SİDAS MEDYA
Akademik Gıda® / Academic Food Journal
ISSN Print: 1304-7582, Online: 2146-9377
http://www.academicfoodjournal.com

Akademik Gıda 10(3) (2012) 84-92

Derleme Makale / Review Paper

Katı Faz Fermentasyon Yöntemi ile Enzim Üretimi

Ülgen İlknur Konak, Barçın Karakaş, Muharrem Certel, Fundagül Erem

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 06.03.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 15.06.2012
Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): barcink@akdeniz.edu.tr (B. Karakaş)
0 242 310 24 27 0 242 227 45 64

ÖZET

Bazı özel uygulamalar için sıvı faz içinde gerçekleştirilen derin fermentasyona (DF) alternatif bir yöntem olan katı faz fermentasyonu (KFF) son yıllarda araştırmacıların ve üreticilerin ilgisinden dolayı bilim ve endüstrinin birçok alanında uygulanmaktadır. Genel olarak, KFF yöntemi gıda, yem maddeleri, enzimler, organik asitler, aroma bileşikleri ve antibiyotikler gibi biyoteknoloji kullanılarak elde edilen ticari ürünlerin üretimi için uygundur ve DF yöntemine kıyasla daha ucuz bir işlemdir. Endüstride kullanılan enzimler, KFF yöntemi ile üretilen ürünler arasında yer alan en yaygın gruplardan biridir. Bu derlemede, KFF'nin uygulama alanları ve endüstride yaygın olarak kullanılan enzimlerin bu yöntemle üretimini etkileyen faktörler üzerinde durulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Katı faz fermentasyonu, Enzim üretimi, Zirai-endüstriyel atıklar

Solid State Fermentation for Enzyme Production

ABSTRACT

As an alternative method to Submerged Fermentation (SmF) for specific applications, Solid State Fermentation (SSF) has been applied in many fields of science and industry due to the interest in SSF from researchers and manufacturers recently. In general, SSF is a well-adapted and cheaper process than SmF for the production of bioproducts such as animal feed, enzymes, organic acids, aroma compounds, antibiotics, etc. Industrial enzymes are one of the most common categories of products from SSF. This review focuses on the SSF process applications and the factors affecting the production of enzymes used extensively in the industry.

Key Words: Solid state fermentation, Enzyme production, Agro-industrial wastes

GİRİŞ

Katı faz fermentasyonu (KFF), sıvı ortamın olmadığı durumlarda fiziksel olarak destek sağlayan ve besin bileşikleri açısından kaynak olarak kullanılan çözünür nitelikte olmayan materyal üzerinde gerçekleştirilen fermentasyon işlemi olarak tanımlanmaktadır [1]. KFF'de katı substrat mikroorganizmaların gelişimini ve metabolizmasını desteklemek amacıyla yeterli miktarda nem içeriğine (<%12) sahip olmalıdır. Yüzeyine ince tabaka halinde uygulanan su ile nemlendirilen katı substratın bileşimindeki suyun substrata ağırlıkça oranı genellikle 1:1 ile 1:10 arasında değişmektedir [2, 3]. Bu fermentasyon yöntemi, düşük nem içeriğinden dolayı başta maya ve küfler olmak üzere sınırlı sayıda mikroorganizma tarafından gerçekleştirilmektedir. Ancak bazı bakterilerin geliştirilmesi için de KFF'nin kullanıldığı bilinmektedir [4].

Esasında, KFF eski zamanlardan günümüze kadar gıda üretimi amacıyla uygulanmakta olan bir yöntemdir. Farklı funguslar kullanılarak gerçekleştirilen bu fermentasyon yönteminin tipik örnekleri; pirincin *Aspergillus oryzae* tarafından koji üretimini başlatmak amacıyla fermentasyona uğratılması ve peynir üretiminde *Penicillium roquefortii*'nin kullanılması şeklinde

sıralanabilir [5]. KFF uzak doğu kültüründe geleneksel gıdaların, içeceklerin vb ürünlerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Funguslar kullanılarak üretilen bu ürünler; Japonya'ya özgü miso, soya sosu ve sake, Endonezya'ya özgü tempeh ve ontjom, Hindistan'a özgü ragi ile Çin'e özgü shao-hsing şarabı ve kaoliangdır [6-8]. Japonya'da KFF endüstriyel enzimlerin ticari olarak üretilmesinde de kullanılmaktadır [9]. Japonya'nın KFF ile yapılan üretimlerde başı çektiği söylenebilir. Zira, soya sosu üretimi de Japonya'da çok yaygındır ve koji üretimi de soya sosu üretiminin bir bölümünü teşkil etmektedir. Batı ülkelerinde (Kuzey Amerika ve Avrupa) KFF uygulamaları Doğu ülkelerine kıyasla çok daha yavaş gelişmiştir. Japonya'ya kıyasla Avrupa fermentasyon endüstrisinde KFF'nin kullanımının daha az olması, KFF'nin uygulanmasında bu yöntemin temel ilkeleri ile ilgili olarak tam bir bilgiye sahip olunmaması ve özellikle şarap ve bira endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan DF gelişimine yönelik çalışmalar üzerine yoğunlaşılması ile ilişkilidir [10]. Ancak son yıllarda KFF yöntemi ile ilgili yayınlanmış birçok makale ve birkaç kitap Batı ülkelerinde de bu yöntemin uygulanmasına çaba harcandığını göstermektedir. Ayrıca bu ülkelerde günümüzün önemli problemlerinden olan çevre kirliliğinin ortaya çıkması [11] ve Brezilya gibi yüksek miktarda tarımsal atıkların üretildiği birçok ülkede atıkların değerlendirilmesi ihtiyacı KFF teknolojisinin gelişmesi için itici bir güç olmuştur [12].

KFF gıda, yem, ilaç ve tarım sanayi ürünlerinin üretiminde önemli ekonomik potansiyele sahiptir [13]. Günümüzde, zararlı bileşiklerin biyoremediasyonu ve biyodegradasyonu, tarımsal sanayi atıklarının biyolojik detoksifikasyonu, besin içeriğinin zenginleştirilmesi amacıyla bitki ve bitki kalıntılarının biyotransformasyonu, kağıt hamuru üretimi (biopulping) ve antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri, enzimler, organik asitler, biyopestisitler (mikopestisit ve biyoherbisit), biyosürfektanlar, biyoyakıtlar, aroma bileşenleri vb bileşikleri içeren katma değeri yüksek biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin üretilmesi gibi biyoproseslerin geliştirilmesinde KFF yönteminin uygulanması üzerine yoğunlaşılmaktadır [3, 4, 14].

KFF'nin uygulanması için gerekli olan koşullar ve bu prosesin özellikleri literatürde ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir [15]. Bu kaynağa göre; kullanılan katı materyalin hem geniş yüzey alanı sağlayarak mikroorganizmaların gelişmesine elverişli olması hem de bu gözenekli yapı sayesinde biyokimyasal olayların yüksek hızda gerçekleşebilmesi için yeterli miktarda suyu absorbe edebilmesi gereklidir. Ayrıca fermentasyon ortamı düşük basınç altında havalandırılmalı ve substrat parçalanmaya veya birbirine yapışmaya eğilimi olmayan küçük granüllü veya lifli partiküllerden oluşmalıdır. Bu özelliklerinin yanı sıra, substrat mikrobiyal aktiviteyi inhibe edebilecek maddeler ile kontamine olmamalı ve karbonhidrat kaynağı (selüloz, nişasta, şeker), azot kaynağı (amonyak, üre, peptit) ve mineraller gibi mikrobiyal besin maddelerini içermelidir.

KATI FAZ FERMENTASYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Kullanılan substrat ve mikroorganizma çeşidine ve üretim ölçeğine de bağlı olarak prosesten prosese farklılık gösteren birçok faktör KFF'yi etkilemektedir. Bu faktörler; biyolojik, fiziko-kimyasal ve çevresel olmak üzere genel olarak üç gruba ayrılmaktadır. Biyolojik faktörler canlı organizmanın biyolojisi, metabolizması ve üremesi ile ilgili faktörlerdir. Fiziko-kimyasal faktörler ise momentum, enerji ve kütle transferi gibi sistemin tüm termodinamik yapısını etkileyebilen, sistem içinde meydana gelen fiziko-kimyasal olaylar ile ilgilidir [16]. Sıcaklık, pH, su aktivitesi, oksijen seviyesi, besin bileşenleri ve ürün konsantrasyonu gibi çevresel faktörler de mikrobiyal gelişmeye ve ürün oluşumuna önemli ölçüde etki etmektedir [15]. Elbette, tüm bu faktörler birbiri ile yakından ilişkilidir ve birbirinden bağımsız olarak düşünülemez.

KFF'de mikrobiyal gelişmeye ve aktiviteye etki eden temel faktörler; uygun mikroorganizma ve substrat seçimi, substrata uygulanan ön işlemler, substratın partikül boyutu, substratın su içeriği ve su aktivitesi, ortamdaki bağıl nem, aşılama (inokülasyon) yöntemi ve miktarı, ortam sıcaklığı, solunum sırasında üretilen metabolik ısının uzaklaştırılması, yetiştirme (kültivasyon) süresi, fermentasyon ortamının homojenliğinin muhafaza edilmesi ve uygun atmosferik bileşimin sağlanmasıdır (oksijen tüketim hızı ve karbondioksit üretim hızı) [17-19].

Katı substrat üzerinde gerçekleştirilecek olan fermentasyon işlemi için uygun mikroorganizmanın seçimine dikkat edilmelidir. Küfler; fizyolojik, enzimolojik ve biyokimyasal özellikleri sayesinde KFF'ye en iyi adapte olabilen mikroorganizmalardır. Hifli formda gelişen küflerin bu yapısı mikroorganizmanın katı substrat içine nüfuz etmesini sağlamaktadır. Bu özellik sayesinde küfler, katı faz üzerinde kolaylıkla yayılarak ve hızla gelişerek mevcut besin öğelerini değerlendirebilmektedir [20, 21]. KFF'de yaygın olarak küfler kullanılmakla beraber, bakterilerin ve mayaların da kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Genel olarak kompostlama ve silolama gibi işlemlerde bakteriler kullanılırken, etanol ve gıda veya yem üretiminde ise mayalar kullanılmaktadır [22].

KFF sisteminde su, katı matriksin içinde kompleks formda veya ince bir tabaka olarak, ya partiküllerin yüzeyine absorbe edilmiş ya da katının kapiler bölgelerinde fazla sıkı olmayan bir şekilde bağlanmış olarak bulunmaktadır. KFF'de su miktarı genellikle %30-85 arasında değişmektedir. Katı matriksin su içeriği bakteriler için %70'den fazla olmalıdır; mayalar için %60-72 gibi dar bir aralıkta ve küfler için ise %20-70 gibi geniş bir aralıkta olabilmektedir. Mikroorganizmaların su gereksinimleri genellikle katı substratın su içeriğinin yanı sıra su aktivitesi açısından da değerlendirilmelidir [15, 16, 23]. Su aktivitesi, substratın su bağlama özelliğine bağlı olarak değişmekte ve fermentasyon süresince substratta meydana gelen dehidrasyon ve çözünen maddelerin substratın içinde birikmesi sonucunda azalabilmektedir [15, 23, 24]. Bakterilerin gelişmeleri için

küflerden daha yüksek su aktivitesine gereksinim duymaları nedeniyle KFF'de küflerden daha başarılı bir şekilde yararlanılmaktadır [23].

Herhangi bir fermentasyon prosesini etkileyen diğer önemli bir faktör de metabolik aktivitelere bağlı olarak değişebilen pH'dır. Her mikroorganizmanın gelişmesi ve faaliyet gösterebilmesi için uygun olan belirli bir pH aralığı vardır. Genellikle bu pH aralığının küfler için 3.5-6.0, mayalar için ise 4.5-7.0 arasında olduğu ve asidik ortamlarda mayaların bakterilerden daha iyi geliştiği gözlenmektedir. Ancak bu bir kural olarak algılanmamalıdır; çünkü *Lactobacillus* sp. gibi bazı bakteriler pH 2 gibi çok düşük pH değerlerinde bile gelişebilmektedir [16].

Ortam pH'sının kontrolü, KFF işleminde henüz çözümlenmemiş sorunlardan biridir. Bu sorun; katı materyalin pH değerini belirlemek için uygun ekipmanların ve elektrodların olmamasından ve katı fazın heterojen yapısından dolayı pH gradientlerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır [15, 16, 23, 25]. KFF prosesi süresince meydana gelen pH değişimi probleminin üstesinden gelmek için, kullanılan farklı bileşenlerin tamponlama kapasitesi göz önünde bulundurularak hazırlanan substratın veya biyolojik aktivite üzerine zararlı etkisi olmayan bileşenler ile hazırlanan tamponun kullanımı gibi girişimlerde bulunulmuştur [10, 25].

KFF'de performansı etkileyen tüm fiziksel değişkenler arasında yer alan en önemli faktör sıcaklıktır. Çünkü mikroorganizmaların gelişmesi ve enzim veya metabolitlerin üretimi genellikle sıcaklığa duyarlıdır [26]. Fermentasyon proseslerinde (KFF ve DF) çoğunlukla mezofilik mikrobiyal suşlar kullanılmakla birlikte; son yıllarda işlem süresince oluşan ısıdan kaynaklanan problemlerin çözümünü sağlayacağı düşüncesiyle termofilik mikroorganizmalar üzerinde durulmaktadır. Fermentasyon işleminin ekzotermik özelliğinden kaynaklanan sıcaklık artışı, KFF'de karşılaşılan başlıca sorunlardan biridir. Sıcaklık kontrolü, DF ile kıyaslandığında KFF'de daha zordur çünkü homojen olmayan substratın özellikleri reaktörde sıcaklık gradientlerinin oluşması ile sonuçlanmaktadır [16].

Büyük ölçekli KFF işlemlerinde karşılaşılan diğer önemli bir sorun da oluşan ısının ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Konveksiyon veya kondüksiyon ile soğutma cihazları çoğu katı substratın düşük termal iletkenliğinden dolayı oluşan metabolik ısının dağıtılmasında yetersiz kalmakta; bu durum da işlemde istenmeyen sıcaklık gradientlerinin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Ancak evaporatif soğutma cihazları, oluşan ısıyı sistemden yeterli ölçüde uzaklaştırma kapasitesine sahiptir. Ayrıca öncelikli fonksiyonu olmamakla birlikte havalandırma işlemi de katı ve gaz faz arasında ısı transferini gerçekleştirerek ısının uzaklaştırılması yönünde önemli bir hizmet sunmaktadır [15].

KFF'de kullanılan mikroorganizma tipinin yanı sıra substrat çeşidi de prosesi etkileyen diğer bir faktördür. Genel olarak KFF'de yararlanılan substratların ortak bir özelliği temel makromoleküler yapıya (örneğin; selüloz, nişasta, pektin, lignoselüloz, lif vb.) sahip olmalarıdır; ayrıca bu substratlar tarım veya tarımsal sanayinin yan ürünlerinden elde edilen kompozit ve heterojen yapıdaki ürünlerdir. Proseste bu temel makromoleküler matrikslerden karbon ve enerji kaynağı olarak yararlanılmaktadır [15]. KFF için uygun substratın seçimi başta maliyeti ve temin edilebilirliği olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır; substratın heterojen yapısı da bu işi zorlaştırmaktadır [13].

Genel olarak tarımsal sanayi atıklarının, zengin organik yapısından dolayı KFF prosesinde katma değeri yüksek ürünlerin üretimi için en uygun substrat olduğu ve bu substratların kullanımının ekonomik açıdan yarar sağladığı düşünülmektedir. Bu substratlar; şeker kamışı küspesi, tatlı patates, patates, buğday, pirinç, mısır, muz atığı, çay ve kahve atıkları, palm yağı fabrikası atıkları, şeker pancarı küspesi, sorgum küspesi, fındık küspesi, hindistan cevizi yağı keki, hindiba kökü, bitkisel atıklar vb ürünlerdir [4, 23].

Substrat seçimi yapıldıktan sonra substratı mikroorganizmaların daha fazla yararlanabileceği uygun forma dönüştürme işlemleri de fermentasyon prosesini etkilemektedir. Substrata uygulanan bu ön işlemler; eleme, öğütme, rendeleme veya doğrama işlemleriyle boyut küçültmek; öğütme, soyma veya çatlatma işlemleriyle substratın dış tabakasını ayırmak; polimerleri kimyasal veya enzimatik olarak hidrolize etmek; besin maddeleri (fosfor, azot, tuzlar) ile takviye etmek; mineral çözeltiler aracılığıyla pH ve nem içeriğini ayarlamak; makromoleküler yapının kısmen parçalanması için pişirmek veya buhar uygulamak ve başlıca kontaminantları uzaklaştırmak şeklinde sıralanabilir [20].

Substratın partikül boyutu, partikülün yüzey alanı/hacim oranını doğrudan etkilediği ve KFF prosesi süresince gerçekleşen mikrobiyal gelişme ve ısı - kütle aktarımlarıyla değişen sistem kapasitesi ile ilgili olduğu için önemlidir [27]. Genel olarak, substratın küçük partiküllü olması mikroorganizmaların kullanabileceği geniş yüzey alanını sağlamaktadır. Ancak, partiküllerin fazla küçük olması çoğu durumda substratın topaklaşmasına neden olabilmektedir. Bu durum mikroorganizmaların solunumunu/havalandırılmasını engelleyebilmekte ve az gelişmelerine neden olabilmektedir. Bununla birlikte, partiküllerin daha büyük olması ise daha iyi solunum/havalandırma verimi sağlamakta; ancak mikroorganizmaların kullanması için sınırlı yüzey alanı sunmaktadır. Bu yüzden, prosese başlamadan önce uygun substrat boyutunun seçilmesi önemli bir aşamadır [4, 23].

Havalandırma ve karıştırma, aerobik bir proseste oksijen ihtiyacının karşılanması ve heterojen sistemde ısı ve kütle aktarımının yapılabilmesi için gerekli olan önemli işlemlerdir [23]. Havalandırma işlemi ile ortamın oksijen ihtiyacı sağlanırken aynı zamanda fermentörde oluşan karbondioksit ve diğer uçucu metabolitler ile beraber ısı da uzaklaştırılmaktadır [10]. Daha önce de belirtildiği üzere; matriksin heterojen yapısı nedeniyle fermentasyon süresince sıcaklık kontrolü ve ısı iletimi gibi birçok sorunla karşılaşılmaktadır. Karıştırma işlemi

de bu problemleri çözmek için olası bir yöntemdir. Bu işlem, aerobik fermentasyon sırasında sıcaklık ve gaz ortamı açısından homojenlik sağlamaktadır [10,16].

KFF'NİN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

Son yıllarda araştırmacıların ve endüstrinin DF yöntemine kıyasla KFF yöntemine olan ilgisi, KFF'nin DF'ye göre katı atık yönetimi, biyokütlenin enerjiye dönüşümü ve biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin üretimi alanlarında sağladığı avantajlardan kaynaklanmaktadır [28]. KFF yönteminin hem ekonomik hem de pratik olması açısından sağladığı bu avantajlar; hammaddelerin substrat olarak kullanılması, bileşimi, boyutu, mekanik işlemlere dayanımı, porozitesi ve su tutma kapasitesi açısından farklı özelliklere sahip geniş çeşit aralığında matrikslerin kullanılması, düşük maliyetli olması, enerji tüketiminin düşük olması, daha az su kullanımı ve atıksu çıkışı, üretim kapasitesinin fazla ve ürün konsantrasyonunun yüksek olması, dar alanlarda fermentasyon yapılabilmesi, kontaminasyon olması durumunda daha kolay müdahale edilebilmesi, genellikle daha basit fermentasyon ortamının olması ve substrat inhibisyonunun olmamasıdır [11, 14, 18, 23, 29].

Bir önceki paragrafta bahsedilen avantajların yanı sıra, KFF yönteminin DF yöntemi ile kıyaslandığında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar; kültür ortamının heterojen yapısının sonucu olarak karıştırma etkinliğinin düşük olması, oksijen transferinin ve pH, ısı, nem gibi proses parametrelerinin kontrolünün zor olması ve kullanılan mikroorganizma çeşidinin ortamın nem içeriğinin düşük olmasından dolayı sınırlı olmasıdır [15, 20, 30, 31].

KFF İLE ENZİM ÜRETİMİ

Enzim üretimi, biyoteknoloji alanında her geçen yıl daha hızlı büyüyen bir alandır. Enzimler, insan ihtiyaçları için mikrobiyal kaynaklardan elde edilen en önemli ürünler arasında yer almaktadır. Endüstriyel, çevre ve gıda biyoteknolojisi alanlarındaki birçok endüstriyel işlemde enzimlerden yararlanılmaktadır. Biyoteknoloji alanındaki güncel gelişmeler, enzimlerin kullanıldığı yeni uygulamalara olanak sağlamaktadır. KFF yöntemi, enzim üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir [17]. Bu yöntemde DF'ye göre genellikle daha az enerji ile daha küçük fermentörlerde daha az atık su kirliliğine yol açarak daha kararlı yapıda ürünlerin üretildiği belirtilmektedir [7]. KFF ile üretilen enzimler; silolama işlemi, bitkisel ürünlere ve atıklarına uygulanan biyo-işlemler, lif prosesi, besin takviyesi, deterjan, kağıt hamuru ve kağıt üretimi ve toprak biyoremediasyonu gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır [14].

Küfler, bakteriler ve mayalar çeşitli enzimleri üretebilme yeteneğindedir. Ancak küflerin; selülaz, ksilanaz, ligninaz ve pektinaz gibi bitki hücre duvarının parçalanmasını sağlayan enzimleri salgılama kapasitesinin yüksek olmasının yanı sıra katı substratlar üzerinde gelişebilme yeteneğinden dolayı; küfler en önemli sanayi mikroorganizmaları arasında yer almaktadır [32, 33]. KFF'de farklı substratlar üzerinde çeşitli enzimlerin üretimini gerçekleştiren mikrobiyal kültürler Tablo 1'de sunulmuştur.

Amilaz

Amilazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmelerine karşın; bu enzimlerin endüstriyel talepleri genellikle mikrobiyal enzim üretimiyle karşılanmaktadır [34]. Amilazları üretme yeteneği olan pek çok bakteri ve küf mevcuttur; fakat üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalar *Bacillus* ve *Aspergillus* türleridir [35]. Amilazlar gıda endüstrisinin yanı sıra tekstil, deterjan ve kağıt endüstrilerinde de kullanılmaktadır [36]. Bu enzimlerin endüstriyel ölçekte üretimi, kullanımının kolay olması ve sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerin daha iyi kontrol edilebilmesi sebebiyle genellikle DF yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak üretilen metabolitlerin yoğun olması ve saflaştırma işlemlerinin daha az maliyetli olmasından dolayı KFF, DF'ye alternatif bir yöntem teşkil etmektedir [35]. Nişasta sakkarifikasyonu, mayalama ve damıtma işlemleri için gıda ve fermentasyon endüstrisinde kullanılan bu enzimler, küfler kullanılarak çeşitli substratlar üzerinde gerçekleştirilen KFF yöntemi ile birçok Asya ülkesinin yanı sıra Kuzey Amerika'da da üretilmektedir [23].

Proteaz

Proteazların peynir üretimi, etin yumuşatılması (tenderizasyon), fırın ürünleri sanayi gibi pek çok endüstriyel prosesin yanı sıra tekstil ve deri sanayisinde ve katkı maddesi olarak deterjanlarda kullanılması gibi geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır [36, 37]. Proteazların küfler kullanılarak KFF ile üretilmesi tercih edilen bir yöntemdir. Çünkü, bu yöntemde enzimlerin konsantre halde ekstraselüler olarak üretilmesi ile geri kazanımı daha kolay olmaktadır [19, 37]. Bu enzimin üretimi için yaygın olarak kullanılan küfler; *Aspergillus oryzae, A. niger, A. flavus, Mucor, Rhizopus oligosporus, Penicillium citrinum* vb'dir. Ayrıca farklı substratlar kullanılmasına rağmen buğday kepeğinin bu proses için en uygun substrat olduğu belirtilmektedir [38].

Selülaz

Selülazların glikoz, etanol ve yüksek fruktozlu şurup üretiminde, sindirime yardımcı maddelerde, yeşil çay bileşenlerinin ekstraksiyonunda, gıdaların yapısal özelliklerinin geliştirilmesinde, jüt lifi üretiminde ve hayvan yemi kalitesinin arttırılmasında [39] kullanımının yanı sıra günümüzde en önemli uygulama alanı kağıt endüstrisidir. Burada selülazlar kağıt hamurlarının biyoağartılmasında, çözünür kağıt hamuru üretiminde, atıksu arıtımında ve geri dönüşümdeki atık kağıtların mürekkeplerinin çıkartılmasında kullanılmaktadır [40]. KFF prosesi ile selülaz üretimi, uygun maliyetli bir teknoloji olarak hızla ilgi kazanmaktadır ve özellikle *T. reesei, A. niger, Penicillium* sp. [41] ve *Melanocarpus* sp., *Scymlidium thermophilum*, *Thermoascus aurantiacus* gibi küfler oldukça yüksek miktarda selülaz üretmektedir [19]. Selüloz açısından zengin çeşitli tarımsal yan ürünler KFF yönteminde selülaz üretimi için kullanılmaktadır [19, 42].

Tablo 1. KFF'de çeşitli enzimlerin üretimi için kullanılan mikrobiyal kültürler

Substrat	Mikroorganizma	Enzim	Kaynak
Buğday kepeği	*Aspergillus* sp.	Glukoamilaz	[35]
Buğday unu	*Aspergillus oryzae*	α-amilaz	[21]
Buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır unu, darı, buğday ezmesi, arpa kepeği, mısır koçanı	*Thermomyces lanuginosus*	Amilaz	[34]
Hindistan cevizi yağı keki	*Aspergillus oryzae*	α-amilaz	[49]
Buğday kepeği, cassava unu, şeker kamışı küspesi, mısır koçanı	*Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*	α-amilaz/ Glukoamilaz	[50]
Buğday kepeği	*Aspergillus oryzae*	Proteaz	[51]
Yaysız soya keki	*Penicillium* sp.	Proteaz	[37]
Buğday kepeği, pirinç kabuğu, pirinç kepeği, hindistan cevizi yağı keki, palm çekirdeği keki, susam yağı keki, tropik meyve (*Artocarpus heterophyllus*) çekirdeği unu, zeytinyağı küspesi	*Aspergillus oryzae*	Proteaz	[52]
Mısır koçanı	*Phanerochaete chrysosporium* / *Phlebia radiata*	Proteaz	[53]
Buğday kepeği	*Penicillium* sp.	Proteaz	[54]
Pirinç kepeği	*Rhizopus oligosporus*	Proteaz	[55]
Buğday kepeği	*Rhizopus oryzae*	Proteaz	[56]
Pirinç ve buğday kepeği	*Aspergillus niger*	Selülaz	[40]
Buğday samanı ve kepeği	*Aspergillus niger*	Selülaz	[42]
Buğday samanı ve kepeği	*Penicillium decumbens*	Selülaz	[57]
Buğday samanı	*Trichoderma reesei*	Selülaz	[58]
Mısır sapı	*Fusarium oxysporum*	Selülaz	[59]
Zeytin atıkları	Tunisia	Ligninolitik enzim	[60]
Talaş, yonga bazlı katı materyal	*Trametes trogii*	Ligninolitik enzim	[61]
Soya keki	*Penicillium simplicissimum*	Lipaz	[62]
Şeker kamışı küspesi	*Rhizopus homothallicus*	Lipaz	[63]
Babassu yağı atıkları	*Penicillium restrictum*	Lipaz	[64]
Buğday kepeği	*Aspergillus niger*	Lipaz	[65]
Buğday kepeği	*Thermomyces lanuginosus*	Ksilanaz	[66]
Buğday samanı	*Aspergillus terreus*	Ksilanaz	[44]
Mısır sapı	*Fusarium oxysporum*	Ksilanaz	[67]
Soya yağı keki	*Penicillium canescens*	Ksilanaz	[68]
Mısır koçanı ve buğday kepeği	*Aspergillus niveus, A. niger, A. ochraceus*	Ksilanaz	[69]
Limon kabuğu, akdarı sapı, ayçiçeği	*Aspergillus niger*	Pektinaz	[70]
Portakal küspesi ve buğday kepeği	*Penicillium viridicatum*	Pektinaz	[71]
Buğday kepeği	*Streptomyces* sp.	Pektinaz	[72]
Soya küspesi	*Aspergillus oryzae*	Fitaz	[73]
Hindistan cevizi yağı keki	*Rhizopus oligosporus*	Fitaz	[74]
Buğday kepeği ve yağ küspesi	*Mucor racemosus*	Fitaz	[75]
Buğday kepeği ve soya küspesi	*Aspergillus niger*	Fitaz	[76]

Lipaz

Mikrobiyal lipaz üretimine olan ilgi giderek artmaktadır. Moleküler yapısının ve katalitik özelliklerinin çok yönlü oluşu sayesinde bu enzim; gıda, atıksu arıtımı, kozmetik, oleo kimyasal, ilaç ve deterjan gibi farklı endüstriyel sektörlerde ve yakıt sektöründe ester sentezinde ve biyodizel üretimi için yağın transesterifikasyonunda katalizör olarak kullanılmaktadır [43]. Gıda endüstrisinde bu enzimden peynirde tat-aroma geliştirilmesinde, peynirin olgunlaştırılmasının hızlandırılmasında ve fırın ürünlerinin üretiminde yararlanılmaktadır [44]. Lipaz şeker kamışı küspesi, soya küspesi, arpa ve buğday kepeği gibi çeşitli tarımsal atıklar kullanılarak KFF yönteminde farklı mikroorganizmalar tarafından üretilebilmekle birlikte; ticari lipaz üretiminde çoğunlukla *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oryzae* küfleri kullanılmaktadır [19].

Ligninaz

Ligninaz yem katkısı olarak ve hayvan yeminden ticari olarak biyoyakıt üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca kağıt hamurunun işlenmesinde ve ağartılmasında, atıksuların detoksifikasyonunda, çevre kirliliğine yol açan maddelerin parçalanmasında ve lignoselülozik materyallerin delignifikasyonunda da kullanılmaktadır [17, 19, 23]. Birçok mikroorganizmanın ligninaz ürettiği; ancak aralarında özellikle *Pleurotus* sp. ve *Phanerochaete chrysosporium*'un KFF yönteminde yaygın olarak buğday posası ve samanı kullanılarak istenilen kalitede ve kapasitede ligninaz üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir.

Ksilanaz

Ksilanaz; gıda endüstrisinde ekmek, bisküvi ve meyve suyu üretiminde amilaz, proteaz ve pektinaz enzimleri ile birlikte kullanılarak ürünlerin yapısal özelliklerini geliştirmektedir [45]. Bu uygulamalarla birlikte yaygın olarak kağıt endüstrisinde ligninin kağıt hamurundan

kimyasal ekstraksiyonunu kolaylaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ksilanazın çeşitli lignoselülozik substratlar kullanılarak KFF'de üretildiği ve bu yöntemde üretimin birçok avantaj sağladığı bildirilmiştir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen ksilanaz enziminin en önemli üreticisi küflerdir [46]. Son yıllarda; *Thermomyces lanuginosus, Thermoascus aurantiacus, Aspergillus awamori, A. niger, A. oryzae, Penicillium canescens, Ceriporiopsis subvermispora, Melanocarpus albomyces, P. thermophila* J18 ve *Trichoderma reesei* gibi birçok küf tarafından bu enzimin üretildiği [19] ve aralarında en iyi ksilanaz üreticisinin termofilik bir küf olan *Thermomyces lanuginosus* olduğu bildirilmiştir [23].

Pektinaz

Pektini parçalayan enzim olan pektinaz; maserasyon, ekstraksiyon, sıvılaştırma, durultma ve valorizasyon (biyolojik atıkların değerlendirilmesi) gibi çeşitli işlevler için yaygın olarak meyve, şarap ve sebze endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ticari ölçekte pektinaz üretimi için çoğunlukla *Aspergillus niger, A. carbonarius, A. sojae* ve *Rhizopus* sp. küflerinden yararlanılmaktadır. KFF'de pektinaz üretimi için soya ve buğday unu, şeker pancarı ve kamışı küspesi, ayçiçeği küspesi, portakal kabuğu ezmesi/posası, limon pulpu, portakal küspesi gibi çeşitli substratlar tek başına veya birlikte kullanılmaktadır [19].

Fitaz

Fitaz; insan beslenmesinde ve hayvan yetiştiriciliğinde mineral absorpsiyonunu artırmak amacıyla kullanılmaktadır [47]. Fitaz enzimi de bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ancak günümüz çalışmaları göstermektedir ki, ticari ölçekte fitaz üretimi için mikrobiyal kaynakların kullanımı daha gelecek vadeden bir uygulamadır. Bu enzimin üretimi amacıyla farklı şartlarda birçok bakteri, maya ve küf kullanılmasına rağmen; *Aspergillus niger* ve *Aspergillus ficuum* enzimin ticari olarak üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [48]. Bu mikroorganizmalar dışında; *Rhizopus oligosporus, Rhizopus oryzae, Mucor racemosus* ve *Aspergillus ficuum* da KFF yöntemi ile fitaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır [19].

SONUÇ

Mikrobiyal enzimler gıda, yem, deterjan ve kağıt gibi birçok endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler genellikle DF yöntemi ile üretilmekle birlikte; son yıllarda çeşitli enzimlerin üretiminde KFF yönteminin kullanımına olan ilgi artmakta ve bu yöntemin çeşitli alanlarda uygulanmasına yönelik önemli gelişmeler olmaktadır. Bu yöntemin bazı dezavantajlarından dolayı endüstrideki uygulamaları kısıtlı olsa da, özellikle düşük maliyeti ve az enerji tüketimi gibi avantajları göz önünde bulundurulduğunda KFF yöntemi ekonomik bir endüstriyel proses olarak karşımıza çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 27(2): 109–117.

[2] Nigam P., Singh D., 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology* 34(6): 405–423.

[3] Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 81–84.

[4] Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35(10): 1153–1169.

[5] Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(2): 175–186.

[6] Steinkraus, K.H., 1984. Solid-state (Solid-substrate) food/beverage fermentations involving fungi. *Acta Biotechnologica* 4(2): 83-88.

[7] Longo, M.A., Deive, F.J., Dominguez, A., Sanroman, M.A., 2008. Solid-State Fermentation for Food and Feed Application. In Current Developments in Solid-state Fermentation, Edited by A. Pandey, C. R. Soccol, C. Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India, pp. 379-411.

[8] Filler, K., 2011. Production of enzymes for the feed industry using solid substrate fermentation. http://hkrota.com/readnews.asp?id=48.

[9] Suryanarayan, S., 2003. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 189-195.

[10] Lonsane, B. K., Saucedo-Castaneda, S., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N. P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M. M., 1992. Scale–up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry* 27: 259–273.

[11] Durand, A., 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 113–125.

[12] Soccol, R.S., Vandenberghe, L.P.S., 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3): 205–218.

[13] Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R., Tramper, J., Rinzema, A., 2000. Defined media and inert supports: Their potential as solid state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology* 18(8): 356-360.

[14] Wang, L., Yang, S.T., 2007. Solid State Fermentation and Its Applications. In Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, Edited by S.T. Yang, Elsevier, Oxford OX5 1GB, UK, pp. 465–489.

[15] Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3): 1–15.

[16] Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, C.R., Pandey, A. and Rodriguez, D.E., 2008. Factors Affecting Solid-state Fermentation. In Current Developments in Solid-

state Fermentation, Edited by A. Pandey, C. R. Soccol, C. Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India, pp. 26-47.
[17] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigam, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77: 149–162.
[18] Pandey, A., Larroche, C. and Soccol, C. R. 2008a. General Considerations about Solid-state Fermentation Processes. In Current Developments in Solid-state Fermentation, Edited by A. Pandey, C. R. Soccol, C. Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India, pp. 13-25.
[19] Singh, S.K., Sczakas, G., Soccol, C.R. and Pandey, A., 2008. Production of Enzymes by Solid-state Fermentation. In Current Developments in Solid-state Fermentation, Edited by A. Pandey, C. R. Soccol, C. Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India, pp. 183-204.
[20] Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., Pastrana, L., 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2(3): 343-350.
[21] Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Haemers, S., Tramper, J., Rinzema, A., 2005. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α-amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology* 36(7): 900–902.
[22] Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C., 2005. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malalaysian Journal of Microbiology* 1(2): 1-9.
[23] Krishna, C., 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(1-2): 1-30.
[24] Nagel, F. J. I., Tramper, J., Bakker, M. S. N., Rinzema, A., 2000. Model for on-line moisture content control during solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 72(2): 231-243.
[25] Saucedo-Castafieda, G., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., Raimbault, M., 1992. Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castellii*. *Letters in Applied Microbiology* 15(4): 164-167.
[26] Yadav, J.S., 1988. SSF of wheat straw with alcaliphilic Coprinus. *Biotechnology and Bioengineering* 31(5): 414-417.
[27] Krishna, C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology* 69(3): 231–239.
[28] Pandey, A., Larroche, C. and Soccol, C.R. 2008b. General and Fundamentals Aspects of SSF. In Current Developments in Solid-state Fermentation, Edited by A. Pandey, C. R. Soccol, C. Larroche, ASIATECH PUBLISHERS, INC., New Delhi, India, pp. 2-12.
[29] Hölker, U., Lenz, J., 2005. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* 8(3): 301–306.
[30] Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3): 291–302.
[31] Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P.A., Rodríguez-Herrera, R. Martínez-Hernandez, J.L., Contreras-Esquivel, J.C., 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(4): 354-366.
[32] Babu, K. R., Satyanarayana, T., 1996. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research* 55: 464–467.
[33] Martin, N., Guez, M.A.U., Sette, L.D., Da Silva, R., Gomez, E., 2010. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid state and submerged fermentation. *Microbiology* 79(3): 306-313.
[34] Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S., 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(2): 168–171.
[35] Soni, S.K., Kaur, A., Gupta, J.K., 2003. A solid state fermentation based bacterial a-amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry* 39(2): 185-192.
[36] Hernandez, M.S., Rodriguez, M.R., Guerra, N.P., Roses, R.P., 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering* 73 1): 93–100.
[37] Germano, S., Pandey, A., Osaku, C.A., Rocha, S.N., Soccol, C.R., 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 32(2): 246–251.
[38] Mitra, P., Chakraverty, R., Chandra, A. L., 1996. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation-an overview. *Journal of Scientific & Industrial Research* 55: 439–442.
[39] Cen, P., Xia, L., 1999. Production of cellulase by solid–state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 65: 70–92.
[40] Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 91(2): 153–156.
[41] Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46(7): 541-549.
[42] Jecu, L., 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products* 11(1): 1-5.
[43] Damaso, M.C.T., Passianoto, M.A., de Freitas, S.C., Freire, D.M.G., Lago, R.C.A., Couri, S., 2008. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 676-681.

[44] Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 235-251.

[45] Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 577-591.

[46] Ghanem, N.B., Yusef, H.H., Mahrouse, H.K., 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresource Technology* 73(2): 113-121.

[47] Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O., 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(5): 588-597.

[48] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, V.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology* 77(3): 203-14.

[49] Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G., Pandey, A., 2004. Coconut oil cake–a potential raw material for the production of α-amylase. *Bioresource Technology* 93(2): 169–174.

[50] Peixoto-Nogueira, S. C., Sandrim, V. C., Guimaraes, L. H. S. , Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M., 2008. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(4): 329–334.

[51] Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S.A., 2010. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37(2): 129–138.

[52] Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A., 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40(8): 2689–2694.

[53] Cabaleiro, D. R., Rodrıguez-Couto, S., Sanroman, A., Longo, M.A., 2002. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. *Process Biochemistry* 37(9): 1017–1023.

[54] Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., Patil, S., 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry* 39(8): 977–981.

[55] Ikasari, L., Mitchell, D.A., 1996. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 19(3): 171-175.

[56] Aikat, K., Bhattacharyya, B.C., 2000. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. *Process Biochemistry* 35(9): 907–914.

[57] Mo, H., Zhang, X., Zuohu, L., 2004. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. *Process Biochemistry* 39(10): 1293-1297.

[58] Chahal, D.S., 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1): 205-210.

[59] Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18(1): 37-45.

[60] Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M.J., Sayadi, S., 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21(8-9): 1415–1423.

[61] Levin, L., Herrmann, C., Papinutti, V.L., 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 39(1): 207–214.

[62] Di Luccio, D. M., Capra, F., Ribeiro, N.P., Vargas, G.D.L.P., Freire, D.M.G., Oliveira, D.D., 2004. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113(1-3): 173-180.

[63] Rodriguez, J.A., Mateos, J.C., Nungaray, J., Gonzalez, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J., 2006. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 41(11): 2264–2269.

[64] Palma, M.B., Pinto, A.L., Gombert, A.K., Seitz, K.H., Kivatinitz, S.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86(1-9): 1137-1145.

[65] Falony, G., Armas, J.C., Mendoza, J.C.D., Hernández, J.L.M., 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 235–240.

[66] Gaffney, M. Doyle, S., Murphy, R., 2009. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in Solid State Fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(12): 2640-2644.

[67] Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18(1): 37-45.

[68] Antoine, A.A., Jacqueline, D., Thonart, P., 2010. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(1): 50-62.

[69] Betini, J. H. A., Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M. L. T. M., 2009. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32(6): 819–824.

[70] Patil, S.R., Dayanand, A., 2006. Exploration of regional agrowastes for the production of pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 289–292.

[71] Silva, D., Tokuioshi, K., da Silva Martins, E., Da Silva, R., Gomes, E., 2005. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry* 40(8): 2885–2889.

[72] Kuhad, R.C., Kapoor, M., Rustagi, R., 2004. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20(3): 257–263.

[73] Chantasartrasamee, K., Na Ayuthaya, D.I., Intarareugsorn, S., Dharmsthiti, S., 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochemistry* 40(7): 2285–2289.

[74] Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G., Soccol, C.R., 2002. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103(1-6): 251-260.

[75] Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G., Pandey, A., 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology* 97(3): 506–511.

[76] Papagianni, M., Nokes, S.E., Filer, K., 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technology and Biotechnology* 39(4): 319–326.