyali	1,2
TOPLAM	100,1

Ürünlerin daha geniş bir görünüm sergilemesinin sebebi oksijen ve hücrel büyüme için gerekli olan besinlerdir. Bu yüzden Pasteur katsayısı, teorik Gay-Lussac kazancının %94,7'sidir. Gay-Lussac kazancı, fermentasyonunda elde edilebilecek maksimum etil alkol kazancıdır. Ticari uygulamada, ideal olmayan substratlar kullanıldığı zaman, uygun bir fermentasyon süresi içinde %90 Gay-Lussac bölgesinde bir dönüşüm verimliliği elde edilir. Tablo 1.3'te 100 g glikozdan fermentasyonla elde edilebilen ürünlerin konsantrasyon sınırları verilmiştir.

Tablo 1.3. 100 g glikozun maya ile fermentasyonu sonucu elde edilmesi gereken ürünlerin konsantrasyon sınırları (URL-6)

Ürünler	Konsantrasyon Sınırları (g / 100 g fermente glikoz)
Etil alkol	45 - 49
Karbondioksit	43 - 47
Gliserol	2 - 5
Suksinat	0,5 - 1,5
Karışık alkol	0,2 - 0,6
Asetat	0 - 1,4
Butilen glikol	0,2 - 0,6
Hücre materyali	0,7 - 1,7

İyi bir fermentasyon prosesi için beş temel unsur gerekmektedir:

- İstenilen son ürünü meydana getirecek mikroorganizma kolaylıkla ve hızla çoğalmalı, yeterli verimi sağlayabilmelidir.
- Ekonomik bir hammadde,
- Kabul edilebilir verimlilik,
- Hızlı fermentasyon,
- Kolayca ayrılabilen ve saflaştırılabilen bir ürün (Üstün, 1997; Çataltaş, 1985).

Fermentasyon boyunca ortamda aşağıdaki değişimler görülür:

- Besiyerindeki substrat yapısının değişmesi ve konsantrasyonunun azalması,
- Mikroorganizma hücrelerinin çoğalması,
- Ortam pH'sının ve sıcaklığın değişmesi,
- Vizkozitenin değişmesi,
- Ürün konsantrasyonunun artmasıdır (Üstün, 1997; Çetin, 1983).

İdeal fermentasyon işlemi için substratın aşağıdaki özellikleri içermesi gerekir:

- Substrat uygun sıcaklık derecesinde ve optimum pH'da olmalı ve maya için gerekli besinleri yeterli miktarda içermelidir.
- Fermente olabilecek şeker konsantrasyonu, belli fermentasyon metoduna uygun olacak şekilde düzenlemeli ve işlem sonunda arta kalan invert şeker miktarı minimum seviyede tutulmalıdır.
- Substrat ortamında aşılana mikroorganizma dışındaki diğer mikroorganizmalar, pastörizasyon, antibiyotik veya antiseptik ilavesi, sterilizasyon metodlarının biriyle yok edilmelidir.
- Maya üzerinde toksik etki yapabilecek maddeler azaltılmalı veya tamamen kaldırılmalıdır.
- Osmotik basıncın ters etkisi uygun seviyelerde tutulmalıdır (URL-6).

1.3. Etil Alkol Fermentasyonu

Etil alkol fermentasyonu, enzimlerin etkisi ile şekerli çözeltilerin etil alkol ve karbondioksite parçalanmalarıdır. Mayaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek için

şekeri parçalamalarının sonucudur. Bu reaksiyon yalnız D-heksozlarda meydana gelir. Glukoz, fruktoz, mannoz şekerlerinde kolay, galaktozda güç olur.

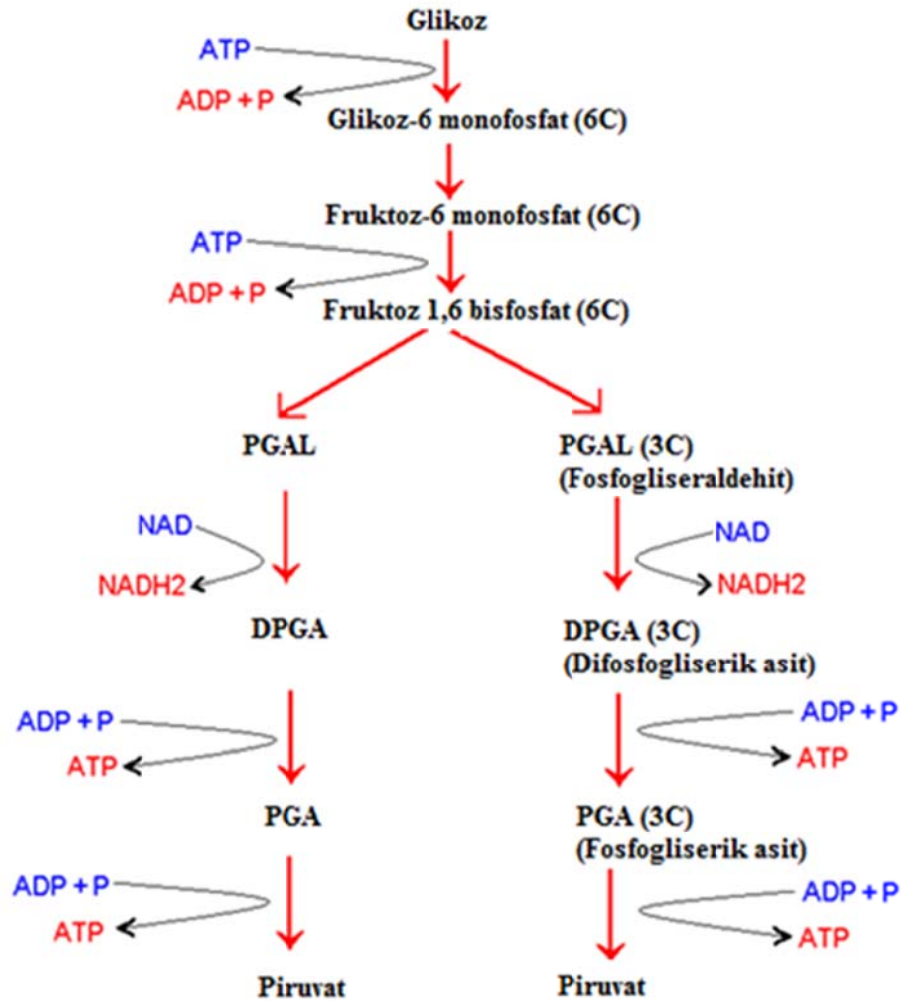
Bütün fermentasyon çeşitlerinde ATP üretimi, glikoliz kısmında gerçekleşir. Bunun için bütün fermentasyonların ATP kazancı da aynıdır. Pirüvik asitten sonra kullanılan enzimler farklı türlerde değişiklik gösterdiğinden fermentasyonun son ürünleri canlı türlerine göre değişiklik gösterir.

Oksijensiz solunum anaerob bakteri ve mayalarda temel enerji üretim biçimiyken bitki ve bazı hayvanların da özel durumlarda başvurduğu enerji üretim biçimidir. Oksijensiz solunumun özellikleri;

- Glikoliz ve fermentasyon olmak üzere iki evrede gerçekleşir.
- Glikolizde temel amaç enerji üretimidir. Fermentasyonda ise temel amaç glikoliz sonucu oluşan artık ürünlerin hücreye zarar vermesinin önlenmesidir.
- Glikoliz bütün canlılarda ortaktır. Fermentasyon ise canlının kullandığı enzime göre oluşum biçiminde ve son ürünlerde farklılıklar görülür.
- Fermentasyon son ürüne göre adlandırılır; Etil alkol, Laktik asit, Asetik asit vb.
- Fermentasyonda O₂ kullanılmaz ancak asetik asit fermentasyonunda O₂ kullanılır.

1.3.1. Glikoliz

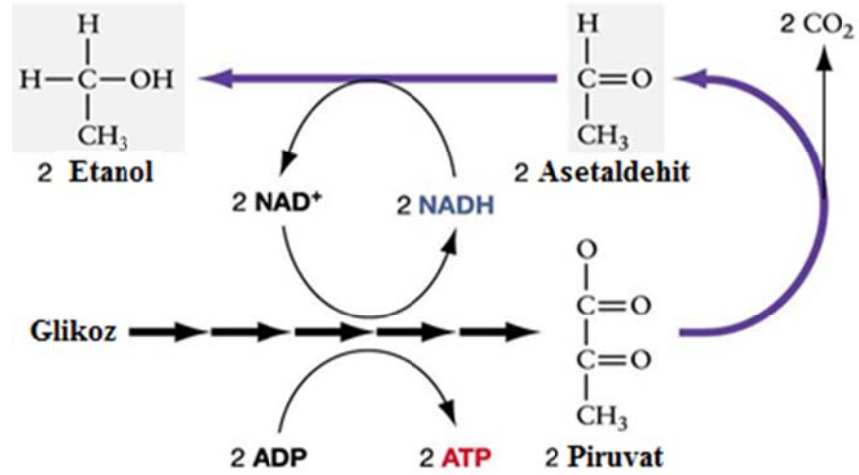
Glikozun, pirüvik asite kadar parçalanması reaksiyonlarına glikoliz denir. Bu reaksiyonlar hem oksijenli (aerobik) hem de oksijensiz (anaerobik) solunumun başlangıcını oluşturur yani iki solunumda da ortaktır. Glikolizde substrat düzeyinde fosforilasyon ile toplam 4 ATP, net 2 ATP sentezi olur. Glikolizin ardından son ürün evresinin olmasının sebebi ise NAD molekülünü tekrar kullanılabilir duruma getirmek ve pirüvik asiti ortamdan uzaklaştırmaktır (Soyuduru, 2007).



Şekil 1.5. Glikoliz şeması (URL-8)

1.3.2. Etil alkol oluşumu

Glikozun glikolize olması, pirüvik aside oksidasyonuyla başlar ve sonuçta 2 mol pirüvik asit, 2 mol ATP, 2 mol NADH₂ meydana gelir. Daha sonraki tepkime 2 mol pirüvik asidin 2 mol asetaldehit ve 2 mol karbondioksit dönüşümü şeklindedir. Bundan sonra 2 mol asetaldehit, 2 mol NADH₂ ile 2 mol etil alkole indirgenir. Etil alkol fermentasyonunda çok az enerji üretilmektedir. Çünkü enerjinin çoğu son ürün olan etil alkolde kalmaktadır (Güven, 2003).



Şekil 1.6. Etil alkol fermentasyonu (URL-9)

1.4. Fermentasyon Ürünleri

Fermentasyonda oluşan temel ürünler:

a) Etil alkol: Etil alkol fermentasyonunun asıl önemli ürünüdür.

Glikoz → 2 Etil alkol + 2 Karbondioksit



Yukarıdaki denkleme göre, 100 g glikozdan, 51,1 g etil alkol ve 48,9 g karbondioksit meydana gelmektedir.

b) Karbondioksit: Etil alkol fermentasyonunun ikinci asıl ürünü olan CO₂ bir gaz olup Gay-Lussac'ın belirlediği eşitliğe göre fermente olan her 100 g şekerden oluşan miktarı kuramsal olarak 48,9 gram'dır. Renksiz, yanmayan, zayıf ekşi tat ve kokuda olan asidik özellikteki CO₂'nin molekül ağırlığı 44,1'dir. Havadan ağır olan CO₂, fermentasyon sırasında tabana çökerek burada toplanır. Bu tabakanın içine giren canlı ölür. Bu nedenle sürekli etil alkol fermentasyonu yapılan yerlerde, havalandırmanın sağlanması zorunludur (Üstün, 1997).

Tablo 1.4. Fermentasyon ürünleri (Üstün, 1997)

Temel ürünler	Yan ürünler	Diğer ürünler
Etil alkol Karbondioksit	Gliserin Füzel yağ Asetaldehit Süksinik asit	Asitler Esterler Metil alkol Akrolein Asetal

1.5. Fermentasyon Yöntemleri

Biyoteknolojide fermentasyonlar kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) veya sürekli (continous) yöntemlerle yürütülmektedir.

1.5.1. Kesikli fermentasyon

Kapalı sistemler olan kesikli sistemlerde fermentasyon ortamı hazırlanır ve mikroorganizma aşılanır. Sistemin pH, sıcaklık gibi değerleri ayarlandıktan sonra ortama yeni substrat veya mikroorganizma eklenmez. Fermentasyon, ortamdaki besin elementleri tükeninceye kadar veya çevresel koşullardaki değişikliklere göre sonlandırılır. Fermentasyon boyunca fermentöre oksijen, köpük önleyici ve pH ayarı için eklenen asit ve bazlar hariç herhangi bir madde ilave edilmez. Hücre metabolizmasının sonucu olarak kültür ortamı, canlı kütle ve metabolit konsantrasyonu sürekli olarak değişiklik gösterir. Kesikli fermentasyonda, steril besiyerinde inkübasyona bırakılan mikroorganizmada dört temel büyüme fazı görülür.

1.5.1.1. Lag faz (Uyum fazı)

Sterilize edilmiş büyüme ortamına mikroorganizma kültürü eklendikten sonra lag faz boyunca mikroorganizma sayısında artış olmaz. Lag fazın süresi hücrelerin aşılama öncesi hangi fazda olduklarına bağlıdır. Aşının geliştirildiği ortam ile fermentasyon ortamı arasındaki farklılığa göre bu süre uzun veya kısa olabilir.

1.5.1.2. Logaritmik faz

Lag fazın sonunda fermentasyon ortamına uyum gösteren hücreler hızla üremeye başlar. Hücre kütlesi hızla artar. Hücre sayısının logaritmik artışına karşın, kültürün spesifik büyüme hızı sabit kalmaktadır.

Mikroorganizma kompleks besin ortamlarında çoğaltılırsa genellikle birden fazla logaritmik faz görülebilir. Mikroorganizma kolay kullanabileceği (genellikle glikoz) şekeri parçalamak için enzimlerini sentezlerken diğer kaynağı kullanacak enzimlerin üretimini baskılar.

1.5.1.3. Durgun faz

Bu fazda ortamdaki karbon kaynağının tükenmesi veya metabolik son ürünlerin birikmesiyle hücre kütlesindeki hızlı artış durmakta ve hücre durgun faza girmektedir. Canlı kütle miktarı sabit kalır. Bu fazda sekonder metabolitlerin sentezi yapıldığından, biyoteknolojide antibiyotikler gibi bazı ürünlerin eldesinde önemlidir.

1.5.1.4. Ölüm fazı

Hücrenin enerji depolarının tükendiği ve metabolik aktivitesinin durduğu dönemdir. Ticari işlemlerde değeri olmayan bu faza gelir gelmez fermentasyon kesilir (URL-7).



Şekil 1.7. Kesikli kültürde hücre büyümesinin kinetiği (URL-7)

1.5.2. Kesikli beslemeli (fed-batch) fermentasyon

Kesikli beslemeli fermentörler endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Proses başlangıçta kesikli olarak başlar. Besin elementleri tükenmeye başlayınca substrat, fermentasyon sırasında azar azar ortama ilave edilir. Besin eklenmesi hem logaritmik hem de durgun faz sırasında yapılır. Bu hem biyomas hem de ikincil metabolit miktarının artmasına neden olur. Bu fermentasyonun en önemli avantajı, metabolik reaksiyon hızının substratın ilave oranına göre kontrol edilebilmesidir. Ayrıca oksijen transferi ve soğutma gibi fermentasyona etki eden parametreler kontrol altında tutulabilir (URL-7).

1.5.3. Sürekli (Continuous) fermentasyon

Açık sistemlerdir. Sürekli fermentasyon yönteminde steril besin biyoreaktöre eklenirken, eşit miktarda ürün ve mikroorganizma sistemden alınır. Ürünün alımı sırasında kaybedilen mikroorganizmalar, reaktördeki hücre bölünmesiyle dengelenir. İki temel uygulaması vardır. Homojen karışımın sağlandığı biyoreaktörler ve tapa akışlı reaktörler, kemostat veya türbidostat olarak çalışabilir. Kemostat sisteminde fermentasyonun kararlılığı substratlardan birinin konsantrasyonu ayarlanarak hücre büyümesi kontrolüyle sağlanır. Türbidostat yönteminde ise fermentasyonda canlı kütle konsantrasyonu türbidimetrik olarak ölçülür ve elde edilen verilere göre besin eklenerek kararlılık sağlanır (URL-7).

1.6. Etil Alkol Fermentasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar birbirlerinden morfoloji, üreme şekli, serbest oksijene karşı davranışı, çeşitli maddelere etki mekanizmaları bakımından ayrılırlar. Bunlar; bakteriler, mayalar ve küf gibi mikroorganizmalardır (Okur, 2003).

Etil alkol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar olan mayaların *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces carlsbergensis (uvarum)* türleridir (URL-10). Çünkü, bu türler; yüksek etil alkol ve karbondioksit toleransı, hızlı gelişme ve fermentasyon kapasitesi, mikroorganizma sayısını endüstriyel çaptaki işlemler için uygun sayıya indirgeme gibi maya özellikleri ile en çok tercih edilen türlerdir (URL-22).

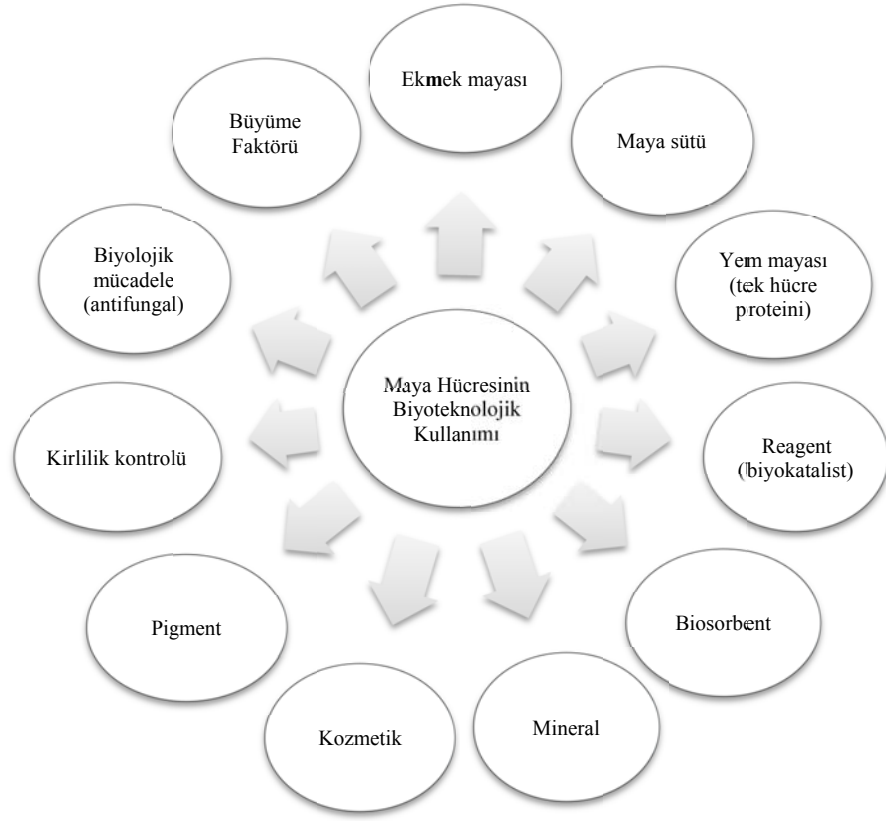
Belirli koşullar altında *Schizosaccharomyces torulopsis* ve bazı *Candida* türlerinin de, teknikte kullanıldığı belirtilmiştir. *Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* cinslerine ait küf türlerinin de etil alkol fermentasyonu yapabildikleri, ancak küflerin mayalar ve bakteriler kadar hızlı gelişemedikleri, bu nedenle bunların endüstriyel üretim için uygun olmadıkları, ayrıca yeterli çalışma yapılmadığı bildirilmiştir. En iyi etil alkol üreten bakterinin *Zymomonas mobilis* olduğu, bunların yüksek konsantrasyonlardaki glikozu hem kesikli hem de sürekli fermentasyonla etil alkole dönüştürebildikleri açıklanmıştır. *Z. mobilis*' in, sadece glikoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği, etil alkolün yanında düşük oranlarda gliserin, süksinat, laktat, asetoin ve bütandiol de ürettiği belirlenmiştir (URL-10).

Son yıllarda termofilik, etanolojenik, sakkarolitik bakteriler çeşitli şekerleri kullanabildiklerinden endüstriyel etil alkol üretimi çalışmaları *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacteroides* ve *Clostridium* cinslerine ait türlerle yapılmıştır. Bunlara örnek olarak *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *T.thermohydrosulfuricus* ve *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* verilebilir (URL-10).

1.7. Maya Hücrelerinin Genel Özellikleri

1.7.1. Mayalar hakkında teknolojik bilgiler

Etil alkol fermentasyonunda en büyük rolü üstlenen mayalar; tek hücreli, spor yaparak veya tomurcuklanarak çoğalan 8-10 µ büyüklüğünde bitkisel kökenli mikroskobik canlılardır. Toprakta özellikle de karbohidrat bakımından zengin olan besinlerde bulunurlar. Üzüm ve meyve üzerinde yabani olarak yaşarlar, meyvelerin sıkılması ile öz suya geçerler, uygun şartlarda ürerler. Yaklaşık 600 adet bilinen maya türünden birkaç tanesi ticari öneme sahiptir. Ekmek yapımında kullanılan ticari maya türü '*Saccharomyces cerevisiae*'dir.



Şekil 1.8. Maya hücrelerinin biyoteknolojik kullanımı (URL-11)

1.7.2. Maya hücresi (*Saccharomyces cerevisiae*)

'*Saccharomyces*' sözcüğü Yunanca ve Latince'den türetilmiştir, 'şeker mantarı' demektir; "*cerevisiae*" Latince "biradan" anlamına gelir. *Saccharomyces cerevisiae*, fungus alemine ait, tomurcuklanan bir maya türüdür. Hücreleri yuvarlak veya oval şekilli, çapları 5–13 µm olarak kaydedilmiştir (Barnett ve Robinow, 2002).

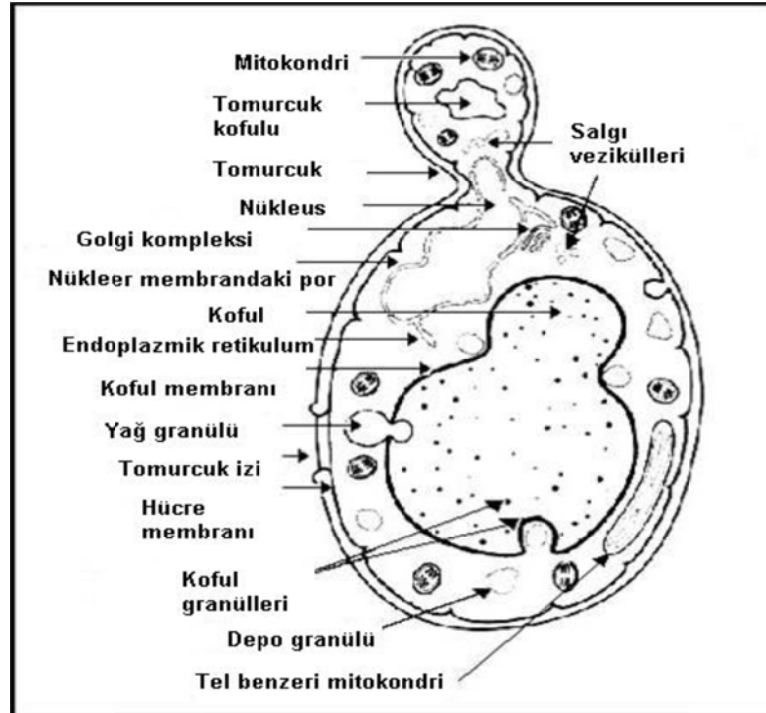
Saccharomyces cerevisiae heterotrof olup, enerjisini glikozdan elde etmekte, aerobik ve anaerobik solunum metabolizmaların ikisini de kullanmaktadır. Örneğin, mayanın anaerobik koşullarda faaliyeti daha çok fermentasyona, aerobik koşullarda ise daha çok hücre yapımına yöneliktir. Bu durum "Pasteur Etkisi" olarak bilinmektedir (Barnett ve Entian, 2005).

Tablo 1.5. Ekmek mayasının taksonomisi (Barnett ve Robinow, 2002)

Alem	Fungus
Şube	Ascomycota
Alt şube	Saccharomycotina
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales Kudrjanzev, 1960
Familya	Saccharomycetacea G. Winter, 1881
Cins	Saccharomyces Meyen
Tür	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, 1883

Saccharomyces kromozomlarının lineer çift iplikçikli DNA'dan oluştuğu bulunmuştur. Genomu ilk olarak 1996'da tamamlanmıştır. Ökaryotlar arasında genomu ilk okunan *S.cerevisiae* genomunun yaklaşık 13.000.000 baz çiftinden ve 6275 genden oluştuğu, ancak yaklaşık 5800 tanesinin işlevsel olduğu sanılmaktadır. Maya ve insan genom dizinlerinin % 23 oranında ortak olduğu tespit edilmiştir (Barnett ve Robinow, 2002).

1.7.3. Mayaların bileşimi ve fizyolojik yapısı



Şekil 1.9. Maya hücresinin şematik görünümü (URL-12)

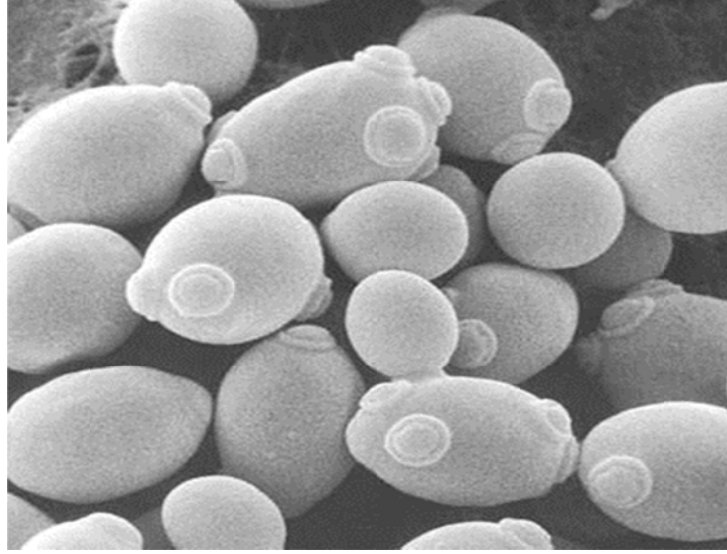
Mikroskop ile incelendiğinde maya hücresinin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdek olmak üzere üç kısımdan oluştuğu görülür.

Maya hücreleri yuvarlak, oval ve silindir biçiminde olup tek hücrelidirler. Boyutları, türlere ve kültür koşullarına göre 2-10 x 3-16 mikrometre arasında değişmektedir. Genellikle bakterilerden büyüktürler Bazen hücreleri yan yana gelerek uzun zincirler (pseudohifa) oluşturabilirler. Kromozom sayısı 16 olup, diploid evre baskındır. Maya hücrelerinde, etrafında delikli bir membrana (nükleer membran) sahip ve çapı 1 mikrometre civarında bulunan bir çekirdek bulunur. Sitoplazmik membran ise permeabilitesi fazla, enzimlerce de oldukça zengindir. Hücre duvarı, maya hücrelerine şekil verir ve bileşiminde glikoz ve mannoz polimerleri (mannan) ile birlikte az oranda lipid, protein ve kitin bulunmaktadır. Hücre içinde, üremenin aktif olduğu dönemde sayıları az olan ve üremenin sonuna doğru artan sayıda granül ve globullere rastlanılmaktadır. İçlerinde şeffaf bir sıvı bulunan büyükçe vakuoller, boyutları 0,25 x 0,5 mikrometre kadar olan mitokondriyumlar ve çok sayıda ribozomlar da yer almaktadır (Brady ve Duncan, 1994), (URL-13).

Maya hücresi sitoplazması içinde bulunan maddeler ise; vakuoller (boşluklar), tanecikler, volutin (yağ tanecikleri içinde bulunan nükleik asit bileşiği olan tanecikler), yağ tanecikleri, albumin, enzim, glikojen ve proteinlerdir. Maya hücreleri klorofil içermez ve zorunlu olarak kemoorganotroftirler. Karbon metabolizmaları çok çeşitlidir. Örneğin; basit şekerleri, polioller, organik ve yağ asitleri, alifatik alkoller, hidrokarbonlar ve çeşitli heterosiklik ve polimerik bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanabilirler (Pamir, 1985).

Saccharomyces cerevisiae, endüstride ticari anlamda; ekmek mayası, alkollü içecekler ve son yıllarda benzine karıştırılarak teknik alkol üretiminde kullanılmaktadır (Beşli ve diğ., 1995). Ekmek yapımında kullanımı M.Ö. 2600 yılına kadar uzanmaktadır. Alkollü içeceklerin yapımında da kullanılmıştır. 1857'de Pasteur tarafından fermentasyon etmeni olarak tanımlanmış ve 1888'de Christian Hansen tarafından izole edilmiştir. B vitaminlerince, niasin ve folik asit yönünden zengindir ve yem katkısı olarak kullanılır (%40-50 protein içerir).

Saccharomyces cerevisiae mayası 'eucaryotik' ve heterotrof bir mikroorganizmadır. Besin kaynağı olarak glikoz, fruktoz, sukroz ve maltoz gibi şekerlerin yanında laktik, tartarik, suksinik, asetik asitleri ve etil alkolü kullanır. Aerobik ve anaerobik ortamda üreyebilir. Gelişmesi için en uygun sıcaklık aralığı 27-30 °C, pH 4-5 aralığında maksimum çoğalma sağlar (Emre, 2007). Bu mayanın dünya çapındaki üretimi 2,5 milyon tonu geçmiştir.



Şekil 1.10. *Saccharomyces cerevisiae'* nin SEM görüntüsü (URL-14)

Tablo 1.6. Ekmek mayasının yaklaşık (% kuru madde) olarak bileşimi (URL-15)

Kuru madde	30-34
Protein (Nx6,25)	40 - 58
Karbonhidrat	35 - 45
Lipidler	4 - 6
Mineral maddeler	5.0 -7.5
Thiamin (B1)	0,002-0,0015
Riboflavin (B2)	0,002-0,008
Pridoxin (B6)	0,002-0,006
Niacin (B3)	0,010-0,050

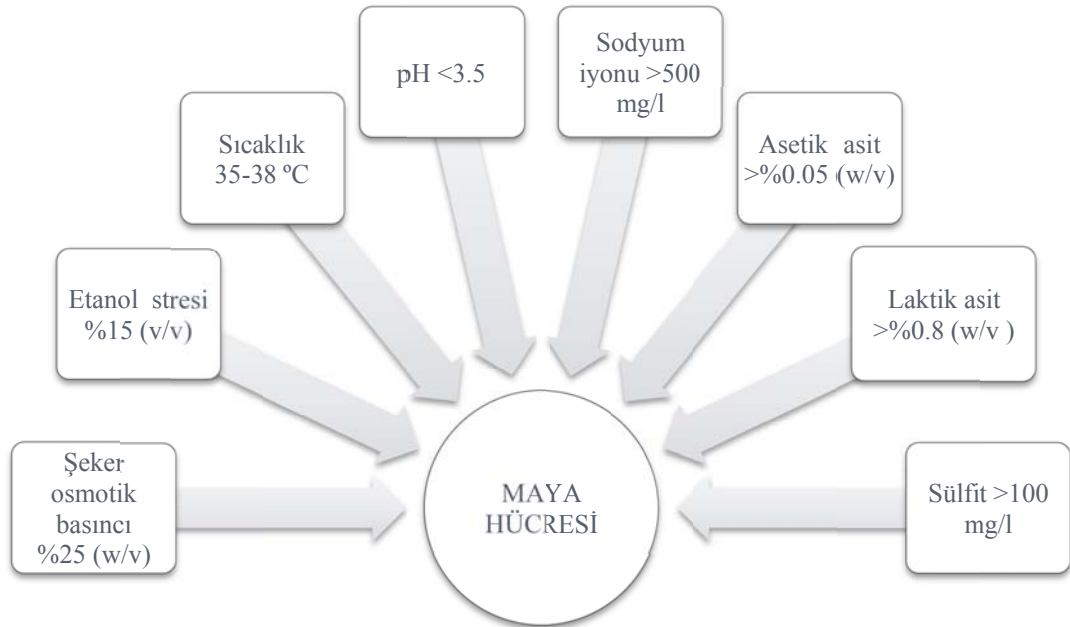
1.7.4. Maya gelişimini düzenleyici etkiler

Maya üremesi sırasında gelişimi düzenleyici önemli etkiler aşağıda açıklanmıştır.

Pasteur etkisi: Glikoliz hızının azalması ve oksijen varlığında dokular ya da mikroorganizmalarda laktat birikiminin bastırılmasıdır. Solunum ile fermentasyon aktivitesinin bastırılması mayada keşfedilen ilk düzenleyici etkidir (Barnett ve Entian, 2005).

Crabtree etkisi: Yüksek oranda aerobik glikoliz yapan mikroorganizmalarda ortama glikoz ekleyerek oksijen tüketiminin önlenmesidir. ‘Crabtree’ etkisi, ‘Pasteur’ etkisinin tersi gibidir. Her ikisi de ekmek mayası üretiminin kontrolü için önemlidir, Çünkü aerobik solunumda oksijenin sınırlı olması ve ortama fazla miktarda şekerin sağlanması hücrelerin fermentatif gelişmesine sebep olur (Barnett ve Entian, 2005).

Glikoz etkisi: Glikozun yüksek derişimlerde bulunduğu durumlarda diğer substratların kullanılabilmesi için gerekli olan yol izleridir. Sonuçta, ortamda yüksek derişimlerde başka substratlar bulunsa bile başlangıç katabolizması için tercih edilen substrat glikoz olur (Emre, 2007).



Şekil 1.11. Etil alkol fermentasyonu boyunca *S. cerevisiae*'da potansiyel stresler (Ingledeew, 1999)

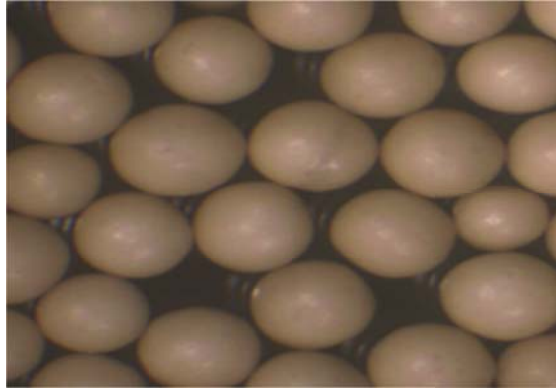
1.8. Ticari Maya Tipleri



Şekil 1.12. Ticari maya tiplerinin sınıflandırılması

1.8.1. Kuru maya

1.8.1.1. Aktif kuru maya



Şekil 1.13. Kuru maya görüntüsü (URL-16)

Kuru maya %92-94 kuru madde miktarına kurutulmuş yaş pres mayadır. Düşük nem içeriğiyle kararlıdır. Kullanmadan önce 35-40 °C sıcaklıkta, suda 10-15 dakika bekletilmesi gerekmektedir. Soğuk su kullanıldığında maya aktivitesi azalır, yüksek sıcaklıklarda ise denatürasyondan dolayı maya aktivitesi yok olabilir. Kuru maya, mekanik olarak maya hücresinden çıkartılmayan suyun termik kurutma işlemi ile uzaklaştırılması ile elde edilir. Böylece mayanın %70 civarında olan su içeriği %5 civarına düşürülür. Bu, maya metabolizmasını yavaşlatır ve mayanın raf ömrünü uzatır. Taşıma ve depolamada hacimsel avantajlar sağlar.

Geleneksel kuru maya atmosferik koşullarda ambalajlanmakta ve ürünün pratik raf ömrü 1 yıl olmaktadır. Son yıllarda aynı ürünler modifiye atmosfer (CO₂ ya da N₂ gazı) altında paketlenilmekte ve raf ömrü uzatılmaya, ürün kalitesi artırılmaya çalışılmaktadır.

Geleneksel kuru mayanın granül boyutları 0,8-1,0 mm arasında, su içeriği ise %7-8 kadardır. Kullanım öncesi ılık suda bekletilip aktive edilmesi gerekmektedir. Genellikle kuru mayaların kurutma işlemleri granül boyutundan dolayı uzun olmaktadır. Bu ise mayaların canlılıkları üzerine olumsuz etki yapmakta dolayısıyla klasik kuru mayaların hamur kabartma yetenekleri diğer ürünlere göre daha düşük olmaktadır.

1.8.1.2. Instant kuru maya



Şekil 1.14. Instant maya görüntüsü (URL-16)

Geleneksel kuru mayanın dezavantajları nedeniyle yeni kurutma yöntemleri kullanılarak, kullanılmadan önce suda bekletmeye gerek duyulmayan instant maya adlı kuru maya üretilmiştir. Kararlılığını uzun süre koruyabilmesi ve nem değişmelerinin önlenmesi için vakum altında paketlenmiştir. Açıldıktan sonra buzdolabı koşullarında kapalı bir kapta saklanmalı ve 3-5 gün içerisinde kullanılmalıdır (URL-15).

Su içeriği %4'ün altında olup raf ömrü 2 yıldır. Daha düşük su içeriği, azot gazıyla yıkandıktan sonra vakum ambalajla korunması, granül boyutlarının küçüklüğü, kısa kurutma prosesi sayesinde az hasar görmüş olması, aktivasyona ihtiyaç duymaması bu ürünün avantajlarıdır (URL-16).

1.8.2. Kuru maya kullanımının önemi

1975 yılından beri sıvı mayanın yanı sıra kuru maya da piyasaya sunulmuştur. Bunun avantajı zaman alan çoğaltmaya gerek olmamasıdır. Kuru maya kullanılmadan önce 30 °C'lik ılık suda 5-15 dakika bekletildikten sonra şıra veya mayşeye ilave edilerek karıştırılmalıdır. Sıvı veya kuru mayanın avantajları; fermentasyonun hemen başlamasını ve düzenli seyretmesini sağlaması, fermentasyon sonrasında ise fermentörlerin cidarlarına tutunmadan çökmesidir (Akman ve Yazıcıoğlu, 1960). Günümüzde kullanımı daha kolay olan kuru maya tercih edilmektedir.

Fermentasyonun istenen şekilde seyretmesi için maya populasyonu $2-5 \times 10^6$ maya hücresi/ml mayşe olduğunda yeterlidir. Bu konsantrasyon şıranın Briksi 24'ün altında, pH'sı 3,1'in üstünde ve sıcaklık 15 °C'nin üstünde olduğunda uygundur (URL-17).

1.9. Fermentasyonu Etkileyen Faktörler

Fermentasyon üzerine etkili faktörler şunlardır:

- Maya türü ve suşu (alkole yüksek tolerans ve yüksek verimli alkol üretimi)
- Şeker konsantrasyonu
- Havanın bileşimi
- Sıcaklık
- pH
- Maya konsantrasyonu
- Etil alkol konsantrasyonu
- Besiyeri bileşimi
- Fermentasyon sıvısının hareketi (Üstün, 1997).

1.9.1. Maya türü ve suşu

Etil alkol fermentasyonunda kullanılacak maya, mayşede bulunan şekerleri fermente etme yeteneğinde olmalı, ayrıca istenen süre içinde fermentasyonu bitirebilmelidir (Üstün, 1997). Genellikle *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar kullanılır.

1.9.2. Şeker konsantrasyonu

Mayalar içinde buldukları ortamdaki çözülmüş gıdalarla beslenirler. Bu gıdaların hücre duvarlarından içeriye osmoz yolu ile geçebilmeleri için belirli bir derişimde olmaları gerekir. Fermentasyonda kullanılan mayşenin, maya üzerinde yaptığı osmotik basınç, önemli etkiye sahiptir. Çözelti derişimi maya aktivite hızına iki şekilde etki eder;

- Substratın inhibisyonu (substratın enzime zehir etkisi)
- Ürün inhibisyonu (ürünün enzime zehir etkisi)

Substratın derişimi enzim derişiminden düşük ise substrat derişimi belli bir noktaya kadar arttırıldıkça reaksiyon hızı artmakta, substrat derişimi enzim derişimine eşit olunca reaksiyon hızı sabit kalmakta, substrat derişimi enzim derişimini geçince reaksiyon hızı düşmektedir. Hızın sabit kaldığı noktadaki derişime maddenin “doygunluk derişimi” denir. Fermentasyonda genellikle %12’lik şeker konsantrasyonunda çalışılır. Şeker konsantrasyonunun daha fazla olması, osmotik basıncın fazla olması nedeniyle, mayaya yavaşlatıcı etki hatta durdurucu etki yapar.

1.9.3. Havanın bileşimi

Oksijen mayanın normal olarak tomurcuklanıp çoğalabilmesi için gerekli enerjinin ortamdaki şekerlerden sağlanmasında gereklidir. Özellikle maya üretiminde verilen havanın iki önemli fonksiyonu vardır;

- Çözelti içerisindeki maya hareketini sağlamak,
- Karbohidratları parçalayarak gerekli olan enerjiyi sağlamak.



Fakat etil alkol üretiminde anaerobik şartlar istenir. Fermentasyon süresince karbondioksit açığa çıkacağından anaerobik şartlar sağlanmış olur.

Fermentasyon başladıktan sonra mayşenin hava ile temas etmesi sakıncalıdır. Çünkü bu sırada ortama giren oksijenin etkisiyle maya fermentasyon yapmak yerine, çoğalma eğiliminde olacak, bu da fermentasyon yan ürünlerini arttıracaktır.

Breisha çalışmasında oksijenin piruvik asit oluşumu sırasında eklenmesi gerektiğini belirtmiştir. Buna dayalı olarak fermentasyonun ilk 12 saatinde reaktör hacmine uygun hacimde oksijen eklemişler ve çalışma sonucunda 350 g/l sakkarozun tamamen tüketildiğini ve %16 etil alkol oluşumunu gözlemlemişlerdir (Breisha, 2010).

Havalandırılan ortamdaki şekerin fermentasyonu daha hızlı olmaktadır. Bunun nedeni, fazla hava ile meydana gelen ve fermentasyon olayına katılan maya miktarının artmasıdır. Maya miktarının artması, şekerin etil alkol üretimi yerine maya üretimine harcanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Sonuçta, daha çok havalandırılan ortamlardaki etil alkol verimi daha düşük olmaktadır.

1.9.4. Sıcaklık

Etil alkol fermentasyonu yapan mayaların faaliyet gösterdikleri optimum sıcaklık 30 °C'dir. Ortam sıcaklığının artması ile reaksiyon hızı da artar, bu artış en yüksek noktaya kadar devam eder sonra enzim zarar gördüğünden yavaş yavaş azalır.

Genellikle her 10 °C sıcaklık artışına karşılık reaksiyon hızı iki kat artar. Bu nedenle mayşe sabit sıcaklıkta tutulmaya çalışılır. Fermentasyon boyunca mayşenin sıcaklığı artacağından optimum sıcaklığı sağlamak için fermentör dışarıdan soğutulmalıdır (Üstün, 1997), (Prescott ve Dunn, 1959).

1.9.5. pH

Fermentasyon sıvısı pH'ının maya büyümesi, fermentasyon hızı ve ürün yapısı üzerinde etkisi vardır. Hidrojen iyonu derişimi enzimler üzerine etkilidir. Bazı enzimler asidik ortamda, bazıları nötr ortamda, bazıları ise bazik ortamda faaliyet gösterirler. Mayalar için genelde fermentasyon, pH 4,0-4,5 arasında gerçekleşir. pH genellikle sülfirik asit ile ayarlanır.

1.9.6. Maya konsantrasyonu

Maya derişimi arttıkça mayanın çoğalma hızı artar. Dolayısıyla enzim aktivitesi de artar. Substratın derişimi sabit olmak koşuluyla enzim derişimi arttırıldığı zaman reaksiyon hızı artmaktadır.

Fermentasyonda aşılana maya miktarı, kullanılan mayşeyi kısa sürede ve hızla fermente ederek tüm şekerini istenen süre içinde etil alkole dönüştürecek düzeyde olmalıdır. Düşük oranlı aşılamaalarda maya ortamdaki şekerini fermente edebilmek için önce yeterli miktarda çoğalmak zorundadır. Bu durumda fermentasyon yavaş seyreder dolayısıyla uzun sürer. Bu da kontaminasyonlara, şeker ve zaman kaybına neden olur (Üstün, 1997).

1.9.7. Alkol konsantrasyonu

Fermentasyon sırasında oluşan etil alkolün, maya üzerine yaptığı osmotik basınç önemli bir etkiye sahiptir. Çoğunlukla mayalar, etil alkol konsantrasyonu %11'in üzerine çıkınca fermentasyon faaliyetini yavaşlatırlar. Bu nedenle mayşe konsantrasyonu olgun mayşenin etil alkol miktarı %8-10 olacak şekilde ayarlanmalıdır (Üstün, 1997).

1.9.8. Besiyeri bileşimi

Etil alkol üretiminde kullanılan hammaddelerin maya besini bakımından yetersiz olduğu durumda maya fermentasyon sırasında yeterli besini bulamayacağı için hem başlangıç fermentasyonunda, hem de asıl fermentasyonda yeterince çoğalıp etkinlik kazanamaz ve fermentasyon aksar. Maya besini olarak en fazla azotlu ve fosforlu maddeler söz konusudur (Üstün, 1997).

1.9.9. Fermentasyon sıvısının hareketi

Etil alkol fermentasyonunda önemli diğeri bir etken karıştırma değildir. Karıştırma olmadığına miktarı artan maya, dibe çökmeye başlar. Bu çökme, fermentasyon hızı düşüp, CO₂ çıkıp azalmaya başladıktan sonra giderek arttığına daha az mayanın şekerle temas etmesine neden olur ve fermentasyon süresi uzar. Eğer fermentasyon sıvısı karıştırılıp, tüm mayanın sıvı içinde yüzmesi sağlanırsa, şeker daha fazla maya hücresi ile temasta olacağına fermentasyon daha hızlı gerçekleşir. Sürekli fermentasyon yöntemlerinin esasını bu sistem teşkil eder (Üstün, 1997).

Maya hareketi sisteme verilen hava ile de sağlanmaktadır. Böylece maya dağıtılmış ve mayaların ortamda bulunan kullanılmamış gıda maddeleri ile teması hem

kolaylaşmış olur. Bu şekilde iyi beslenen mayanın çoğalma hızı ve fermentasyon kabiliyeti artar.

1.9.10. Bakteri gelişiminin önlenmesi ve sterilizasyon

Sterilizasyon, mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan aletlerin, katı ve sıvı gıda ortamlarının, her çeşit zararlı mikroorganizmalardan temiz hale getirilme işlemidir. Sterilizasyon; yakma, buharlama, etüvde ısıtma veya ışınlama suretiyle gerçekleştirilir.

Ortamda sadece fermentasyonu gerçekleştirecek olan mikroorganizmanın olması gerekir. İstenmeyen mikroorganizmaların proses ortamına girmesini önlemek için fermentasyon sıvısının ve kullanılan malzemelerin önce sterilize edilmesi gerekmektedir.

1.10. Mayaların Gelişimi ve Fermentasyonunu Etkileyen Etmenler

1.10.1. Basınç

Osmotik basıncın maya üremesi üzerinde büyük etkisi vardır. Ortamdaki aşırı madde derişimi, osmatik basıncı artırarak hücrenin su kaybetmesine yol açar. Bunun sonucu olarak mayanın üremesi yavaşlar veya durur.

1.10.2. Radyoaktif ışınlar

Mayalar diğer organizmalar gibi radyoaktif ışınlardan etkilenirler. Enzimatik reaksiyonları yavaşlar ve aktivitelerini kaybederler.

1.10.3. Zaman

Zamanla enzim aktivitesinin düşmesi ile reaksiyon hızı düşer. Uzun süre çalışılan enzimlerin yenilenmesi gerekmektedir.

1.10.4. Kimyasal maddelerin etkileri

Maya üretimi veya fermentasyon esnasında ortama verilen bazı maddeler enzim aktivitesini arttırırlar bazıları ise enzim aktivitesini düşürürler.

- Aktivatörler: Enzim aktivitesini artıran maddelerdir.
- İnhibitörler: Enzim aktivitesini düşüren maddelerdir.

Aktivatörler; temas yüzey alanını artırarak substratı enzime karşı daha aktif yaparlar. Metal iyonları; Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , NH_4^+ vs. iyonları birer aktivatördür.

Melastan etil alkol üretiminde bu metal iyonlarının çoğunun olmasına karşılık enzim aktivitesini artırmak için Mg^{+2} , NH_4^+ , azot ve fosfor tuzları da ilave edilir.

Zehir etkisi yapan inhibitörler enzime bağlandığı zaman enzimin aktif merkezini şekil değişikliğine uğratarak substratın enzime bağlanmasını engellerler.

Bazen de oluşan ürün enzime inhibitör etkisi yapmaktadır. Civanın çözülmüş tuzları, bazı proteinler, etil alkol, eter, formaldehit gibi maddeler mayalara inhibitör etkisi gösterirler. Bunlar, mayalarda üremeye engel olarak ve fermentasyon kabiliyetini azaltarak etkili olurlar.

1.10.5. Su

Bütün organizmalar gibi mayanın da hücre gelişmesi ve gerekli hidrostatik ve osmotik basınçların düzenlenmesi açısından suya ihtiyacı vardır. Hücrede suyun bulunması gerekli olduğu gibi besin maddelerinin çözünmesi için de yeterli miktarda suyun bulunması gerekir. Çünkü besin maddeleri ancak suda çözülmüş bir halde hücre içine geçebilirler.

1.10.6. Metabolizma ürünleri

Fermentasyon boyunca çeşitli metabolizma ürünleri oluşur (organik asitler, etil alkol gibi). Oluşan laktik, asetik, propiyonik, valerik ve bütirik asitler ortamın pH değerini düşürerek maya gelişimi üzerinde zararlı etkilere neden olurlar. Oluşan ürünlerden biri olan etil alkolün osmotik basıncı da maya üzerinde etkilidir. Eğer fermente olmuş sıvıdaki etil alkol derişimi, tüm şeker tüketilmeden önce maya üzerinde olumsuz etki gösterecek seviyeye ulaşırsa kalan invert şeker tüketilemez.

Etil alkol mayalar için en önemli metabolizma ürünü olmakla birlikte mayaların gelişimine olan engelleyici özellik taşır. Köşker çalışmasında, maya çoğalmasının %2'lik etil alkol derişiminde yavaşladığını, etil alkol derişimi %10 olduğunda ise durduğunu gözlemlemiştir (Emre, 2007).

Saccharomyces cerevisiae mayası için ortamdaki etil alkol derişiminin etkisi Wilke tarafından incelenmiş ve yaklaşık 93 g/l etil alkol derişiminde maya üreme ve etil alkol üretim hızının sıfır olduğu bulunmuştur (Wilke, 1981). Diğer bir metabolizma ürünü olan karbondioksitin maya üzerindeki etkisi ise oldukça azdır.

1.10.7. Mayaların beslenmesi

Mikroorganizmaların gelişmesi, üremesi ve fizyolojik olarak görevlerini yapabilmeleri için gerekli gıda maddelerini içeren ortamlara ihtiyacı vardır. Bu ortamlara “besiyeri” denir. Besiyeri aşağıdaki maddeleri içermelidir:

- C, H, O elementlerini içeren karbonlu gıda maddeleri
- N elementini içeren azotlu gıda maddeleri
- P, K, S, Mg elementlerini içeren mineral maddeler
- Vitaminler
- Eser elementler

Ayrıca besi ortamı belli bir sıcaklıkta ve pH da, ortamın CO₂ ve O₂ içeriği de belli bir oranda olmalıdır.

1.10.7.1. Karbonlu gıda maddeleri

Karbonlu gıda maddeleri, mikroorganizmalar tarafından hem karbon hem de enerji kaynağı olarak kullanılır. Anaerobik mikroorganizmalar karbon kaynağının %10'unu, aerobik mikroorganizmalar ise karbon kaynağının %50–55'ini çoğalmak için kullanırlar. Karbon kaynağı olarak; melas, nişasta, selüloz, hidrokarbonlar kullanılır.

Ancak hidrokarbonların suda çok az çözünmeleri nedeniyle mikroorganizmaların yararlanması güç ve üreme hızları yavaş olmaktadır. Bunlar dışında çeşitli alkoller, asetatlar, yağlar ve hidrolizleri sonucu oluşan gliserin ile metabolizmaya katılan yağ asitleri, selüloz ve nişasta karbon kaynağı olarak kullanılabilirler.

1.10.7.2. Azotlu gıda maddeleri

Azot ve fosfat maya gelişimi ve maksimum verimde etil alkol üretimi için ana besin ihtiyaçlarıdır. Her ne kadar melas maya gelişimi için gerekli besinleri içerse de, genellikle maya gelişimi ve etil alkol üretimini geliştirmek için azot ve fosfat bileşikleri eklenir (Mukhtar ve diğ., 2010).

Maya performansının ve etil alkol toleransının fermentasyon ortamına vitamin ve azot kaynakları eklenerek artırılması ümit verici bir başarıdır. Asimile edilebilir azot içeriği fermentasyon hızında en fazla etkisi olan, fermentasyonun başında maya biyokütlesini ve fermentasyon boyunca da şeker taşınmasını etkileyen bir maddedir. Ayrıca protein sentezi, hücre duvar bileşikleri ve enzimlerin sentezi için gereklidir (URL-18).

Büyüme fazının sonunda azotun tükenmesine bağlı olarak protein sentezinde ve şeker taşıma aktivitesinde azalma görülür. Azot katkısı protein sentezi ve şeker taşınmasını hızlandırır bu da fermentasyon hızında bir artış ile sonuçlanır (Bely ve diğ.,1990), (Julien ve diğ., 2000).

Azotlu besiyeri maddeleri de, karbohidratlar gibi suda çözünüp hücre duvarından geçerek kolayca hücre içerisine girebilmelidir. Azot kaynağı olarak kullanılan maddeler: üre, NH_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dır.

Mayanın, bünyesinde bulunan proteinleri yapabilmesi için en iyi azot kaynağı olarak amonyum tuzları kullanılır. Fakat nitratlar azot kaynağı olarak genellikle kullanılmazlar. Amonyak azotunun maya hücresi tarafından kolayca sindirebilmesi için ortamda az miktarda azotlu organik maddelerin bulunması gerekir. Bu tuzlar anorganik azotun sindirilmesinde katalitik etki yapmaktadırlar.

Doğal azot kaynağı olarak; soya fasülyesi, balık unu, peynir altı suyu, süt kullanılır. Arı ve Dönmez çalışmalarında soya ununun farklı konsantrasyonlarını *S.cerevisiae* türünün bazı suşları üzerinde denemişlerdir. Etil alkol konsantrasyonu ve şeker tüketim oranına etkilerini incelediklerinde %9'luk konsantrasyon tüm suşları olumlu etkilemiş maya sayısında artışa neden olmuş ancak %12'lik konsantrasyon bazı

suşlarda fermentasyonu kısaltmış ve daha düşük oranda etil alkol oluşumuna neden olmuştur (Arı ve Dönmez, 2000).

Bajpai ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda fermentasyon ortamına ilave edilen %2 soya ile 30°C'de 3. günde 275 g/l sakkaroz kullanarak %14 etil alkol elde edilebilirken soyasız koşulda 48 saatlik fermentasyon süresi sonunda 155 g/l sakkaroz tüketilerek %8 etil alkol elde edildiğini bildirmişlerdir (Bajpai ve diğ., 1988).

K (potasyum), Mg (magnezyum), P (fosfor) azot kullanımını kolaylaştırıcı olarak kullanılırlar. Gelişen maya tarafından alınan azotlu maddelerin bir kısmı proteine dönüşür, diğer kısmı ise azot değişiminin bir ürünü olarak Leuzin, izoleuzin, Triozin gibi maddeler halinde hücreden dışarı atılırlar. İhtiyaç duyulması halinde ise tekrar maya tarafından alınabilirler.

1.10.7.3. Mineral maddeler

Diğer organizmalarda olduğu gibi maya fizyolojisinde de minerallerin rolü büyüktür. Son yıllarda çeşitli mineral katkılarıyla fermentasyon performansının artırılmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır.

Mineral maddelerin büyük kısmı enzim aktivatörü olarak görev yapar ya da enzim ve ya hücre yapısına katılırlar. Bunların başında K, S, P, Mg, Ca, Fe gibi elementler ile; Zn, Cu, Co, Mn ve Mo gibi iz elementler gelir. Fosfor, nükleotit ve nükleik asitlerin temel yapısına katılır. Potasyum, protein sentezinde görevli enzimlerin aktivatörüdür (Okur, 2003). Minerallerin maya metabolizmasındaki görevleri;

- Bazı glikolitik enzimlerin kofaktörleri,
- ATP az aktivitesini artırma ve maya hücre zarından bileşikleri pompalama,
- Etil alkole ve sıcaklığa karşı toleransı artırma,
- Ağır metallerin zehirliliğine karşı zıt etki,
- Hücresel büyümenin düzenlenmesi,
- Etil alkol ve esterlerin yapısının düzenlenmesidir.

Protein oluşumunda ve enzim aktivitesinin artırılmasında maya K, Ca, Mg, Na ve PO₄'a ihtiyaç duymaktadır. Bu maddeleri içermeyen ortamlarda mayanın normal

şekilde üremediği ve fermentasyon olayının meydana gelmediği görülmüştür. Magnezyum, hücre metabolizması ve gelişimi için gerekli metal iyonlarından biridir. Hücreyi, ısısız şok, osmotik basınç ve etil alkol toksitesine karşı korur (Walker, 1998). Maya metabolizması ve büyümesi için çinko ve potasyum kadar önemlidir. Sınırlı magnezyum maya gelişiminin ve fermentasyon aktivitesinin azalmasına neden olur (Dombek ve Ingram, 1986).

Kunkee ve Bisson tarafından yapılan çalışmada maya içinde canlılığın yapılandırılması için gerekli magnezyum iyonu optimum konsantrasyonu 5 mg/l olarak belirlenmiştir (Kunkee ve Bisson, 1993).

Sadece magnezyumun tek başına etkisinin yanında magnezyum kalsiyum oranı da önemlidir. Eğer gelişme ortamında magnezyuma göre aşırı miktarda kalsiyum olursa, magnezyumun hücre plazmasına transferi yavaşlar (Walker, 1998). Dolayısıyla hücre gelişimi ve iyi bir fermentasyon için magnezyum kalsiyum oranının yüksek olması gereklidir. Magnezyumun da yüksek derişimlerinde hücre solunumu olumsuz yönde etkilenmektedir.

Sodyum da maya için gereklidir ancak ortamda yüksek derişimde bulunduğunda, hücre yapısı, enzim aktivitesi dolayısıyla glikoliz evresi zarar görür.

Sodyum, potasyumla hücre içine alınması için yarışır ve potasyumun hücre tarafından alınmasını engeller ve yararlı etkilerini inhibe eder.

Garcia ve arkadaşları yaptıkları çalışmanın bir bölümünde, *S. cerevisiae* ve *C. tropicalis* mikroorganizmalarının, ortamdaki Na⁺ ve K⁺ iyonlarını bünyelerine almaları ve bu iyonların mikroorganizma gelişimi üzerindeki etkileri üzerinde durmuşlardır. Mikroorganizmanın gelişiminin, adsorplanan Na/K oranının artmasıyla zarar gördüğü belirlenmiştir (Garcia ve diğ.,1997).

Çinko mayanın fermentasyon performansı için gerekli metal iyonlarından biridir.

Hücre metabolizmasında, ribofilavin ve protein sentezinde katalitik kofaktör olarak çalışır. Ayrıca çinko, hücre zarı dışında serbest halde bulunan şeker moleküllerinin, zar içinde kimyasal reaksiyonla fosfatlanarak içeri alınmasını kolaylaştırır. Çinkonun

besi ortamında yüksek derişimlerde bulunması, potasyumun hücre zarından geçişini olumsuz yönde etkileyeceğinden hücre gelişimi ve fermentasyon üzerinde zehirleyici etki göstermiştir (Kreder, 1999).

Kudo ve arkadaşları, potasyumun hidrojen iyonlarına oranının maya gelişimi ya da maksimum hücre biyokütlesi oranını etkilemediğini göstermişler, ancak özellikle düşük pH da potasyum eksikliğinin hücre canlılığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu ve fermentasyonun duraklamasına yol açabileceğini belirtmişlerdir (Kudo ve diğ., 1998).

1.10.7.4. Vitaminler

Biotin, tiamin ve pantotenik asit başta olmak üzere vitaminler, maya hücresi içinde gerçekleşen karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarını desteklemek ve hücre zarını korumak gibi özelliklerinden dolayı gerekli maddelerdir.

Alfenore ve arkadaşlarının çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile biyoetil alkol üretiminin yüksek bir seviyeye ve verimliliğe ulaştırılmasının etil alkol fermentasyonu prosesinde aşılması gereken bir engel olduğu belirtilmiştir. Beslenme stratejisi ile *S. cerevisiae*'in, 30 °C'de beslemeli kesikli kültürde 45 saat içinde %19 (v/v) oranında etil alkol üretimi açıklanmaktadır. Bu performans, fermentasyon süreci boyunca vitamin ilavesi yapılarak elde edilmiştir (Alfenore ve diğ., 2002).

Breisha çalışmasının bir bölümünde %30'luk sakkaroz ile fermentasyon ortamında 0,2 g/l tiamin ilavesinin etkisini araştırmıştır. Tiamin, %30 sakkaroz ile 48. saatte %12 etil alkol konsantrasyonu ile %74 teorik verime ulaştırmış, fermentasyon verimliliğini arttırmıştır. Tiamin maya canlılığı ve şeker tüketimini de arttırmıştır. Daha yüksek konsantrasyonda tiamin ilavesi (0,3 g/l) maya gelişimi ve şeker tüketiminde pozitif etkili iken etil alkol üretiminde beklenmeyen bir negatif etki vermiştir. 200 mg/l üzerindeki konsantrasyonun maya hücrelerinin gelişimini arttırmasına rağmen, prosesin yavaşlamasına neden olmuştur (Breisha, 2010).

1.10.7.5. Eser elementler

Besi ortamına ilave edilen eser elementler, mikroorganizmaların gereksinimlerine göre üç gruba ayrılırlar:

- Mutlak olarak gerekli elementler: Ca, Mn, Fe, Co, Cu, ve Zn'dur.
- Daha az gerekli elementler: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Ma, Sn ve I'dur.
- Çok ender gerekli elementler de Be, F, Sc, Ti, Ga, Ge, Br, Zr ve W'dur.

Bu elementlerin mikroorganizmalara göre gereksinim oranları değişir (Soyuduru, 2007).

1.11. Fermentasyon Ortamına Eklenen Maddelerin Etil Alkol Üretimine Etkileri

Biyokimyasal yollarla etil alkol üretiminde etkili mikrobiyal işlemler ve yüksek ürün derişimlerinin sağlanmasında, uygun mayanın, reaktör sisteminin ve fermentasyon ortamının seçimi önemli faktörlerdir.

Literatürde çeşitli mikroorganizmalarla fermentasyon yoluyla etil alkol üretiminde, substratları saflaştırmak ve etil alkol üretimini arttırmak amacıyla fermentasyon ortamlarına maddeler eklenmiştir. Bu maddelerden biri, iyon değişim, adsorplama ve katalitik özelliklerinden dolayı, substrat içinde bulunan ve mikroorganizmalar için zehirleyici etkisi olan eser elementlerin zararlı etkilerini azaltabilen zeolitlerdir. Killer de adsorplama ve iyon değiştirme gibi özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Etil alkol üretimini arttırmak için ortama konan maddelerden bir diğeri de vitaminlerdir. Biotin, tiamin ve pantotenik asit başta olmak üzere vitaminler, maya hücresi içinde gerçekleşen karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarını desteklemek ve hücre zarını korumak gibi özelliklerinden dolayı gerekli maddelerdir (URL-19).

Alfenore ve arkadaşları, *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile glikozlu ortamda, hazırladıkları vitamin karışımının (pantotenik asit + nikotinik asit + inositol + tiamin + biyotin + para-aminobenzoik asit) değişen derişimlerinin etil alkol üretimine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda vitamin karışımının artan derişimlerinden en fazla 9,5 g/L etil alkol miktarına ulaşılmıştır (Alfenore ve diğ., 2002).

1.11.1. Maya fermentasyonunda en çok kullanılan besinler

1.11.1.1. Tampon maddeler

Mikroorganizmalar genellikle nötr ve nötre yakın pH' larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH' ları (örneğin *Rhizobium* bakterileri), bazıları (örneğin mayalar, küfler, asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler.

Asitlik/alkalilik, besiyerlerine selektivite kazandırmak amacıyla, kolay ve dolayısıyla yaygın olarak kullanılan bir faktördür. Örneğin maya ve küflerin, asidofilik bakterilerin geliştirileceği ortamlarda pH düşürülerek pek çok bakterinin gelişmesi baskılanır.

Metabolizmaya bağlı olarak besiyeri pH'sında değişimler meydana gelir. Genellikle inkübasyon sırasında pH değişimi, geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vereceği için istenmez. pH değişimini minimumda tutmak için besiyerine çeşitli tampon maddeler ilave edilir.

Büyük ölçekli endüstriyel üretimlerde pH stabilitesi tampon eklenerek değil, belirli pH aralığında tutmak üzere 'pH-stat' denilen sistemlerle dışarıdan asit ya da baz ilavesi ile yapılır. Tampon olarak en çok kullanılan maddeler; fosfatlar, karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır (URL-19).

1.11.1.2. KH_2PO_4

Tamamen suda çözünebilir, katı tuz formundadır. P ve K besin elementlerini içeren KH_2PO_4 en çok tercih edilen besin kaynağıdır. Klor, sodyum ve ağır metaller içermez. KH_2PO_4 çözeltisinin pH değeri $4,5 \pm 0,3$ tür ve tamponlayıcı etkisi vardır.

1.11.1.3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Magnezyum, glikoliz aşamasında 300'den fazla enzimin sentezinde rol oynar. Bazı enzimlerin aktivasyonunda önemlidir ve etil alkol üretimindeki merkezi rolü zar yapısını kararlı hale getirmesidir. Hücre zarındaki H^+ - ATP aktivitesini hızlandırır (Walker, 1998).

1.11.1.4. Biotin

B grubu vitaminlerden B7 vitamindir. Vitamin H, Koenzim R, biyotin ve Biopeiderm olarak da isimlendirilir. Yaygın olarak kullanılan ismi biotin ya da saç ve tırnak vitamindir (URL-20).

1.11.1.5. Maya ekstraktı (Yeast ekstrakt)

Sitoplazmadan ayrılmış hücre duvarı maya ekstraktı olarak adlandırılmaktadır. Hücre duvarının tamamına yakını glukan, mannan, oligosakkaritler gibi karbohidratlardan oluşmaktadır. Maya ekstraktı, proteolitik olarak parçalanmış ekmek mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Hücre kültürleri ve bakteriyel büyüme için hazırlanmış, bakteriyolojik kullanım için standart hale gelmiş mükemmel bir uyarıcıdır.

Özellikle, yüksek B kompleks vitamini içeriği sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar. Yapısında suda çözünen N'lu maddeler, maltoz, glikojen, pentozlar vb karbohidratlar, B grubu vitaminleri, K, PO₄ vb tuzlar, organik asitler bulunur. Besiyerlerine %0,5–1 oranında katılarak ortam zenginleştirilir. Maya ve küflerin geliştirilmesi için de uygun besiyeridir (URL-21). Tablo 1.7'de yeast ekstraktın özellikleri verilmiştir.

Tablo 1.7. Yeast ekstrakt özellikleri (URL-21)

Parametreler	Bileşim (%)
Toplam Protein	62,5-73,8
Toplam Azot	10,0-11,8
Amino Azot	4,5-5,8
Kül (Klorür hariç)	11,5-16,0
Sodyum Klorür	0,5
pH (%2 çözelti)	6,8-7,2
Nem	< 6,0

1.11.1.6. NH₄ tuzu

Mayalar için en önemli azot kaynaklarından biridir. Maya hücrelerinin protein sentezinde önemlidirler.

Taillandier ve arkadaşlarının çalışmasında azot katkısının şeker seviyesi ile orantılı olması gerektiği ve artan şeker düzeyi ile azot düzeyinde paralel artışın gerekliliği bildirilmiştir. Bu kritere göre azot konsantrasyonunun optimize edilmesi gerektiği açıklanmıştır (Taillandier ve diğ., 2007).

Breisha, tüketilen şekere göre hesaplayarak ekledikleri 1 g sakkaroz için 5 mg azot oranının, çalışmasındaki en iyi sonuçları verdiğini bildirmiştir. Yüksek şeker konsantrasyonlarının fermentasyonu için bu oranın sabit olması önerilmiştir. %25 sakkarozun (250 g/l) fermentasyonu için ortama doğru oranda eklenen amonyum sülfat seviyesi 1250 mg/l'dir. Bu miktardaki amonyum sülfatın üretim ortamına ilavesinden sonra %25 sakkarozun fermentasyonu, sakkarozun tamamen tüketimi ile sonuçlanmış ve %11,5 etil alkol üretilmiştir. Maya hücreleri büyük oranda aktif ve maksimum sayıya ulaşılmıştır. %30 sakkaroz ile azotu denenmiş ve %10,2 etil alkol üretilmiştir. Ancak, önemli miktarda sakkaroz (56 g/l) fermente olmadan kalmıştır. Bunun, vitaminler gibi diğer besin faktörlerindeki bir eksiklik nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Breisha, 2010).

Thomas ve arkadaşları tarafından azotun, fosfofruktokinaz (fermentasyon yolunun bir anahtar düzenleyici enzim) sentezindeki düşüşü önlediği rapor edilmiştir (Thomas ve diğ., 1996).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Laboratuvar

Bu araştırma, Kocaeli Üniversitesi, Köseköy Meslek Yüksekokulu, Fermentasyon Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

2.2. Mikroorganizma ve Hazırlanışı

Mikroorganizma olarak *Saccharomyces cerevisiae* türü kullanılmıştır. Pakmaya ticari kuru ekmek mayası aynı üretim tarihli ve bir sene raf ömrü olan 100 g'lık paketler halinde piyasadan temin edilmiştir. Aynı gün içinde yapılacak bir çalışma için bir paket maya açılıp kullanılmıştır. Bu şekilde aynı paketten alınan granüllerdeki maya hücrelerinin aktifliği açısından eşitlik sağlanmaya çalışılmıştır.

2.3. Kullanılan Alet ve Ekipman

- Elektro-mag marka su banyosu
- İmolab pH metre
- ARE manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı
- Elektro-mag M16 vorteks
- UV mini 1240 Shimadzu spektrometre
- Elektro-mag M420B inkübatör
- Etüv Elektro-mag M5040 sterilizatör
- Denver hassas terazi
- Sigma 3-16 K soğutuculu santrifüj
- SX 6540 Vestel elektronik buzdolabı
- Etil alkol distilasyon düzeneği
- ISOlav otoklav şişeleri, deney tüpleri, mikropipetler, cam pipetler, puar, balon jojeler, mezürler, erlenler, beherler vb. laboratuvar malzemeleri.

2.4. Ön Deneyleer ile Uygun Fermentasyon Ortamının Belirlenmesi

Sterilize edilmiş 500 ml' lik şişe içerisine 10 g/l maya olacak şekilde steril spatül ile Denver marka hassas terazide 3 g kuru maya tartılarak bir miktar distile su içinde çözünməsi sağlanmıştır. Diğer taraftan da 100 g/l sakkaroz olmak üzere 30 gr sakkaroz terazide tartılıp bir miktar distile su içinde çözülmüş sonra şişeye eklenerek distile su ile 300 ml'ye tamamlanmıştır. Seri bir şekilde şeker katılmadan ve şeker eklendikten sonra İnoLab marka pH metre ile pH değerleri ölçülmüştür. 30 °C' ye ayarlanan Elektro-mag marka su banyosuna yerleştirilip 10 dakika aralıkla pH ölçümleri yapılmıştır. pH değerlerindeki değişimleri kaydedilerek mayanın aktivitesi izlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda fermentasyon işlemi için kullanılacak maya miktarı, kalan invert şeker konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve numune alma süreleri hakkında bilgi edinilmesini sağlanmıştır.

2.5. Üreme Ortamının Hazırlanışı

Ön deneyleerde alınan sonuçlara göre 30 °C maya aktivitesi için çok uygun bir sıcaklık olduğundan fermentasyon ortamının pH değeri hızlı bir şekilde düşmüş, şeker tüketimi çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Çalışmada numune alımları sırasında oluşacak zaman farkı bile invert şeker ve etil alkol analizleri sırasında ciddi farklılara ve hatalara neden olabileceğinden hem fermentasyonu yavaşlatmak hem de pratikte kullanımı için ortam sıcaklığı, oda sıcaklığı olan 25 ± 1 °C olarak seçilmiştir. Bu şekilde pH, şeker tüketimi ve etil alkol üretiminin daha kontrollü bir şekilde izleneceği düşünölmüştür. Maya aktivitesinin neticesi olan pH değerlerindeki değişim göz önünde tutularak numune alım süreleri ise; 6., 24., ve 48. saat olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak maya miktarı 0,1 g/l, sakkaroz miktarı 200 g/l olacak şekilde Denver hassas terazi ile tartılıp ayrı steril beherlerde çözündürölen maya ve şeker çözeltileri 4 şişe içerisine aktarılmış ve distile su ile 300 ml hacime seyreltilmiştir. 25 ± 1 °C'ye ayarlanan su banyosunda fermentasyona bırakılan fermentasyon şişeleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Su banyosundaki fermentasyon şişeleri

2.6. Farklı Besin Konsantrasyonlarının Denenmesi

0,1 g/l maya, 200 g/l sakkaroz ve 0,3 g/l yeast ekstrakt olacak şekilde 300 ml hacime karşılık gelen miktarları hesaplanarak hassas terazide tartımları yapılmıştır. 4 ayrı şişeye, kuru maya konulup bir miktar distile su ile çözülürken diğer taraftan yeast ekstrakt ve bir miktar su içinde çözülmüş sakkaroz eklenmiştir. Hacim distile su ile 300 ml'ye seyreltilerek 25 ± 1 °C'ye ayarlanan su banyosunda fermentasyona bırakılmışlardır. 6., 24. ve 48. saatlerde pH değerleri ölçülmüş ve aynı anda steril cam pipetlerle 22'şer ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler soğutuculu santrifüjde 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Şekil 2.2'de santrifüj işlemi gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Alınan numunelerin santrifüj işlemi

Santrifüj sonucunda çökelti atılıp, üst sıvıdan invert şeker analizi için 1 ml ve etil alkol analizi için de 20 ml ayrılmıştır.

Etil alkol analizinde kullanılacak olan numune tüplerinin ağızları parafilm ile kapatılarak buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Aşağıdaki Tablo 2.1’de çalışmada kullanılan diğer besinlerin konsantrasyonları verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan besin konsantrasyonları

Besinler	Konsantrasyonlar (g/l)		
Yeast ekstrakt	0,3	1,5	3
KH ₂ PO ₄	0,5	1	1,5
MgSO ₄	0,5	1	1,5
Biotin	0,1	0,3	0,5

2.7. Analizler

2.7.1. İvert şeker analizi

İvert şeker; bazik çözeltide aldehit veya keton oluşturan bir şeker tipidir. Bu tür şekerler, Maillard reaksiyonu veya Benedict reaksiyonunda indirgeyici olarak davranırlar. Fruktoz, glikoz, laktoz, galaktoz arabinoz, ve maltoz bu gruba dahildir. Keton grubu olan monosakkaritler; ketoz, aldehit grubu bulunduranlar; aldoz olarak adlandırılırlar. Sükroz indirgen bir şeker değildir.

Benedict ayırıcı ile indirgen bir şekerin varlığında karışım yeşil veya turuncu veya kırmızı olur. Fehling çözeltisi de aynı amaçla kullanılabilir çünkü her iki ayıraçta da bulunan bakır (II) iyonları ısıtıldıklarında indirgenip turuncu renkli bakır (I) oksit çökeleği oluştururlar.

Çalışmada invert şekerlerin kantitatif olarak belirlenmesi için Nelson-Somogy metodu kullanılmıştır (Somogy, 1952).

2.7.1.1. Malzemeler

Nelson A Reaktifi: 2,5 gr Na_2CO_3 , 25 gr NaK-tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), 20 gr NaHCO_3 ve 200 gr Na_2SO_4 1000 ml'lik balon içerisine tartılarak, 700 ml distile suda çözülüp hacime tamamlanmıştır. Bu çözelti doygun bir çözelti olduğundan kristallenebilir. Böyle durumda 30 °C'lik su banyosunda çözülür.

Nelson B Reaktifi: 15 gr $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 ml lik balon içerisine alınmış ve saf su ilave edilerek 100 ml hacime seyreltilmiş, içerisine 1-2 damla derişik H_2SO_4 ilave edilmiştir.

Nelson Reaktifi: 25 ml Nelson A + 1 ml Nelson B karıştırılmıştır. Kullanılacağı zaman günlük olarak hazırlanmıştır. Bir numune için 1 ml kullanıldığından gerekli miktarda hazırlanmasına dikkat edilmiştir.

Arsenomolibdat Reaktifi;

- 25 gr Amonyum molibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 450 ml suda çözülüş ve üzerine 21 ml derişik H_2SO_4 eklenmiştir.
- 3 gr Sodyum arsenat (NaH_2AsO_4) 25 ml saf suda çözülmüştür.

Bu iki çözelti karıştırılıp, koyu renkli bir şişeye konulmuş ve 37 °C de 24-48 saat bekletilmiştir. Hazırlanan çözelti 1 sene dayanıklıdır. Çözelti rengi yeşile dönüştüğünde kullanılmamalıdır.

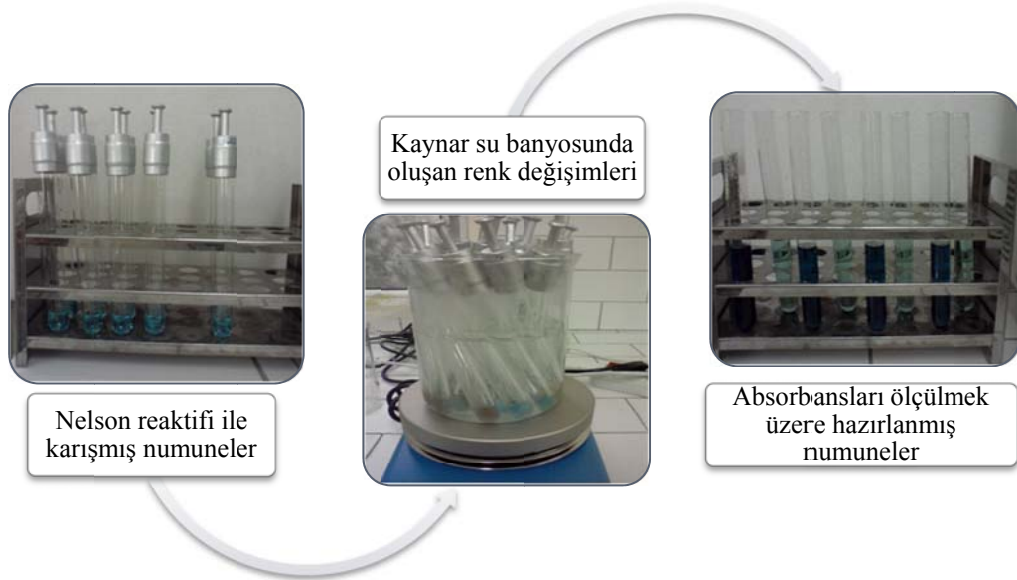
2.7.1.2. Standart eğri hazırlanması

Stok A çözeltisi 0,5 gr glikoz ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) ve 0,5 gr fruktoz ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) tartılıp distile su ile 100 ml'ye seyreltilmiştir.

Standart eğri çalışmasında stok A çözeltisinden 1 ml alınıp distile suyla 100 ml'ye seyreltilmiştir. Bu çözeltinin 0,1 ml'sinde 10 µg glikoz + fruktoz vardır. Standart eğri hazırlanması için, 0-100 µg/ml lik konsantrasyonlarda hazırlanan standartların 540 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüş, standart eğri grafiği çizilerek eğim formülü hesaplanmıştır.

2.7.1.3. Deneyin yapılışı

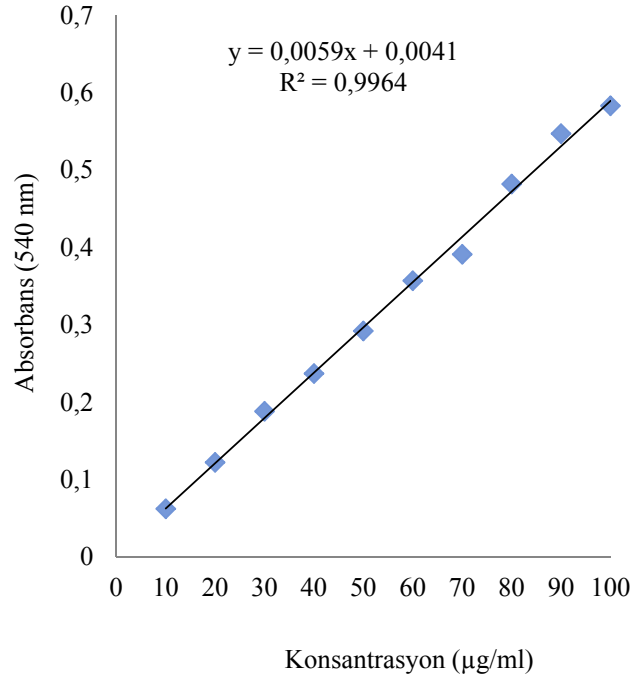
Fermentasyon ortamından alınıp santrifüj edilerek mayası ayrılmış örneklerden steril mikropipetleriyle 1'er ml alınarak paralel olarak hazırlanmış 2 deney tüpüne konulmuştur. 2 paralele ise 1'er ml distile su konularak blank olarak hazırlanmıştır. Şeker yoğunluğunu düşürmek ve okunabilmesini sağlamak için örnekler 10^{-3} veya 10^{-4} 'e kadar seyreltme yapılmış ve 1 ml Nelson reaktifi ilave edilip karıştırılmıştır. Başlangıçta şeffaf renkteki örnekler, Nelson reaktifi ile karışınca mavi renk almıştır. Kaynar su banyosunda 20 dk tutulmuş ve süre sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve 1 ml arsenomolibdat eklenip tekrar karıştırılmıştır. En son 7 ml distile su ilave edilerek Elektro-mag M16 ile vortekslenmiştir. Şekil 2.3'te bahsedilen renk değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 2.3. İvert şeker analizinde renk değişimi

Numunelerin absorbansları, 540 nm'de UV mini 1240 SHIMADZU spektrofotometrede ölçülmüştür. Glikoz + Fruktoz değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Glikoz + Fruktoz} = \frac{(\text{Absorbans-Blank}-0,0014)}{0,06107} \quad (2.1)$$



Şekil 2.4. İvert şeker standart eğrisi

2.7.2. Fermentasyon ortamında etil alkol analizi

Çalışmada fermentasyon ortamındaki etil alkol miktarını belirlemek için spektrofotometrik metod uygulanmıştır (Bennett, 1971).

2.7.2.1. Kimyasal maddeler

- H₂SO₄ (Sülfürik Asit): %96
- K₂Cr₂O₇ (Potasyum Bikromat): 0,15 M Bikromat çözeltisi hazırlamak için 44,1 g K₂Cr₂O₇ tartılarak distile su ile 1 litre hacime seyreltilmiştir.
- C₂H₅OH (Etil Alkol): %99,5 (% v)

2.7.2.2. Etil alkol standartlarının hazırlanması

Etil alkol stok çözeltisi: %99,5'lik alkolden %5'lik etil alkol stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 5,025 ml %99,5'lik etil alkol çözeltisi alınarak hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Etil alkol standart çözeltileri: %5'lik alkol stok çözeltilisinden %0,01-2 (% v) derişim aralığında standart etil alkol çözeltileri hazırlanmıştır.

Örneğin %0,1 etil alkol standardı için %5'lik etil alkol çözeltisinden 0,4 ml alınarak hacmi 20 ml'ye distile su ile seyreltilmiştir.

2.7.2.3. Deneyin yapılışı

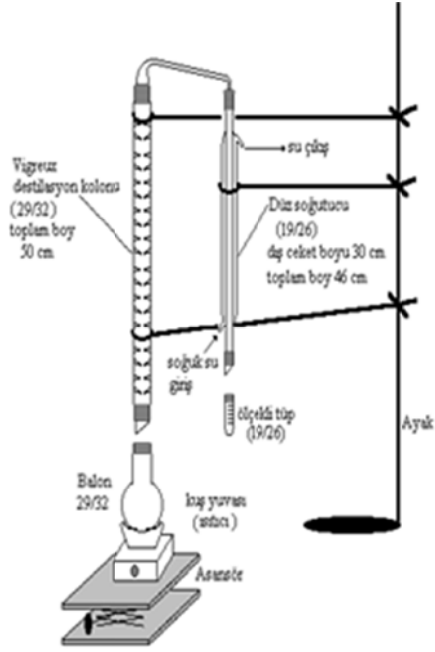
Deney tüplerine 2'şer ml H_2SO_4 ve $K_2Cr_2O_7$ çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve soğutulmuştur. En son olarak tüplere hazırlanan standart çözeltilerden 1'er ml pipetlenerek karıştırılmıştır. Blank için 1 ml distile su alınmıştır. Blank ve tüm çözeltilerin absorbansları, 600 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede blank numuneye karşı okunmuştur.

Blankın absorbans değeri numunelerin absorbans değerlerinden çıkarılarak bulunan absorbans değerlerine karşı grafik çizilmiştir. Bu grafik sadece %0-2 derişim aralığında kullanılabilir. Ayrıca %0,1-5 derişim aralığında yukarıdaki işlemler yapılarak hazırlanan çözeltilerin üzerlerine sıvı parafin eklenerek karanlıkta saklanıp, numune derişimlerinin renk farkı yoluyla belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak bu çözeltilerin her hafta taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

2.7.2.4. Mayşe numunelerinde etil alkol analizi

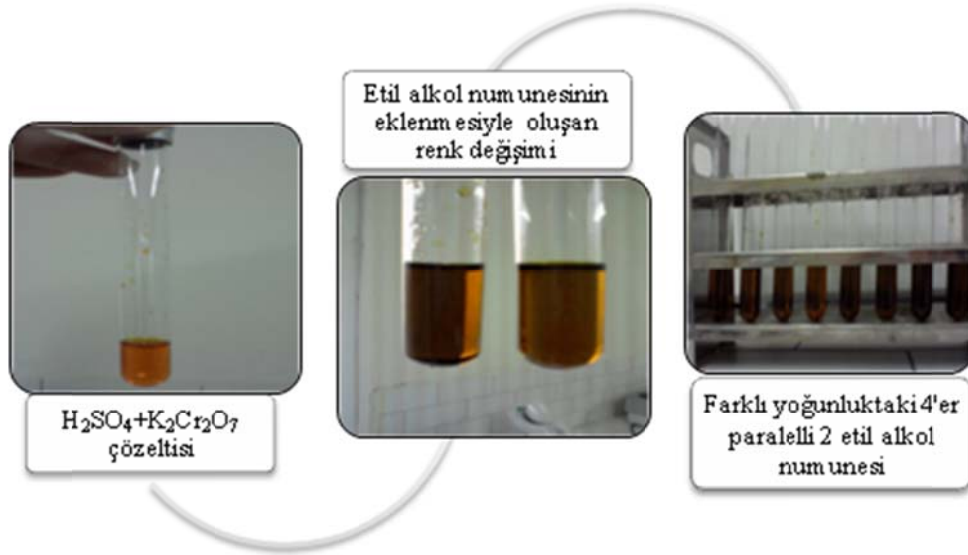
Fermentasyon ortamından alınan numune Sigma 3-16 K soğutmalı santrifüjde 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, 20 ml üst sıvı alınmış ve distilasyon düzeneğinde kullanılan balon joje içerisine konulmuştur.

Bu çözelti, Şekil 2.5'teki düzenekte etil alkolün buharlaşma sıcaklığı olan yaklaşık 78 °C'de 4 ml destilat toplanana kadar distile edilmiştir. Toplanan alkol çözeltisi orjinal hacmi olan 20 ml'ye distile su ile seyreltilmiştir.



Şekil 2.5. Etil alkol distilasyon düzeneği

Deney tüpüne 2 ml H_2SO_4 ve 2 ml $K_2Cr_2O_7$ pipetlenerek iyice karıştırılmış ve soğutulmuştur (Şekil 2.6).



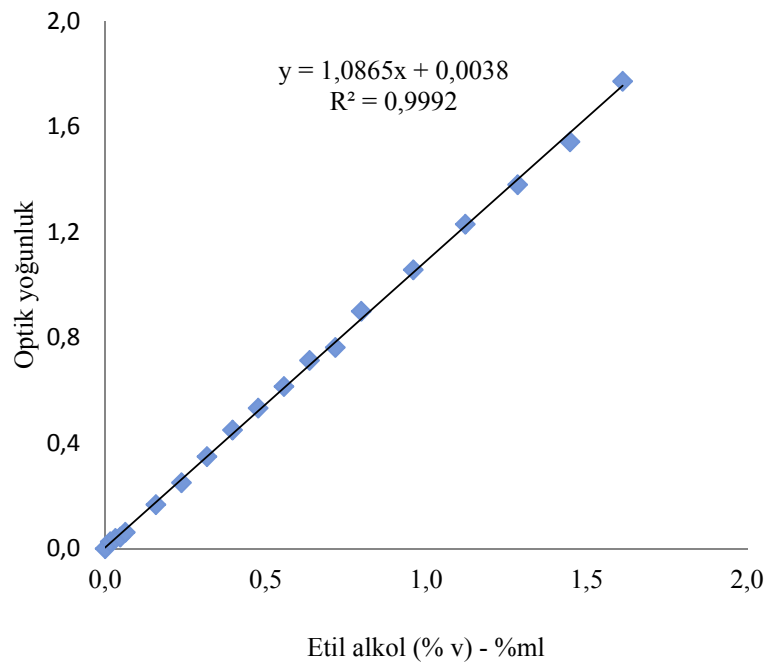
Şekil 2.6. Etil alkol analizinde renk değişimi

En son olarak tüpe numunedan 1 ml pipetlenerek karıştırılmış ve vortekslelendikten sonra 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değeri UV mini 1240 SHIMADZU spektrofotometrede okunmuştur.

Blank olarak H₂SO₄ + K₂Cr₂O₇ çözeltisi kullanılmıştır. Okunan optik yoğunluk değerinden blankın suya karşı optik yoğunluğu çıkarılmıştır. Şekil 2.7'deki etil alkol kalibrasyon grafiğinin eğim formülünde yerine konularak % v cinsinden karşılık gelen etil alkol derişimi hesaplanmıştır.

Standart grafiğın eğim formülü;

$$\% \text{ Etil alkol (\%v)} = \frac{\text{Optik yoğunluk} - 0,0002}{0,8742} \quad (2.2)$$



Şekil 2.7. Etil alkol kalibrasyon grafiği

2.8. Değişen Maya Miktarının Etkisinin Belirlenmesi

100 mg/l maya ile 200 g/l sakkaroz olacak şekilde hazırlanan 4 paralel fermentasyon ortamından 6, 24, ve 48. saatlerde örnek alınarak Nelson metoduyla ortamda kalan invert şeker miktarları tayin edilmiştir. Aynı çalışma 200 mg/l, 300 mg/l ve 500 mg /l maya miktarları için de yapılarak maya miktarının şeker kullanımına etkisi araştırılmıştır.

2.9. Uygun Konsantrasyonları Seçilen Besinlerle Fermentasyon

Yapılan ön çalışmalar ile çalışmada kullanılacak maya miktarının 500 mg/l olması uygun görülmüştür. Besin maddelerinin ise şeker kullanımı ve pH değişimine etkileri incelenerek konsantrasyonları belirlenmiş ve aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.2. Besinlerin seçilen konsantrasyonları

Kullanılan Besinler	Miktar (g/l)
Yeast ekstrakt	3,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄	1,5
Biotin	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1 g şeker için 5 mg)	5,0

Diğer taraftan besin ilavesi olmadan sadece 500 mg/l maya ve 50, 100, 150, 200 g/l sakkaroz konsantrasyonları için ayrı ayrı denenerek kontrol grup çalışmaları da 4 paralel halinde yapılmıştır. Kontrol grup numunelerine de 6, 24 ve 48. saatlerde pH ölçümü yapılmıştır. Her örnekte kalan invert şeker ve etil alkol analizleri yapılmıştır. Böylece kullandığımız besinlerin etkisini karşılaştırabileceğimiz veriler de elde edilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise 500 mg/l maya ve 150 g/l sakkaroz ile hazırlanan fermentasyon ortamında 5 g/l yeast ekstraktın tek başına etkisi araştırılmıştır.

2.9.1. Besin ilavesinin şeker kullanımına etkisinin belirlenmesi

Kuru mayanın etil alkol üretiminde, besin ilavesinin, şeker miktarındaki değişime olan etkisini belirlemek için yukarıdaki besin karışımıyla (Tablo 2.2) öncelikle 500 mg/l kuru maya olacak şekilde 50 g/l sakkaroz fermentasyona bırakılmıştır (NH₄ tuzu miktarları şeker miktarına göre hesaplanarak ortama ilave edilmiştir). Daha sonra 100, 150 ve 200 g/l sakkaroz miktarları denenerek belirli zaman aralıklarında 4 paralelden de 22'şer ml steril cam pipetlerle alınarak 7000 rpm'de 10 dk santrifüje bırakılmıştır. Üst sıvıdan 1 ml invert şeker analizi için, 20 ml ise etil alkol analizinde kullanılmak üzere steril tüplere alınmıştır.

2.9.2. Besin ilavesinin etil alkol üretimine etkisinin belirlenmesi

Besin ilavesinin kuru mayanın etil alkol üretimine etkisini belirlemek için 500 mg/l kuru maya olacak şekilde yukarıdaki besin karışımıyla birlikte, sırasıyla 50, 100, 150, ve 200 g/l sakkaroz kullanılmıştır (NH₄ tuzu miktarları şeker miktarına göre hesaplanarak ortama ilave edilmiştir). 6, 24 ve 48. saatlerde alınan örneklerden alkol distilasyonu yapılmış ve analiz basamakları izlenmiştir. Örnekler karıştırılarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Özellikle etil alkol miktarı yüksek olan destilatlar seyreltilerek H₂SO₄ + K₂Cr₂O₇ çözeltisine eklenmiştir. Numuneler iyice karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür.

2.9.3. Besin ilavesinin pH değişimine etkisinin belirlenmesi

Fermentasyon ortamında, inolab marka pH metre ile 6, 24 ve 48. saatlerde pH ölçülerek veriler kaydedilmiştir.

2.10. Çalışma Sonuçlarının İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Bu çalışmada; kontrol ve karışım gruplarının bağımsız örnek ortalamalarının karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (one-way Analysis Of Variance, one-way ANOVA) SPSS 15.0 - 2006 istatistik programı ile yapılmıştır.

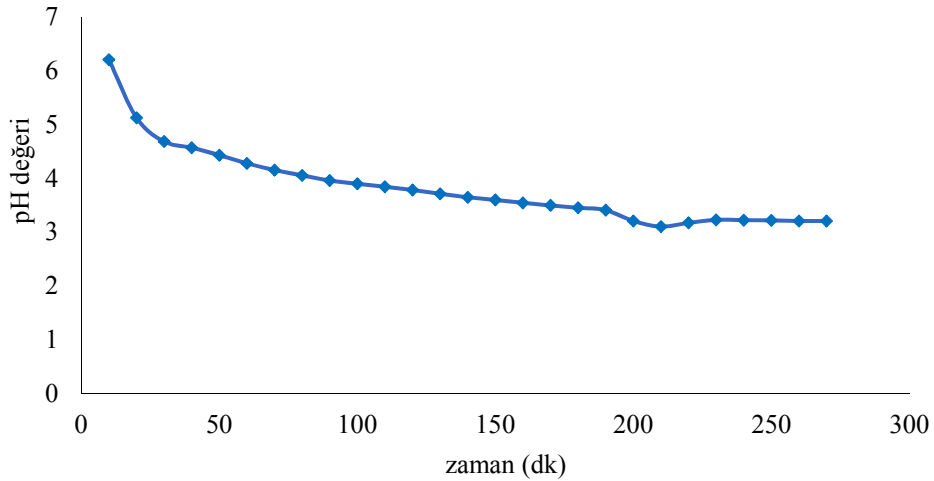
Ayrıca varyans analizi sonucunda grubun ortalamasının birbirlerinden farklılığını test etmek için hangi grup ortalamasının farklı olduğunun ve farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının ortaya konması için çoklu karşılaştırma yöntemleri 'post-hoc yöntemler' kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. pH Etkisi

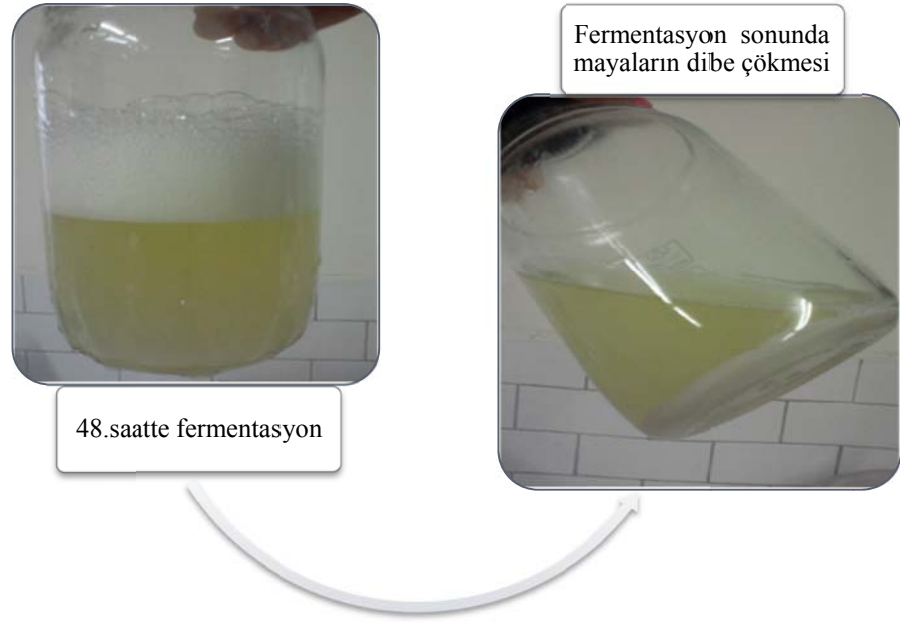
pH değişimi fermentasyon hızının bir göstergesidir. Fermentasyon ürünü olan CO₂ fermentasyon ortamında arttıkça ortamın asitliği artmakta ve pH değeri giderek düşmektedir. pH değerinin belirli bir süre sonunda sabitlenmesi ise fermentasyonun tamamlandığını göstermektedir. Buna bağlı olarak, pH değişiminin belirli noktalarında fermentasyon ortamında kalan invert şeker ve etil alkol miktarları ölçülerek fermentasyon sürecinin takibi yapılmıştır.

pH değişiminin günlük takibi ile numune alma zamanları belirlenerek, analizler için bir çalışma planı yapılmıştır. şekil 3.1’de ilk 6 saat pH’ın hızla düştüğü gözlenirken, 24. saatte pH değişiminin devam ettiği görülmüştür. Ancak 48. saatten sonra belirgin bir değişimin olmadığı gözlenmiştir.



şekil 3.1. Etil alkol fermentasyonunda zamana bağlı pH değişimi

Saccharomyces cerevisiae mayasıyla etil alkol üretiminde optimum pH değeri 4,25 olduğu belirlenmiştir. Pramanik, çalışmasında pH değerlerine bağlı olarak etil alkol üretim hızının önemli ölçüde değiştiğini gözlemlemiştir. 48 g/l maksimum etil alkol konsantrasyonu pH 4,25’de sağlanmıştır (Pramanik, 2003).



Şekil 3.2 Fermentasyon süreci

3.2. Sıcaklık Etkisi

Fermentasyonda sıcaklık, farklı *Saccharomyces* suşlarının gelişimini etkileyebilir. Etil alkol ve diğer fermentasyon ürünlerinin miktarı sıcaklıkla ilişkilidir. Genellikle, fermentasyon oranı geleneksel ekmek mayası kullanımında 30 ile 40 °C arasındaki optimum sıcaklıkta arttığı tespit edilmiştir (Asli, 2010; Pramanik, 2003). Bununla birlikte hücre gelişiminde hem optimum sıcaklık hem de sıcaklık toleransı ile fermentasyon arasında güçlü bir bağ vardır. Bu nedenle etil alkol konsantrasyonu, şeker tüketimi ve etil alkol verimi üzerindeki 28, 30, 32, 34, 36, 38 ve 40 °C sıcaklık değerlerinin etkisi araştırılmıştır. 32 °C'de, pH 4,5 ve 100 g/l sakkaroz değerlerinde maksimum etil alkol konsantrasyonuna ulaşılmıştır (Asli, 2010).

Fermentasyon süresince yüksek sıcaklıklar maya gelişimi ve metabolizmasını ciddi bir şekilde etkileyebilir. Sıcaklık mayaların etil alkole toleransını etkiler. Yüksek sıcaklıklarda, hücre membran akışkanlığı arttığından hücre canlılığını ve metabolizmasını etkileyen etil alkol hücreye girebilir.

Daha düşük sıcaklıklarda, maya hücre zarlarındaki sterol seviyeleri yükseldiğinden etil alkole olan toleransı arttırabilmektedir. Bu da, daha az hücre içi etil alkol birikimine yol açar (Malherbe ve diğ. 2007).

Pramanik bir çalışmasında, hurma içkisinden *S.cerevisiae* maya suşunun geliştirilmesi ve sakkarozun etil alkole fermentasyonunu kolaylaştıracak önemli proses parametrelerini araştırmıştır. Çalışmasında pH, sıcaklık, şeker konsantrasyonu, zaman ve ortam bileşenleriyle maya suşunun performansı izlenmiştir. Optimum pH'ın 4,25, sıcaklığın 30 °C olduğu bulunmuştur. Fermentasyon ortamı 10 g sakkaroz, 0,2 g et ekstraktı, 0,04 g magnezyum sülfat, 0,2 g amonyum sülfat ve 0,5 g KH₂PO₄ ile hazırlanmıştır. pH, sülfürik asit ile 4,25 değerine ayarlanmış ve besiyeri otoklavda sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan sıvı besiyerine maya kolonileri aşılanmış ve 30 °C'de 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde fermentasyona bırakılmıştır. Başlangıçta 35-38 °C'de etil alkol üretiminin daha yüksek olmasına rağmen, en iyi etil alkol konsantrasyonuna 30 °C'de ulaşılmıştır (Pramanik, 2003).

Şeker tüketiminin ise 30, 35, ve 38 °C'de sırasıyla %100, %97 ve %87,3 olduğu bulunmuştur. Mayanın etkinliğine karşı etil alkol oranındaki azalma, daha yüksek sıcaklıklardaki enzim aktivitesinin kaybına bağlanmıştır (Pramanik, 2003).

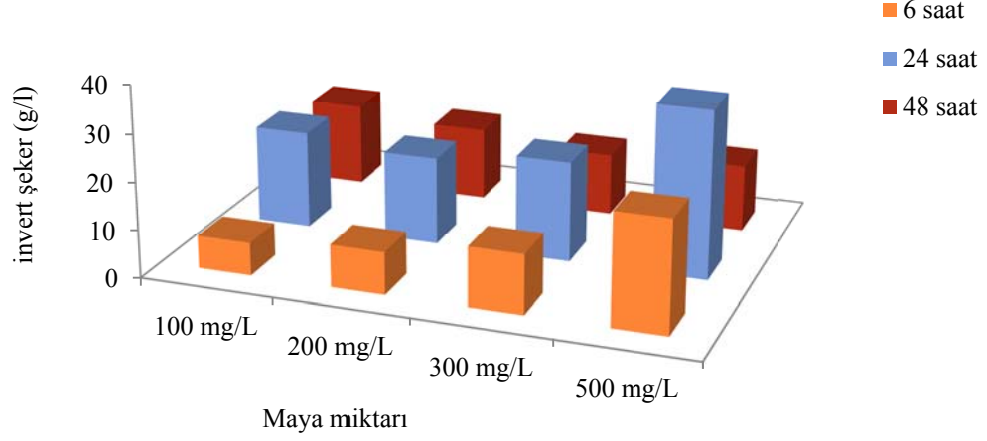
Bu çalışmada ise sıcaklık 30 °C'de yapılan ön deneme ile belirlenmiştir. 30 °C maya aktivitesi için çok uygun bir sıcaklık olduğundan pH hızlı bir şekilde düşmüş, şeker tüketimi çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Hem fermentasyonu yavaşlatarak numune alımları sırasında zaman farkından oluşabilecek hataları minimum seviyeye indirmek, hem de sonuçların pratikte kullanımı için ortam sıcaklığı, oda sıcaklığı olan 25 °C seçilmiştir.

3.3. Maya Miktarının Etkisi

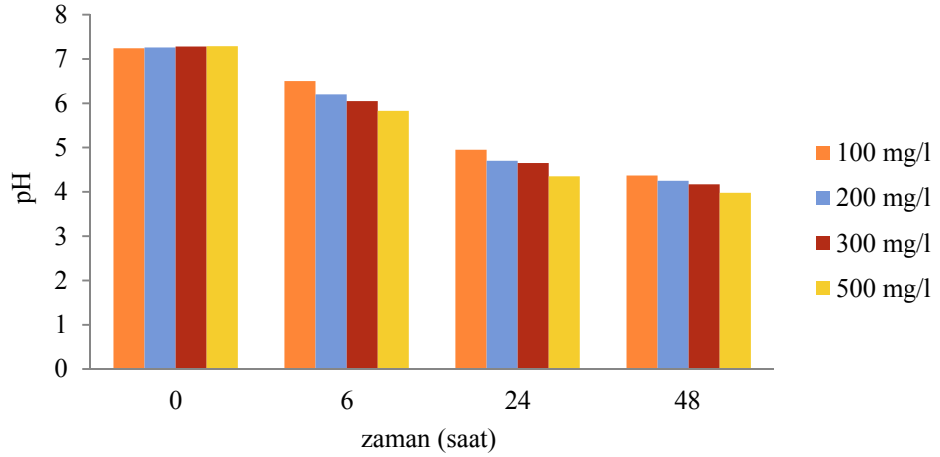
Maya derişiminin artması enzim aktivitesinin de artması anlamına gelmektedir. Substratın derişimi sabit iken enzim derişimi arttırıldığı zaman reaksiyon hızı artmaktadır.

Fermentasyon ortamındaki maya miktarı, ortamdaki şekeri kısa sürede ve hızla fermente ederek etil alkole dönüştürebilecek düzeyde olmalıdır. Eğer maya miktarı az ise ortamdaki şekeri fermente edebilmek için önce yeterli miktarda çoğalmak zorunda olduğundan. fermentasyon uzun sürer. Bu da mikroorganizma

bulaşmalarına, şeker ve zaman kaybına neden olur. Bu nedenle, ortamda yeterli miktarda maya bulunması maksimum etil alkol oranı için önemli bir şarttır.



Şekil 3.3. Maya miktarının ortamda kalan invert şeker miktarına etkisi



Şekil 3.4. Maya miktarının pH değişimine etkisi

Şekil 3.4 incelendiğinde düşük pH değerine 500 mg/l maya miktarı ile ulaşılmıştır. Düşük miktarda maya içeren fermentasyon ortamında fermentasyonun daha yavaş seyrettiği gözlenmiştir. Şekil 3.3'e bakıldığında ise 24.saatte ortamdaki şekeri çoğalmak için harcadığından 500 mg/l maya miktarına kıyasla oldukça az olduğu görülmektedir. Diğer taraftan ortamdaki maya ne kadar fazla olursa sakkaroz da o kadar hızlı parçalanarak kullanıma hazır hale gelecektir. Dolayısıyla kalan invert şeker miktarı fermentasyon hızı hakkında önemli bir belirleyici olmuştur. Bu nedenle çalışmamızda 500 mg/l maya miktarı tercih edilmiştir.

3.4. Kullanılan Besinlerin Etkileri

Azot ve fosfor, mayanın büyüme ve maksimum etil alkol üretim verimliliği için temel besin gereksinimleridir. Melas maya gelişimi için gerekli besinleri içerir, ancak genel olarak azot ve fosfat maya büyüme ve etil alkol üretimi arttırmak için ortama eklenir. Melas ortam içinde uygun maya verimi için, azot kaynağı olarak üre ve diamonyum fosfat olarak kullanılmıştır. Fosfor, maya hücresinde glikoliz döngüsünde önemli bir role sahiptir (Vasconcelos ve diğ., 2004), (Mukhtar ve diğ., 2010). Üre, fosforik asit ve sülfürik asit ilavesi ile etil alkol üretiminin arttığı ve daha ekonomik hale geldiği bildirilmiştir (Arshad, 2005), (Mukhtar ve diğ., 2010).

Asli çalışmasında fermente elma posasından izole edilen *S.cerevisiae* suşunun etil alkol fermentasyonunu etkileyen çeşitli durumları araştırmıştır. Fermentasyon ortamını ise Pramanik'in çalışmasında olduğu gibi 10 g glikoz, 0,2 g et ekstraktı, 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,04 g MgSO_4 ve 0,5 g KH_2PO_4 ile hazırlamıştır. pH 4,5'e sülfürik asit ile ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk sterilize edilen fermentasyon ortamı oda ısısına geldiğinde maya eklenmiştir. Fermentasyon 30 °C'de, 110 rpm'de çalkalamalı bir şekilde sürdürülmüştür. Bu suş için optimum şartlar olarak; pH'nın 4,5 sıcaklığın 32 °C, başlangıç şeker konsantrasyonun 100 g/l, en iyi fosfor kaynağının KH_2PO_4 , azot kaynağının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olduğu sonucuna varılmıştır (Asli, 2010), (Pramanik, 2003).

3.4.1. Farklı azot kaynaklarının etkisi

Maya hücrelerinin verimliliği ve azot dengesi arasında güçlü bir ilişki vardır. Çünkü kültür ortamı içindeki invertaz üretimi üzerinde çok büyük bir etkiye sahiptir. Shafiq ve arkadaşlarının çalışmasında, *S.cerevisiae*'nin invertaz üretiminde, nutrient broth, pepton ve yeast ekstrakt gibi farklı nitrojen kaynakları test edilmiş ve sonuçta maksimum üretimi peptonun sağladığı görülmüştür (Shafiq ve diğ., 2002).

Breisha'nın çalışmasında, araştırmacılar azot eksikliğinin biyokütle konsantrasyonunu azaltacağını ve fermentasyonun ağır ilerlemesine neden olabileceğini bildirmişlerdir (Breisha, 2010).

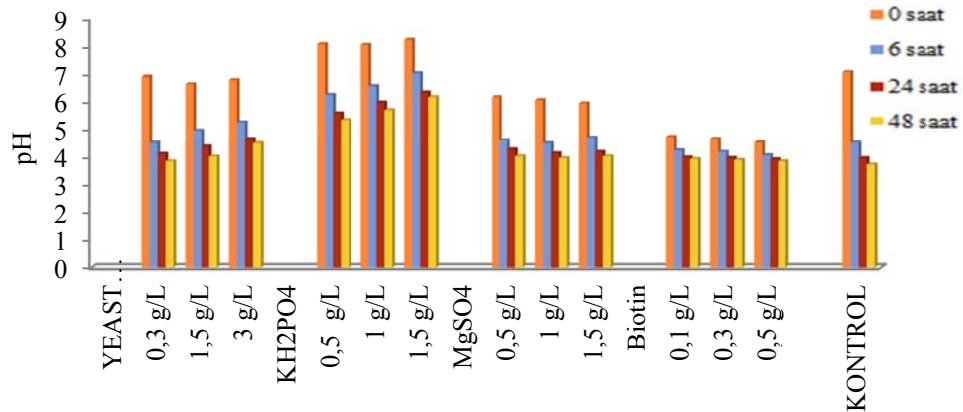
Bely ve arkadaşlarının bildirdiği bir çalışmada da azot eksikliğinin maya gelişimini ve fermentasyon hızını sınırladığı sonucuna varılmıştır (Bely ve diğ., 1990), (Julien ve diğ., 2000).

Asli'nin çalışmasında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 gibi azotlu bileşiklerin etil alkol üretimine etkisi incelendiğinde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın *S.cerevisiae* için 46,1 g/l etil alkol konsantrasyonuyla etil alkol fermentasyonunda en iyi azot kaynağı olduğu gözlenmiştir. Etil alkol fermentasyonu için optimum parametrelerin pH'ın 4,5, sıcaklığın 32 °C, başlangıç şeker konsantrasyonunun 100 g/l, fosfat kaynağının KH_2PO_4 ve azot kaynağının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olduğu bulunmuştur (Asli, 2010).

3.4.2. Kullanılan besin konsantrasyonlarının etkileri

Çalışmada kullanacağımız besinlerin hangi konsantrasyonlarının maya üzerinde daha etkili olduğunu gözlemleyebilmek amacıyla besin maddelerinin çeşitli konsantrasyonlarıyla hazırlanan fermentasyon ortamlarında pH değerlerinin ölçümü ve kalan invert şeker analizleri yapılmıştır.

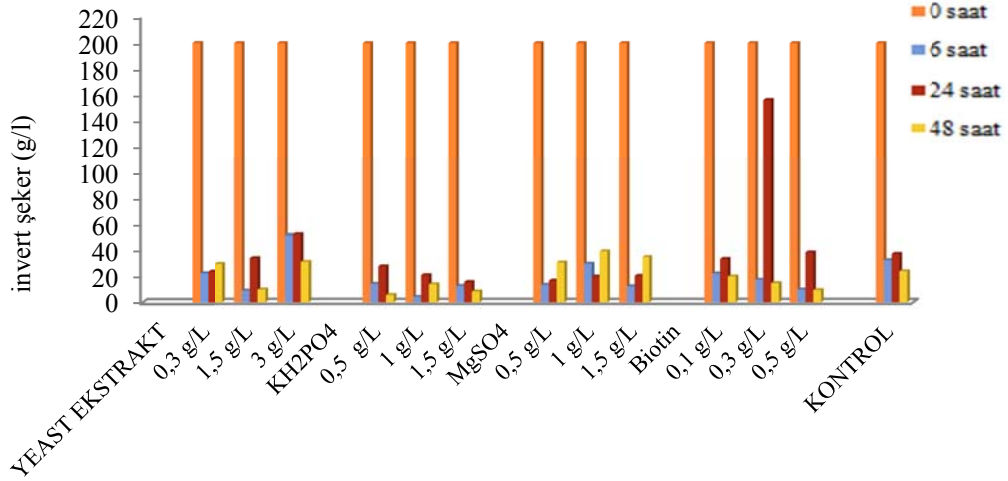
Son aşamadaki karışımda kullanacağımız besin konsantrasyonlarını belirlemek için 4 paralel halinde yürüttüğümüz fermentasyon sonucunda elde ettiğimiz verilerin ortalamalarına göre aşağıdaki tablo ve grafikler hazırlanmıştır.



Şekil 3.5. Besin konsantrasyonlarının pH değerleri değişimine etkisi

Denenen besin konsantrasyonlarının zamana bağlı pH değerlerinin değişimine etkileri incelenmiş ve 48. saatte pH'ı en yüksek seviyede tutan konsantrasyonlar, karışımda kullanılmak üzere seçilmiştir. Burada pH değerlerinin değişiminin

minimum seviyede tutulması ve fermentasyonun yavaşlatılması için besinlerin tamponlayıcı özelliğinden faydalanılmıştır. Şekil 3.5'e göre her besin maddesinin en yüksek konsantrasyonu etkili olmuştur. Tamponlayıcı etkisi en fazla olan besinin KH_2PO_4 ; en etkili konsantrasyonunun ise 1,5 g/l olduğu bulunmuştur. İkinci sırada yeast ekstraktın 3 g/l konsantrasyonunun etkili olduğu bulunmuştur. Bunları, MgSO_4 1,5 g/l ile biotin 0,5 g/l konsantrasyonları izlemiştir.



Şekil 3.6. Besin konsantrasyonlarının kalan invert şeker miktarına etkisi

3.4.3. Sakkaroz konsantrasyonunun etkisi

Başlangıç sakkaroz konsantrasyonu fermentasyon prosesindeki şeker tüketimi ve etil alkol konsantrasyonunu etkilemektedir.

Pramanik'in çalışmasında maksimum etil alkol konsantrasyonları 23, 48 ve 93 g/l sırasıyla 50, 100, ve 200 g/l sakkaroz ile 50.,72. ve 105. saatlerde elde edilmiştir. Karşılık gelen substrat tüketimleri ise sırasıyla %100, %100 ve %96'dır. Gözleendiği gibi düşük şeker konsantrasyonunda etil alkol üretimi kısa bir süre içindeki maya gelişimi ile ilişkilidir ve dolayısıyla fermentasyon daha az süre gerektirmiştir. Ancak daha yüksek bir sakkaroz konsantrasyonunda örneğin; 250 g/l sakkarozun fermentasyonunda sağlanan etil alkol konsantrasyonu ve sakkaroz tüketiminin 200 g/l sakkaroz çözeltisi ile sağlanandan daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum alkol fermentasyonunda yüksek sakkaroz konsantrasyonunun etkisiyle maya hücrelerinin plazmolizine bağlanmıştır. Ayrıca etil alkolün konsantrasyonu 95 g/l civarına ulaştığında maya üzerinde inhibitör etkili olduğu gözlemlenmiştir (Pramanik, 2003).

Asli'nın çalışmasında, sakkaroz konsantrasyonunun etkisini araştırmak için 50, 100, 150, 200, 250 g/l olmak üzere çeşitli başlangıç sakkaroz konsantrasyonları ayrı ayrı çalışılmıştır. Sonuçlara göre etil alkol konsantrasyonu substrat konsantrasyonundaki artış ile artmıştır. Fakat fermentasyonun tamamlanması için geçen süre çeşitlilik göstermiştir. Maksimum etil alkol konsantrasyonları 23, 46,1 ve 95,4 g/l sırasıyla 50, 100, ve 250 g/l sakkaroz ile 48.,72. ve 120. saatlerde elde edilmiştir. Sonuçlara göre 50 ve 100 g/l'de sakkaroz tüketiminin %100; 250 g/l sakkaroz ile %89,5 olduğu bulunmuştur. Maksimum etil alkol oranı, 100 g/l; minimum etil alkol ise 250 g/l sakkaroz konsantrasyonu ile sağlamıştır (Asli, 2010).

Gayon ve arkadaşları fermentasyondaki toplam sakkaroz konsantrasyonunun genellikle 170 g/l ve 220 g/l arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir (Ribereau-Gayon ve diğ., 2006).

Nishino ve arkadaşlarına göre, 200 g/l'den daha yüksek şeker konsantrasyonu fermentasyonun yavaşlamasıyla sonuçlanmaktadır. 250 g/l ve 300 g/l arasındaki sakkaroz konsantrasyonu hücre içi yüksek etil alkol konsantrasyonu ve osmotik basıncın bir sonucu olarak maya gelişimini engellemektedir (Nishino ve diğ., 1985).

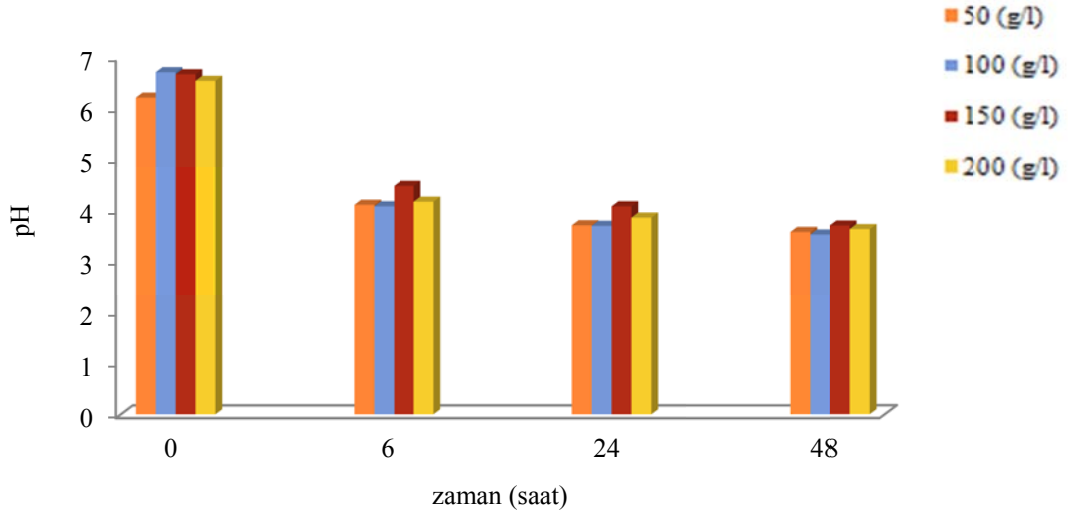
3.4.3.1. Kontrol ve karışım gruplarında pH değerleri değişimine etkisi

Karışım ve kontrol grupları arasında artan sakkaroz miktarlarına bağlı pH değerlerinde değişimler gözlenmiştir. Bu farklılığın sakkaroz miktarından değil özellikle karışım grubu içerisindeki tamponlayıcı özellikteki besinlerden kaynaklandığı görülmüştür. pH'ın, sakkaroz miktarı ile besin ilavesine bağlı değişimi aşağıdaki Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

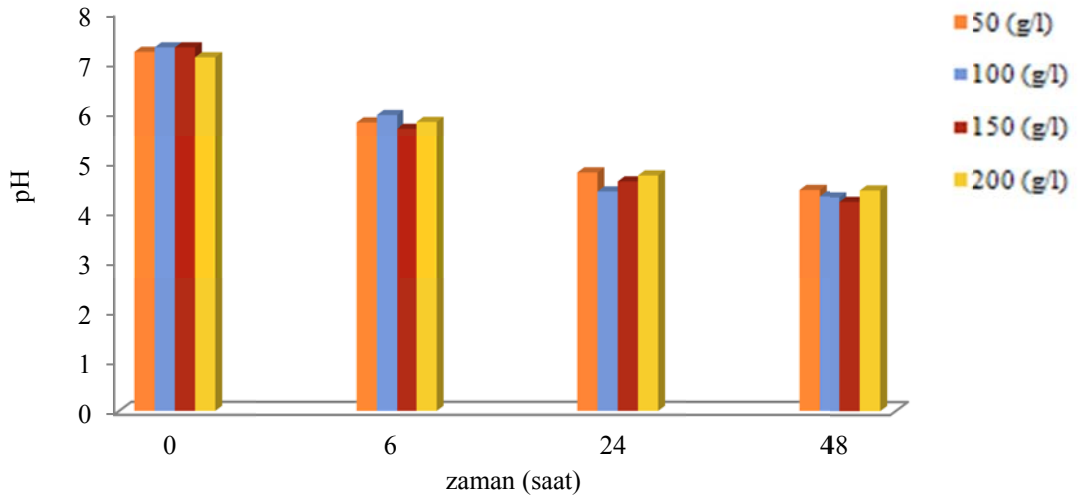
Tablo 3.1. Kontrol ve karışım gruplarında sakkaroz miktarının pH değişimine etkisi

Sakkaroz (g/l)	0		6		24		48	
	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım
50	6,21	7,21	4,10	5,80	3,70	4,78	3,57	4,43
100	6,71	7,30	4,07	5,95	3,69	4,40	3,52	4,30
150	6,67	7,30	4,47	5,67	4,07	4,60	3,71	4,21
200	6,54	7,10	4,16	5,81	3,85	4,72	3,64	4,44

Yukarıdaki tablo incelendiğinde; karışım grubundaki pH değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Maksimum fermentasyon performansı için karışım grubundaki pH değerleri değişiminin optimum seviyede olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.7. Kontrol grubunda sakkaroz miktarının pH değerleri değişimine etkisi



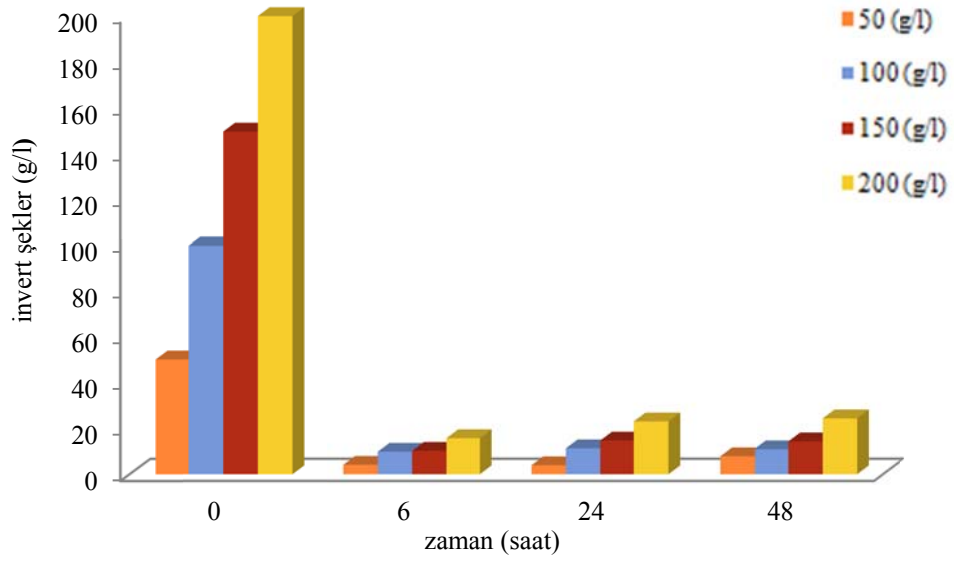
Şekil 3.8. Karışım grubunda sakkaroz miktarının pH değerleri değişimine etkisi

Şekil 3.7 ve 3.8 karşılaştırıldığında; karışım grubunda 150 g/l sakkaroz konsantrasyonunda 48. saatte pH değerinin 4,21'e düştüğü, kontrolde ise 50 g/l sakkaroz ile pH değerinin hızla düşerek 3,52'ye kadar azaldığı görülmektedir. Başka bir açıdan değerlendirildiğinde ise karışım grubunun pH değeri, maya gelişimine

uygun olduğundan daha fazla şekerin kullanılmasına ve dolayısıyla yüksek oranda etil alkol oluşumuna imkan sağlamıştır.

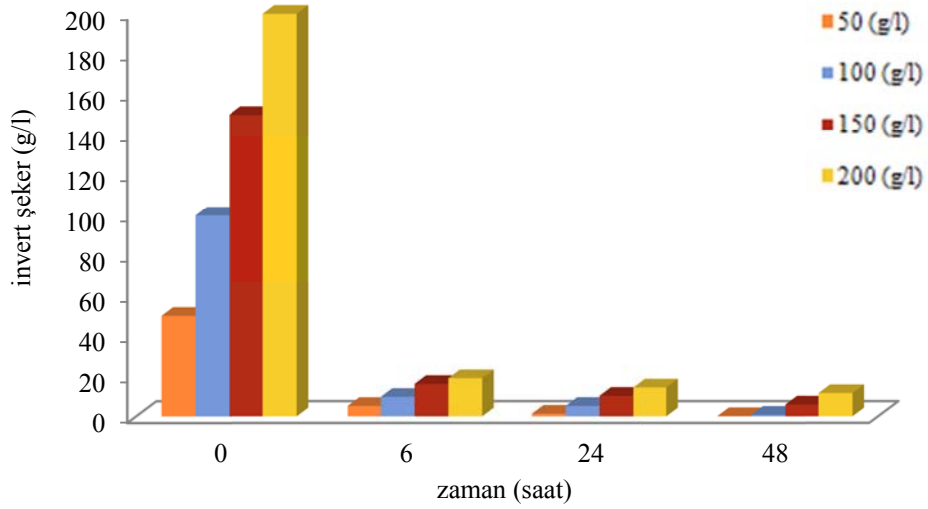
Pramanik çalışmasında 48 g/l etil alkol değerine pH 4,25'te ulaşırken, 40 g/l etil alkol değerine pH 5,0' de ulaşmıştır. Elde ettiği maya suşunun en düşük aktivitesinin pH 3,75 değerinde olduğunu belirtmiştir (Pramanik, 2003).

3.4.3.2. Kontrol ve karışım gruplarında kalan invert şeker miktarına etkisi



Şekil 3.9. Kontrol grubunda sakkaroz miktarının kalan invert şeker miktarına etkisi

Karışım grubunda kullandığımız maddeler sakkaroz kullanımını arttırmıştır. Şekil 3.9 ile Şekil 3.10 karşılaştırılmıştır ve 50, 100 150, 200 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında sakkaroz kullanımı; kontrol grupta sırasıyla %84,3, %89,1, %90,4, %87,75 seviyesindeyken karışım grubunda ise bu oranların, %99,8, %99,2, %96,08, %94,2 olduğu bulunmuştur.



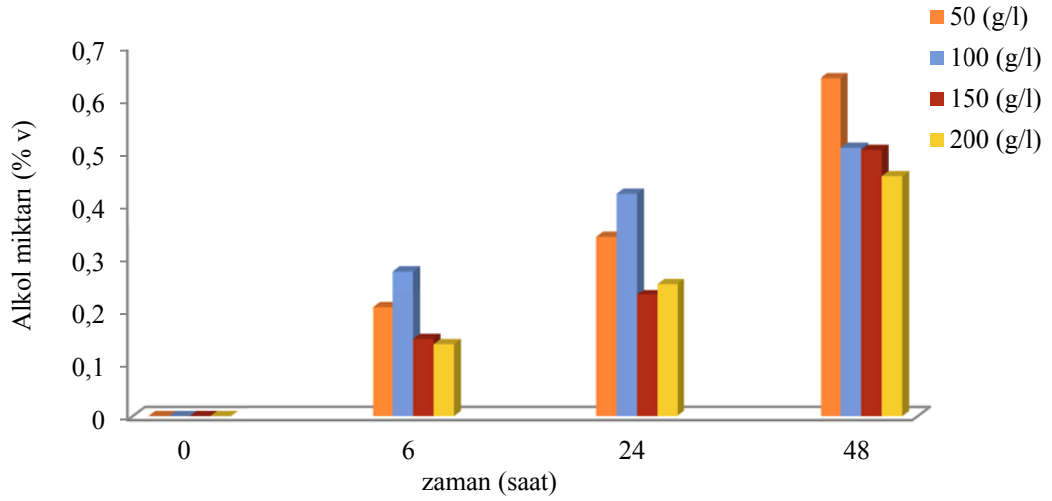
Şekil 3.10. Karışım grubunda sakkaroz miktarının kalan invert şeker miktarına etkisi

3.4.3.3. Kontrol ve karışım gruplarında etil alkol miktarına etkisi

Karışım ve kontrol gruplarında artan şeker miktarlarına bağlı olarak elde edilen etil alkol miktarlarında önemli derecede fark vardır. Etil alkolün sakkaroz miktarına ve besin ilavesine bağlı değişimi aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

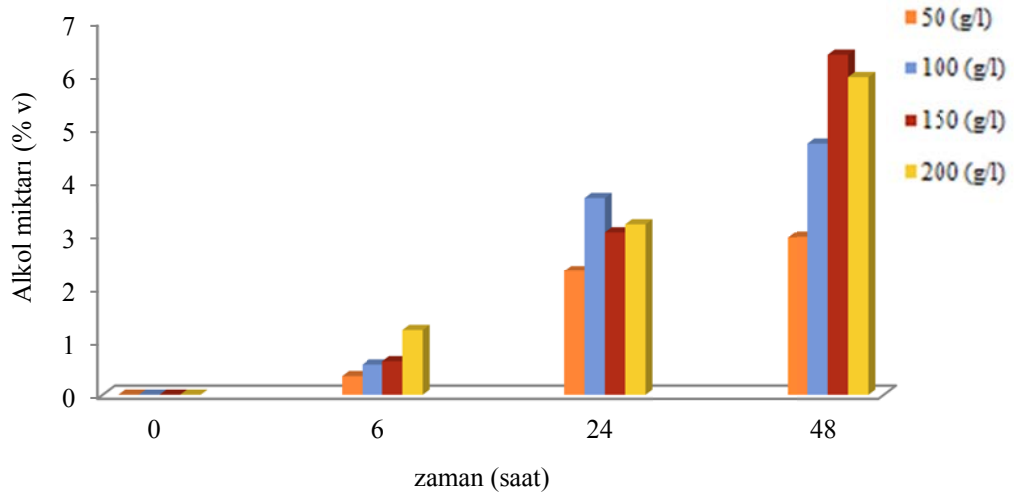
Tablo 3.2. Kontrol ve karışım gruplarında sakkaroz miktarının etil alkol miktarına etkisi

Sakkaroz (g/l)	0		6		24		48	
	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım	Kontrol	Karışım
50	0	0	0,21	0,35	0,34	2,32	0,64	2,95
100	0	0	0,27	0,56	0,42	3,69	0,51	4,71
150	0	0	0,15	0,63	0,23	3,05	0,51	6,38
200	0	0	0,14	1,21	0,25	3,2	0,46	5,96



Şekil 3.11. Kontrol grubunda sakkaroz miktarlarının etil alkol miktarına etkisi

Şekil 3.11 incelendiğinde ortamda besin ilavesi olmayan kontrol grubunda en yüksek etil alkol miktarı %0,64 oranında 50 g/l sakkaroz konsantrasyonunda sağlanmıştır.

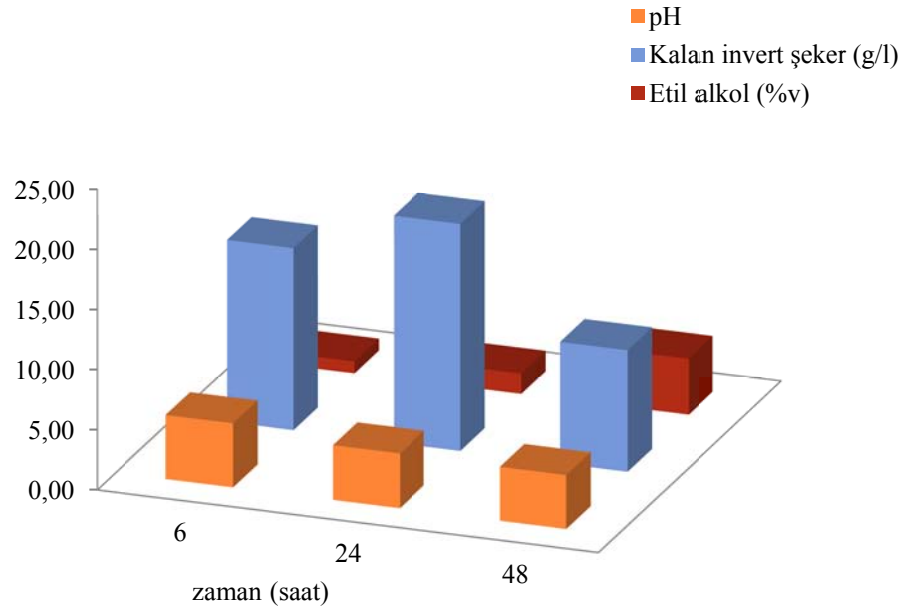


Şekil 3.12. Karışım grubunda sakkaroz miktarlarının etil alkol miktarına etkisi

Şekil 3.12 değerlendirildiğinde ise karışım grubunda en yüksek etil alkol miktarı %6,38 oranında 150 g/l sakkaroz konsantrasyonunda sağlanmıştır. Bu derişimin üzerinde maya hücrelerinde osmotik basıncı arttırdığından mayaya yavaşlatıcı etki göstermiştir. Bu nedenle 200 g/l sakkaroz konsantrasyonunda beklenenin aksine daha düşük oranda (%5,96) etil alkol elde edilmiştir.

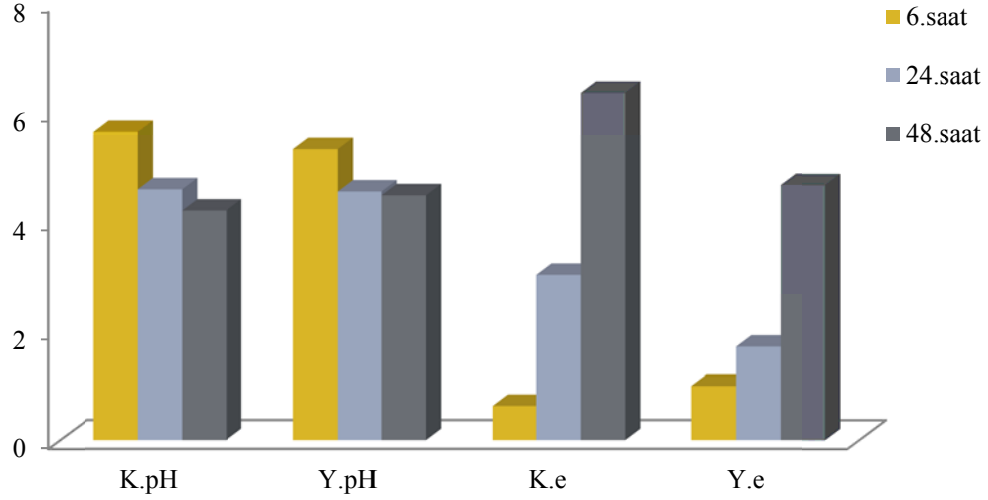
Breisha'nın çalışmasında da 50, 100, 150, 200 ve 250 g/l sakkaroz konsantrasyonları kullanılarak yaş ekmek mayası ile 150 g/l sakkaroz konsantrasyonda 38. saatte %6,80, 200 g/l şeker ile 72. saatte %8,7 etil alkol elde edilmiştir. Şeker miktarı %20 iken tamamen tüketilirken %25 olduğunda kalan invert şeker miktarının 130 g/l, hücre sayısı ve etil alkol konsantrasyonunun ise çok düşük (%4,5) olduğu belirlenmiştir. Maya suşu için %25 şeker konsantrasyonunun substrat inhibisyonuna yol açan bir değer olduğu sonucuna varılmıştır (Breisha, 2010).

Görüldüğü gibi çalışmamızda elde edilen etil alkol miktarı literatürde geçen değerlere benzerlik göstermektedir. Kullanılan maya suşunun türüne, etil alkol ve şeker toleranslarına bağlı olarak farklılıklar gözlenebilmektedir.



Şekil 3.13. 5 g/l yeast ekstraktın pH değeri kalan invert şeker ve etil alkol miktarına etkisi

Şekil 3.13'e bakıldığında karışım grupta elde edilen etil alkol oranına yakın oranda etil alkol elde edilmesi ve ayrıca fermentasyon ortamında pH değerini istenen seviyede tutması yeast ekstraktın önemli rolünü göstermektedir.



Şekil 3.14. Karışım ve yeast ekstrakt (5g/l) deney sonuçlarının karşılaştırılması (K.pH: karışım grubunun pH değerleri değişimi, Y.pH: yeast ekstrakt grubunun pH değerleri değişimi; K.e: karışım grubu etil alkol oranı, Y.e: yeast ekstrakt grubunun etil alkol oranını belirtmektedir.)

Yeast ekstraktın tek başına kullanımı özellikle fermentasyon ortamının pH değerinin kararlı olmasını sağlamıştır. Etil alkol değerleri açısından karşılaştırıldığında ise karışımda elde edilen etil alkol değeri %6,38 iken, yeast ekstrakt kullanımıyla bu değer %4,68 olarak bulunmuştur.

Fermentasyon ürünlerinden elde edilecek verim üretim ortamının çeşitli bileşenlerinin maliyeti ile yakından ilişkilidir. Ayrıca üretim ortamı için yüksek maliyetli ortam bileşenleri fermentasyon ürününün satış fiyatını etkiler. Bu yüzden literatürde düşük maliyetli alternatif bileşenler bulma girişimleri bulunmaktadır. Örneğin, Pramanik aynı fermentasyonu diğer bileşenleri sabit tutup et ve yeast ekstraktı kullanarak çalışmıştır. Etil alkol fermentasyonunda yeast ekstrakt ve sığır eti ekstresi kullanıldığında yeni maya suşunun performansında önemli bir değişiklik olmadığı gözlemiştir (Pramanik, 2003).

Breisha çalışmasında bir vitamin kaynağı olarak 6 g/l yeast ekstraktı, 0,2 g/l tiamin ile birlikte eklemiştir. Bu işlemler yaşayan maya hücre sayısını büyük ölçüde arttırmaya ve şekerin tamamen kullanımıyla etil alkol üretim fermentasyonuna yöneliktir. Bu koşullar altında %30 sakkaroz 48. saatte tamamen tüketilmiş ve %14 etil alkol konsantrasyonu elde edilmiştir (Breisha, 2010). Bu sonuçlar Alferone ve

arkadaşlarının çalışmasıyla karşılaştırılmıştır (Alfenore ve diğ., 2002). Aynı koşullar altında, %35 sakkaroz ile hazırlanan fermentasyonda, mayanın yüksek miktarda sakkaroz tüketmesine rağmen sadece %5 etil alkol ürettiği tespit edilmiştir. Bu sonucu mayanın şekeri kendi gelişimi için kullanmasına bağlamıştır (Breisha, 2010).

3.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

3.5.1. Tukey testi sonuçları

Bu çalışma verilerine uygulanan eş zamanlı Tukey testi sonuçlarına göre; etil alkol miktarları, kalan invert şeker miktarları ve pH değerleri değişimleri açısından karışım ve kontrol grupları arasında önemli derecede fark vardır ($p < 0,05$). Ancak grupların birimleri arasında fark yoktur.

Tablo 3.3. Eş zamanlı Tukey testi sonuçları

	*GRUP	Ortalama	SF	T- Değeri	p- Değeri
(a)	Kontrol	-2,577	0,039	-65,49	<0,0010
(b)	Kontrol	4,259	0,190	22,40	<0,0010
(c)	Kontrol	-0,959	0,007	-146,00	<0,0010

*Grup: Karışım ve Yanıt değişkeni: (a) Alkol, (b) Kalan invert şeker, (c) pH

Etil alkol miktarları pH değerleri değişimi ve kalan invert şeker miktarı açısından değerlendirildiğinde karışım ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Ortalamalar farkı dikkate alındığında ise kontrol grup için elde edilen etil alkol miktarı ve pH değerlerinin karışım gruplarına oranla azaldığı (-), ancak kalan invert şeker miktarlarının karışım gruplarına oranla arttığı (+) belirlenmiştir.

Aşağıdaki Tablo 3.4, 3.5 ve 3.6'da karışım grubunun 1. birimi diğer grup birimleriyle ve kontrol grubunun her birimiyle karşılaştırılmıştır. Karışım grubunun 1. birimi ile diğer 2., 3., ve 4. birimleri arasında fark yoktur. Ancak kontrol grubu birimleri ile arasında anlamlı bir fark vardır.

Tablo 3.4. Etil alkol miktarı bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar

Yanıt değişkeni: Etil alkol					
Grup = Karışım					
Birim = 1					
GRUP	BİRİM	Ortalamalar farkı	SF	T-Değeri	p-Değeri
Karışım	2	-0,058	0,079	-0,73	0,9953
Karışım	3	0,044	0,079	0,56	0,9992
Karışım	4	-0,147	0,079	-1,87	0,5813
Kontrol	1	-2,617	0,079	-33,25	<0,0010
Kontrol	2	-2,608	0,079	-33,13	<0,0010
Kontrol	3	-2,604	0,079	-33,09	<0,0010
Kontrol	4	-2,641	0,079	-33,56	<0,0010

Tablo 3.5. Kalan invert şeker miktarı bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar

Yanıt değişkeni: Kalan invert şeker					
Grup = Karışım					
Birim= 1					
GRUP	BİRİM	Ortalamalar farkı	SF	T-Değeri	p-Değeri
Karışım	2	-0,438	0,380	-1,153	0,9398
Karışım	3	-0,292	0,380	-0,767	0,9938
Karışım	4	-0,801	0,380	-2,107	0,4301
Kontrol	1	4,557	0,380	11,986	<0,0010
Kontrol	2	3,713	0,380	9,766	<0,0010
Kontrol	3	3,453	0,380	9,082	<0,0010
Kontrol	4	3,782	0,380	9,948	<0,0010

Tablo 3.6. pH değeri bakımından grupların birim düzeyleri arasındaki tüm ikili karşılaştırmalar

Yanıt Değişkeni: pH					
Grup = Karışım					
Birim = 1					
GRUP	BİRİM	Ortalamalar farkı	SF	T-Değeri	p-Değeri
Karışım	2	0,003	0,0132	0,19	1,0000
Karışım	3	0,018	0,0132	1,33	0,8829
Karışım	4	-0,012	0,0132	-0,90	0,9845
Kontrol	1	-0,928	0,0132	-70,59	<0,0010
Kontrol	2	-0,974	0,0132	-74,06	<0,0010
Kontrol	3	-0,979	0,0132	-74,49	<0,0010
Kontrol	4	-0,949	0,0132	-72,20	<0,0010

Tablo 3.7'ye göre, sakkaroz miktarı karışım grubunda elde edilen etil alkol miktarını değiştirirken, kontrol grubunda oluşan etil alkol miktarlarını etkilememektedir.

150 g/l ve 200 g/l'lık sakkaroz konsantrasyonu ile elde edilen etil alkol miktarı değişmemektedir.

Tablo 3.7. Kontrol ve karışım gruplarının etil alkol miktarlarının şeker miktarına bağlı olarak gruplandırılması

Grup	Şeker	N	Ortalama	Gruplama
Karışım	200	12	3,4617	A
Karışım	150	12	3,3528	A
Karışım	100	12	2,9898	B
Karışım	50	12	1,8752	C
Kontrol	100	12	0,4015	D
Kontrol	50	12	0,3949	D
Kontrol	150	12	0,2935	D
Kontrol	200	12	0,2806	D

Aşağıdaki tablolarda karışım grupları ve kontrol grupları için elde edilen etil alkol miktarları ve kalan invert şeker miktarları %95 güven düzeyinde Tukey metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Her iki grubun birimleri arasında yapılan gruplandırma Tablo 3.8 ve 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.8. Grup birimlerinde etil alkol miktarı gruplandırma bilgisi

GRUP	BİRİM	N	Ortalama	Gruplama
Karışım	3	12	3,0039	A
Karışım	1	12	2,9601	A
Karışım	2	12	2,9023	A
Karışım	4	12	2,8132	A
Kontrol	3	12	0,3558	B
Kontrol	2	12	0,3526	B
Kontrol	1	12	0,3433	B
Kontrol	4	12	0,3188	B

Tablo 3.9. Grup birimlerinde kalan invert şeker miktarı gruplandırma bilgisi

GRUP	BİRİM	N	Ortalama	Gruplama
Kontrol	1	12	13,2375	A
Kontrol	4	12	12,4625	A
Kontrol	2	12	12,3933	A
Kontrol	3	12	12,1333	A
Karışım	1	12	8,6808	B
Karışım	3	12	8,3892	B
Karışım	2	12	8,2425	B
Karışım	4	12	7,8800	B

*Bir harfi paylaşmayanlar önemli derecede farklıdır.

Tablo 3.10. Seçilen faktör seviyeleri ve değerleri

Faktör	Seviye	Değerler
GRUP	2	Karışım; Kontrol
BİRİM (Grup paralelleri)	8	1; 2; 3; 4; 1; 2; 3; 4
ŞEKER	4	50; 100; 150; 200
İŞLEM (Zaman)	3	6; 24; 48

Tablo 3.11. Etil alkol miktarı için varyans analizi sonuçları

Kaynak	SD	KT	DKO	F	p
GRUP	1	159,41	159,41	4288,71	<0,001
BİRİM	6	0,25	0,04	1,14	0,359
ŞEKER	3	8,27	2,76	74,20	<0,001
GRUP*ŞEKER	3	10,80	3,60	96,88	<0,001
ŞEKER*BİRİM	18	0,90	0,05	1,35	0,217
İŞLEM	2	86,71	43,35	1166,36	<0,001
GRUP*İŞLEM	2	63,63	31,81	855,88	<0,001
İŞLEM*BİRİM	12	0,18	0,02	0,40	0,954
ŞEKER*İŞLEM	6	7,48	1,25	33,52	<0,001
GRUP*ŞEKER*İŞLEM	6	7,56	1,26	33,89	<0,001
HATA	36	1,34	0,04		
TOPLAM	95	346,53			
S = 0,192796		R ² = %99,61		R ² (adj) = %98,98	

Her p<0,001 değeri için fark vardır.

Tablo 3.11 de verilen varyans analiz sonuçlarına göre; kalan invert şeker miktarı ve zamana bağlı olarak grup birimlerinde elde edilen etil alkol miktarı bakımından fark yoktur.

Tablo 3.12. Kalan invert şeker miktarı için varyans analizi sonuçları

Kaynak	SD	KT	DKO	F	p
GRUP	1	435,244	435,244	501,93	<0,001
BİRİM	6	12,132	2,022	2,33	0,053
ŞEKER	3	2655,568	885,189	1020,82	<0,001
GRUP*ŞEKER	3	59,250	19,750	22,78	<0,001
ŞEKER*BİRİM	18	24,049	1,336	1,54	0,132
İŞLEM	2	49,674	24,837	28,64	<0,001
GRUP*İŞLEM	2	627,019	313,510	361,55	<0,001
İŞLEM*BİRİM	12	4,266	0,355	0,41	0,950
ŞEKER*İŞLEM	6	79,829	13,305	15,34	<0,001
GRUP*ŞEKER*İŞLEM	6	52,823	8,804	10,15	<0,001
HATA	36	31,217	0,867		
TOPLAM	95	4031,070			
S = 0,931200		R ² = %99,23		R ² (adj) = %97,96	

Her p<0,001 değeri için fark vardır.

Tablo 3.12’de ise grup birimleri arasında sakkaroz miktarı ve zamana bağlı olarak kalan invert şeker miktarlarında fark yoktur.

Tablo 3.13. pH değişimi için varyans analizi sonuçları

Kaynak	SD	KT	DKO	F	p
GRUP	1	29,472	29,472	21309,52	<0,001
BİRİM	6	0,034	0,006	4,07	0,002
ŞEKER	3	0,240	0,080	57,87	<0,001
GRUP*ŞEKER	3	0,806	0,269	194,17	<0,001
ŞEKER*BİRİM	18	0,155	0,009	6,22	<0,001
İŞLEM	3	165,658	55,219	39925,90	<0,001
GRUP*İŞLEM	3	4,519	1,506	1089,01	<0,001
İŞLEM*BİRİM	18	0,032	0,002	1,29	0,229
ŞEKER*İŞLEM	9	0,751	0,084	60,34	<0,001
GRUP*ŞEKER*İŞLEM	9	0,427	0,047	34,30	<0,001
HATA	54	0,075	0,001		
TOPLAM	127	202,168			
S = 0,0371893		R ² = %99,96		R ² (adj) = %99,91	

Her p<0,001 değeri için fark vardır.

Tablo 3.13’e göre zamana bağlı olarak grup birimlerinin pH değerleri arasında ise fark yoktur.

3.5.2. Regresyon analizi sonuçları

Tablo 3.14. Karışım grupları için genel regresyon analizi

Terimler	Katsayılar	Standart hata	T	p
Sabit	-0,826969	0,226751	-3,6470	0,001
Zaman (sa)	0,105438	0,004560	23,1226	0,000
Şeker miktarı (g)	0,007684	0,001523	5,0441	0,000
S = 0,681250		R ² = %90,18		R ² (adj) = %89,86

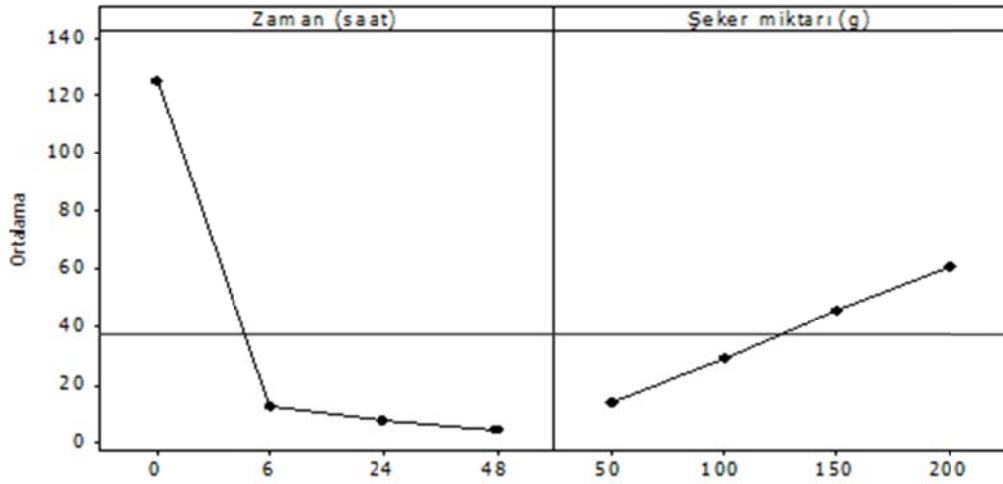
$$\% \text{ Etil alkol} = -0,826969 + 0,105438 \text{ Zaman} + 0,00768375 \text{ Şeker miktarı} \quad (3.1)$$

Tablo 3.15. Kontrol grupları için genel regresyon analizi

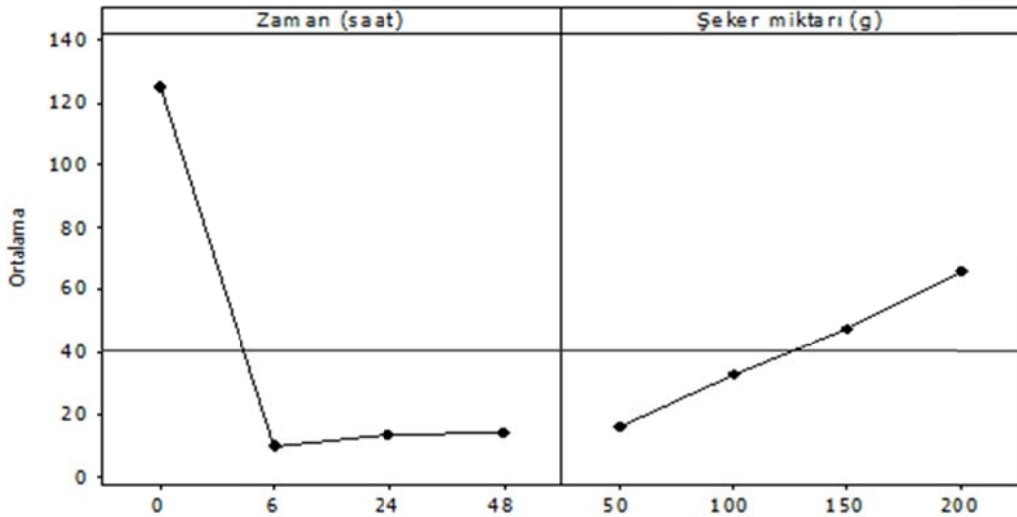
Terimler	Katsayılar	Standart hata	T	p
Sabit	0,145685	0,0243763	5,9765	0,000
Zaman (saat)	0,009933	0,0004902	20,2625	0,000
Şeker miktarı (g)	-0,000675	0,0001638	-4,1219	0,000
S = 0,0732360		R ² = %87,51		R ² (adj) = %87,10

$$\% \text{ Etil alkol} = 0,145685 + 0,0099328 \text{ Zaman} - 0,000675 \text{ Şeker miktarı} \quad (3.2)$$

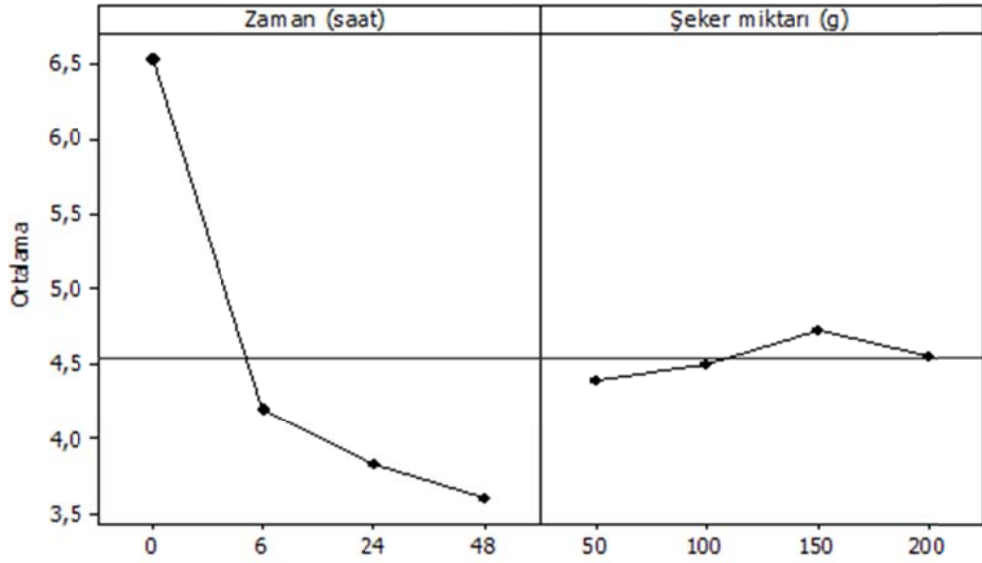
Karışım grubunda kalan invert şeker miktarları zamanla azalmaktayken kontrol grupta 24. saatte kalan invert şeker miktarının sabitlendiği Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da görülmektedir. Karışım grubunda kontrol grubuna kıyasla ortamda daha fazla şeker kaldığı görülmektedir. Buna göre karışım grubuna eklediğimiz besinlerin tamponlama etkisi, mayaya şekeri kullanabilme fırsatı vermektedir. Kullanılan sakkaroz miktarı arttıkça ortamda kalan invert şeker miktarları da artış göstermektedir.



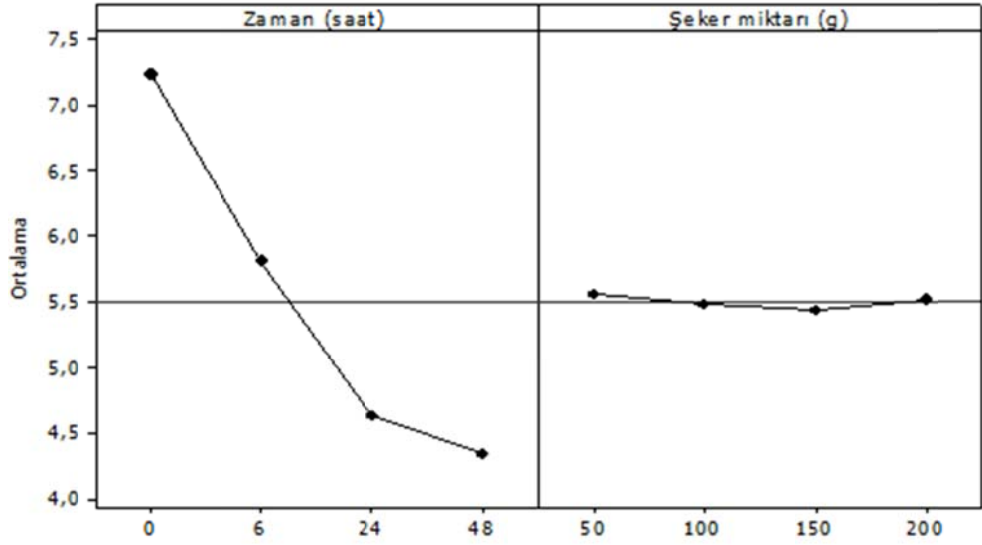
Şekil 3.15. Karışım grubunda zaman ve sakkaroz miktarına bağlı kalan invert şeker değişimi



Şekil 3.16. Kontrol grubunda zaman ve sakkaroz miktarına bağlı kalan invert şeker değişimi

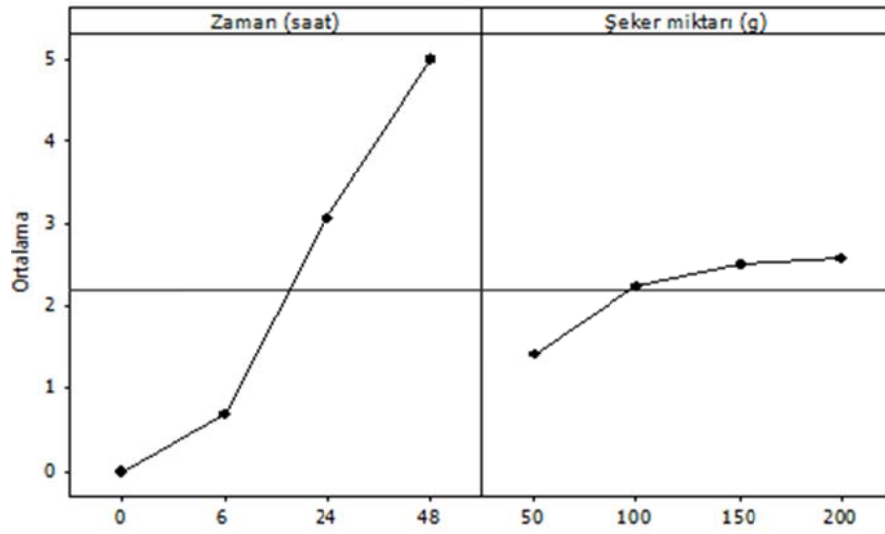


Şekil 3.17. Kontrol grubunda pH değişimi



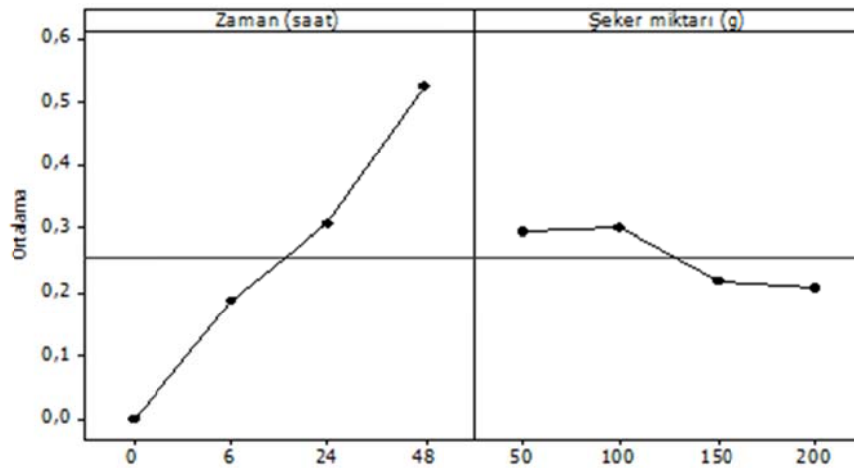
Şekil 3.18. Karışım grubunda pH değişimi

Şekil 3.17 ve Şekil 3.18 karşılaştırıldığında sakkaroz miktarındaki artışın; kontrol gruplarının pH değişiminde etkili olduğu, karışım gruplarının pH değişiminde etkili olmadığı görülmektedir. Bunun sebebi karışım gruplarına tamponlayıcı besinlerin eklenmiş olmasıdır. Karışım ve kontrol gruplarının zamana bağlı pH değişimlerine bakıldığında kontrol grubunda pH değerinin 3,6, karışım gruplarında ise pH değeri 4,4 tür.

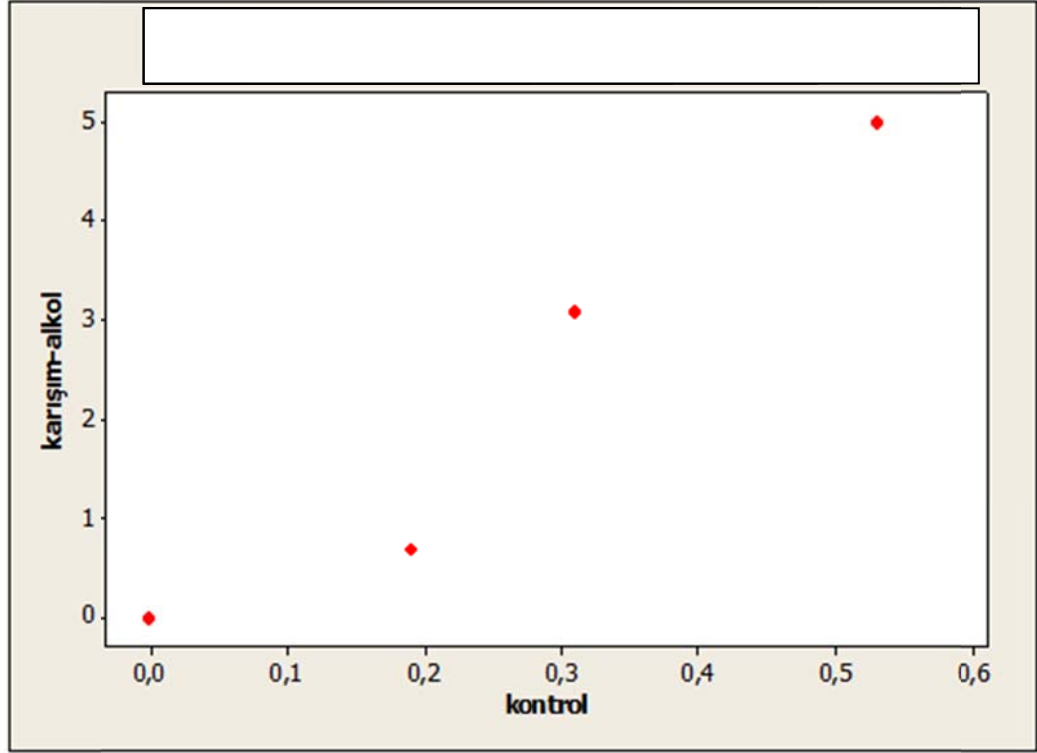


Şekil 3.19. Karışım grubundaki etil alkol değişimi

Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de etil alkol miktarında zamanla artış olduğu gözlenmektedir. Maksimum seviyede etil alkol miktarına 48.saat sonunda ulaşılmıştır. Ortama eklenen sakkaroz miktarındaki artışa bağlı olarak fermentasyon sonucunda ortamda kalan invert şeker miktarı artış göstermektedir. Ancak 150 g/l ile 200 g/l sakkaroz kullanımında kalan invert şeker miktarında belirgin bir fark görülmemektedir. Bu sonuçlara göre, sakkaroz miktarının 150 g/l'den daha fazla olması osmotik basıncı arttırdığından mayaya yavaşlatıcı etkide olduğu söylenebilir.



Şekil 3.20. Kontrol grupta etil alkol değişimi



Şekil 3.21. Zamana bağlı kontrol ve karışım grupta etil alkol miktarı değişimi

Şekil 3.21’de karışım ve kontrol gruplarında zamana bağlı olarak etil alkol miktarı karşılaştırılmıştır. 48.saatte kontroldeki etil alkol %0,55 iken karışım grupta %5 seviyesine ulaşılmıştır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ticari kuru mayaların etil alkol üretimi üzerinde bazı besinlerin etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Laboratuvar çalışmaları süresince steril çalışma koşulları sağlanmış, herhangi bir kontaminasyona yol açmamaya dikkat edilmiştir. Ticari ambalajlı bir ürün olan kuru mayanın O₂ ile teması halinde aktifliği değişebileceğinden, paralel fermentasyon ortamlarına aynı zamanda aynı paketten alınan numuneler eklenmiştir.

Etil alkol üretimini arttırmak için ortama pH değişimini kısıtlayan tamponlama etkisi yüksek olan besinlerin ilavesi mayanın ortamdaki şekeri maksimum düzeyde kullanabilmesini sağlamıştır. Karışıma hangi besinden ne miktarda koyacağımızı belirlemek için yaptığımız çeşitli besin konsantrasyonlarını belirleme çalışmasında 48.saat sonunda pH değeri en yüksek, ortamda kalan invert şeker miktarı en az olan besin maddesinin KH₂PO₄; en etkili konsantrasyonunun ise 1,5 g/l olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra karışımda ön çalışma ile belirlenip seçilen konsantrasyonlardaki besinlere ilaveten şeker konsantrasyonu ile orantılı miktarda NH₄ tuzu kullanılarak tampon etkisi artırılmıştır.

Bu çalışma ile fermentasyon ortamına eklenen besin karışımı etil alkol üretimini arttırmada etkili olmuştur. Fermentasyon ortamına besin ekleyerek 150 g/l sakkaroz konsantrasyonunda 500 mg/l maya ile 48 saatte %6,38 oranında etil alkol eldesi sağlanmıştır.

En son aşamada sadece 5 g/l yeast ekstrakt ilavesi ile yapılan denemelerde %4,68 oranında etil alkol değerine ulaşılmıştır. Bu nedenle karışım içindeki etil alkol miktarını arttırmada en etkili besinin yeast ekstrakt olduğu sonucuna varılmıştır.

Kontrol ve karışım gruplarında fermentasyon ortamında elde edilen pH değerlerinin değişimi, kalan invert şeker miktarı ve etil alkol miktarı Tukey Metodu-Varyans Analizi ve Regresyon Analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Grup ve grup

paralelleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için deneysel veriler varyans analizi ile değerlendirilerek gruplandırma yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda elde edilen belirleme katsayısı (R^2) değerlerinin yüksek olması, çalışmanın deneysel sonuçlarıyla uyumluluk içinde olduğunu göstermektedir.

Fermentasyon ortamında pH değerlerinin değişimi, kalan invert şeker miktarı ve zaman gibi faktörlerin karışım ve kontrol grubunda elde edilen etil alkol miktarına etkileri regresyon analizi ile belirlenmiştir. Oluşan etil alkol yüzdesini veren bir regresyon denklemi elde edilmiştir.

Ticari önemdeki bu bilginin etil alkol üreticileri açısından değerlendirilebilmesi mümkündür. Kuru maya içerisine besin karışımlarında kullanılan maddeleri belirli dozlarda eklemek suretiyle piyasaya sürülebilecek ve üreticilerin kullanımına sunulabilecek bir ürün tasarlanabilir.

Diğer taraftan bu çalışma; farklı meyve sularından ya da atık sebze ve meyve kabuklarından *S.cerevisiae* ile etil alkol üretimi gibi konularda çalışma imkanı sunabilecektir.

KAYNAKLAR

Akman A. V., Yazıcıoğlu T., Şarap Kimyası ve Teknolojisi, *A. Ü.Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı No 55*, 1, A.Ü. Basımevi, Ankara, 160, 1960.

Alfenore S., Molina C., Guillouet J. L., Gome G., Benbadis L., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, *Applied Microbiol Biotechnol.*, 2002, **60**, 67-72.

Arı T., Dönmez S., Melastan etil alkol üretiminde soya ununun alkol ve hücre konsantrasyonuna etkisi, *Turk J. Biol.*, 2000, **24**, 573-584.

Arshad M., Optimization of fermentation conditions for enhanced ethanol production from blackstrap molasses at industrial scale, M.Phil. thesis, University of Agriculture, Institute of Microbiology, Faisalabad, 2005.

Asli M. S., A study on some effecient parameters in batch fermentation of ethanol using *Saccharomyces cerevisiae* SC1 extracted from fermented siahe sardasht pomace, *Africa Journal of Biotechnology*, 2010, **9**, 2906-2912.

Bai F. W., Anderson W. A., Shafiq K., Ali S., Haq I., Effect of different mineral nutrients on invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5, *Biotechnology*, 2002, **1**, 40-44.

Bajpai P., Sharma A., Raghuram N., Rapid production of ethanol in high concentration by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* through soy flour supplementation, *Biotechnol. Lett.*, 1988, **10**, 217-220.

Balat M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, *Energy Conversion and Management*, 2011, **52**, 858-875.

Barnett J. A., Robinow C. F., A history of research on yeasts 4: cytology part II 1950-1990, *Yeast*, 2002, **19**, 745-772.

Barnett J. A., Entian K. D., A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism, *Yeast*, 2005, **22**, 835-894.

Bely M., Sablayrolles J. M., Barre P., Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions, *J. Ferm. Bioeng.*, 1990, **70**, 246-252.

Bennett C., Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol, *Am. J. Med. Technol.*, 1971, **37**, 217-220.

- Beşli N., Turker M., Gul E., Design and simulation of a fuzzy controller for fed-batch fermentation, *Bioprocess Eng.*, 1995, **13**, 141-148.
- Brady D., Duncan J. R., Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, **41**, 149-154.
- Breisha G. Z., Production of 16% ethanol from 35% sucrose, *Biomass and Bioenergy*, 2010, **34**, 1243-1249.
- Çataltaş A. İ., *Kimyasal Proses Endüstrileri 2*, 4. basım, İnkilap Kitabevi, Ankara, 1985.
- Çetin E. T., *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, 1. basım, İ.Ü. Tıp Fak. Vakfı-Bayda Yayını, İstanbul, 1983.
- Dombek K. M., Ingram L. O., Magnesium limitation and it's role in apperent toxicity of ethanol during yeast fermentation, *Appl Environ Microbiol.*, 1986, **52**, 975-981.
- Emre İ., Yarı-kesikli fermantasyonda besleme ve havalandırma profillerinin optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 185895.
- Galbe M., Zacchi G., A review of the production of ethanol from softwood, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **59**, 618-628.
- Garcia M. J., Rios G., Ali R., Belles J. M., Serrano R., Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, 1997, **143**, 1125-1131.
- Güven S., Güneser O., Biyoetil alkol üretimi ve önemi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2007, **1**, 91-96.
- Güven S., Şarap üretimindeki alkol fermentasyonunda görülen duraklamalar, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 2003, **15**, 12-17.
- Ingledeew M. W., Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, *Fuel and Industrial Alcohol Industries*, 3rd ed., Nottingham University Press, Nottingham, 49-87, 1999.
- Julien A., Roustan J. L., Dulau L., Sablayrolles J. M., Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences, *Am. J. Enol. Vitic.*, 2000, **51**, 215-222.
- Kırbaşlar Ş. İ., Çavuş S., Dramur U., Fermentasyonla etil alkol üretimi üzerine çözücü etkisi, *Deü Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik dergisi*, 2000, **3**, 13-21.
- Kreder G. C., Yeast assimilation of trub-bond zine, *Journal American Soc. Brew. Chem.*, 1999, **57**, 129-132.

Kudo M., Vagnoli P., Bisson L. F., Imbalance of potassium and hydrogen ion concentration as a cause of stuck enological fermentations, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, **49**, 295-301.

Kunkee R. E., Bisson L. F., Yeast Technology, Editors: Rose A. H., Harrison J. S., *The yeasts*, 5th ed., Academic Press, New York, 69-127, 1993.

Malherbe S., Bauer F. F., Du Toit M., Understanding problem fermentations - a review Institute for Wine Biotechnology, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2007, **28**, 169-186.

Mukhtar K., Asgher M., Afghan S., Hussain K., Hussain Z. S., Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, DOI: 10.1155/2010/419586.

Nishino H., Miyazaki S., Tohyo K., Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeast, *Am. J. Enol. and Vitic.*, 1985, **36**, 170-174.

Okur T. M., Ayçiçeği tohum kabuğu hemiselüloz hidrolizatının alkole fermentasyon koşullarının ve kinetiğinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003, 133403.

Pamir M. H., *Fermentasyon Mikrobiyolojisi*, 1. Basım, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1985.

Pramanik K., Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces* yeast extracted from toddy, *J.Chin. Inst. Chem. Engrs.*, 2003, **34**, 487-492.

Pramanik K., Rao D. E., Kinetic study of ethanol fermentation of grape waste using *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated from toddy, *Journal of Institution of Engineers*, 2005, **85**, 53-58.

Prescott S. C., Dunn C. G., The yeasts, *Industrial Microbiology*, 3th edition, McGraw-Hill Book Company, Newyork, 25-26, 1959.

Ribereau-Gayon P. I., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvou A., *Handbook of enology*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd., Chishester, 2006.

Shafiq K., Ali S., Haq I., Effect of different mineral nutrients on invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5, *Biotechnology*, 2002, **1**, 40-44.

Somogy M., Determination of reducing sugars by Nelson-Somogy method, *J. Biol. Chem.*, 1952, **200**, 245.

Soyuduru D., Fermentasyonla etanol üretiminde etanol veriminin artırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 201032.

Sun Y., Cheng J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technology*, 2002, **83**, 1-11.

Taillandier P., Portugal F. R., Fuster A., Strehaiano P., Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content, *Food Microbiology*, 2007, **24**, 95-100.

Thomas K. C., Hynes S. H., Ingledew W. M., Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates, *Biotechnology*, 1996, **18**, 1165-1168.

URL-1: <http://web.deu.edu.tr/fmd/s6/6-3.pdf> (Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2013).

URL-2: http://tr.wikipedia.org/wiki/Etil_alkol (Ziyaret tarihi: 2 Haziran 2013).

URL-3: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Alken> (Ziyaret tarihi: 2 Haziran 2013).

URL-4: <http://article.sapub.org/10.5923.j.chemistry.20120204.06.html> (Ziyaret tarihi: 2 Haziran 2013).

URL-5: <http://dektmk.org.tr/upresimler/enerjikongresi12/89-DrFigenAr.pdf> (Ziyaret tarihi: 10 Mayıs 2013).

URL-6: <http://foodwaste-fruit.tripod.com/id2.html> (Ziyaret tarihi: 15 Haziran 2013).

URL-7: <http://www2.bayar.edu.tr/muhendislik/gida/docs/databank/unite%204.pdf> 'Dr. Halil Tosun, Biyoetil alkol üretimi, Ders notları, 9.Ünite' (Ziyaret tarihi: 11 Eylül 2013).

URL-8: <http://www.agnostik.net/viewtopic.php?f=12&t=9963> (Ziyaret tarihi: 20 Temmuz 2013).

URL-9: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/> (Ziyaret tarihi: 29 Temmuz 2013).

URL-10: <http://www2.bayar.edu.tr/muhendislik/gida/docs/databank/unite9.pdf> (Ziyaret tarihi: 14 Eylül 2013).

URL-11: http://www.ikev.org/haber/ikev2007/Mustafa_Turker.pdf (Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2013).

URL-12: <http://www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.jpg> (Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2013).

URL-13: http://biotek.ankara.edu.tr/files/NALAN-OYA-SAN_Mayalar%C4%B1n-A%C4%9F%C4%B1r-Metal-ve-Boyar-Madde-Giderimi.pdf (Ziyaret tarihi: 17 Eylül 2013).

URL-14: <http://yourweeklymicrobe.blogspot.com.tr/2011/04/yeast-leader-in-libations-king-of.html> (Ziyaret tarihi: 18 Eylül 2013).

URL-15: <http://www.ozmaya.com.tr/index.phtml?id=902000&dil=Tss> (Ziyaret tarihi: 26 Ağustos 2013).

URL-16: <http://www.dryeast.net/sitebuilder/page005.asp> (Ziyaret tarihi: 28 Ağustos 2013).

URL-17: http://www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/0ec53c4682d36f5_ek.pdf?dergi=1 (Ziyaret tarihi: 2 Eylül 2013).

URL-18: http://www.maurivin.com/upload/Classic_YAN.pdf (Ziyaret tarihi: 2 Eylül 2013).

URL-19: Halkman K. A., Besiyerleri 1, Ankara Üni. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, www.mikrobiyoloji.org (Ziyaret tarihi: 28 Ağustos 2013).

URL-20: <http://www.biotin.gen.tr/biotin-vitamini.html> (Ziyaret tarihi: 9 Eylül 2013).

URL-21: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7184_PL.pdf (Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2013).

URL-22: <http://prezi.com/gelzer1xw3t9/copy-of-fermantasyonla-sarap-uretimi/> (Ziyaret tarihi: 28 Ağustos 2013).

Üstün D., Sürekli etil alkol fermentasyonu parametrelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1997, 66642.

Vasconcelos J. N., Lopes C. E., France F. P., Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugarcane stalks, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004, **21**, 357–365.

Walker G. M., Magnesium as a stres-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal American Soc. Brew. Chem.*, 1998, **56**, 109-113.

Wilke C. R., High productivity anaerobic fermentation with dense cell culture, *Advances in Biotechnology*, 1981, **8**, 539-545.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Güven K., Yücel E., **Çetintaş F.**, Antimicrobial activities of fruits of Crataegus and Pyrus species, *Pharmaceutical Biology*, 2006, **44**, 79-83.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında İzmit'te dünyaya geldi. İlköğretimini Abidin Pak İlkokulu'nda, ortaöğretimini Seka Çocuk Dostları Ortaokulu'nda tamamladı. 2000 yılında 19 Mayıs Lisesi'nden mezun olup Eskişehir Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2005'te mezun oldu ve Biyolog ünvanını aldı. 2005-2011 yılları arasında çeşitli dersanelerde Biyoloji öğretmenliği yaptı. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji bölümünde yüksek lisansa başladı.