



PEYNİR ALTI SUYU LAKTOZUNDAN ETANOL ÜRETİMİ

Nida ARASAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2020

Nida ARASAN tarafından hazırlanan “PEYNİR ALTI SUYU LAKTOZUNDAN ETANOL ÜRETİMİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. S. Ferda MUTLU

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. İrfan AR

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 19/06/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nida ARASAN

29/06/2020

PEYNİR ALTI SUYU LAKTOZUNDAN ETANOL ÜRETİMİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Nida ARASAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2020

ÖZET

Gün geçtikçe artan enerji ihtiyacı ve artan fosil yakıt kullanımından kaynaklanan sera gazları emisyonlarındaki artışın neden olduğu sorunlar Dünya'yı yeni ve temiz enerji kaynaklarının arayışına yönlendirmiştir. Buna ek olarak, fosil yakıt rezervlerinin tükeniyor oluşu alternatif enerji kaynaklarından olan biyoyakıtlara verilen önemi artırmıştır. Biyoetanol en önemli biyoyakıtlardan biridir ve genel olarak şeker içeren maddelerden çeşitli mikroorgaizmalar kullanılarak fermantasyon yolu ile üretilir. Bu kapsamda bir süt endüstrisi atık ürünü olan peynir altı suyu yüksek laktoz içeriğinden dolayı biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılmaya uygun görülmektedir. Peynir altı suyunun doğrudan atılması yüksek üretim hacmi ve yüksek organik içeriği nedeni ile hem doğal su sistemlerinde ciddi çevresel sorunlara yol açmakta hem de peynir altı suyunun değerli organik içeriği israf olmaktadır. Bu çalışmada peynir altı suyunun ultrafiltrasyon işleminden sonra süzüntü olarak alınan peynir altı suyu süzüntüsü biyoetanol üretimi için ham madde olarak seçilerek hem peynir altı suyu bertaraf edilirken, hemde sahip olduğu değerli içeriğin geri kazanılması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında, *Kluyveromyces marxianus* mayası kullanılarak fermantasyon ile peynir altı suyu süzüntüsünden etanol üretiminde en uygun koşulların belirlenmesi için istatistiksel bir yöntem olan Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Laktoz derişimi, pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişimi parametrelerinin etanol üretimine etkileri Box Wilson deneysel tasarım yöntemine göre çalkalamalı erlen kültürlerinde incelenmiştir. Bu model kullanılarak, sırasıyla laktoz derişiminin 150 g/L, pH'nı 5 ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin 2 g/L olduğu değerlerde en yüksek % 3,04 etanol derişimine ulaşılmıştır.

Bilim Kodu : 91206
Anahtar Kelimeler : Biyoetanol üretimi, Etanol fermantasyonu, *Kluyveromyces marxianus*, Peynir altı suyu
Sayfa Adedi : 78
Danışman : Doç. Dr. S. Ferda MUTLU

ETHANOL PRODUCTION FROM CHEESE WHEY LACTOSE

(M. Sc. Thesis)

Nida ARASAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2020

ABSTRACT

Increasing energy demand and increasing greenhouse gas emissions caused by increasing fossil fuel usage led the world to search for new and clean energy sources. In addition, the depletion of fossil fuel reserves has increased the importance given to biofuels from alternative energy sources. Bioethanol is one of the most important biofuels and is generally produced from sugar-containing substances by fermentation using various microorganisms. In this context, whey, which is a dairy industry waste product, is considered suitable for use as a raw material in bioethanol production due to its high lactose content. Due to the high production volume and high organic content, direct disposal of whey causes serious environmental problems in natural water systems and the valuable organic content of whey is wasted. In this study, whey permeate, which is taken as a filtrate after the ultrafiltration process of whey, is selected as the raw material for bioethanol production, and it is aimed to recover both the whey and its valuable content. Within the scope of the study, Box Wilson experimental design method, which is a statistical method, was used to determine the optimum conditions for production of ethanol from whey permeate by fermentation using *Kluyveromyces marxianus* yeast. The effects of lactose concentration, pH and ammonium dihydrogen phosphate concentration on ethanol production were investigated in shaking flask cultures according to Box Wilson experimental design method. Using this model, the highest 3,04% ethanol concentration was achieved at lactose concentration where 150 g/L, pH 5 and ammonium dihydrogen phosphate concentration 2 g/L, respectively.

Science Code : 91206

Key Words : Bioethanol production, Ethanol fermentation, *Kluyveromyces marxianus*, Cheese whey

Page Number : 78

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. S. Ferda MUTLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam Doç. Dr. S. Ferda MUTLU'ya en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen M. Oğuzhan AYVALI'ya, değerli arkadaşım Pınar ÇİTLİ'ye, hayatımın her aşamasında bana destek olan değerli kardeşim Utku Göktuğ ARASAN'a ve benden hiçbir zaman desteğini esirgmeden beni bu günlere getiren annem Ümran ARASAN ile babam Ahmet ARASAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
2.1. Enerji Kaynağı Olarak Etanol	5
2.2. Peynir Altı Suyu	8
2.2.1. Peynir altı suyunun bileşimi.....	9
2.2.2. Peynir altı suyu ve çevre kirliliği	11
2.2.3. Peynir altı suyunun endüstriyel olarak değerlendirilmesi.....	11
2.2.4. Peynir altı suyunun sıvı olarak kullanımı	12
2.2.5. Peynir altı suyunun yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu olarak kullanımı.....	13
2.2.6. Peynir altı suyunun peynir altı suyu proteini konsantresi olarak kullanımı	13
2.2.7. Peynir altı suyundan laktoz üretimi	14
2.2.8. Peynir altı suyundan fermantasyon yoluyla çeşitli bileşiklerin üretimi....	15
2.3. Peynir Altı Suyundan Etanol Üretimi	16
2.4. Besiyerleri	19
2.5. Peynir Altı Suyundan Fermantasyon ile Etanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	23

	Sayfa
2.5.1. <i>Kluyveromyces</i> türleri	24
2.5.2. <i>C. pseudotropicalis</i> (<i>C. kefir</i>)	28
2.5.3. <i>S. Cerevisiae</i>	29
2.6. Box Wilson Deneysel Tasarım Yöntemi.....	31
3. DENEYSEL YÖNTEM	37
3.1 Materyal	37
3.2. Kuru Dondurulmuş Haldeki Mayanın Çoğaltılması	37
3.3. Büyüme Ortamının Hazırlanışı	40
3.4. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı	41
3.5. Etanol Analizi.....	43
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	49
4.1. Büyüme ve Fermantasyon Ortamının Belirlenmesi ve Maya Seçimi	49
4.2. Box-Wilson Deneysel Tasarım Yöntemi Kullanılarak Deneysel Tasarım Matrisinin Belirlenmesi.....	50
4.3. Design Expert 11 Sürümü Programından Yararlanılarak Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	52
4.3.1 Model denkleminin kurulması	53
4.3.2. Model için ANOVA testi sonuçları	54
4.3.3. Deneysel değerler ve model değerlerinin karşılaştırılması	55
4.3.4. Bağımsız değişkenlerin etanol yüzdesi üzerindeki etkilerinin cevap yüzey grafikleri ile incelenmesi	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
EKLER	71
EK-1. Model için ANOVA testi sonuçları.....	72
EK-2. ANOVA testi sonucunda elde edilen R ² değerleri	73
EK-3. ANOVA testi sonucunda elde edilen katsayılar.....	74

	Sayfa
EK-4. Kodlanmış değerler cinsinden model eşitliği	75
EK-5. Gerçek değerler cinsinden model eşitliği	76
EK-6. Katsayılar ve p değerleri	77
ÖZGEÇMİŞ	78



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 100 mL peynir altı suyunun kimyasal bileşimi	10
Çizelge 2.2. Üç değişkenli tasarım matrisi	33
Çizelge 2.3. ANOVA testinde kullanılan terimler.....	35
Çizelge 3.1. Katı besi yeri bileşimi	39
Çizelge 3.2. Sıvı besi yeri bileşimi	39
Çizelge 3.3. Büyüme ortamı bileşimi	40
Çizelge 4.1. Bağımsız değişkenler, seviyeleri ve alve üst sınır değişkenleri	50
Çizelge 4.2. Deneysel tasarım matrisinin gerçek ve kodlanmış değerleri	51
Çizelge 4.3. Bağımlı değişkenler, bağımsız değişkenler ve tasarım değişkenleri	52
Çizelge 4.4. Laktoz derişimi, pH, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi ve etanol yüzde değerleri	52
Çizelge 4.5. Design Expert 11 sürümü programı kullanılarak hesaplanan katsayılar ve istatistiksel değerler	53
Çizelge 4.6. Model için ANOVA testi sonuçları	54
Çizelge 4.7. Model denkleminde gerekli ihmaller yapıldıktan sonra model terimleri için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler.....	55
Çizelge 4.8. Deneysel değerler ile model değerlerinin karşılaştırılması	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. 2000-2017 yılları arasında Dünya etanol üretimi	6
Şekil 2.2. Peynir altı suyu çeşitleri.....	9
Şekil 2.3. Peynir altı suyundan yaygın olarak üretilen ürünler ve kullanım alanları	12
Şekil 2.4. Peynir altı suyundan etanol üretim süreci.....	18
Şekil 2.5. Besiyerlerinin sınıflandırılması	22
Şekil 4.1. Deneysel değerler ile model değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması ..	57
Şekil 4.2. Laktoz derişimi ve pH'nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği	58
Şekil 4.3. Laktoz derişimi ve pH'nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi	59
Şekil 4.4. Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği	60
Şekil 4.5. Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi.....	61
Şekil 4.6. pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği.....	62
Şekil 4.7. pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi	63
Şekil 4.8. Zamana bağlı etanol yüzdesi	64

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Maya ekimi için hazırlanan katı ve sıvı besiyerleri	38
Resim 3.2. Maya kolonileri.....	40
Resim 3.3. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (1. grup).....	42
Resim 3.4. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (2. grup).....	42
Resim 3.5. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (3. grup).....	42
Resim 3.6. Etanol analizi için kullanılan su buharı ile damıtma düzeneği	44
Resim 3.7. Soğutucu çıkışına yerleştirmek için hazırlanan $K_2Cr_2O_7$ çözeltileri	45
Resim 3.8. Su banyosunda bekletilen örnekler	45
Resim 3.9. Örneğe KI çözeltisi eklendikten sonra oluşan rengin görüntüsü	46
Resim 3.10. Titrasyon bitimindeki renk dönüşümü.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

ΔX_i	Değişkenlerin adım aralığı
K	Değişken sayısı
N_0	Merkez noktada yapılan deney sayısı
N_d	Deney sayısı
U_i	Değişkenin kodlanmış değeri
X_1	Laktoz derişimi (g/L), bağımsız değişken
X_2	pH, bağımsız değişken
X_3	$NH_4H_2PO_4$ derişimi (g/L), bağımsız değişken
X_i	Değişkenlerin gerçek değeri
X_{i0}	Değişkenlerin ortalama değeri
Y	Etanol derişimi (%) a/h, bağımlı değişken

Kısaltmalar

$BOİ$	Biyolojik oksijen ihtiyacı
HKO	Hata karelerinin oranı
HKT	Hata karelerinin toplamı
$KOİ$	Kimyasal oksijen ihtiyacı
MKO	Model karelerinin oranı
MKT	Model karelerinin toplamı
PAS	Peynir altı suyu
$THKT$	Toplam Hata karelerinin toplamı

1. GİRİŞ

Süt ürünleri endüstrisi dünyadaki en büyük endüstrilerden biridir ve süt ürünleri üretimi ile birlikte kayda değer miktarda kirlilik derecesi yüksek olan atık su açığa çıkar. Bu durumda süt ürünleri endüstrisi atık suyunun alıcı ortama verilmesinde çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Peynir üretimi sırasında ortaya çıkan peynir altı suyunun ön işlem yapılmadan atılması yüksek organik içeriği ve son derece büyük olan üretim hacmi nedeniyle ciddi bir çevresel sorun haline gelmiştir.

Peynir altı suyu içerisindeki bileşenlerin çoğu küçük molekül kütleli ve suda çözünür olduklarından, doğal su sistemlerine doğrudan verildiklerinde yüksek biyolojik oksijen ihtiyacından dolayı oksijen seviyesini kolaylıkla düşürebilirler. Yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı değerinden dolayı, peynir altı suyunun oksijenli aktif çamur süreçleriyle artırılması ekonomik değildir [1]. Bu kapsamda peynir altı suyunun giderilmesinde uygun ekonomik ve çevre dostu işlemlerin uygulanması gerekmektedir.

Peynir altı suyu tipik olarak %4.5–5 laktoz (a/h), %0.8–1 protein (a/h), %0.06 yağ (a/h) içerir [2]. Bu nedenle peynir altı suyu çeşitli bileşiklerin üretimi için içerik bakımından zengin ve ucuz bir hammaddedir. Peynir altı suyu yüksek karbonhidrat içeriği ve kolay ulaşılabilir olması sayesinde etanol üretimi için uygun bir kaynak olarak görülmektedir. Peynir altı suyundan üretilen ve çevre dostu bir yakıt olan biyo-etanol, zararlı gaz emisyonlarının azaltılması için benzine çeşitli oranlarda harmanlanarak içten yanmalı motorlu araçlarda yakıt olarak kullanılabilir. Gün geçtikçe tükenmekte olan fosil yakıt rezervleri düşünüldüğünde, biyo-etanolün dünyanın yakıt talebinin karşılanmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Peynir altı suyundan üretilen etanol biyoyakıt olarak kullanımı yanında, yiyecek-içecek endüstrisi ile ilaç ve kozmetik endüstrilerinde de kullanılabilir.

Peynir altı suyu veya peynir altı suyu süzüntüsü içerisindeki laktozun etanole çevrilmesi, şeker kamışı ve mısır gibi bitkileri substrat olarak kullanıldığı kurulu teknolojiler veya lignoselulozik yapıdaki biyokütlenin hammadde olarak kullanıldığı yükselen yeni nesil teknolojilerle ekonomik olarak rekabet edebilir değildir. Ancak peynir altı suyunun atık ürün olması, etanol üretiminde mısır gibi gıdayla ilgili fermentasyon hammaddelerine karşı üstünlük sağlar. Ayrıca peynir altı suyunun giderilmesinde çeşitli seçeneklerin olması, her

mandıranın kendi özelliklerine göre peynir altı suyu fazlası nedeniyle ortaya çıkan çevresel sorunlarla mücadele etmenin en uygun yolunu bulmasına olanak sağlamak açısından önemlidir. Son olarak, peynir altı suyundan elde edilen etanol içilebilir niteliktedir ve bu nedenle yiyecek-içecek, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde uygun pazarlar bulması mümkündür.

Peynir altı suyu içerisinde kayda değer miktarda laktoz bulunmaktadır. Basit bir örnek olarak, Dünya peynir altı suyu üretimini %5 laktoz içeriğiyle birlikte yıllık 200 milyon ton olarak ele alırsak, bu 10 milyon ton laktoz anlamına gelir [3-5].

Yapılan çalışmalarda, son 50 yıl boyunca dünya peynir altı suyunun yaklaşık olarak yarısının çeşitli ürünlere dönüştürülmeksizin doğrudan atıldığı belirtilmiştir [6]. Bu nedenle, etanol üretimi için ulaşılabilir olan peynir altı suyu kaynaklı laktoz miktarı yıllık 5 milyon tona ulaşabilir. Bu durumda 5 milyon ton laktozdan 2,7 milyon ton etanol elde edilebilir. Bu miktar, yaklaşık olarak 120 milyon ton olan 2016 dünya etanol üretiminin %1,35'ine denk gelmektedir [7].

Peniraltı suyu atık ürün olması nedeniyle, peynir altı suyundan etanol üretimi mısır gibi doğrudan yiyecek olarak tüketilen bitkilerin fermantasyonu ile etanol üretimine göre avantajlıdır. Fakat, peyniraltı suyunun doğrudan fermantasyonu, düşük laktoz derişimi nedeniyle düşük etanol derişimiyle sonuçlanır. Bu durumda, etanolün seyreltik fermantasyon suyundan ayrılmasında damıtma maliyetinin oldukça büyük olması nedeniyle peynir altı suyunun doğrudan fermantasyonu ile etanol üretimi ekonomik olarak uygulanabilir değildir.

Bu noktada, peynir altı suyunun kurutulması ile elde edilen peynir altı suyu tozunun etanol üretiminde kullanılması uygun seçeneklerden biridir. Ancak Peynir altı suyu proteinlerinin de geri kazanılması adına, peynir altı suyu proteininin genellikle ultrafiltrasyon yöntemiyle ayrılmasından sonra geriye kalan peynir altı suyu süzıntüsünün nanofiltrasyon ve ters ozmoz gibi membran sistemleri ile deriştirilerek veya pülverizasyonla toz haline getirilerek etanol üretiminde kullanılması elde edilen yüksek laktoz derişiminden dolayı daha uygun görölmektedir.

Bazı durumlarda mayaların şeker karışımları içinde katatabolit baskı nedeniyle laktozu tüketememeleri durumu söz konusu olsa da, seçenek olarak peynir altı suyunun şeker derişimi, peynir altı suyunun melaslar gibi şeker içeriği yüksek olan sıvılarla karıştırılması yoluyla artırılabilir. Bunların yanında, sürecin etanol üretkenliğinin en yüksek değere çıkarılabilmesi için fermentasyon hızlı gerçekleşmelidir. Sürecin amacının, hem peynir altı suyu içerisindeki değerli bileşenlerin mümkün olduğunca değerlendirilmesi hem de atık giderilmesi olması nedeniyle, peynir altı suyundan etanol üretiminde, etanol yüzdesi ve etanol üretim hızının en yüksek değere çıkarılması ile artık şeker derişiminin en aza indirilmesi arasında bir orta yol bulunması gerekir.

Bu tez çalışmasında fermentasyon ortamlarının hazırlanması için peynir altı suyunun ultrafiltrasyon sisteminden geçirilmesinden sonra peynir altı suyu süzöntüsünün pülverize edilerek toz haline getirilmesi ile elde edilen peynir altı suyu süzöntü tozu kullanılmıştır.

Laktozdan etanol üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudotropicalis* (*C. kefyr*) ve *Saccharomyces cerevisiae* isimli mayalardır. Bu mayalardan *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ve *C. pseudotropicalis* ile karşılaştırıldığında daha yüksek etanol toleransına sahiptir. Ancak *K. marxianus* ve *C. pseudotropicalis* laktozu doğrudan kullanabilirken, *S. cerevisiae* laktozu doğrudan kullanamaz. Bu nedenle laktozun enzim kullanılarak glikoz ve galaktoza parçalanmasını içeren bir ön hidroliz işlemi gerektirir. *S. cerevisiae* yüksek etanol toleransına sahip olmasına karşın, hidroliz işlemi için gerekli enzim maliyeti fazla olduğundan daha az tercih edilir. Bu çalışmada *K. marxianus* kullanılarak peynir altı suyu süzöntü tozundan etanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında laktoz derişimi, pH ve amonyum dihidrojen fosfat parametreleri incelenerek, peynir altı suyundan fermentasyon yolu ile etanol üretiminde en uygun koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Fermentasyon işlemi kesikli bir sistemde gerçekleştirilmiş, işlem süresince belirli aralıklarla örnekler alınarak laktoz derişimi ve etanol derişimi belirlenmiştir. Box-Wilson deneysel tasarım yöntemine göre yapılan çalışma, Design Expert programı ile istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Bu program ile seçilen parametrelerin etkinlik dereceleri belirlenmiş ve modelden elde edilen değerlerle deneysel sonuçlar karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Enerji Kaynağı Olarak Etanol

Etil alkol ve bitkisel alkol olarak da adlandırılan etanol, C_2H_5OH formülüyle gösterilen bir kimyasal bileşiktir. Etanol karakteristik kokusu olan, renksiz ve yanıcı bir sıvıdır. Kaynama noktası $78.4^{\circ}C$ ve ergime noktası $-112^{\circ}C$ olan etanolün $20^{\circ}C$ 'deki yoğunluğu $0,789\text{ g/mL}$ 'dir [8].

Etanol çeşitli kimyasal bileşikler, yapıştırıcılar ve dezenfektan maddelerin üretimine ek olarak ilaç, kozmetik ve plastik endüstrilerinde de yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, alkollü içeceklerde kullanılan tek alkol türüdür. Bunlar ek olarak, etanol Otto Çevrimi ile çalışan içten yanmalı motorlarda doğrudan yakıt olarak kullanılabildiği gibi, yüksek oktan değerinden dolayı benzin için oktan artırıcı katkı olarak da kullanılabilir. Etanolün yakıt olarak kullanımı durumunda, benzin karışımı içerisindeki etanol miktarı arttıkça, standart benzinli motorlar için uygunluğu azalmaktadır. Benzine %10-30 arası etanol karıştırılması durumunda motorda herhangi bir değişiklik yapılması gerekmezken, daha yüksek oranlarda motorda çeşitli tadilatların yapılması gerekir. Günümüzde benzine etanol karıştırılması konusundaki en yaygın uygulamalar E10 ve E85 olarak bilinen ve sırasıyla %10 ve %85 etanol içeren karışımlardır.

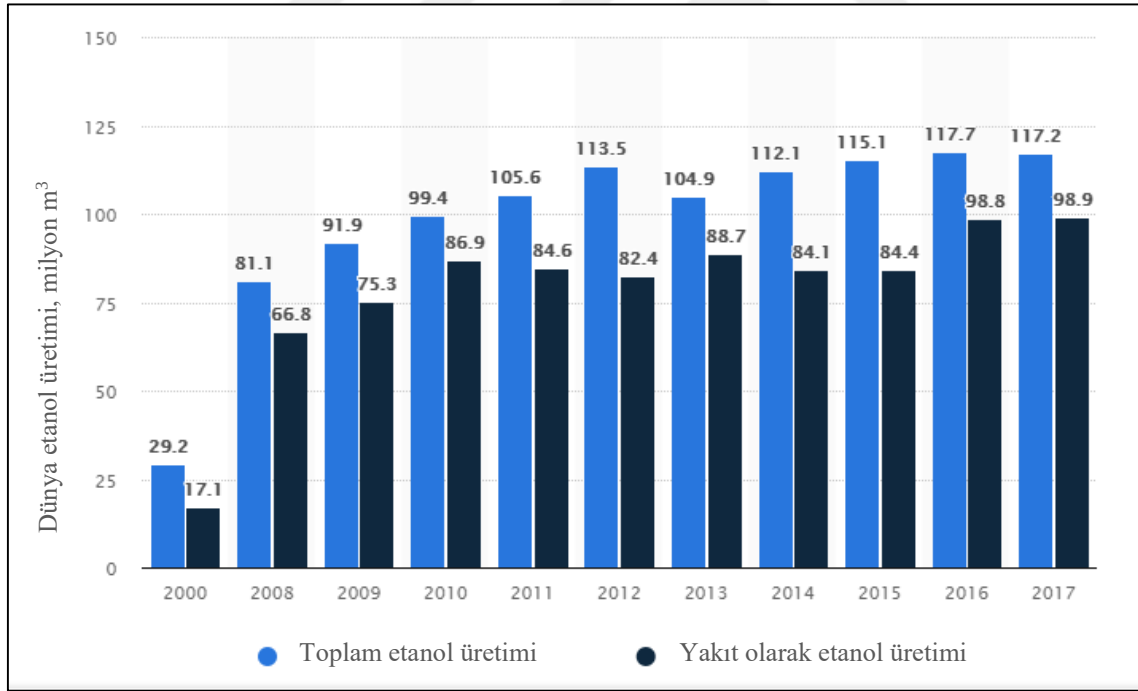
Yenilenebilir kaynaklar kullanılarak üretilmesi ve fosil yakıtlarda olduğu gibi çevre açısından zararlı bileşenler içermemesi sayesinde, etanolün doğrudan veya benzinle karıştırılarak yakıt amaçlı kullanımının, fosil yakıtların gün geçtikçe tükenmesinden kaynaklanan yetebilirlik ve artan fosil yakıt kullanımından kaynaklanan artan zararlı gaz yayılımı sorunlarına etkili bir çözüm sunacağı düşünülmektedir.

Endüstriyel etanol genel olarak petrol ürünlerinden, çoğunlukla etilenin, sülfürik asitle katalitik hidrasyonundan elde edilmektedir. Aynı zamanda, eten ya da asetilen aracılığıyla, kalsiyum karbit, kömür, doğal gaz ve diğer kaynaklardan da elde edilebilir. Buna ek olarak, özellikle şeker kamışı ve mısır olmak üzere, glikoz gibi karbonhidratlar içeren bitkilerden maya fermentasyonu yolu ile üretilir.

Günümüzde ABD dünyadaki en büyük etanol üreticisiyken, Brezilya dünya etanol üretiminde ikinci sıradadır. Dünya etanol üretiminin büyük bir bölümü ABD ve Brezilya tarafından gerçekleştirilmektedir.

Şekil 2.1’de 2000 yılından başlayarak 2017 yılına kadar olmak üzere dünya toplam etanol üretimi ile yakıt olarak kullanılmak üzere gerçekleştirilmiş olan toplam etanol üretimi verilmiştir [9]. 2017 dünya toplam etanol üretimi 117.2 milyon m³ olmakla birlikte, bunun 98.9 milyon m³’ü yakıt olarak kullanılmak üzere üretilmiştir.

Fosil yakıt kaynaklarının tükenmekte olması ve artan fosil yakıt kullanımı dolayısıyla ortaya çıkan çevresel sorunlar nedeniyle, yenilenebilir ve temiz kaynaklar kullanılarak elde edilen biyoyakıt üretiminin 2000 yılından itibaren dünya genelinde devlet politikaları ile teşvik edilmesinden dolayı, 2000 yılından bu yana etanol üretiminin önemli bir artış gösterdiği görülmektedir.



Şekil 2.1. 2000-2017 yılları arasında Dünya etanol üretimi [9]

Etanol üretiminde kullanılan hammaddelere göre genel olarak üç jenerasyona ayrılabilir [10].

Birinci jenerasyon etanol, mısır ve buğday gibi nişasta içerikli veya şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker içerikli bitkilerden üretilmektedir. Fakat, birinci jenerasyon etanol temel gıda olarak kullanılan ürünlerden üretildiği için, birinci jenerasyon etanol üretiminin sürdürülebilir olmadığı düşünülmektedir.

İkinci jenerasyon etanol üretiminde ham madde olarak lignoselülozik biyokütle kaynakları kullanılır. Lignoselülozik biyokütle, selüloz, hemiselüloz ve lignin birleşiminden oluşan karmaşık yapılu maddelerdir. Dal, sap saman gibi tarımsal atıklar, testere tozu, talaş gibi orman ürünleri atıkları, enerji ormanları ve kağıt endüstrisi atıkları genel olarak lignoselülozik biyokütleyi oluşturur. Selülozik etanol üretimi konusunda çok sayıda kayda değer yenilik olmasına rağmen, halen bazı engeller bulunmaktadır. Bunlardan ilki ön işlem aşamasında son derece büyük olan enerji ihtiyacıdır. İkinci olarak, kimyasal atık giderimi ve atık su arıtımı, ticari üretim söz konusu olduğunda iki kritik sorunu oluşturmaktadır. Üçüncü olarak hidroliz aşamasında kullanılan yüksek maliyetli enzimler selülozik etanol üretiminde ticarileşme aşamasında önemli bir engeli oluşturmaktadır. Son olarak lignoselülozik biyokütleden etanol üretiminde ulaşılabilen dönüşüm oranlarının düşük olması, selülozik etanol üretiminin ekonomik olarak uygulanabilir hale getirilmesi için, bu oranların çeşitli teknolojik gelişmelerle artırılmasını gerektirmektedir.

Diğer bir yandan, mikroalgler üçüncü jenerasyon etanol üretiminde kullanılan hammadde olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikroalgler, basit biyolojik yapıları nedeniyle ve düzensiz koşullarda bile diğer tüm tarımsal bitkilere kıyasla daha hızlı gelişebilirler. Mikroalg kaynaklı etanol üretiminde lignoselülozik kaynaklı etanol üretimine benzer bazı sorunlarla karşılaşılrsa da, mikroalglerin etanol üretiminde umut veren yeni bir kaynak olduğu düşünülmektedir.

Süt ürünleri ve özellikle peynir endüstrisi yiyecek endüstrisinin önemli bir bölümünü oluşturmakta ve kayda değer miktarda yüksek organik içerikli atık su üretmektedir. Peynir üretimi sırasında, peynirin ayrılması ile arta kalan peynir altı suyu peynir endüstrisinin başlıca yan ürünüdür.

Peynir altı suyunun temel bileşeni laktozdur ve yüksek laktoz içeriği gerektirdiği yüksek kimyasal oksijen ihtiyacından dolayı peynir altı suyunun oldukça kirli bir atık olmasına yol

açmaktadır. Buna ek olarak peynir altı suyu, kendisini çeşitli ürünlerin üretimi için besinsel açıdan zengin hale getiren proteinler, yağlar ve çeşitli mineralleri de içerir.

Yüksek laktoz içeriği ve yüksek kimyasal oksijen ihtiyacından kaynaklanan yüksek arıtım maliyetlerinden dolayı peynir altı suyunun etanol üretimi için hammadde olarak kullanılması, kirleticilik seviyesi çok yüksek olan peynir altı suyu bertaraf edilirken aynı zamanda dünyada artan bir talebe sahip, temiz ve çevre dostu bir seçenek yakıt olan etanol üretimi kapsamında avantajlı görülmektedir.

Biyoetanol kullanımı çevresel ve toplumsal açıdan pek çok üstünlüğe sahiptir. Bu üstünlükler aşağıda maddeler halinde listelenmiştir.

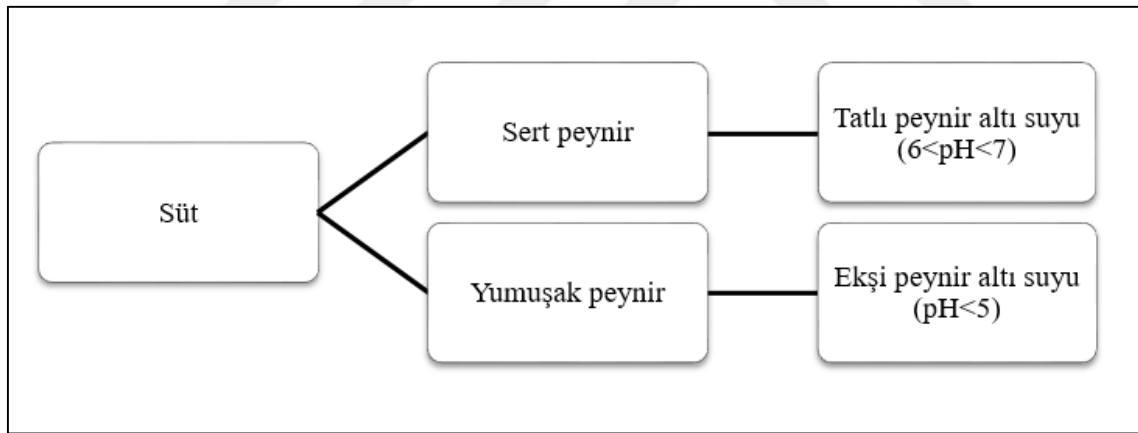
- Biyoetanol yakıt içindeki oksijen seviyesini artırarak yakıtın daha iyi yanmasını ve CO emisyonunun azalmasını sağlar.
- Yakıtlarda oktan artırmak için kullanılan, çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olan metil tersiyer bütül eter gibi maddelere seçenek çevre dostu bir oktan artırıcı olarak kullanılmaya uygundur.
- Ozon tabakasının delinmesi yolu ile küresel ısınmaya neden olan zararlı egzoz emisyonlarının azalmasını sağlar .
- Biyoetanol hammaddesi olarak kullanılan bitkilerin ekilmesini teşvik ederek bu bitkiler için enerji amaçlı tarımının gelişmesini sağlar.
- Yabancı kaynaklı fosil yakıtlara seçenek yerli, yenilenebilir, temiz ve çevre dostu bir kaynak oluşturur.
- Gün geçtikçe tükenmekte olan fosil yakıt rezervleri düşünüldüğünde, yenilenebilir kaynaklardan üretildiğinden üretim ve kaynak sıkıntısına yol açmaz [11].

2.2. Peynir Altı Suyu

Peynir altı suyu, peynir üretimi sırasında sütün enzim veya peynir mayasıyla kazeinlerinin çöktürülmesi veya asitlendirme yolu ile pıhtılaştırılmasından sonra arta kalan sarımsı-yeşil renkli, organik içerik bakımından zengin bir sıvıdır. Peynir altı suyunun sarımsı-yeşil rengi bileşiminde bulunan riboflavin (B2 vitamini) maddesinden kaynaklanmaktadır.

Peynir altı suyu genel olarak su, laktoz, proteinler, yağlar, çeşitli mineraller ve vitaminlerden oluşan önemli bir süt ürünleri endüstrisi yan ürünüdür. Peynir üretiminde kullanılan yöntemle ilgili olmakla birlikte peynir üretiminde kullanılan sütün kütleye %70-90'ı peynir altı suyu olarak alınmaktadır. Genel bir kabul olarak 1 kg peynir üretmek için 10 kg süt kullanılmakta ve 9 kg peynir altı suyu açığa çıkmaktadır.

Peynir altı suyunun bileşimi, kullanılan sütün kalitesine ve türüne, peynir yapımında uygulanan yöntemle ve sütün pıhtılaştırılmasında kullanılan maddenin asit veya maya enzimi oluşuna göre değişir. Peynir üretiminde kazeinin çöktürülme şekline göre ekşi peynir altı suyu ($\text{pH} < 5$) ve tatlı peynir altı suyu ($6 < \text{pH} < 7$) olmak üzere iki çeşit peynir altı suyu üretilir [12]. Peynir üretimi sırasında kazeinin çöktürülmesi maya enzimi yoluyla gerçekleştirilmesiyle yapılan sert peynir üretiminde tatlı peynir altı suyu elde edilirken, kazeinin asit ile çöktürülmesiyle yapılan yumuşak peynir (lor peyniri, krem peynir) üretiminde ekşi peynir altı suyu elde edilir. Şekil 2.2'de peynir altı suyu çeşitleri verilmiştir.



Şekil 2.2. Peynir altı suyu çeşitleri

2.2.1. Peynir altı suyunun bileşimi

Peynir altı suyunun %93-94'lük kısmı sudan oluşurken, geri kalanını genel olarak laktoz, protein, yağ, çeşitli mineraller ve laktik asit oluşturur. Peynir altı suyunun organik içeriğinin büyük bölümü (%90) laktozdan oluşurken, kalan kısmı ise temel olarak protein ve yağlardan oluşur [13].

Peynir altı suyu peynir üretiminde kullanılan sütün yaklaşık olarak hacimce %85-95'lik kısmını oluşturur ve süt içeriğinin %55'lik kısmını içerir. Peynir altı suyu genellikle temel olarak %4,5-5 laktoz, %0,6-0,8 protein, %0,4-0,5 yağ ve kuru kütlenin %8-10 kısmı kadar mineral tuzlarını ve az miktarda temel olarak B grubu vitaminlerinden oluşan çeşitli vitaminleri içerir. Ayrıca, peynir altı suyu içerisinde dikkate değer miktarda laktik asit, sitrik asit, üre ve ürik asit gibi protein kaynaklı olmayan azot bileşiklerini de bulunur [6]. Çizelge 2.1'de tipik peynir altı suyu bileşimi verilmiştir.

Çizelge 2.1. 100 ml peynir altı suyunun kimyasal bileşimi [14]

Bileşen	Miktar	Ölçü Birimi
Kuru madde	6,3-7,0	g
Yağ	0,05-0,4	g
Ham protein	0,85-1,15	g
Karbonhidrat	4,6-5,2	g
Kül	0,5-0,6	g
Laktoz	4,6-5,2	g
Laktik asit	0,05-0,2	g
Sitrik asit	0,14-0,17	g
Kazein	0,04-0,05	g
α -laktoglobulin	0,12	g
β -laktoglobulin	0,32	g
Serum albümün	0,40	g
İmmüoglobulinler	0,70	g
Na	36-51	mg
K	140-160	mg
Ca	40-50	mg
Mg	8-10	mg
Fe	0,10	mg
Cl	70-120	mg
P	40-55	mg
S	40-55	mg
Tiamin	0,03-0,05	mg
Riboflavin (B2)	0,1-0,16	mg
Piridoksin	0,04-0,07	mg
Vitamin C	0,9-1,5	mg
Vitamin A	0,002-0,004	mg

Peynir altı suyu proteinleri temel olarak β -Laktoglobulin, α -Laktalbumin, serum albümin, immünoglobülinler ve proteoz peptonlardan oluşmaktadır. Peynir altı suyu mineral tuzlarının %50 sinden fazlasını NaCl ve KCl tuzları oluştururken, geri kalan kısmını başlıca $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ olmak üzere çeşitli kalsiyum tuzları ve diğer tuzlar oluşturur. Ayrıca, peynir altı suyu içerisinde dikkate değer miktarda laktik asit, sitrik asit, üre ve ürik asit gibi protein kaynaklı olmayan azot bileşiklerini de bulunur.

2.2.2. Peynir altı suyu ve çevre kirliliği

Peynir altı suyu temel olarak içinde bulundurduğu laktoz nedeniyle yüksek organik içerikli bir atık sudur. Atık suların kirlilik derecesi belirlenirken biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve kimyasal oksijen ihtiyacını (KOİ) ifade eden değerler kriter olarak kullanılmaktadır. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) atık sudaki yükseltgenebilir maddelerin kimyasal yolla oksitlenmeleri için gerekli oksijen miktarını gösterirken, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ise atık sudaki organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından oksitlenmesi için gereken oksijen miktarını verir. Ham peynir altı suyunun BOİ değeri 30-50 g/L ve KOİ değeri 60-80 g/L olarak bilinmektedir [15].

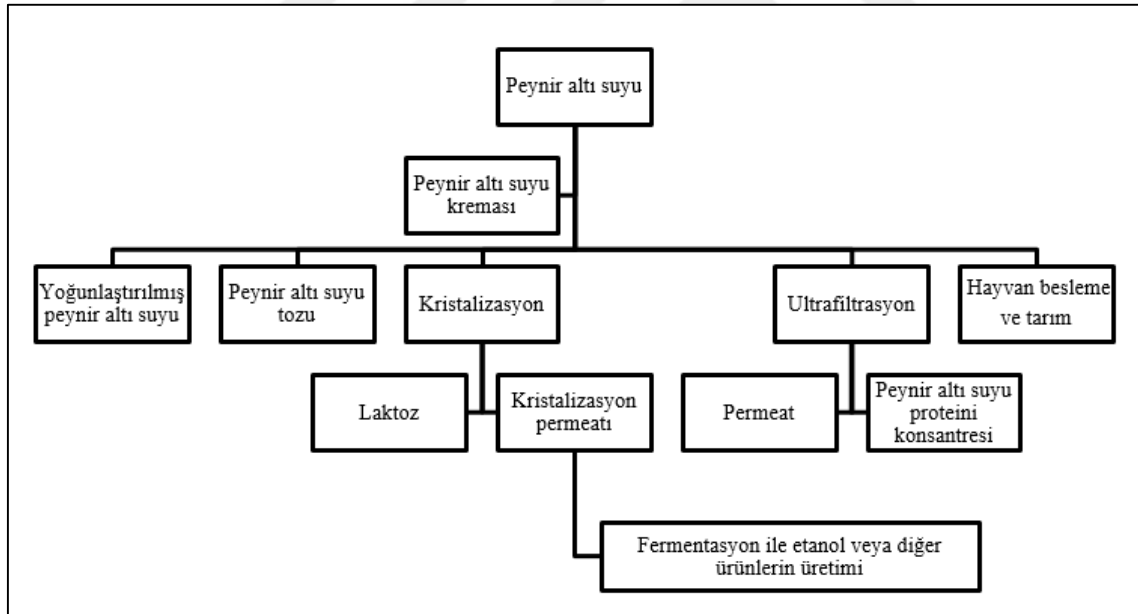
Peynir altı suyu yüksek BOİ ve KOİ değerlerinden dolayı yüksek kirliletilikte bir atık su türü olarak sınıflandırılmaktadır. Buna bağlı olarak, hiçbir işlem yapılmaksızın doğrudan atılması durumunda yüksek üretim hacmi ve yüksek organik içeriği nedeniyle çevresel sorunlara yol açmaktadır. Peynir altı suyu doğrudan doğal su sistemlerine karıştırıldığında, içerisindeki organik maddelerin oksitlenmesi için suda çözünmüş olan oksijen kullanılacağından, özellikle balıklar olmak üzere suda yaşayan canlılar ihtiyaçları olan oksijeni sağlayamaz ve bu durum ölümlerle sonuçlanır. Ayrıca suda çeşitli toksik maddelerin oluşmasına neden olan bazı alg ve bitki türlerinin ortaya çıkmasına ve gelişmesine ortam hazırlanmış olur.

2.2.3. Peynir altı suyunun endüstriyel olarak değerlendirilmesi

Geçmişte peynir altı suyunun giderilmesi için kullanılan yollar akarsulara, göllere, denizlere veya okyanuslara boşaltmak, mağaralara akıtmak, tarlalara yaymak veya hayvan beslemede kullanmak üzerineydi. Başka bir seçenek ise, peynir altı suyunu oksidasyon için lagünlere veya kanalizasyon sistemlerine boşaltmaktır, fakat peynir altı suyunun yüksek

BOİ ve KOİ değerleri genellikle sistemlerin aşırı yüklenmesine yol açmaktadır. Peynir altı suyunun bu şekilde atılması içerisindeki değerli ürünlerin israf olmasına neden olurken, genellikle tüm elleçleme ve taşıma işlerini üstlenen peynir üreticileri için iş gücü gerektirir ve maaliyetlidir. Bu nedenle, bu çözümler peynir altı suyunun giderilmesi için tatmin edici görülmemektedir. Peynir altı suyunun bgiderilmesi konusunda etkili çözümler geliştirebilmek için peynir altı suyu büyük katma değer potansiyeli göz önünde tutularak, sadece bir atık değil kaynak olarak ele alınmalıdır.

Dünya peynir altı suyunun yaklaşık % 50'sinin çeşitli gıda ürünlerine dönüştürüldüğünü bilinmektedir [6]. Atık giderilmesi konusundaki ağırlaştırılmış yasal düzenlemeler nedeniyle peynir üreticileri üzerinde artan baskıdan dolayı peynir altı suyunun değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmaların yaygınlaşması sayesinde bu yüzdenin artması beklenmektedir. Şekil 2.3'te peynir altı suyundan üretilen temel ürünler ve yaygın kullanım alanları gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Peynir altı suyundan yaygın olarak üretilen ürünler ve kullanım alanları

2.2.4. Peynir altı suyunun sıvı olarak kullanımı

Peynir altı suyu yüksek kalitedeki protein ve laktoz içeriğinin yanı sıra, Kalsiyum, fosfor, kükürt gibi çeşitli mineraller ve suda çözünen bazı vitaminler sağlar. Bu nedenle, hiçbir işlem yapılmadan suya karıştırılarak veya doğrudan hayvan beslemede kullanılmaktadır,

fakat içesisindeki yüksek laktoz ve mineral oranları peynir altı suyunun hayvan beslenmesinde kullanımını kısıtlayan etkenlerdir.

Hayvan beslenmesine ek olarak peynir altı suyu tarımsal gübre olarak da kullanılmaktadır. Peynir altı suyunun tarımsal gübre olarak kullanılmasında karşılaşılan sorun ise toprakta tuz tortularının birikmesine sebep olmasıdır.

Her iki durumda da taşıma maliyetinin oldukça yüksek olmasından dolayı peynir altı suyunun sıvı olarak kullanılması sınırlıdır ve peynir altı suyunun değerlendirilmesinde diğer seçenekler ön plana çıkmaktadır.

2.2.5. Peynir altı suyunun yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu olarak kullanımı

Yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu; peynir üretimi sırasında pıhtıdan ayrılan peyniraltı suyundan suyun kısmen uzaklaştırılmasıyla elde edilen ürünlerdir.

Yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu genel olarak peynir altı suyu içerisindeki suyun büyük bölümünün vakumda buharlaştırılarak uzaklaştırılmasının ardından püskürtme yöntemi ile kurutulması yoluyla üretilir.

Üretilen peynir altı suyunun büyük bir bölümü yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu üretmek üzere kurutulmaktadır. Bu sayede taze peynir altı suyu kalitesini daha uzun süre koruyarak, taşınması kolaylaşır.

Yoğunlaştırılmış peynir altı suyu ve peynir altı suyu tozu melas ve soya unuyla karıştırılarak daha çok hayvan beslemek için kullanılırken, yoğurtlar, bebek mamaları, dondurmalar, unlu mamüller, soslar, çorbalar ve çeşitli içeceklerin üretiminde yaygın olarak kullanılır.

2.2.6. Peynir altı suyunun peynir altı suyu proteini konsantresi olarak kullanımı

Peynir altı suyunun değerlendirilmesi ile ilgili çoğu sürecin ilk basmağı protein kısmının geri kazanılmasından oluşur.

Besin değeri oldukça yüksek olan, sağlık açısından raporlanmış yararları ve tedavi edici potansiyeli olan peynir altı suyu proteinleri süt proteinlerinin yaklaşık olarak %20'sini içerir. Bu proteinlerin başlıcaları β -Laktoglobulin (%50), α -Laktalbumin (%12), immünoglobülinler (10%), serum albumin (5%) ve proteoz peptonlardır (%0.23) [6].

Peynir altı suyu proteinlerinin ayrılması için yiyecek-içecek endüstrisinde çok sayıda uygulama alanı olan peynir altı suyu proteini konsantresi elde etmek üzere genellikle ultrafiltrasyon veya diafiltrasyon işlemleri uygulanır.

Ultrafiltrasyon, sıvıların hidrostatik basınç ile yarı geçirgen membrana karşı itildiği bir çeşit membran filtrasyonudur. Ultrafiltrasyon temel olarak, basınçla çalışan eleme ilkesi ile yönetilen ve parçacık boyutuna bağlı ayırma sürecidir. Düşük basınç altında büyüklüklerine göre seçilmiş maddeler ayrılır. Diafiltrasyon ise ultrafiltrasyon sonrası elde edilen sıvının sulandırılarak ultrafiltrasyona benzer bir işlemle derişiminin daha da artırılması işlemidir.

Yiyecek-içecek endüstrisine ek olarak, peynir altı suyu proteinlerinin kozmetik ve ilaç endüstrisinde de gıda dışı uygulama alanları vardır.

2.2.7. Peynir altı suyundan laktoz üretimi

Peynir altı suyu proteini konsantresi üretimi için peynir altı suyunun işlenmesi sırasında peynir altı suyu süzüntüsü olarak adlandırılan büyük hacimde laktoz açısından zengin bir sıvı akımı da elde edilir. Süzüntü peynir altı suyunun katı kütlesinin yaklaşık olarak %70 gibi büyük bir bölümünü oluşturan laktozu içerdiği için çevre açısından oldukça kirleticidir. Bu yüzden, süzüntü yüksek üretim hacmi ve kirletici olması nedeniyle neredeyse ham peynir altı suyunda olduğu kadar giderim sorunlarına yol açmaktadır.

Çoğu memelinin sütünde bulunan bir şeker türü olan laktoz, galaktoz ve glikozdan oluşan bir disakkarittir ve kimyasal olarak $O\text{-}\beta\text{-D-galaktopiranosil-(1-4)-}\beta\text{-D-glukoz}$ şeklinde, $C_{12}H_{22}O_{11}$ formülüyle tanımlanmıştır.

Laktozun hidroliz ürünleri olan galaktoz ve glikoz ile olduğu kadar fruktoz ve sakkaroz isimli diğer şekerlerle karşılaştırıldığında, laktozun çözünürlüğü ve tatlandırıcılığı daha düşüktür.

Üretilen laktozun büyük bir kısmı peynir altı suyu veya peynir altı suyu süzöntüsünden kristalizasyon yolu ile geri kazanılarak elde edilir. Laktozun başlıca kullanım alanları; yiyecek-içecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak, ilaç endüstrisinde tabletler için dolgu veya kaplama maddesi olarak ve katma değer laktoz türevlerinin (örneğin laktuloz, laktitol, laktobiyonik asit, laktoz üre, galakto-oligosakkaritler ve laktosükroz) üretimi için hammadde olarak kullanımıdır. Hidrolize edilmiş laktoz çözeltileri laktoza göre daha fazla tatlandırıcı güce sahiptir ve özellikle şekerleme ve dondurma endüstrisinde olmak üzere gıda endüstrisinde sakkaroz veya nişasta şurubu yerine kullanılır. Hidroliz edilmiş laktoz şurubu teknolojisi iyi gelişmiş ve kullanılmakta olan bir teknolojidir, örnek olarak laktoz intoleranslı bireyler için laktozsuz süt ürünlerinin üretilmesinde kullanılır. Düşük pH (<1.5) ve yüksek sıcaklıkta (150 °C'ye kadar) laktozun kimyasal hidrolizi mümkündür, ancak enzimatik hidroliz genellikle tercih edilen yöntemdir. *Aspergillus* ve *Kluyveromyces* türlerinin enzimleri en yaygın olarak kullanılan enzimlerdir.

2.2.8. Peynir altı suyundan fermentasyon yoluyla çeşitli bileşiklerin üretimi

Peynir altı suyu veya süzöntü içindeki laktoz için bir başka önemli uygulama fermentasyon yoluyla değerli bileşiklerin üretimi için substrat olarak kullanımıdır. Biyoteknologların sunduğu çok sayıda seçenekle birlikte, bu değerli bileşiklere en bilindik örnekler maya bazlı biyoprosesler ile etanol, biyogaz ve tek hücreli protein üretimidir.

Peynir altı suyu veya süzöntü içindeki laktozdan üretilen diğer biyoürünler biyogaz (metan), organik asitler (asetik, propionik, laktik, sitrik, glukonik, itakonik ve gibberelic), amino asitler (glutamik, lizin ve treonin), vitaminler (Sırasıyla B12 ve B2 veya kobalaminler ve riboflavin), polisakkaritler (ksantan zımkı, dekstran, fosfomannan, pullulan ve gellan), yağlar (lipitler), enzimler (β -galaktosidaz ve poligalaktorunaz) ve diğer bileşiklerdir (fruktoz-difosfat, 2,3-bütandiol, kalsiyum magnezyum asetat, amonyum laktat, butanol ve gliserol).

Laktoz doğrudan laktoz kullanan mikroorganizmalar tarafından veya seçenek olarak hidrolize edilmiş laktoz çözeltilisinin substrat olarak kullanılmasıyla laktoz negatif mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir.

Büyük miktardaki peynir altı suyu fazlası ile birlikte ucuz ve kolay ulaşılabilir hammadde arayışı ve her şeyin ötesinde, mikrobiyal biyoteknolojideki hızlı ilerlemelerin peynir altı suyu laktozunun katma değerli ürünlerin üretilmesinde fermantasyon hammaddesi olarak kullanımını yaygınlaştıracakı düşünülmektedir.

2.3. Peynir Altı Suyundan Etanol Üretimi

Fermantasyon çeşitli mikroorganizmalar tarafından genellikle glikozun oksijensiz koşullar altında hücresel enerji üretmek üzere organik asitler ve alkollere dönüştürülmesini içeren biyokimyasal bir süreçtir. Fermantasyon tepkimeleri glikoliz ve son ürün oluşum aşaması olmak üzere iki temel aşamada gerçekleşmektedir. Glikoliz aşamasında glikoz hücre sitoplazmasındaki enzimler sayesinde piruvik asite kadar parçalanır ve gerekli enerji bu aşamada elde edilir. Enerji üretimi olmayan fakat glikoliz aşamasında indirgenen NAD^+ koenzimlerinin tekrar yükseltgenerek hidrojen tutabilecek hale yani NADH koenzimlerine dönüştürülmesi amacıyla gerçekleştirilen son ürün oluşum aşamasında, glikoliz aşamasında oluşan piruvik asit canlı türüne bağlı olarak çeşitli ürünlere (sitrik asit, laktik asit, asetik asit, bütirik asit, hidrojen, aseton, etanol vb.) dönüştürülür. Fermantasyon yapan tüm mikroorganizmalar yaşamını sürdürebilmek için enerji üretmek zorundadır ve glikoliz aşaması fermantasyon yapan tüm hücrelerde aynı şekilde gerçekleşir. Son ürün oluşum aşamasında, glikoliz aşamasında açığa çıkan piruvatın ne tür kimyasal değişimler geçirerek ne tür ürünlere dönüşeceği ise hücrede bulunan enzimler tarafından belirlenir.

Fermentasyon çeşitleri oluşan son ürüne göre isimlendirilir. Etanol fermantasyonunda, glikoliz aşamasında açığa çıkan piruvik asitin, son ürün oluşum aşamasında etanol ve CO_2 'ye dönüşümü gerçekleşmektedir.

Mikroorganizmalardan çok sayıda bakteri ve maya fermantasyon sırasında ana fermantasyon ürünü olarak etanol üretebilir. Endüstride etanol fermantasyonu için kullanılan mikroorganizmalar genel olarak maya türleridir. Etanol üretimi için en yaygın kullanılan maya türü yüksek etanol toleransından dolayı *Saccharomyces cerevisiae* iken, *Zymomonas mobilis*, *E. Coli*, *Kluyveromyces* türleri etanol fermantasyonunda kullanılan diğer mikroorganizmalardır.

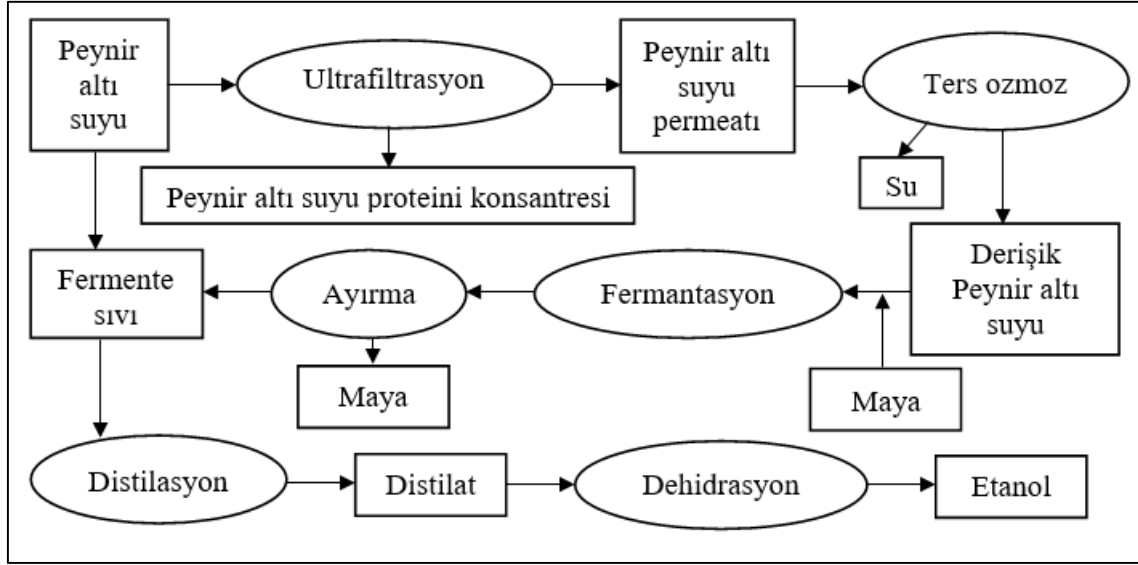
Yüksek laktoz içeriği ve yüksek üretim hacmi ile yüksek organik içeriğinden kaynaklanan giderim sorunları nedeniyle peynir altı suyu, fosil yakıtlara göre temiz ve yenilenebilir bir yakıt olan etanol üretimi için hammadde olarak kullanılmaya uygundur. Peynir altı suyu içerisindeki laktozdan çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak fermantasyon yolu ile etanol üretilir.

Eşitlik 2.1'e göre kuramsal olarak 1 kg laktozdan 0,54 kg etanol üretilbileceğinden, 1 litre saf etanol üretmek için, laktoz içeriğinin %4,4 olduğu düşünülerek 42 ton peynir altı suyu gerekir.



Çoğunlukla çeşitli maya türleri ve bazı bakteriler olmak üzere fermantasyon yoluyla etanol üretebilen çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır. Laktozdan etanol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar *Kluyveromyces* türü mayalar (*K. lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*) ile, *Candida pseudotropicalis* (*C. kefir*) ve *Saccharomyces cerevisiae* isimli mayalardır.

Tüm peynir altı suyundan etanol üretimi süreçleri benzer temel basamakları ve işlemleri içermektedir. Şekil 2.4'te temel basamaklarıyla peynir altı suyundan etanol üretim süreci gösterilmiştir. Sürecin ilk basamağında ultrafiltrasyon işlemiyle peynir altı suyu proteinleri peynir altı suyundan ayrılarak peynir altı suyu süzüntüsü elde edilir. Daha sonra elde edilen peynir altı suyu laktoz derişimini artırmak amacıyla, ikinci basamakta ters ozmoz işlemiyle deriştirilerek derişik peynir altı suyu süzüntüsü elde edilir. Bir sonraki basamakta mayalar fermantasyon ortamına eklenerek, karışım fermantasyon sistemine gönderilir. Fermantasyon gerçekleştikten sonra mayalar ayrılır ve geri kalan sıvıya damıtma işlemi uygulanır. Son olarak damıtığa dehidrasyon işlemi uygulanarak etanol elde edilir.



Şekil 2.4. Peynir altı suyundan etanol üretim süreci

Ticari olarak peynir altı suyundan etanol üretimi yapan ilk tesis Carbery Group tarafından 1978 yılında İrlanda’da kurulmuştur. Tesis içilebilir alkol üretmek üzere kurulmuş olsa da, 1985 yılında yakıt etanol üretmeye başlamıştır. Carbery süreci Yeni Zellanda ve ABD’deki tesislerde de kullanılmıştır [16].

Endüstride etanol fermentasyonu kesikli, beslemeli-kesikli ve sürekli işlemlerle gerçekleştirilmektedir. Sözü geçen her bir işlemin kullanılan hammadde ve mikroorganizma türüne bağlı olarak çeşitli üstünlük ve sakıncaları vardır.

Fermentasyon bitiminde santrifüj yöntemiyle hücrelerin toplanarak bir sonraki fermentasyonda tekrar kullanılmak üzere geri kazanılmasını sağlayan hücre geri kazanımı işlemleri beslemeli ve kesikli sistemlerin her birine uygulanabilir. Hücrelerin geri kazanım yoluyla tekrar kullanılması hücre çoğaltma ihtiyacını azaltmasının yanı sıra hücre oluşumu ve büyümesi için harcanan şeker miktarının da azalmasını sağlar.

Beslemeli-kesikli işlem, yüksek derişimli substrat çözeltisinin yavaş olarak beslenmesine olanak vermesi sayesinde substrat inhibisyonunun giderilmesini sağlaması açısından kesikli ve sürekli işlemlere göre daha üstündür.

Diğer bir yandan, sürekli işlemler besleme şeker derişimi ve hidrolik alıkoyulma sürelerinin ayarlanmasına olanak vermesi sayesinde ürün derişiminin kontrol edilmesini sağlaması ve ürün kalitesinin korunması açısından kesikli işlemlere göre üstündür.

2.4. Besiyerleri

Mikroorganizmaların gelişmesi ve çoğalması için özel olarak hazırlanan ve gerekli olan tüm besinleri içeren ortamlara besiyeri denir. Besiyeri içinde bulunan maddeler gelişme ve çoğalma için gerekli olan maddeler, inhibitörler ve diğer maddeler olarak sınıflandırılabilir. Besiyerinin bileşiminde genel olarak su, peptonlar, maya özütü, malt özütü, et özütü, beyin ve kalp özütü, agar, karbonhidratlar, tuzlar, tampon maddeler ve çeşitli indikatörler bulunabilir [17].

Su

Besiyeri hazırlamak için kullanılacak olan suyun deiyonizasyon veya damıtma ile taze olarak hazırlanması ve mikroorganizmalara zarar verebilecek toksik maddeleri içermemesi gerekir [17].

Peptonlar

Peptonlar proteinlerin hidroliz edilmesi ile elde edilen maddelerdir. Mikroorganizmaların büyük bir bölümü proteinleri doğrudan azot kaynağı olarak kullanamazlar. Bu nedenle, mikroorganizmaların gereksinim duydukları azotu daha kolay almalarını sağlamak amacıyla besiyerlerinde yaygın olarak kullanılır [17].

Azot kaynağı olarak kullanılmasının yanında, peptonlar mikrororganizmalar tarafından karbonhidrat kaynağı olarak da kullanılır. Buna ek olarak, peptonların içeriğindeki çeşitli aminoasitler ve vitaminler mikroorganizmaların gelişmesini ve çoğalmasını olumlu yönde etkiler [17].

Peptonlar hayvansal doku, süt veya soya kaynaklı olabilir. Hazırlanacak besiyerinin kullanım amacına göre farklı özellikteki peptonlar kullanılabilir [17].

Maya özütü

Maya özütü bira mayası veya ekmek mayası olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae*'nin proteinleri hidrolizleyen ve sindiren enzimler tarafından parçalanması ve sonrasında sulu özütlenme yöntemi ile elde edilen bir maddedir [17].

İçeriğinde bulunan aminoasitler, peptitler, karbonhidratlar, vitaminler ve mineraller sayesinde mikroorganizmaların gelişmesi ve çoğalmasını olumlu yönde etkilediğinden besiyeri hazırlamada yaygın olarak kullanılır [17].

Malt özütü

Malt özütü bira üretiminde kullanılan arpanın çimlendirilmesi ve kurutulması yolu ile üretilen malttan elde edilen bir maddedir. Özellikle maltoz olmak üzere yüksek karbonhidrat derişiminden dolayı gelişimi olumlu yönde etkilediğinden maya ve küfler için hazırlanan besiyerlerinde tyaygın olarak kullanılır [17].

Et özütü

Yağı ve kasları ayrılmış etin hidrolize edildikten sonra özütlenmesi ile elde edilen bir maddedir. Karbonhidrat içermediğinden karbonhidratlardan asit oluşturma testlerinde pepton gibi maddelerin yerine kullanılır [17].

Beyin ve kalp özütü

Beyin ve kalp özütü geliştirilmesi zor olan çeşitli patojen bakterilerin geliştirilmesi ve çoğaltılması için hazırlanan besiyerlerinde kullanılır [17].

Agar

Çeşitli türlerdeki kırmızı deniz yosularından elde edilen ve bileşimindeki D-galakton sayesinde besiyerlerinin katılaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Besiyerine sadece katılaştırma amaçlı katılır ve çoğunlukla mikroorganizmalar tarafından besin olarak kullanılmaz [17].

Karbonhidratlar

Karbonhidratlar mikroorganizmalar için enerji ve karbon kaynağı olarak besiyerlerinde kullanılır. Buna ek olarak, karbonhidratlardan asit oluşturma temeline dayanan tanımlama testlerinde kullanılan besiyerlerinde karbonhidratlardan yararlanır [17].

Glikoz, laktoz ve sakkaroz besiyerlerinin hazırlanmasında enerji ve karbon kaynağı olarak sıklıkla kullanılan karbonhidratlardır [17].

Tuz

NaCl genellikle besiyerlerinde izotonik bir ortam oluşturmak için kullanılır. Buna ek olarak, tuza dayanıklı ve tuz seven mikroorganizmaların seçici olarak izole edilmesi için besiyerlerinde yüksek oranda NaCl kullanılır [17].

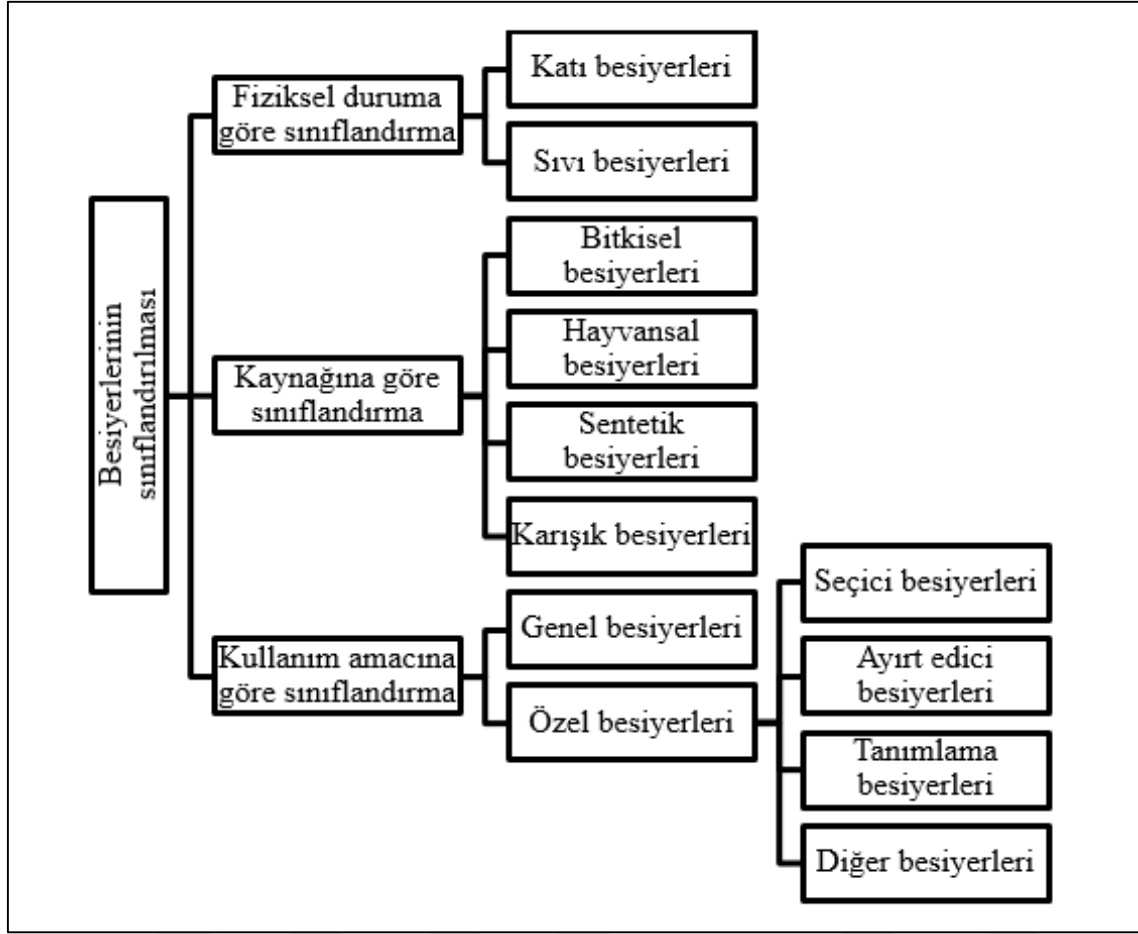
Tampon maddeler

Mikroorganizmalar çoğunlukla pH olarak nötr ortamlarda geliştirilseler de, bazı mikroorganizmalar asidik bazıları ise bazik ortamlarda gelişir. Tampon maddeler besiyerinin pH'sını korumak için kullanılır. Besiyerinin asidik veya bazik hazırlanması, besiyerine seçicilik özelliği kazandırmak için yaygın olarak uygulanır [17].

İndikatörler

Mikroorganizmaların gerçekleştirdiği metabolik faaliyetler sonucu açığa çıkan ürünlerin belirlenmesi yolu ile mikroorganizmaların tanımlanması için besiyerlerinde pH indikatörleri, redoks indikatörleri ve diğer indikatörler olmak üzere çok sayıda indikatör kullanılır [17, 18].

Besiyerleri fiziksel özelliklerine göre katı ve sıvı besiyerleri olarak sınıflandırılabilir gibi, kaynağına bağlı olarak bitkisel, hayvansal, yapay ve karışık besiyerleri olarak da sınıflandırılabilir. Ancak besiyerlerinin sınıflandırılmasında en çok kullanılan yöntem, kullanım amacına göre sınıflandırmadır. Şekil 2.5'te besiyerlerinin sınıflandırılması gösterilmiştir [17, 18].



Şekil 2.5. Besiyerlerinin sınıflandırılması [17, 18]

Laboratuvarlarda kullanılan besiyerlerinin büyük bir bölümü suyu alınmış formdan hazırlanır. Gereken miktarda maddeler tartılarak bir behere alınır ve üzerine deiyonize veya damıtık su eklenir. Maddeler karıştırılarak çözündükten sonra, cam tüpler veya petri kapları gibi uygun yerlere alınarak genellikle otoklavda 121 °C sıcaklıkta 15-20 dk boyunca sterilizasyon gerçekleştirilir [18].

Besiyeri hazırlamada kullanılacak cam kaplar besiyerine herhangi bir istenmeyen maddenin karışmasını önlemek açısından iyice yıkanmış ve deiyonize veya damıtık sudan geçirilmiş olmalıdır. Bu cam kaplar etüvde veya otoklavda yüksek sıcaklıkta sterilizasyona dayanabilecek ölçüde kaliteli olmalıdır. Ekimin yapılacağı cam kaplar sterilizasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için besiyeri hacmi ile karşılaştırıldığında yeterince büyük olmalıdır. Genel bir kabul olarak kullanılacak cam kapların hacmi eklenecek besiyeri hacminin yaklaşık olarak iki katı olmalıdır [18].

Besiyeri sıvı ise gerekli maddeler deiyonize veya damıtık su ile çözüldükten sonra doğrudan sterilize edilebilir. Ancak hazırlanacak besiyeri agarlı ise, sterilizasyondan önce mutlaka besiyeri içindeki agar iyice eriyip dağılana kadar 50-55 °C sıcaklıkta sürekli olarak karıştırılmalıdır [18].

2.5. Peynir Altı Suyundan Fermantasyon ile Etanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Alkolik fermantasyon, peynir altı suyundan peynir altı suyu proteinlerinin ayrılmasından sonra arta kalan ve çevre açısından kirletici olan peyniraltı suyu süzütüsünün giderilmesi için ilgi çekici bir seçenektir. Penir altı suyu laktozunun mayalar kullanılarak etanole fermantasyonu konusu 1940'lardan beri literatürde sıkça dile getirilmiştir. Laktozu aerobik olarak asimile eden mayalar yaygın olmasına rağmen, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* ve *Candida pseudotropicalis* gibi laktozu fermente eden mayalar nadirdir.

Peynir altı suyundan fermantasyon yolu ile biyoetanol üretimi için yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar genellikle maya türleridir. Mayalar genellikle tek hücreli olmak üzere bazı türleri çok hücreli olabilen okaryotik yapıdaki canlılardır [19].

Mayalar zorunlu olarak aerobik veya istemli olarak anaerobik olabilirler. Mayalar oksijen azlığında karbonhidratları karbondioksit ve etanole veya laktik asite dönüştürerek enerji üretirler. Mayalar tomurcuklanma yolu ile eşeysiz olarak üreyebildikleri gibi askospor oluşumu ile eşeyli olarak da üreyebilirler [19].

Mayaların büyüme ve gelişmesine etki eden pek çok etken bulunmaktadır. Bu etkenler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Mayaların büyümesi, gelişmesi, çoğalması ve diğer faaliyetlerini düzgün bir şekilde sürdürebilmeleri için ortamda yeterli miktarda su olmalıdır. Mayalar için genellikle %30-40 oranında su içeren ortamlar uygundur.
- Mayalar oksijen varlığında ve yokluğunda yaşamlarını sürdürebilen canlılardır. Oksijen varlığında faaliyetleri için gerekli olan enerjiyi oksijenli solunum yolu ile karşılarken, ortamda oksijenin az bulunduğu durumda fermantasyon yolu ile enerji üretirler. Bu durumda, fermantasyon işleminin gerçekleşmesi için ortamdaki oksijen miktarının doğru bir şekilde ayarlanması önemlidir. Ortamdaki oksijenin gerekenden fazla olması

mayaların karbonhidrat kaynağını biyokütle artışı için kullanmasına dolayısı ile fermantasyon veriminin düşmesine yol açar.

- Mayalar geniş bir pH aralığında çalışmalarına rağmen genellikle zayıf asidik ortamlarda (pH: 4,5-5) faaliyetlerini daha iyi gerçekleştirirler.
- Mayaların faaliyetlerini düzgün bir şekilde sürdürebilmeleri için önemli olan parametrelerden biri de sıcaklıktır. Mayalar genel olarak 0-45 °C arasındaki sıcaklıklarda yaşayabilirler. Fermantasyon işlemi için en uygun sıcaklık üretilmesi amaçlanan ürüne ve kullanılan maya çeşidine bağlıdır.
- Mayaların çoğalmasında ve faaliyetlerini düzgün bir şekilde yerine getirmesinde etkili olan parametrelerden biri de ortamda çözünmüş tuz ve şeker derişimidir. Maya çeşidine bağlı olarak şeker derişimi belirli bir değerin üzerine çıktığında oluşan fermantasyon ürününün de etkisi ile maya hücresi suyunu kaybetmeye başlayarak plazmolize uğrar ve nihayetinde hücre ölür.
- Etanol, karbondioksit gibi metabolik ürünler mayaların gelişmesi ve faaliyetlerini sürdürmesi üzerinde olumsuz etkiye yol açarak fermantasyon hızında düşüşe neden olur.
- Son olarak güneş ışığı maya gelişimi üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Bu yüzden fermantasyon ortamının doğrudan güneş ışığı almaması önemlidir [20].

Peynir altı suyundan fermantasyon yolu ile biyoetanol üretimi için yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar *Kluyveromyces*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida pseudotropicalis* isimli maya çeşitleridir.

C. pseudotropicalis ve *Kluyveromyces* türleri laktozu doğrudan metabolize edebilirken, *Saccharomyces cerevisiae*, laktozu doğrudan metabolize edemez. Bu nedenle, öncelikle laktozun *Saccharomyces cerevisiae* tarafından metabolize edilebilen glikoz ve galaktoza hidroliz edilmesi gerekir.

2.5.1. *Kluyveromyces* türleri

Kluyveromyces türleri laktozu doğrudan metabolize edebilirler. Bu yetenek β -galaktosidaz enziminin varlığından ileri gelmektedir. β -galaktosidaz laktozu glikoz ve galaktoza hidroliz eder. Yani *Kluyveromyces* türleri laktoz fermentasyonunda kullanıldığında, fermentasyonun gerçekleşebilmesi için ayrı bir hidroliz işlemine gerek yoktur.

K. lactis Kluyveromyces türleri içerisinde en çok çalışılan maya türlerinden biridir ve özellikle *S. Cerevisiae* gibi "konvansiyonel olmayan" mayaların moleküler fizyolojisi üzerine çalışmalar için model sistem haline gelmiştir.

Kluyveromyces türleri içerisinde *K. lactis* model organizma olarak kabul edilmesine karşın, *K. lactis* ile karşılaştırıldığında öne çıkan bazı avantajlarından dolayı *K. Marxianus* daha çok ilgi görmüştür. *K. lactis*'in aksine, *K.marxianus* üzerindeki bilgi birikiminin daha az olmasına rağmen, literatürde *K. marxianus*'un biyokimyasal, metabolik ve fizyolojik yönlerini içeren kayda değer sayıda çalışma bulunmaktadır.

Literatürde *Kluyveromyces* mayalarını kullanarak gerçekleştirilen laktoz/peynir altı suyu alkolik fermentasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma vardır ve bunların büyük kısmında *K. marxianus* ve *K. fragilis* isimli mayalar öne çıkmaktadır. *K. marxianus* ve *K. fragilis*'in geçmişte uzun süre boyunca farklı türler olarak bilinmesine karşın, günümüzde *K. fragilis* *K. marxianus* türünün içine dahil edilmiştir.

Literatürde pek çok yazar, derişik laktoz/peynir altı suyu fermentasyonunda başlangıç derişiminin genellikle 150 g/L veya bazı durumlarda 200 g/L üzerinde olması durumunda, özellikle düşük fermentasyon hızı ve atıkta yüksek şeker derişimi gibi inhibitör etkiler ve bunlarla ilgili sorunlar raporlamıştır [12]. Bu sorunlar ozmotik duyarlılık (yüksek laktoz derişimi nedeniyle) ve düşük etanol toleransının yanı sıra yüksek tuz derişimi nedeniyle inhibisyon durumlarına bağlanmıştır. Fermentasyon koşulları ile oksijen ve diğer bileşenlerin varlığı durumlarının laktoz fermentasyonunda önemli bir rol oynamasına rağmen, bu etkilerin kapsamının çoğunlukla maya türleri ile ilgili olduğu görülmektedir. Beslemeli-kesikli fermentasyon sisteminin uygulanmasının substratın inhibisyon problemlerinin giderilmesine yardımcı olabileceği düşünülürken, etanol inhibisyonu çeşitli besinsel takfiyeler ile hafifletilebilir. Seçenek olarak, tür geliştirme programları ile ozmotik ve/veya etanol streslerine karşı gelişmiş toleranslı dayanıklı maya türleri geliştirilebilir.

Kargi ve Ozmihci (2006) tarafından yapılan çalışmada başlangıçtaki pH, laktoz derişimi ve dış besin (N ve P) katkısının *Kluyveromyces marxianus* NRRL kullanılarak gerçekleştirilen peynir altı suyu tozu çözeltisinin etanol fermentasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Başlangıç pH'sı 3 ile 7 arasında değişmiş ve en uygun başlangıç pH değeri 5 olarak

bulunmuştur. Peynir altı suyu çözeltisine dış azot ve fosfat kaynaklarının eklenmesiyle peynir altı suyu çözeltisinin N ve P içeriğinin yeterli olup olmadığı araştırılmış ve bu durumun fermentasyonda herhangi bir iyileşmeye yol açmadığı gözlenmiştir. Son olarak, laktoz derişimi 25-150 g/L arasında değiştirilmiş ve artan laktoz derişiminin fermentasyon hızını yavaşlatmasına rağmen yüksek etanol derişimi ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Etanol verimi değişen laktoz derişimi ile birlikte 0,35-0,54 g etanol/g laktoz arasında değişim göstermiş ve ulaşılabilen en yüksek etanol verimi ve etanol derişimi 150 g/L laktoz derişiminde gerçekleşmiştir [21].

Dragone ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, *K. fragilis* kullanılarak proteini alınmış peynir altı suyu tozu çözeltisinden fermentasyon ile etanol üretimi için, başlangıç laktoz derişimi (50-150 g/L), sıcaklık (25-35 °C) ve inokülüm derişiminin (1-3 g/L) fermentasyona etkisi incelenmiş ve etanol üretimini en yüksek değere çıkarmak için optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, sadece başlangıç laktoz derişiminin etanol üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve etanol derişiminin başlangıç laktoz derişiminin artırılması ile arttığı gözlenmiştir. Daha sonra başlangıç laktoz derişimi 150-250 g/L arasında değiştirilmiş ve 200 g/L başlangıç laktoz derişimi, 1 g/L inokülüm derişimi ve 35 °C sıcaklık koşullarının etanol üretimi için optimum koşullar olduğu belirlenmiştir. Bu koşullar altında 44 saat fermentasyon süresi sonunda 80.95 g/L etanol derişimine ulaşılmıştır [22].

Diniz ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 kullanılarak peynir altı suyu süzöntüsünün fermentasyonu ile etanol üretiminin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, sıcaklık (30-45 °C), pH (4,5-6,5), laktoz derişimi (50-250 g/L) ve hücre biyokütle derişimi (A_{600} 2-4) parametrelerinin fermentasyona olan etkileri değerlendirilmiştir. Sıcaklığın etanol üretimi optimizasyonunda en önemli etken olduğu gözlenirken, sıcaklığı pH, hücre biyokütle derişimi ve laktoz derişimi izlemiştir. Sıcaklığın 33,3-38,5 °C, pH'nın 4,7-5,7, hücre biyokütlesi derişiminin A_{600} 2,4-3,3, laktoz derişiminin 50-108 g/L arasında olduğu durumlarda, %90 üzerinde etanol üretim verimine ulaşılmıştır [23].

Özellikle yüksek derişimlerde laktoz içeren peynir altı suyu fermente edilirken, peynir altı suyu besin içeriğinin sınırlandırılması da bir sorun kaynağı olmuştur. Jansens ve arkadaşları (1983) tarafından yapılan çalışmada zaten %0,5 bakto-pepton eklenmiş olan

derişik peynir altı suyuna (200 g/L) ergesterol ve Tween 80 eklenmesiyle *K. fragilis*'in fermentasyon yeteneğinde kayda değer bir iyileşme raporlanmıştır. Buna ek olarak, 90 saatin üzerindeki fermentasyon süresinde 60 saatin altına kadar bir düşüş gözlenmiştir. Amonyum sülfat, üre, pepton, NH_4Cl ve KH_2PO_4 tuzları, çeşitli vitamin ve mineraller bu kapsamda literatürde test edilen diğer katkılar arasındadır [12].

Oksijen, fermentasyon sırasında maya performansını etkileyen önemli etkenlerden biridir. Oksijen kaynağı, etanol veriminde düşüğe neden olabilecek aşırı maya büyümesine neden olmayacak şekilde, membran lipidlerinin biyosentezi için yeterli olmalıdır. Silveira ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada peynir altı suyunun, başlangıç laktoz derişiminin 1-240 g/L arasında değiştirilmesiyle laktoz derişimi ve fermentasyon ortamında farklı oksijen seviyelerindeki aerobik, hipoksik ve anoksik koşulların oluşturulmasıyla oksijen seviyesinin, peynir altı suyunun etanole fermentasyonunda kullanılan *Kluyveromyces marxianus* UFV3'ün büyümesi ve metabolizması üzerine etkisi incelenmiştir. Laktoz derişimindeki artış, etanol verimini ve hacimsel etanol verimliliğini artırırken, hücre verimliliğini azaltmıştır. Oksijen seviyesinin düşük ve laktoz derişiminin 50 g/L ve üzerinde olduğu durumda etanol veriminin teorik değerine yaklaştığı gözlenmiştir. En yüksek etanol derişimlerine 76 ve 80 g/L değerleriyle sırasıyla hipoksik ve anoksik koşullarda, başlangıç laktoz derişiminin 170 g/L olması durumunda ulaşılmıştır [24].

Literatürde, *Kluyveromyces* türleri kullanılarak yapılan peynir altı suyu fermentasyonu çalışmalarının çoğu kesikli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, çeşitli biyoreaktör tasarımları kullanan sürekli sistemlerle de çalışılmıştır. Bazı çalışmalarda ise beslemeli-kesikli fermentasyon sistemleri kullanılmıştır.

Ozmihci ve Kargi (2007a) tarafından yapılan çalışmada, besleme akımı laktoz derişiminin, *Kluyveromyces marxianus* (DSMZ 7239) kullanılarak gerçekleştirilen peynir altı suyu tozu çözeltisinin sürekli bir fermentasyon sisteminde etanol fermentasyonuna etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hidrolik alıkoyulma süresi 54 saatte sabit iken besleme akımı laktoz derişimi 55-200 g/L arasında değiştirilerek etanol oluşumu, biyokütle oluşumu ve laktoz kullanımı incelenmiştir. Laktoz derişimi özellikle 100 g/L nin üzerinde olduğu durumlarda besleme laktoz derişiminin artırılması ile, laktoz kullanım yüzdesi ve biyokütle derişimi azalırken, çıkış şeker derişiminde artış gözlenmiştir. En yüksek etanol derişimi

(29 g/L) ve etanol verimliliğine ($0,54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) besleme laktoz derişimi 100-125 g/L arasında olduğu durumda ulaşılmıştır [25].

Ozmihci ve Kargi (2007b) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Kluyveromyces marxianus* (DSMZ 7239) kullanılarak peynir altı suyu tozu çözeltisinin sürekli bir fermentasyon sisteminde etanol fermentasyonu incelenmiştir. Fermenter içerisinde, pH 4,5 ve sıcaklık $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ civarında tutulmuştur. Besleme akımı olan peynir altı suyu tozu çözeltisinin şeker derişimi 100 g/L 'de sabit tutulurken, fermentasyon hacmi sabit tutularak besleme akış hızının değiştirilmesiyle hidrolik alıkonma süresi 12,5-60 saat arasında değiştirilmiştir. Hidrolik alıkonma süresindeki artış, çıkış laktoz derişiminin azalmasına neden olurken, laktoz kullanım yüzdesi, etanol derişimi ve biyokütle derişimi artan hidrolik alıkonma süresi ile artmıştır. Etanol verimliliği 43,2 saat hidrolik alıkonma süresi için en yüksek değerine ($0.745 \text{ gE L}^{-1} \text{ saat}^{-1}$) ulaşmıştır ve aynı koşullarda biyokütle verimliliği neredeyse en düşük değerindedir ($0.18 \text{ gX L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Elde edilen sonuçlara göre 43 saat, peynir altı suyu tozu çözeltisinin sürekli bir fermentörde etanol fermentasyonu için optimum hidrolik alıkonma süresi olarak seçilmiştir ve bu koşullarda etanol derişimi 32 g/L 'ye ulaşmıştır [26].

2.5.2. *C. pseudotropicalis* (*C. kefir*)

Peynir altı suyunun etanol fermentasyonunda *Kluyveromyces* türleri ve *S. cerevisiae* kullanılan çalışmalarla karşılaştırıldığında az sayıda olmasına karşın, bazı çalışmalarda *C. pseudotropicalis* kullanılmıştır.

Kluyveromyces türlerine ek olarak, *C. pseudotropicalis* de laktozu doğrudan metabolize etme yeteneğine sahiptir fakat *Kluyveromyces* türlerine benzer olarak, yüksek laktoz ve etanol derişimlerine karşı dirençli değildir.

Ghaly ve El-Taweel (1995a) tarafından yapılan çalışmada kesikli bir fermentasyon sisteminde *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 kullanılarak etanol üretmek üzere gerçekleştirilen peynir altı suyunun etanol fermentasyonunda besin takfiyesinin ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , maya özütü ve üçünün kombinasyonu) etanol verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrı ayrı her üç besin katkısı ve üçünün kombinasyonunun düşük derişimlerde etanol verimini önemli ölçüde etkilemediği görülürken, yüksek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ve K_2HPO_4 derişimlerinin hücre inhibitasyonuna yol açarak laktoz kullanımını azalttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar peynir altı suyunun etanol fermentasyonunda tam laktoz kullanımı için besin desteği gerekmediğini göstermiştir. Buna karşın, bu katkı maddeleri ayrı ayrı ve üçü birlikte küçük miktarlarda eklendiğinde mayaların uyum süresinin azaldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, %0,01 k/h oranında maya özütü eklenmesinin fermentasyon süresinin kayda değer miktarda azalmasını sağlamıştır. En iyi sonuçlar peynir altı suyuna %0,01 k/h oranında maya özütü eklenmesi durumunda elde edilmiş, en yüksek 21 g/L etanol derişimi elde edilirken %98 dönüşüme ulaşılmıştır [27].

Ghaly ve El-Taweel (1995b) tarafından yapılan başka bir çalışmada peynir altı suyunun etanol fermentasyonunda *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 kullanılarak mikro-havalandırmanın (240-720 ml/dakika veya 0.05-0.15 h/h/dakika) ve başlangıç laktoz derişiminin (50-200 g/L) hücre büyüme hızı, laktoz kullanımı ve etanol üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar mikro-havalandırmanın maksimum hücre derişimi ve özgül büyüme hızı üzerinde kayda değer olumlu etkilerinin olduğu, laktoz kullanım hızını ve etanol verimini artırdığı gözlenmiştir. Optimum başlangıç laktoz derişimi 150 g/L, optimum mikro-havalandırma seviyesi 0.1 h/h/dakika olarak belirlenmiş ve %98.3 dönüşüm verimine ulaşılmıştır. Mikro havalandırma seviyesinde daha fazla artışın biyokütle derişiminde artışa, dolayısıyla daha fazla laktozun biyokütle üretimi için kullanılması nedeniyle etanol üretiminde azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu koşullarda etanol verimliliğinin mikro-havalandırma yapılmadığı duruma göre %35 daha fazla olduğu belirlenmiştir [28].

Buna ek olarak Ghaly ve El-Taweel (1997) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, aynı maya türü sürekli bir fermentasyon sisteminde test edilmiş ve besleme laktoz derişimi (50-150 g/L) ile alıkonma süresinin (18-42 saat) etanol fermentasyonuna etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek 58 g/L etanol derişimine ulaşılmıştır [29]

2.5.3. *S. Cerevisiae*

S. cerevisiae alkol fermentasyonu içeren endüstriyel prosesler için genellikle ilk tercihtir. Bu durum iyi fermantatif kapasitesi ve % 20 (h/h) oranına kadar etanol üretilmesine izin veren yüksek etanol toleransı, genel olarak güvenli olarak kabul edilir statüsü, hakkındaki

kapsamlı endüstriyel ve bilimsel bilgi birikimi ve biyokütlesinin hayvan yemi olarak (yardımcı ürün) kullanılabilme olanağı gibi üstünlüklerden ileri gelir.

Diğer bir yandan, *S. cerevisiae* laktozu metabolize etme yeteneğine sahip değildir, fakat galaktozu kullanabilir. Bu kapsamda, peynir altı suyunun fermentasyonunda *S. cerevisiae* kullanımıyla ilgili iki temel dezavantajla karşılaşilmektedir. İlk olarak, *S. cerevisiae* kullanılan peynir altı suyu fermentasyonu uygulamaları fermentasyon aşamasından önce laktozun glikoz ve galaktoza parçalandığı ve çoğunlukla β -galaktosidase enzimi ile gerçekleştirilen bir enzimatik süreç olan hidroliz aşamasını gerektirir. İkinci olarak, *S. cerevisiae* katabolit baskı fenomeni nedeniyle, galaktoz yerine tercihen glikozu tüketir. Bu durum fermentasyon süresinin uzamasına ek olarak ve glikoz fermentasyonu ve glikozun tükenmesiyle başlayan galaktoz fermentasyonu arasında mikroorganizmaların gerekli enzimleri sentezleyerek yeni ortam koşullarına uyum sağlaması için gerçekleşen bir lag fazına neden olur. Başka bir deyişle, ortamda iki farklı karbon kaynağı bulunduğunda mikroorganizma öncelikle kolay kullanabileceği karbon kaynağını kullanır. Bu karbon kaynağı bittiğinde de ikinci karbon kaynağını kullanmaya geçmeden önce değişen ortama uyum sağlayabilmek için bir uyum süresi geçirir.

Bailey ve arkadaşları (1982) tarafından yapılan çalışmada, yukarıda sözü geçen katabolit baskı sorununa çözüm bulmak amacıyla seçim ajanı olarak 2-deoksiglikoz kullanılarak, glikoz ve galaktozu eş zamanlı olarak kullanabilen katabolit baskıya karşı dirençli olacak şekilde mutasyona uğramış *S. cerevisiae* izolasyonu amaçlanmıştır. Sonuç olarak, %20 laktozun hidroliz ürünlerine denk olan %10 glikoz ile %10 galaktoz içeren karışımın fermentasyonu kesikli bir sistemde 37 saatte tamamen gerçekleşmiş ve 90 g/L etanol derişimine ulaşılmıştır [30].

Hahn-Hägerdal (1985) tarafından yapılan çalışmada, seçenek olarak sürekli dolgulu kolon tipi sistemde peynir altı suyu fermentasyonu için kalsiyum aljinatta β -galaktosidaz ile birlikte tutuklanmış *S. cerevisiae* ve kalsiyum aljinatta tutuklanmış *K. fragilis* kullanılmıştır. Sonuç olarak, kalsiyum aljinatta β -galaktosidaz ile birlikte tutuklanmış *S. cerevisiae* kullanılması durumunda daha yüksek etanol derişimi (*S. cerevisiae* kullanıldığında; 52 g/L, *K. fragilis* kullanıldığında: 13 g/L) ve etanol üretim hızı (*S. cerevisiae* kullanıldığında; 4,5 gL⁻¹saat⁻¹, *K. fragilis* kullanıldığında; 1,1 gL⁻¹saat⁻¹) elde edilmiştir [31].

Laktozun etanole fermentasyonu söz konusu olduğunda, hem laktozu metabolize edebilen hemde yüksek etanol derişimlerine karşı dayanıklı maya suşlarının oluşturulması önem kazanmıştır. *K. fragilis* laktozu fermente etme yeteneğine sahiptir, fakat yüksek etanol derişimlerine karşı toleransı *S. cerevisiae* kadar yüksek değildir. Laktoz tüketebilen *S. cerevisiae* geliştirmek üzere gerçekleştirilen ilk yaklaşımlardan biri protoplast füzyonu ile *Kluyveromyces* suşlarıyla hibrit suşların oluşturulmasını içermektedir.

Taya ve arkadaşları (1984) *S. cerevisiae* ve *K. Laktis*'in laktozu fermente etme yeteneğine sahip hibritlerini elde etmiştir. Elde edilen hibritin *K. Laktis* ile karşılaştırıldığında daha fazla ve daha hızlı etanol ürettiği gözlenmiştir [32].

Farahnak ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan çalışmada, protoplast füzyonu ile *S. cerevisiae* ve *K. fragilis* suşlarının hibritleri elde edilmiş ve elde edilen hibritlerden biri ile maya özütü/pepton/laktoz ortamında gerçekleştirilen fermentasyonda %13 (h/h) etanol üretimine ve 105 g/L etanol derişimine ulaşılırken, yalnızca *K. fragilis* kullanıldığı durumda %10 (h/h) etanol üretimi gerçekleşmiştir [33].

Ryu ve arkadaşları (1991) tarafından yapılan çalışmada da *S. cerevisiae* ve *K. fragilis* suşlarından protoplast füzyonu ile elde edilen hibrit suşun laktoz fermentasyon performansının *K. fragilis*'in performansından daha iyi olduğu gözlenmiştir. %20 laktoz içeren yarı sentetik ortamda gerçekleştirilen fermentasyonda, hibrit suş kullanılarak 82 g/L etanol derişimine ulaşılırken, *K. fragilis* kullanılarak 72 g/L etanol derişimi elde edilmiştir [34].

2.6. Box Wilson Deneysel Tasarım Yöntemi

Bu çalışmada fermentasyon için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla Box Wilson Deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntemde deneysel tasarım matrisinin oluşturulabilmesi için öncelikle bağımsız değişkenler ve aralıkları belirlenir. Bağımsız değişken aralıkları deneyim ve literatür araştırması ışığında seçilir. Deneysel tasarım matrisi değişkenlerin kodlanmış değerleri kullanılarak oluşturulur. Değişkenlerin kodlanmış değerleri aşağıdaki Eşitlik 2.2 kullanılarak belirlenir.

$$U_i = (X_i - X_{i0}) / \Delta X_i \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte;

U_i : i parametresinin kodlanmış değeri

X_{i0} : i parametresinin ortalama değeri

X_i : i parametresinin gerçek değeri

ΔX_i : i parametresinin adım ağırlığıdır.

Parametrelerin kodlanmış değerleri (+1), (-1) ve (0) değerlerini alabilir. Bu değerlerden (+1) ve (-1) yüksek ve düşük seviyeyi temsil ederken, (0) orta seviyeyi temsil eder. Deney sonuçları söz konusu değerlerle ifade edilerek hesaplama kolay hale getirilir.

U_α noktaları temsil eden $-\alpha$ ve $+\alpha$ değerleri ve Eşitlik 2.3 ve Eşitlik 2.4 kullanılarak hesaplanır;

$$\alpha = 2^{K/4}, K < 5 \quad (2.3)$$

$$\alpha = 2^{(K-1)/4}, K \geq 5 \quad (2.4)$$

Yapılacak deney sayısı (N_d) Eşitlik 2.5 ve Eşitlik 2.6 kullanılarak hesaplanır.

$$N_d = 2^K + 2K + N_0 \quad K < 5 \quad (2.5)$$

$$N_d = 2^{(K-1)} + 2K + N_0 \quad K \geq 5 \quad (2.6)$$

Bu eşitliklerde;

N_d : Deney sayısı

K : Değişken sayısı

N_0 : Merkez noktada yapılan deney sayısı olarak ifade edilir.

Bağımlı değişken ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin daha açık ifade edilebilmesi için cevap yüzey grafikleri kullanılır. Cevap yüzey grafikleri, bağımsız değişkenlerin

bağımlı değişken üzerindeki etkisinin tek başına veya çoklu olarak incelenmesine olanak sağlar.

Çizelge 2.2’de 3 değişkenli bir tasarım matrisi için örnek verilmiştir. Burada merkez noktada yapılan deney sayısı 6, dolayısı ile toplam deney sayısı 20’dir.

Çizelge 2.2. Üç değişkenli tasarım matrisi [37]

Deney No	U_1	U_2	U_3	Y
1	+1	+1	+1	Y_1
2	+1	+1	-1	Y_2
3	+1	-1	+1	Y_3
4	+1	-1	-1	Y_4
5	-1	+1	+1	Y_5
6	-1	+1	-1	Y_6
7	-1	-1	+1	Y_7
8	-1	-1	-1	Y_8
9	$+\alpha$	0	0	Y_9
10	$-\alpha$	0	0	Y_{10}
11	0	$+\alpha$	0	Y_{11}
12	0	$-\alpha$	0	Y_{12}
13	0	0	$+\alpha$	Y_{13}
14	0	0	$-\alpha$	Y_{14}
15	0	0	0	Y_{15}
16	0	0	0	Y_{16}
17	0	0	0	Y_{17}
18	0	0	0	Y_{18}
19	0	0	0	Y_{19}
20	0	0	0	Y_{20}

Eğer model bağımlı değişkenler ile doğrusal olarak ifade edilebiliyorsa fonksiyon Eşitlik 2.7’de gösterilen birinci derceden bir denklem ile tanımlanabilir.

$$Y=f(x)=\beta_0+\sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i \leq j}^3 \beta_{ij} X_{ij} \quad (2.7)$$

Modelde dönüm noktası olması durumunda model daha yüksek mertebeden bir denklem ile tanımlanabilir.

Eşitlik 2.8’de ikinci dereceden bir model denklemi verilmiştir.

$$Y=f(x)=\beta_0+\sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i \leq j}^3 \beta_{ij} X_{ij} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \epsilon \quad (2.8)$$

Bu denklemlerde,

Y: bağımlı değişken

$X_1, X_2, \dots$: Bağımsız değişkenler

β_0 : doğrusal modelin katsayıları

β_{ij} : karesel modelin katsayıları

ϵ : hata

Eşitlik 2.8 dikkate alındığında, üç bağımsız değişkenli bir sistemin model denkliği Eşitlik 2.9’daki gibidir.

$$Y= f(x)= \beta_0 + \beta_1 X_1+ \beta_2 X_2+ \beta_3 X_3+ \beta_4 X_1^2+ \beta_5 X_2^2+ \beta_6 X_3^2+ \beta_7 X_1 X_2+ \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 \quad (2.9)$$

Model katsayıları Taylor Serileri yardımı ile belirlenir.

Elde edilen modelin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ANOVA testi ile gerçekleştirilir. Model ve hata için serbestlik derecesi, karelerin toplamı ve karelerin oranı terimlerini içeren ANOVA testinde kullanılan değerler Çizelge 2.3’te verilmiştir.

Çizelge 2.3. ANOVA testinde kullanılan terimler

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Oranı	F Değeri
Model	MKT	f_1	MKT/f_1	MKO/HKO
Hata	HKT	f_2	HKT/f_2	
Toplam	THKT	f_3	$THKT/f_3$	

Burada,

MKT: Model karelerinin toplamı

HKT: Hata karelerinin toplamı

THKT: Toplam hata karelerinin toplamı

MKO: Model karelerinin oranı

HKO: Hata karelerinin oranı

Regrasyon katsayısı Eşitlik 2.10 ile ifade edilir;

$$R^2 = \text{MKT} / \text{THKT} \quad (2.10)$$

Regrasyon katsayısı değerinin 1'e yakın olması modelin sistemi doğru bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir.



3. DENEYSEL YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan DSM 7239 kodlu *Kluyveromyces marxianus* türü maya Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonundan (DSMZ) sağlanmıştır.

Gerçekleştirilen deneylerde çalkalamalı su banyosu, otoklav, inkübatör, pH metre, manyetik karıştırıcı, hassas terazi, buhar damıtma düzeneği, desikatör ve diğer laboratuvar araç gereçleri kullanılmıştır.

Çalışmada fermantasyon ortamlarının hazırlanmasında peynir altı suyu süzüntü tozu kullanılmıştır. Çeşitli peynirlerden elde edilen ve ultrafiltrasyon sisteminden geçirilen taze peyniraltısu su süzüntüsünün pulverize edilerek kurutulmasıyla üretilen ve hiçbir katkı maddesi içermeyen peynir altı suyu süzüntü tozu Enka Firmasından alınmıştır.

Çalışma kapsamındaki diğer tüm deneyler ve ölçümler Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü bünyesindeki laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kuru Dondurulmuş Haldeki Mayanın Çoğaltılması

Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonundan (DSMZ) alınan maya belirli bir prosedüre göre katı ve sıvı besi yerlerine ekilerek çoğaltılmıştır. Hazırlanan katı ve sıvı besiyerleri Resim 3.1’de gösterilmiştir.



Resim 3.1. Maya ekimi için hazırlanan katı ve sıvı besiyerleri

Maya cam bir ampul içindeki kapağı pamuktan bir tıpa ile kapalı bir tüpün içinde kuru dondurulmuş durumda bulunmaktadır. Dış kısımdaki cam ampül ve iç kısımdaki tüp arasında bulunan silika jel ve hidrofilik pamuk nemin tutulmasını ve mayanın kuru kalmasını sağlar.

Ekim için izlenen adımlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Ampulün uç kısmı alevde ısıtılır.
- Isıtılan kısma iki üç damla su damlatılarak camın çatlaması sağlanır.
- Kırılan kısım bir pens yardımı ile alınır.
- İzolasyon maddesi bir pens yardımı ile çıkarılır ve iç kısımdaki cam tüp cam ampulün içinden çıkarılır.
- Cam tüp üzerindeki pamuk tıpa bir pens yardımı ile çıkarılarak steril koşullarda tutulur ve cam tüpün üst kısmı aleve tutulur.
- Cam tüp içine 0,5 mL sıvı besi ortamı ekilir, pamuk tıpa yerine takılır ve maya hücrelerinin normal suyunu geri kazanması için 30 dk süresince beklenir.

- Belirtilen süre sonunda cam tüp içindeki içerik bir inokülasyon özesi ile nazıkçe karıştırılır. Mayaları içeren ortamın bir kısmı hazırlanan katı besi yerlerine ekilirken, geriye kalan kısmı da sıvı besiyerine ekilir.
- Ekimi tamamlanan mayalar çoğalıncaya kadar 25 °C sıcaklıkta inkübatörde tutulur.

Mayaların ekimi için hazırlanan katı besi yerinin bileşimi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Katı besi yeri bileşimi

Bileşen	Miktar	Birim
Maya özütü	3,0	g
Malt özütü	3,0	g
Pepton	5,0	g
Glikoz	10,0	g
Agar	15,0	g
Distile Su	1000,0	mL

Mayaların ekimi için hazırlanan sıvı besi yerinin bileşimi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Sıvı besi yeri bileşimi

Bileşen	Miktar	Birim
Maya özütü	3,0	g
Malt özütü	3,0	g
Pepton	5,0	g
Glikoz	10,0	g
Distile Su	1000,0	mL

Resim 3.2’de besi yeri üzerinde çoğalmış maya kolonileri görülmektedir.



Resim 3.2. Maya kolonileri

3.3. Büyüme Ortamının Hazırlanışı

Mayaların büyümesini ve çoğalmasını sağlamak için hazırlanan büyüme ortamında peynir altı suyu süzöntü tozu kullanılmıştır. Buna ek olarak, büyüme ortamının besin içeriği maya özütü, malt özütü ve pepton eklenerek zenginleştirilmiştir.

%50'lik H_2SO_4 ile pH değeri 5 olacak şekilde ayarlanan 300 mL'lik bir büyüme ortamının bileşimi Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Büyüme ortamı bileşimi

Bileşen	Miktar	Birim
Maya özütü	3	g/L
Malt özütü	3	g/L
Pepton	5	g/L
Laktoz	50	g/L

Hazırlanan büyüme ortamı ağzı pamuk ile kapatılarak 30 dakika boyunca 121 °C sıcaklıkta otoklavda sterilize edilmiştir.

Soğumuş haldeki Steril büyüme ortamından bir miktar alınarak 4 °C sıcaklıkta saklanan katı besiyeri (3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 3 g/L pepton, 10 g/L glikoz, 15 g/L agar ve damıtık su) üzerindeki maya kolonilerinin içinde bulunduğu tüp üzerine eklenmiştir. Tüp çalkalanarak mayaların sıvı kısma geçmesi sağlandıktan sonra, mayaları içinde bulunduran sıvı büyüme ortamına eklenmiştir.

Mayaları içeren büyüme ortamı 25 °C sıcaklıkta 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımı ile inkübatörde tutulmuş ve belirtilen süre sonunda mayalar fermantasyon ortamına ekilmek için hazır hale gelmiştir.

3.4. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı

Laktoz derişimi (100-200 g/L), pH (4-6) ve amonyum dihidrojen fosfat derişimi (1-2,5) parametrelerinin fermantasyona etkisinin incelenebilmesi için Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kapsamında 20 adet 100 mL'lik örnek hazırlanmıştır.

Ağızı pamuk ile kapatılan örnekler 30 dk boyunca 121 °C sıcaklıkta otoklavda sterilize edilmiştir. Soğutulan fermantasyon ortamlarına büyüme ortamından alınan 10 mL'lik hacimler eklenmiş ve hemen ardından su banyosunda çalkalama hızı 150 rpm'e ayarlanarak 72 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince 20 adet fermantasyon ortamından her 24 saatte bir örnek alınmış ve alınan örnekler analizler için dondurularak saklanmıştır.

Resim 3.3, Resim 3.4 ve Resim 3.5'te 3 grup olmak üzere 20 adet fermantasyon ortamının çalkalamalı su banyolarında görüntüleri verilmiştir.



Resim 3.3. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (1. grup)



Resim 3.4. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (2. grup)



Resim 3.5. Çalkalamalı su banyosunda fermentasyon ortamları (3. grup)

3.5. Etanol Analizi

72 saat fermantasyon süresi boyunca 24 saat aralıkla alınan tüm örneklere etanol analizi yapılmıştır. Etanol analizi için 0,1 N $K_2Cr_2O_7$, 6 N H_2SO_4 , %8 KI çözeltisi 0,1 N $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ve %1 nişasta çözeltisi kullanılmıştır.

0,1 N $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ çözeltisinin hazırlanışı

- 1 L damıtık su ağzı kapalı bir şekilde bir beherde en az 5 dakika süreyle kaynatılır.
- Soğutulan su içine 25 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ve mikroorganizmalara karşı koruyucu olarak 1 gram Na_2CO_3 eklendikten sonra çözünene kadar karıştırılır.
- Elde edilen çözelti koyu renkli cam bir şişede ışık almayan bir ortamda saklanır.

%1 lik Nişasta çözeltisinin hazırlanışı

- 1 g nişasta 100 mL distile suya eklenerek, tamamen çözülene kadar kaynatılır. Daha sonra ağzı kapatılarak ışık almayan bir ortamda saklanır.
- Mümkünse kullanılacağı zaman hazırlanmalıdır.
- Nişasta çözeltisi titrasyon sırasında dönüm noktasının belirlenebilmesi için kullanılır.

0,1 N $K_2Cr_2O_7$ çözeltisinin hazırlanışı

- 4,904 g $K_2Cr_2O_7$ bir miktar distile suda çözülür.
- Tamamen çözüldükten sonra hacmi distile su eklenerek 1 L'ye tamamlanır.

0,6 N H_2SO_4 çözeltisinin hazırlanışı

- 166,4 mL % 96'lik H_2SO_4 çözeltisi bir miktar su üzerine eklenir ve nazikçe çalkalanır.
- Daha sonra hacmi distile su eklenerek 1 L'ye tamamlanır.

%8'lik KI çözeltisinin hazırlanışı

- 80 g KI tuzu bir miktar distile suda çözülür.
- Tamamen çözüldükten sonra hacmi distile su eklenerek 1 L'ye tamamlanır.

Box Wilson deneysel tasarım yöntemine göre hazırlanan 20 örnek için aşağıda verilen adımlar izlenerek etanol analizi yapılmıştır ve her bir örnek için etanol yüzdeleri hesaplanmıştır.

1. Örnek içindeki etanolün dikromat çözeltisi içine aktarılabilmesi için buhar jeneratörü, rodajlı balon joje ve soğutucudan oluşan deney düzeneği kurulur.

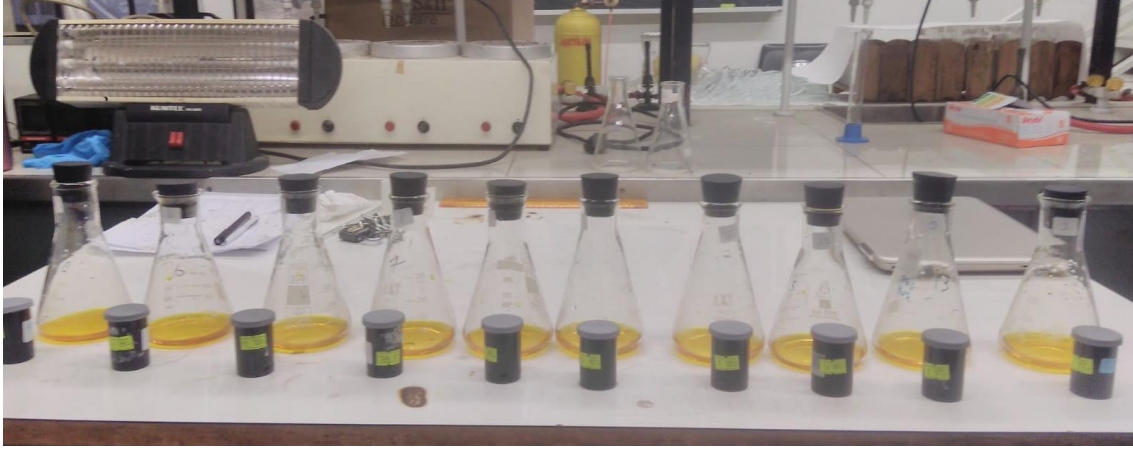
Resim 3.6’da kurulan su buharı ile damıtma düzeneği gösterilmiştir.



Resim 3.6. Etanol analizi için kullanılan su buharı ile damıtma düzeneği

2. Soğutucunun çıkışına içinde 25 mL 0,1 N $K_2Cr_2O_7$ çözeltisi bulunan erlen yerleştirilir.

Resim 3.7’de de soğutucu çıkışına yerleştirilmek için hazırlanarak erlenler içine alınan 25 mL 0,1 N $K_2Cr_2O_7$ çözeltileri gösterilmiştir.



Resim 3.7. Soğutucu çıkışına yerleştirmek için hazırlanan $K_2Cr_2O_7$ çözeltileri

3. Rodajlı balon içine analizi yapılacak örnekten 1 mL koyulur.
4. Buhar jeneratörü ısıtılarak su kaynatılır. Elde edilen buhar örnek üzerine verilerek örnek içindeki etanolün buhara geçmesi sağlanır. Daha sonra buhar soğutucudan geçirilerek yoğunlaştırılır ve dikromat çözeltisi içine aktarılır. Bu işlem erlenedeki seviye yaklaşık olarak 50 mL'ye gelinceye kadar sürdürülür.
5. Deney düzeneğinden alınan erlen içine 6 mL 6 N H_2SO_4 çözeltisi eklenir ve sonrasında 25 dakika boyunca 60 °C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosunda tutulur.

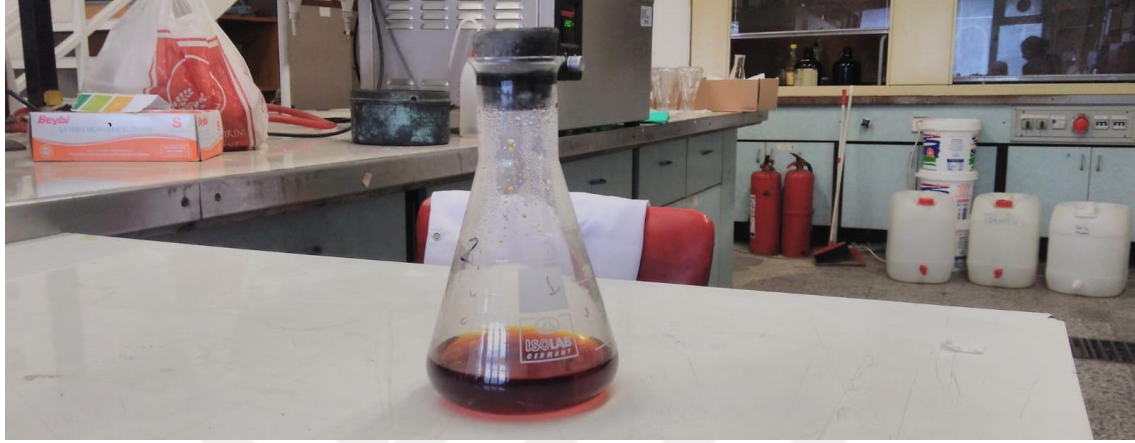
Resim 3.8'de su banyosunda bekletilen örnekler gösterilmiştir.



Resim 3.8. Su banyosunda bekletilen örnekler

6. Soğutulduktan sonra 9 mL %8'lik KI çözeltisi eklenir ve 5 dakika boyunca ışık almayan bir ortamda bekletilir.

Resim 3.9'da örneğe KI çözeltisi eklendikten sonra oluşan renk görülmektedir.



Resim 3.9. Örneğe KI çözeltisi eklendikten sonra oluşan rengin görüntüsü

7. Belirtilen süre sonrasında örnekler 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile titre edilir. Titrasyon sırasında açık sarı renk görüldüğünde 1 mL %1'lik nişasta çözeltisi eklenir ve oluşan koyu mavi renk açık maviye dönüşene kadar titrasyon işlemine devam edilir ve tüm örnekler için harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisi hacmi belirlenir.



Resim 3.10. Titrasyon bitimindeki renk dönüşümü

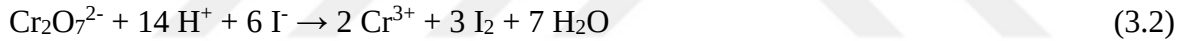
8. Örneklerde başlangıçta bulunan potasyum dikromat miktarının belirlenebilmesi için 25 mL 0,1 N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ çözeltisine 25 mL saf su ve 9 mL %8'lik KI çözeltisi eklenerek yukarıda anlatılan titrasyon işlemi uygulanır. Harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisi hacmi kaydedilir.

9. Şahit çözeltinin titrasyonu için harcanan sodyum tiyosülfat hacminden her bir örnek için harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisi hacmi çıkarılarak, elde edilen değerler etanol derişimini belirlemek için kullanılır.
10. Elde edilen hacim içindeki sodyum tiyosülfatın mol sayısı belirlenir ve sodyum tiyosülfatın ile etanolün mol sayısı arasındaki ilişkiden yararlanılarak etanolün mol sayısına buradan da etanolün derişimine ulaşılır. Tiyosülfat ve etanolün mol sayıları arasındaki ilişki aşağıdaki reaksiyonlara göre belirlenmiştir.

Etanol analizi için kullanılan yöntemde örnek içindeki etanol yüzdesinin belirlenmesi için redoks titrasyonu kullanılır. Etanol asidik ortamda dikromat iyonları ile tepkimeye girerek Eşitlik 3.1’de verilen tepkime ile etanoik asite yükseltgenir.



Tepkimeye girmeyen dikromat miktarının belirlenmesi için ortama eklenen potasyum iyodür de potasyum dikromat tarafından Eşitlik 3.2’ye göre iyodüre yükseltgenir.



Son olarak iyodür standart sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilerek, titrasyon sonuçları örnekteki etanol içeriğini belirlemek için kullanılır. Tiyosülfat ve iyodür arasında Eşitlik 3.3’te verilen tepkime gerçekleşir.



Verilen tepkimelere göre tiyosülfat ve dikromat iyonlarının mol sayıları ile etanol mol sayısı arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir.

- 6 mol S_2O_3 , 1 mol Cr_2O_7 ’ye eşdeğerdir.
- 2 mol Cr_2O_7 , 3 mol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ’ye eşdeğerdir.
- 1 mol S_2O_3 , 0,25 mol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ’ye eşdeğerdir.



4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada derişik peynir altı suyu süzüntüsünden etanol üretiminde laktoz derişimi (g/l), pH ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişmi parametrelerinin etanol yüzdesine etkileri Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Söz konusu parametrelerin en yüksek etanol derişimini verdiği aralıklar yapılan literatür araştırması ışığında belirlenmiştir. Box Wilson deneysel tasarım yöntemine uygun olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmadaki sonuçlar kullanılarak sistem Design Expert programı ile modellenmiştir.

4.1. Büyüme ve Fermantasyon Ortamının Belirlenmesi ve Maya Seçimi

Fermantasyon ile etanol üretiminde genellikle çeşitli maya türleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada etanol üretimi için hammadde olarak kullanılan peynir altı suyunda bulunan şeker türü glikoz ve galaktozdan oluşan bir disakkarit olan laktozdur ve fermantasyondan önce monosakkaritlere parçalanması gerekir. Bu nedenle laktoz fermantasyonunda kullanılacak mikroorganizma laktozu glikoz ve galaktoza parçalayabilmesi için ya gerekli olan beta-galaksidaz enzimini içermelidir, ya da laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması için fermantasyon öncesinde hidroliz işleminin uygulanması gerekir.

Laktozdan etanol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar *Kluyveromyces Marxianus*, *Candida pseudotropicalis* (*C. kefir*) ve *Saccharomyces cerevisiae* isimli mayalardır. Bunlardan *S. cerevisiae* diğerleri ile kıyaslandığında oldukça yüksek etanol toleransına rağmen, laktozu doğrudan metabolize edemez. Bundan dolayı *S. Cerevisiae* mayası kullanıldığında fermantasyondan önce laktozun enzim kullanılarak glikoz ve galaktoza parçalanmasını içeren bir hidroliz işlemi gerekir ve bu durum ek maliyete yol açar. Bu yüzden peynir altı suyundan etanol üretiminde laktozu doğrudan metabolize edebilen *K. Marxianus* ve *C. pseudotropicalis* mayalarının kullanımı üzerinde durulmaktadır.

K. Marxianus ve *C. Pseudotropicalis* kıyaslandığında, *K. Marxianus* ile peynir altı suyundan etanol üretiminde daha iyi sonuçlara ulaşıldığından bu çalışmada *K. Marxianus türü* maya kullanılmıştır.

Peynir altı suyunun doğrudan fermentasyonu, düşük laktoz derişimi nedeni ile düşük etanol derişimi, dolayısı ile yüksek ayırma maliyeti ile sonuçlanacağından ekonomik olarak uygulanabilir değildir. Bu yüzden fermentasyona yüksek laktoz derişimi ile başlamak sürecin ekonomik hale getirilmesi için oldukça önemlidir. Peynir altı suyu içindeki proteinin de geri kazanılması adına, peynir altı suyunun ultrafiltrasyon sisteminden geçirilmesi ile süzöntü tarafında elde edilen peynir altı suyu süzöntüsünün fermentasyonda kullanılması etkili bir yaklaşımdır. Ultrafiltrasyon aşamasından sonra buharlaştırma ve sprey kurutma yöntemleri ile elde edilen peynir altı suyu süzöntü tozu kullanılarak istenilen laktoz derişimine ulaşmak mümkündür. Bir diğer yandan, ultrafiltrasyon ile elde edilen peynir altı suyu süzöntüsünün nanofiltrasyon veya ters osmoz yöntemleri ile deriştirilmesi de endüstride uygulanan yaklaşımlardandır.

Bu çalışmada ultrafiltrasyon ile elde edilen peynir altı suyu süzöntüsünün pülverize edilerek kurutulması ile elde edilen ve hiçbir katkı maddesi içermeyen peynir altı suyu süzöntü tozu fermentasyon ortamlarının hazırlanması için kullanılmıştır.

4.2. Box-Wilson Deneyisel Tasarım Yöntemi Kullanılarak Deneyisel Tasarım Matrisinin Belirlenmesi

Box-Wilson deneyisel tasarım yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenler laktoz derişimi (X_1 , g/l), pH (X_2) ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi (X_3 , g/L)'dir. Etanol derişimi yüzdesi ise (Y , % a/h) bağımlı değişken olarak seçilmiştir.

Etanol üretimi için bağımsız değişkenler, seviyeleri ve alt ve üst sınır değişkenleri Çizelge 4.1'de verilmiştir

Çizelge 4.1. Bağımsız değişkenler, seviyeleri ve alve üst sınır değişkenleri

Bağımsız değişkenler	Seviyeleri ve Alt ve Üst Sınır Değişkenleri				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Laktoz derişimi (X_1 , g/L)	65,9	100	150	200	234
pH (X_2)	3,32	4	5	6	6,68
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi (X_3 , g/L)	1,16	1,5	2	2,5	2,84

Laktoz derişimi için adım aralığı 50 g/L, pH için adım aralığı 1, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi için adım aralığı 0,5 g/L olarak alınmıştır. Deneysel tasarım matrisinin gerçek ve kodlanmış değerleri izelge 4.2’de verilmiştir. Box Wilson deneysel tasarım yöntemine göre, ikinci dereceden üç (2³) değişkenli tasarım matrisinde değişken sayısı 3, merkez noktada yapılan deney sayısı 6 ve toplam deney sayısı 20’dir.

Çizelge 4.2. Deneysel tasarım matrisinin gerçek ve kodlanmış değerleri

Deney No	X ₁ Laktoz Derişimi (g/L)	X ₂ pH	X ₃ NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi (g/L)	U ₁	U ₂	U ₃
1	200	6	2,5	+1	+1	+1
2	200	6	1,5	+1	+1	-1
3	200	4	2,5	+1	-1	+1
4	200	4	1,5	+1	-1	-1
5	100	6	2,5	-1	+1	+1
6	100	6	1,5	-1	+1	-1
7	100	4	2,5	-1	-1	+1
8	100	4	1,5	-1	-1	-1
9	234	5	2	+ α	0	0
10	65,9	5	2	- α	0	0
11	150	6,68	2	0	+ α	0
12	150	3,32	2	0	- α	0
13	150	5	2,84	0	0	+ α
14	150	5	1,16	0	0	- α
15	150	5	2	0	0	0
16	150	5	2	0	0	0
17	150	5	2	0	0	0
18	150	5	2	0	0	0
19	150	5	2	0	0	0
20	150	5	2	0	0	0

4.3. Design Expert 11 Sürümü Programından Yararlanılarak Optimum Koşulların Belirlenmesi

Laktoz derişimi, pH ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi parametrelerinin peynir altı suyu süzüntüsünden fermentasyon yolu ile etanol üretimine etkilerinin incelendiğı bu çalışmada Design Expert 11 Sürümü kullanılarak ve cevap yüzey grafiklerinden yararlanılarak fermentasyon için optimum koşullar belirlenmiştir.

Çizelge 4.3’da deneysel tasarım matrisinde kullanılan bağımlı değişkenler, bağımsız değişkenler ve tasarım değişkenleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bağımlı değişkenler, bağımsız değişkenler ve tasarım değişkenleri

Bağımlı ve Bağımsız Değişkenler		Tasarım Değişkeni
Bağımsız Değişkenler	Laktoz derişimi (g/L)	X_1
	pH	X_2
	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi (g/L)	X_3
Bağımlı Değişken	Etanol yüzdesi (a/h)	Y_1

Çizelge 4.4’da deneysel tasarım matrisinde kullanılan laktoz derişimi, pH, amonyum dihidrojen fosfat derişimi değerleri ve gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen etanol yüzdesi değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.4. Laktoz derişimi, pH, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi ve etanol yüzde değerleri

Deney No	X_1 Laktoz Derişimi (g/L)	X_2 pH	X_3 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ Derişimi (g/L)	Y_1 Etanol Yüzdesi (a/h)
1	200	6	2,5	1,30
2	200	4	1,5	1,46
3	150	5	2,84	1,70
4	100	4	2,5	2,06
5	100	4	1,5	1,56
6	65,9	5	2,0	1,18

Çizelge 4.4. (devam) Laktoz derişimi, pH, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi ve etanol yüzde değerleri

7	1050	3,32	2,0	1,40
8	150	5	2,0	3,05
9	234	5	2	1,21
10	200	4	2,5	1,30
11	100	6	1,5	1,40
12	150	5	2	3,05
13	200	6	1,5	1,51
14	150	6,68	2	1,28
15	150	5	2	3,02
16	150	5	2	3,03
17	150	5	2	3,02
18	150	5	2	3,06
19	150	5	1,16	2,06
20	100	6	2,5	1,46

4.3.1 Model denkleminin kurulması

Design Expert 11 sürümü programı kullanılarak etanol yüzde (a/h) değerleri için hesaplanan katsayılar ve istatistiksel değerler Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Design Expert 11 sürümü programı kullanılarak hesaplanan katsayılar ve istatistiksel değerler

Model Terimleri	Katsayılar	P Değerleri	Standart Hata
Sabit	3,04	<0,0001	0,0565
X_1	-0,0629	0,122	0,0375
X_2	-0,0668	0,104	0,0375
X_3	-0,0304	0,434	0,0375
$X_1 X_2$	0,101	0,0644	0,0489
$X_1 X_3$	-0,116	0,0382	0,0489
$X_2 X_3$	-0,0613	0,237	0,0489
X_1^2	-0,626	<0,0001	0,0365
X_2^2	-0,575	<0,0001	0,0365
X_3^2	-0,384	<0,0001	0,0365

Etanol yüzde (a/h) değerleri için tüm model terimleri kullanılarak elde edilen model eşitliği Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$Y_1 = 3,04 - 0,0629 X_1 - 0,668 X_2 - 0,0304 X_3 + 0,101 X_1 X_2 - 0,116 X_1 X_3 - 0,0613 X_2 X_3 - 0,626 X_1^2 - 0,575 X_2^2 - 0,384 X_3^2 \quad (4.1)$$

R^2 değeri 0,9680 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,7-1,0 aralığında olması modelin doğruluğunu gösterir. R^2 değeri 1’e yaklaştıkça modelin doğruluğu artar. Elde edilen $R^2 = 0,9680$ sonucu model ile sistemin birbirleri ile uyumlu olduğunu ve modelin sistemi doğru bir şekilde yansıttığını gösterir.

Çizelge 4.5’de model terimleri için verilen ‘p’ değerleri terimlerin sistem için önemini gösterir. ‘p’ değerlerinin 0,1’den büyük olması söz konusu ‘p’ değerlerine sahip terimlerin ihmal edilebileceği anlamına gelir. 0,05’ten küçük ‘p’ değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu ifade eder. Bu durumda $X_1 X_3$, X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 terimlerinin model için anlamlı terimler olduğu görülmektedir. Modelde X_1 , X_2 , X_3 , $X_1 X_2$, $X_2 X_3$ bağımsız terimlerinin ‘p’ değerleri 0,1’den büyük olduğundan, bu terimlerin model üzerindeki etkileri ihmal edilebilir düzeydedir.

4.3.2. Model için ANOVA testi sonuçları

Model üzerindeki etkileri ihmal edilebilir olan parametreler ihmal edildikten sonra, modele ANOVA testi yapılmış ve kareler toplamı, kareler oranı, F değeri ve serbestlik derecesini içeren sonuçlar model, hata ve toplam değerleri için Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Model için ANOVA testi sonuçları

ANOVA Testi	Kareler Toplamı	Karaler Oranı	Serbestlik derecesi	F değeri
Model	10,9	1,21	9	64,0
Hata	0,190	0,0190	10	-
Toplam	11,1	-	19	-

Model kareler toplamının toplam kareler toplamına bölünmesi ile elde edilen regrasyon katsayısı, $R = 0,9820$ olarak bulunmuştur. Regrasyon katsayısının 0,7-1,0 aralığında olması, modelin sistemi doğru bir şekilde ifade ettiğini gösterir.

Çizelge 4.7’de model üzerinde etkili olmayan terimler çıkarıldıktan sonra geriye kalan terimler, bu terimlere ait katsayılar ve istatistiksel değerler verilmiştir.

Çizelge 4.7. Model denkleminde gerekli ihmaller yapıldıktan sonra model terimleri için elde edilen katsayılar ve istatistiksel değerler

Model Terimi	Katsayılar	P Değerleri	Standart Hata
Sabit	3,04	<0,0001	0,0913
$X_1 X_3$	-0,116	0,0389	0,0489
X_1^2	-0,626	<0,0001	0,0365
X_2^2	-0,575	<0,0001	0,0365
X_3^2	-0,384	<0,0001	0,0365

Model üzerinde etkili olmayan terimlerin ihmal edilmesinden sonra geriye kalan terimlerle oluşturulan model eşitliği Eşitlik 4.2’de verilmiştir.

$$Y_1 = 3,04 - 0,116 X_1 X_3 - 0,626 X_1^2 - 0,575 X_2^2 - 0,384 X_3^2 \quad (4.2)$$

4.3.3. Deneysel değerler ve model değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.8’te etanol yüzdesi için deneysel olarak elde edilen değerler, modelden elde edilen değerler ve standart sapmalar verilmiştir. Standart sapma oranı Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

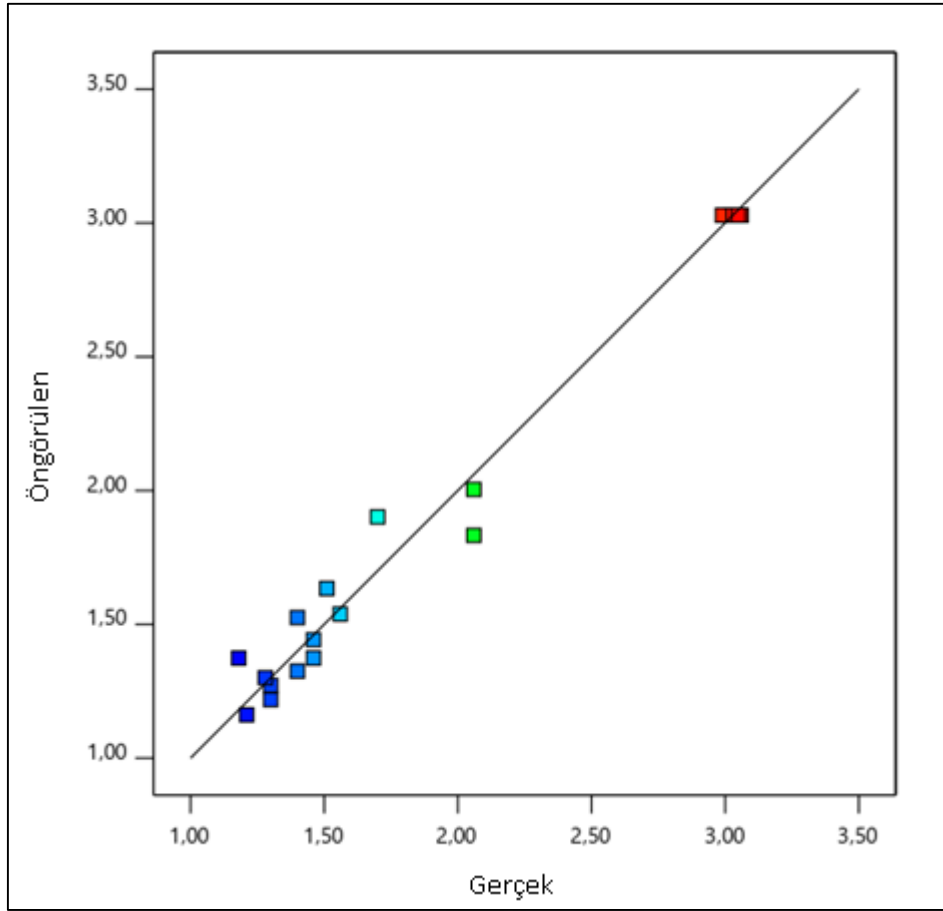
$$\% \text{ Standart Sapma} = [(Y_{\text{model}} - Y_{\text{deneysel}}) / Y_{\text{deneysel}}] * 100 \quad (4.3)$$

Deneysel değerler ile model değerlerinin yakın olması modelin sistemi doğru bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir.

Çizelge 4.8. Deneysel değerler ile model değerlerinin karşılaştırılması

Deney No	X ₁ (Sıcaklık (°C))	X ₂ (pH))	X ₃ (laktoz derişimi (g/L))	Deneysel Değerler (%)	Model Değerleri (%)	% Sapma
1	200	6	2,5	1,30	1,22	-6,15385
2	200	4	1,5	1,46	1,44	-1,36986
3	150	5	2,84	1,70	1,90	11,76471
4	100	4	2,5	2,06	1,83	-11,165
5	100	4	1,5	1,56	1,54	-1,28205
6	65,9	5	2,0	1,18	1,37	16,10169
7	1050	3,32	2,0	1,40	1,53	9,285714
8	150	5	2,0	3,05	3,03	-0,65574
9	234	5	2	1,21	1,16	-4,13223
10	200	4	2,5	1,30	1,27	-2,30769
11	100	6	1,5	1,40	1,32	-5,71429
12	150	5	2	3,05	3,03	-0,65574
13	200	6	1,5	1,51	1,63	7,94702
14	150	6,68	2	1,28	1,30	1,5625
15	150	5	2	3,02	3,03	0,331126
16	150	5	2	3,03	3,03	0
17	150	5	2	3,02	3,03	0,331126
18	150	5	2	3,06	3,04	-0,98039
19	150	5	1,16	2,06	2,00	-2,91262
20	100	6	2,5	1,46	1,37	-6,16438

Şekil 4.1’de deneysel değerler ile model değerlerinin karşılaştırılması grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Deneysel değerler ile model değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi değerlerin diyagonale yakın veya diyagonalin üzerinde olması elde edilen modelin sistemi iyi bir şekilde ifade ettiğini gösterir.

4.3.4. Bağımsız değişkenlerin etanol yüzdesi üzerindeki etkilerinin cevap yüzey grafikleri ile incelenmesi

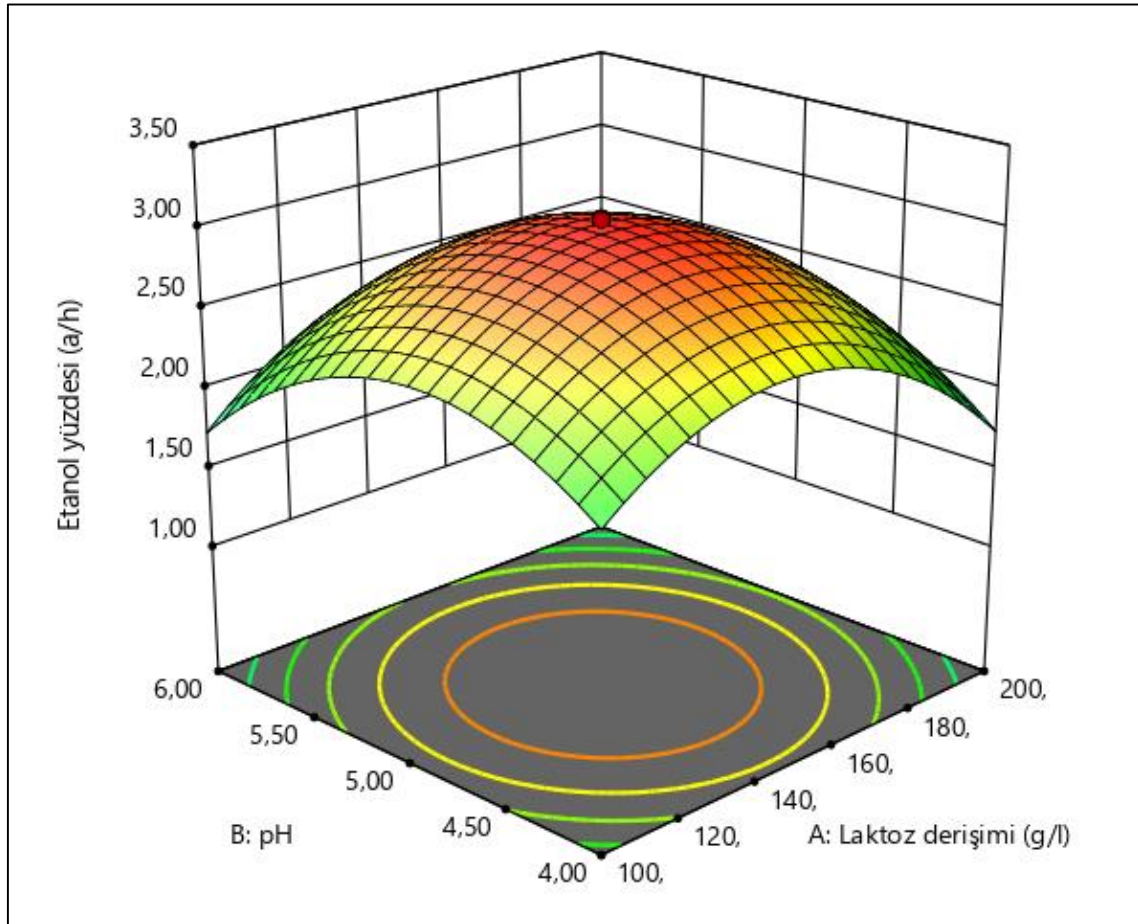
Bağımsız değişkenlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bağımlı değişken üzerine etkilerinin incelenebilmesi ve optimum koşulların belirlenebilmesi amacı ile Design Expert 11 sürümü kullanılarak üç boyutlu cevap yüzey grafikleri oluşturulmuştur.

Cevap yüzey grafiklerinin renk skalası mavi ile kırmızı renk arasında değişmektedir. Mavi renk etanol yüzdesinin düşük olduğu noktaları ifade ederken kırmızı renk etanol yüzdesinin yüksek olduğu noktaları ifade eder. Buna ek olarak cevap yüzey grafiklerinin üstten görünüşüne eş değişim eğrileri denir. Eş derişim eğrilerinde de kırmızı bölge etanol yüzdesinin yüksek olduğu noktaları ifade ederken, mavi bölge etanol yüzdesinin düşük olduğu noktaları ifade eder.

Laktoz derişimi 148 g/L, pH 4,96 ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin 1,96 g/L olması durumunda en yüksek etanol yüzdesine (%3,06) ulaşılmıştır.

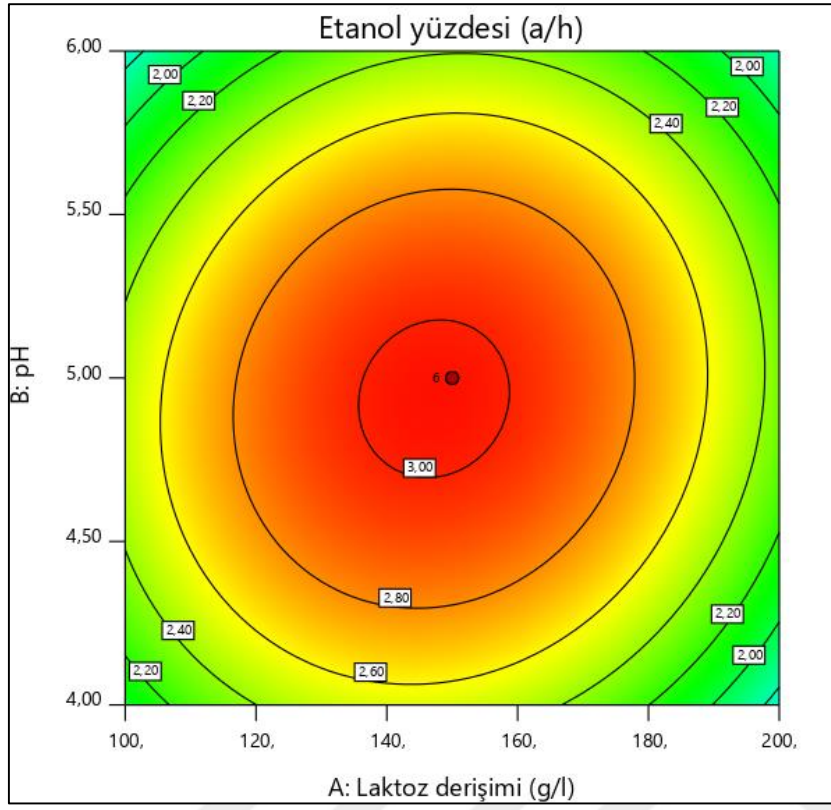
Amonyum dihidrojen fosfat derişimi 2 g/L’de sabit tutularak, 3 boyutlu cevap yüzey grafikleri ve eş derişim eğrilerinin elde edilmesi ile laktoz derişimi ve pH parametrelerinin etanol yüzdesine etkileri incelenmiştir.

Laktoz derişimi ve pH’nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği şekil 4.2’de verilmiştir.



şekil 4.2. Laktoz derişimi ve pH’nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği

Laktoz derişimi ve pH’nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren cevap yüzey grafiğinin daha iyi ifade edilebilmesi amacı ile şekil 4.3 laktoz derişimi ve pH’nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi verilmiştir.

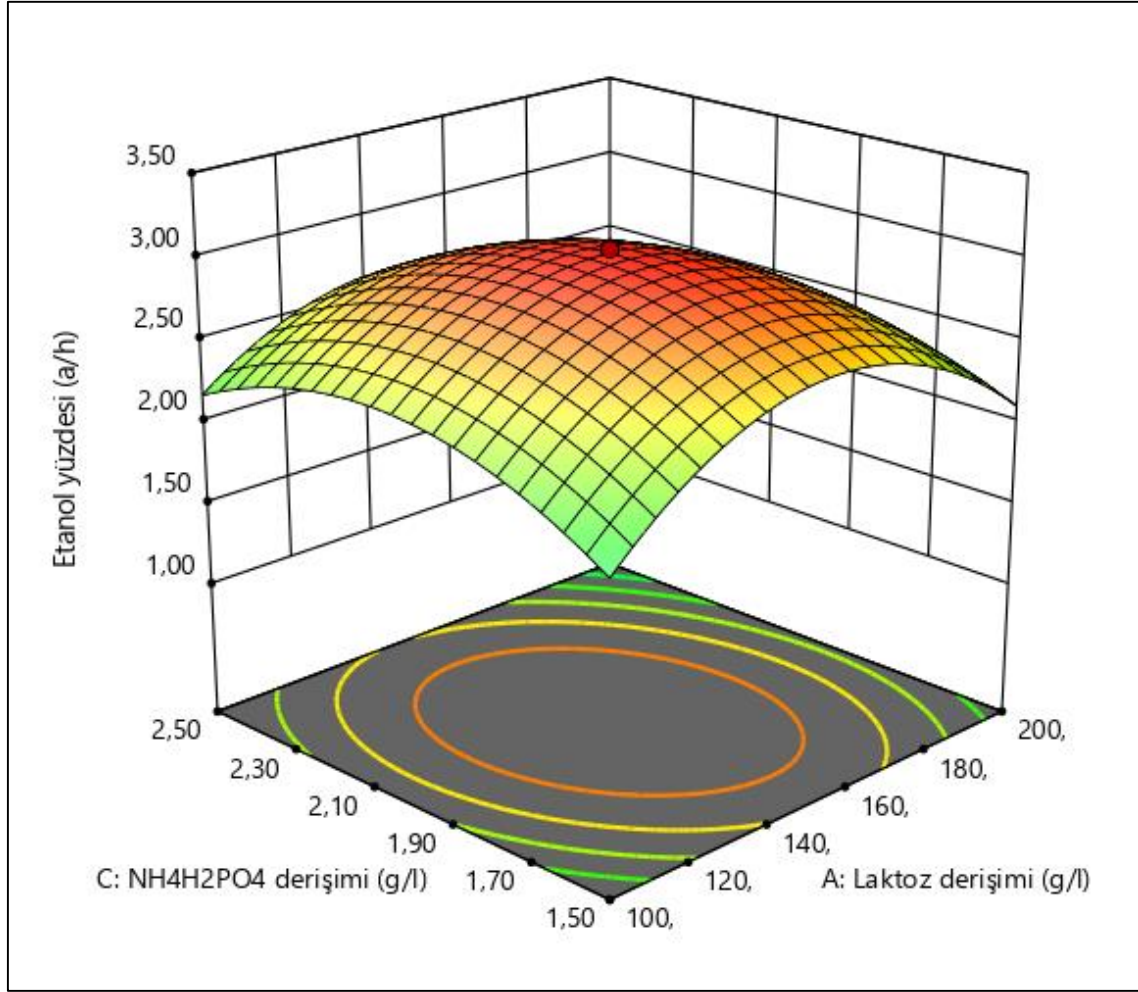


Şekil 4.3. Laktoz derişimi ve pH'nın etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi

Şekil 4.2 ve 4.3'te görüldüğü gibi belirli bir laktoz derişiminde pH'ın belirli bir değere kadar artması ile etanol yüzdesi artmakta ancak pH'ın daha fazla artması ile etanol yüzdesi azalmaktadır. Aynı şekilde, belirli bir pH değerinde laktoz derişimi belirli bir değere kadar artığında etanol yüzdesi artarken laktoz derişiminin belirli bir değer üzerine çıkması ile etanol yüzdesi azalmaya başlamaktadır. Yüksek laktoz derişimi nedeni ile ortaya çıkan ozmotik duyarlılık veya düşük etanol toleransından kaynaklanan olumsuz etkiler mayaları olumsuz etkileyerek inhibisyona yol açmaktadır.

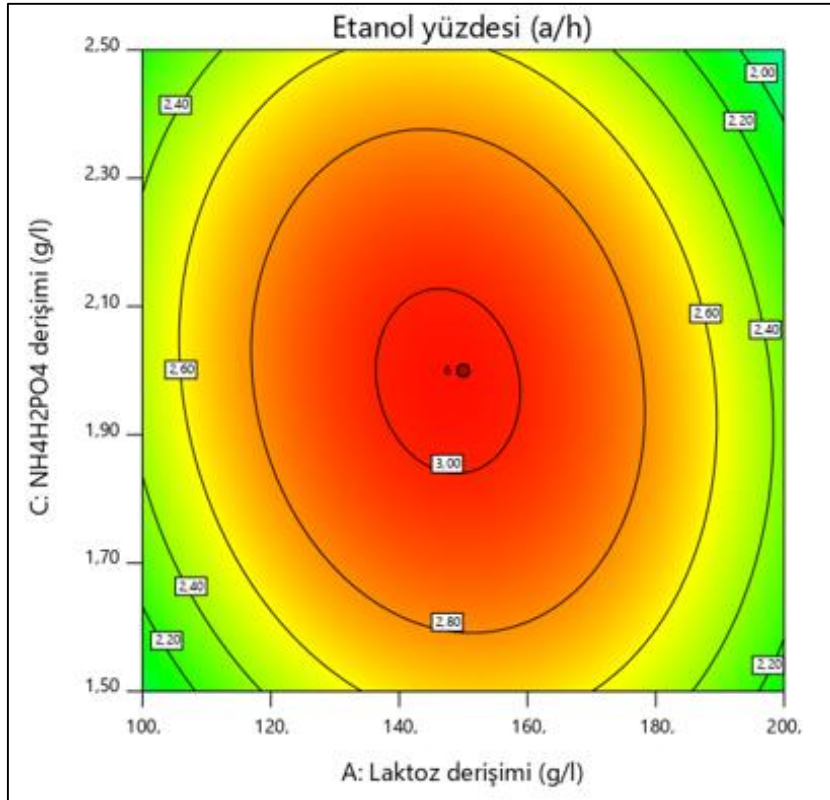
pH değeri 5'te sabit tutularak, 3 boyutlu cevap yüzey grafikleri ve eş derişim eğrilerinin elde edilmesi ile laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişimi parametrelerinin etanol yüzdesine etkileri incelenmiştir.

Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir.



şekil 4.4. Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği

Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren cevap yüzey grafiğinin daha iyi ifade edilebilmesi amacı ile şekil 4.5'te laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi verilmiştir.

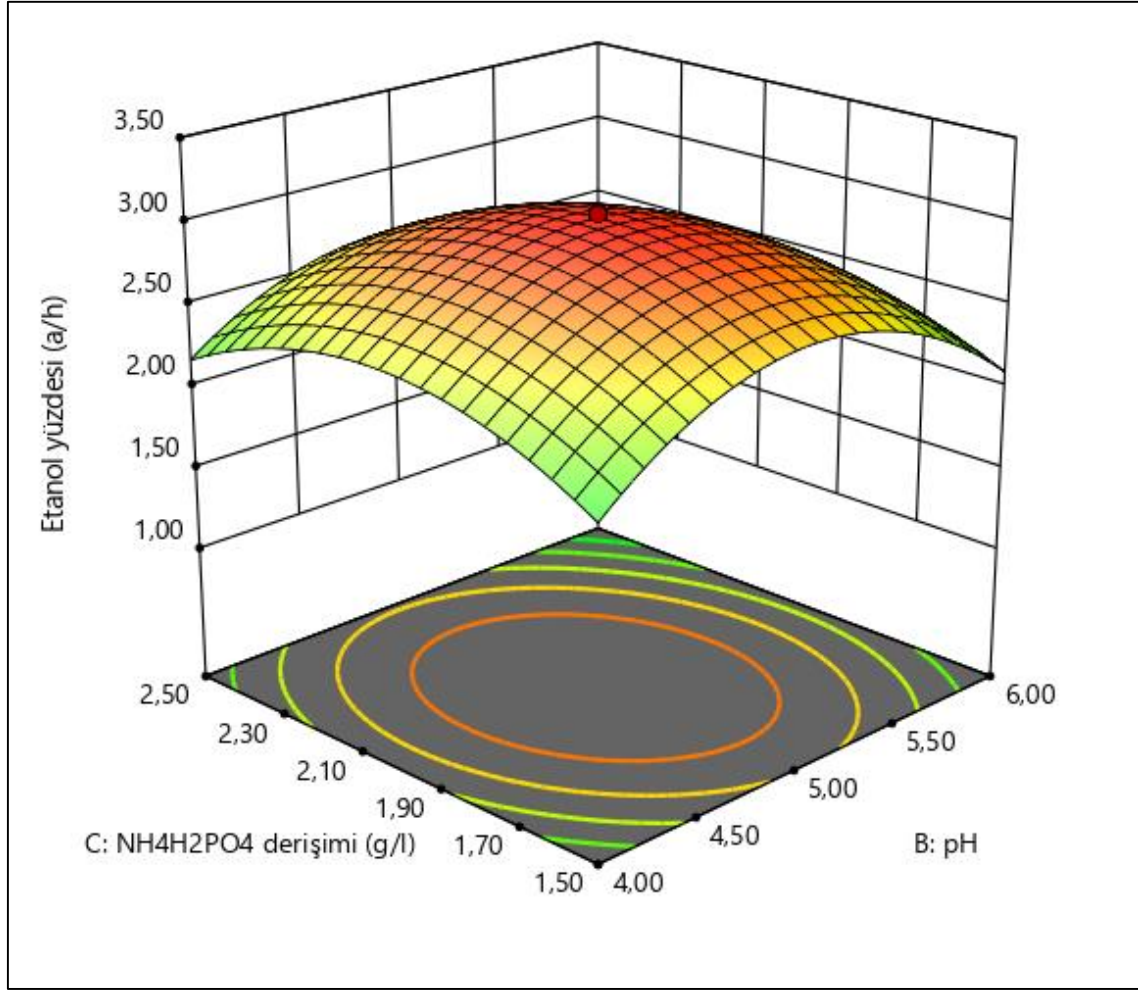


Şekil 4.5. Laktoz derişimi ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi

Şekil 4.4 ve 4.5'te görüldüğü üzere sabit laktoz derişiminde amonyum dihidrojen fosfat derişiminin belirli bir değerin üzerine çıkması çıkması mayaları olumsuz etkilerde etanol yüzdesinin düşmesine neden olmaktadır. Aynı şekilde sabit amonyum dihidrojen fosfat derişiminde laktoz derişimi belirli bir değerin üzerine çıktığında ozmotik duyarlılık ve düşük etanol toleransı gibi sorunlardan dolayı etanol yüzdesi düşmüştür.

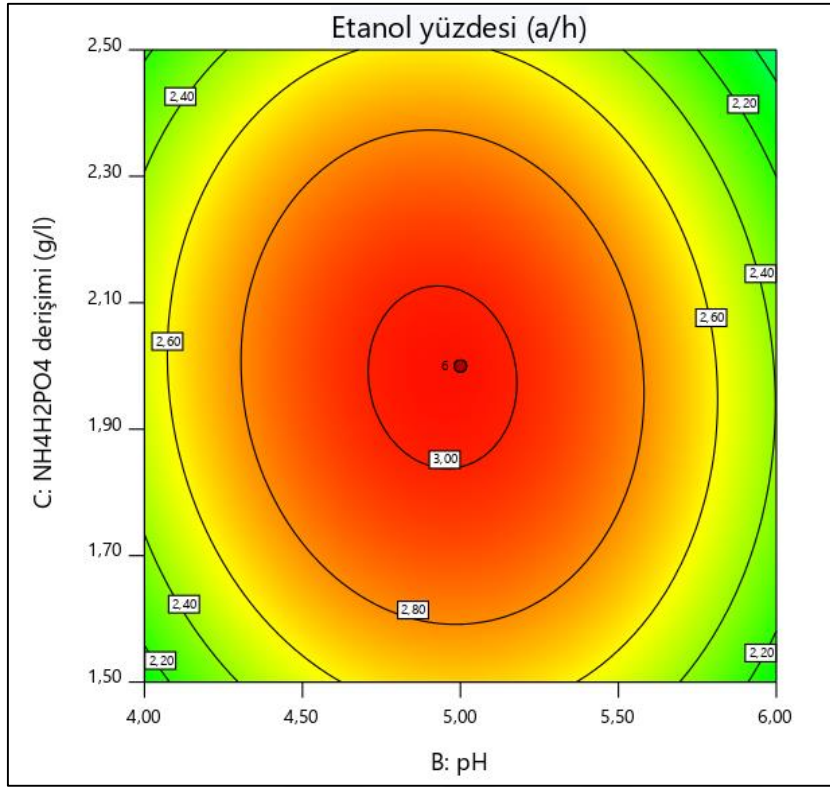
Laktoz derişimi 150 g/L değerinde sabit tutularak, 3 boyutlu cevap yüzey grafikleri ve eş derişim eğrilerinin elde edilmesi ile amonyum dihidrojen fosfat derişimi ve pH parametrelerinin etanol yüzdesine etkileri incelenmiştir.

pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren 3 boyutlu cevap yüzey grafiğı

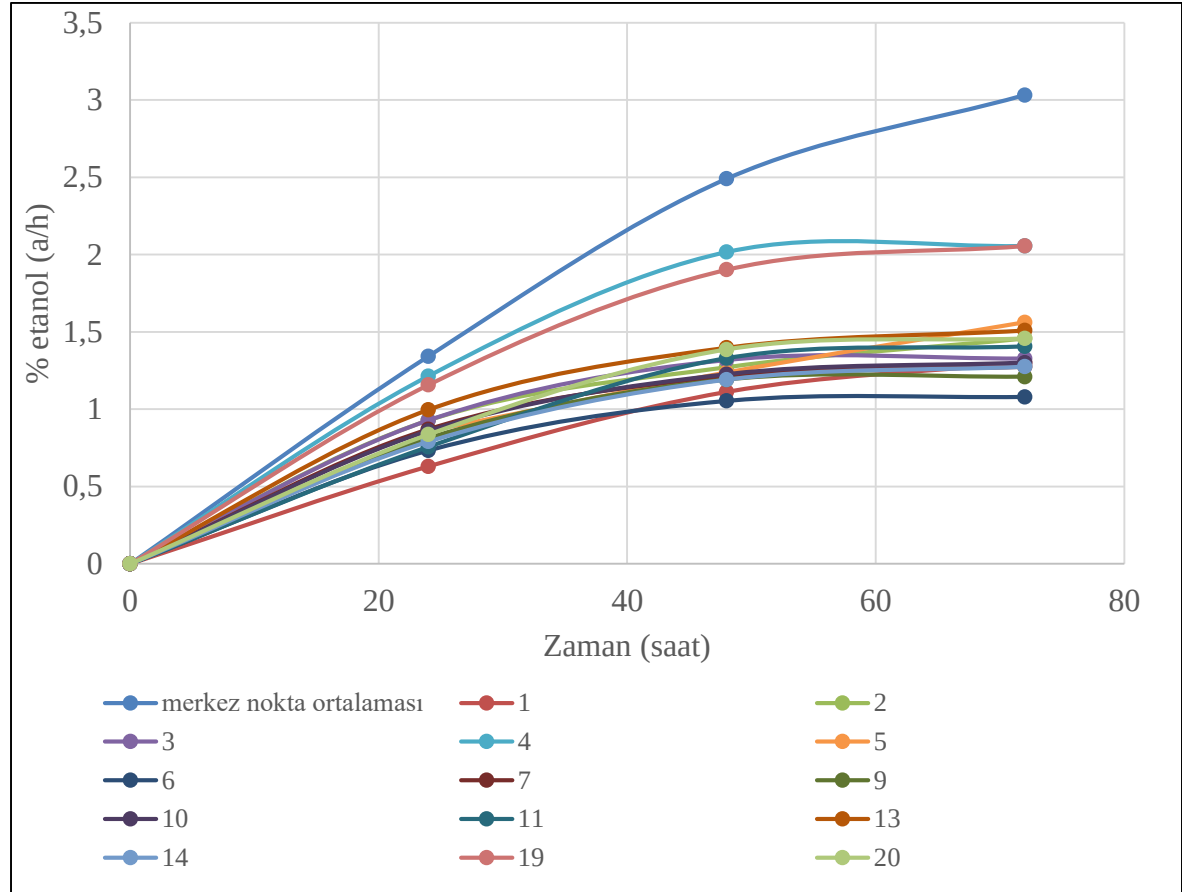
pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren cevap yüzey grafiğinin daha iyi ifade edilebilmesi amacı ile Şekil 4.7’de pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi verilmiştir.



Şekil 4.7. pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişiminin etanol yüzdesine etkilerini gösteren eş derişim eğrisi

Şekil 4.6 ve 4.7’de görüldüğü üzere sabit amonyum dihidrojen fosfat derişiminde pH’nın belirli bir değere kadar artması ile etanol yüzdesi artarken belirli bir değerden sonra etanol yüzdesinde düşüş gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, sabit pH değerinde amonyum dihidrojen fosfat derişimindeki artış belirli bir noktaya kadar etanol yüzdesini artırırken, amonyum dihidrojen fosfat derişiminin daha fazla artması etanol yüzdesinin azalmasına neden olmuştur.

Şekil 4.8’de zamana bağlı etanol yüzdesi verilmiştir.



Şekil 4.8. Zamana bağlı etanol yüzdesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bir süt endüstrisi yan ürünü olan peynir altı suyunun ultrafiltrasyon sisteminden geçirildikten sonra pülverize edilerek kurutulması ile elde edilen peynir altı suyu süzüntü tozundan fermentasyon yolu ile etanol üretimi amaçlanmıştır. Laktoz derişimi, pH ve amonyum dihidrojen fosfat derişimi parametrelerinin etanol yüzdesi üzerine etkileri incelenerek, peynir altı suyu süzüntüsünden fermentasyon yolu ile etanol üretiminde optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Box Wilson deneysel tasarım yöntemine göre tasarlanan deneylerden elde edilen sonuçlar Design expert 11 sürümü programı yardımı ile yorumlanarak fermentasyon için en uygun koşullar belirlenmiştir.

Fermentasyon ile etanol üretiminde yüksek etanol toleransından dolayı yaygın olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* ile karşılaştırıldığında laktozu hidroliz işlemine gerek duymadan doğrudan kullanabilme kabiliyeti nedeniyle bir maya türü olan *Kluyveromyces marxianus* tercih edilmiştir. DSM 7239 kodlu maya Alman Kültür Koleksiyonundan sağlanmıştır.

Çalışmada yüksek laktoz derişimlerini sağlayabilmek için peynir altı suyunun ultrafiltrasyon sisteminden geçirildikten sonra pülverize edilerek kurutulması ile elde edilen peynir altı suyu süzüntü tozu kullanılmıştır. Hiçbir katkı maddesi içermeyen peynir altı suyu süzüntü tozu Enka firmasından sağlanmıştır.

Katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanması, büyüme ve fermentasyon ortamlarının hazırlanması ve ekim sırasında her aşamada dikkatli bir şekilde sterilizasyon işlemleri yapılarak bu ortamlara çeşitli yollarla giren mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesi sağlanmıştır.

Box-Wilson deneysel tasarım yönteminde kullanılacak bağımsız değişkenler laktoz derişimi (X_1 , g/L), pH (X_2) ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ derişimi (X_3 , g/L)'dir. Etanol derişimi yüzdesi ise (Y , % a/h) bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin alt ve üst seviyeleri gerçekleştirilen literatür araştırması ışığında seçilmiştir. Laktoz derişimi için alt seviye 100 g/L ve üst seviye ise 200 g/L, pH için alt seviye 4 ve üst seviye 6 ve amonyum dihidrojen fosfat derişimi için alt seviye 1,5 g/L ve üst seviye 2,5 g/L olarak seçilmiştir. Box Wilson deneysel tasarım yöntemi kullanılarak elde edilen ve merkez noktada

gerçekleştirilen deney sayısı 6 olan 20 adet deneyden oluşan bir deneysel tasarım matrisi 2^3 tasarım matrisine göre oluşturulmuş, gerçekleştirilen deneyler sonucunda en yüksek %3,03 etanol yüzdesine 150 g/L laktoz derişimi, 5 pH ve 2 g/L amonyum dihidrojen fosfat derişimi değerlerinde ulaşılmıştır.

Design Expert 11 sürümü programı kullanılarak gerçekleştirilen ANOVA testi sonucunda, seçilen bağımsız değişkenlerin bağımlı değişken olan etanol yüzdesi üzerine etkileri belirlenerek Eşitlik 5.1’de verilen gerçek değerler cinsinden model eşitliği oluşturulmuştur.

$$Y_1 = -23,06 - 0,00465 X_1 X_3 - 0,000250 X_1^2 - 0,575 X_2^2 - 1,540 X_3^2 \quad (5.1)$$

ANOVA testi sayesinde model üzerinde etkili olan ve etkili olmayan parametreler belirlenmiştir. Testin sonuçlarına göre, bu çalışma için regrasyon katsayısı $R^2 = 0,9820$ olarak bulunmuştur. Bu değerin 1’e yakın olması modelin sistemi iyi bir şekilde ifade ettiğini gösterir.

KAYNAKLAR

1. Ozmihci, S. and Kargi, F. (2007a). Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess Biosyst Engineering*, 30, 79–86.
2. Das, B., Sarkar, S., Maiti, S. and Bhattacharjee, S. (2016). Studies on production of ethanol from cheese whwy using *Kluyveromyces marxianus*. *Materials Today*, 3, 3253-3257.
3. Domingos, J. M. B., Puccio, S., Martinez, G. A., Amaral, N., Reis, M. A. M., Bandini, S., Fava, F. and Bertin, L. (2018) Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chemical Engineering Journal*, 336, 47–53.
4. Lappa, I. K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A. Koulougliotis, D., Eriotou, E. and Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey Processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347.
5. El-Tanboly E. S., El-Hofi M. and Khorshid. (2017) Recovery of cheese whey, a by-product from the dairy industry for use as an animal feed. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 26(5), 148-154.
6. Siso M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57, 1-11.
7. İnternet: OECD/FAO (2019), “OECD-FAO Agricultural Outlook”, OECD Agriculture statistics (database), URL: https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/data/oecd-agriculture-statistics/oecd-fao-agricultural-outlook-edition-2019_eed409b4-en?parentId=http%3A%2F%2Finstance.metastore.ingenta.com%2Fcontent%2Fcollection%2Fagr-data-en, Son Erişim Tarihi: 27.02.2020.
8. Perry, R. H., Green D. W. and Maloney, J. O. (2008). *Perry's chemical engineers' handbook* (Seventh Edition). New York: McGraw-Hill, 2-37.
9. İnternet: Anonim. Global ethanol production for fuel use from 2000 to 2017. URL: <https://www.statista.com/statistics/274142/global-ethanol-production-since-2000/>, Son Erişim Tarihi: 27.02.2020.
10. Jiao, J., Li, J. and Bai, Y. (2018). Ethanol as a vehicle fuel in China: A review from the perspectives of raw material resource, vehicle, and infrastructure. *Journal of Cleaner Production*, 180, 832-845.
11. İnternet: Anonim. Biyoetanol. URL: <http://www.yegm.gov.tr/yenilenebilir/biyoetanol.aspx>, Son Erişim Tarihi: 27.02.2020.
12. Guimarães, P., Teixeira, J. and Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375–384.

13. Das, M., Raychaudhuri, A. and Ghosh S.K. (2016). Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 833 – 846.
14. Yiğit, N. (2007). *Peyniraltı suyundan sürekli sistemde biyogaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 96-100.
15. Guimarães, P., Teixeira, J. and Domingues, L. (2010), Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375–384.
16. İnternet: Ling K. C. (2008, February). Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives? USDA Rural Business and Cooperative Programs Rural Development Research Report 214, 1-27. URL: <https://ageconsearch.umn.edu/record/280102/>, Son Erişim Tarihi: 27.02.2020.
17. Anonim. (2005). *Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları* (Baskı sayısı). Ankara: Başak Matbaacılık Limited Şti, 358.
18. İnternet: Anonim. Besiyeri Hazırlama. URL: http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Temel%20Mikrobiyoloji.pdf, Son Erişim Tarihi: 10.11.2018.
19. İnternet: Anonim. Gıda teknolojisi ve temel mikrobiyoloji. URL: http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Besiyeri%20Haz%C4%B1rlama.pdf, Son Erişim Tarihi: 10.11.2018.
20. Pamir, H. (1985). *Fermantasyon mikrobiyolojisi*. Ankara: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayını, 10-43.
21. Kargi, F. and Ozmihci, S. (2006), Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 711–718.
22. Dragone, G., Mussatto, S., Silva, J. and Teixeira, A. (2011). Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*, 35, 1977-1982.
23. Diniz, R., Rodrigues, M., Fietto, L. Passos, F. and Silveira, W. (2014). Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 111–117.
24. Silveira, W. B., Passos, F. J. V., Mantovani, H. C. and Passos F. M. L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 930–936.
25. Ozmihci, S. and Kargi F. (2007b). Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 876–880.

26. Ozmihci, S. and Kargi, F. (2007b). Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. *Bioprocess Biosyst Engineering*, 30, 79–86.
27. Ghaly A. E. and El-Taweel A. A. (1995a). Effect of nutrient supplements addition on ethanol production from cheese whey using *Candida pseudotropicalis* under batch condition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53, 107–31.
28. Ghaly, A. E. and El-Taweel, A. A. (1995b). Effect of micro-aeration on the growth of *candida pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey. *Bioresource Technology*, 52, 203-217.
29. Ghaly, A. E. and El-Taweel, A. A. (1997). Continuous ethanol production from cheese whey fermentation by *Candida pseudotropicalis*. *Energy Sources Part a Recovery Utilization and Environmental Effects*, 19, 1043–63.
30. Bailey R. B., Benitez T. and Woodward A. (1982). *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression: use in cheese whey hydrolysate fermentation. *Applied Environmental Microbiology*, 44, 631–9.
31. Hahn-Hagerdal, B. (1985). Comparison between immobilized *kluveromyces fragilis* and *saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with p-galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. *Siotechnology and Bioengineering*, 27, 914-916.
32. Taya, M., Honda, H. and Kobayashi, T. (1984). Lactose-utilizing hybrid strain derived from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluveromyces lactis* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2239–43.
33. Farahnak, F., Seki, T., Ryu, D. D. and Ogrydziak, D. (1986). Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 362–7.
34. Ryu, Y. W., Jang H. W. and Lee H. S. (1991). Enhancement of ethanol tolerance of lactose assimilating yeast strain by protoplast fusion. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1, 151–6.
35. Soyuduru, D. (2006). *Fermentasyonla etanol üretiminde etanol veriminin artırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-100.
36. Aslan Çötelli, B. (2007). *Fındık kabuklarından tek kademeli özütlemeli sistemde furfural üretimi için uygun koşulların belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 27-67.
37. Derici, T. (2019). *Şeker pancarı melasından ticari kuru maya fermentasyonu ile biyoetanol üretiminde şeker, amonyum dihidrojen fosfat ve zeolit-X derişimlerinin etkilerinin istatistiksel teknikle incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 45-49.





EKLER

EK-1. Model için ANOVA testi sonuçları

ANOVA for Quadratic model							
Response 1: Etanol yüzdesi							
	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	10,9	9	1,21	64,0	1,18E-07	significant
	A-Laktoz derişimi	0,0541	1	0,0541	2,85	0,122	
	B-pH	0,0609	1	0,0609	3,21	0,104	
	C-NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi	0,0126	1	0,0126	0,665	0,434	
	AB	0,0820	1	0,0820	4,32	0,0644	
	AC	0,108	1	0,108	5,69	0,0382	
	BC	0,0300	1	0,0300	1,58	0,237	
	A ²	5,65	1	5,65	297,	9,09E-09	
	B ²	4,76	1	4,76	251,	2,08E-08	
	C ²	2,12	1	2,12	112,	9,50E-07	
	Residual	0,190	10	0,0190			
	Lack of Fit	0,189	5	0,0378	167,	1,48E-05	significant
	Pure Error	0,00113	5	0,000227			
	Cor Total	11,1	19				

EK-2. ANOVA testi sonucunda elde edilen R^2 değerleri

Fit Statistics					
	Std. Dev.	0,138		R^2	0,983
	Mean	1,96		Adjusted R^2	0,968
	C.V. %	7,04		Predicted R^2	0,868
				Adeq Precision	19,3

EK-3. ANOVA testi sonucunda elde edilen katsayılar

Coefficients in Terms of Coded Factors

	Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
	Intercept	3,04	1	0,0562	2,91	3,16	
	A-Laktoz derişimi	-0,0629	1	0,0373	-0,146	0,0202	1,00
	B-pH	-0,0668	1	0,0373	-0,150	0,0163	1,00
	C-NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi	-0,0304	1	0,0373	-0,114	0,0527	1,00
	AB	0,101	1	0,0487	-0,00732	0,210	1,00
	AC	-0,116	1	0,0487	-0,225	-0,00768	1,00
	BC	-0,0613	1	0,0487	-0,170	0,0473	1,00
	A ²	-0,626	1	0,0363	-0,707	-0,545	1,02
	B ²	-0,575	1	0,0363	-0,656	-0,494	1,02
	C ²	-0,384	1	0,0363	-0,465	-0,303	1,02

EK-4. Kodlanmış değerler cinsinden model eşitliği

Final Equation in Terms of Coded Factors

	Etanol yüzdesi	=
	+3,04	
	-0,0629	* A
	-0,0668	* B
	-0,0304	* C
	+0,101	* AB
	-0,116	* AC
	-0,0613	* BC
	-0,626	* A ²
	-0,575	* B ²
	-0,384	* C ²

EK-5. Gerçek değerler cinsinden model eşitliği

Final Equation in Terms of Actual Factors

Etanol yüzdesi	=	
-23,6		
+0,0730	* Laktoz derişimi	
+5,62	* pH	
+7,39	* NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi	
+0,00202	* Laktoz derişimi * pH	
-0,00465	* Laktoz derişimi * NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi	
-0,122	* pH * NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi	
-0,000250	* Laktoz derişimi ²	
-0,575	* pH ²	
-1,54	* NH ₄ H ₂ PO ₄ derişimi ²	

EK-6. Katsayılar ve p değerleri

Coefficients Table

p-value colors: **p < 0,0500** 0,0500 ≤ p < 0,100 p ≥ 0,100

	Intercept	A	B	C	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
Etanol yüzdesi	3,04	-0,0629	-0,0668	-0,0304	0,101	-0,116	-0,0613	-0,626	-0,575	-0,384
p-values		0,122	0,104	0,434	0,0644	0,0382	0,237	9,09E-09	2,08E-08	9,50E-07

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ARASAN, Nida
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 19.12.1993, İzmir
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 543 240 5085
e-mail : nidaarasan@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Mühendisliği	2017
Lise	75. Yıl Lisesi	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019-2020	Gemak	ArGe Mühendisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Arasan, N., Mutlu, S.F. (2020). *Peynir altı suyundan fermantasyon yolu ile etanol üretimi*. 4. Çukurova Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, 21-23 Şubat 2020, Adana, Türkiye.

Hobiler

Yan flüt, Kitap okumak.



GAZİ GELECEKTİR..