

## TARIMA DAYALI SANAYİ ATIKLARININ KATI KÜLTÜR FERMANTASYONU İLE DEĞERLENDİRİLMESİ: SÜRECE ETKİ EDEN FAKTÖRLERE GENEL BAKIŞ

Hande Demir<sup>1</sup>, Canan Tari<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Osmaniye, Türkiye

<sup>2</sup>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Urla, İzmir, Türkiye

Geliş tarihi / *Received*: 19.06.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 09.10.2014

Kabul tarihi / *Accepted*: 10.10.2014

### Özet

Katı-kültür fermantasyonu (KKF) batı ülkelerinin son yıllarda ilgisini çekmiş olan fakat doğu ülkeleri tarafından çok eski zamanlardan beri kullanılan bir teknolojidir. KKF, mühendislik ve çevresel açıdan bakıldığında birçok ürün ve biyolojik işlemin gelişimi için uygun bir yöntem olmakla birlikte, hâlihazırda derin kültür fermantasyonu ile rekabeti devam etmektedir. Bu derleme makalede KKF'nin tanımı, kısa tarihçesi, tarıma dayalı sanayi atık kullanımının avantajları ve kısıtları ile birlikte inert yataklar hakkında bilgi verilmektedir. Derlemenin önemli bir bölümünde ise inokülüm oranı, inkübasyon süre ve sıcaklığı, nem içeriği ve su aktivitesi, başlangıç pH'ı, parçacık büyüklüğü, karıştırma ve inokülüm türü gibi KKF işlemlerini etkileyen etkenler özetlenmiştir. Her bir etkenin KKF işlemleri üzerindeki etkisi teorik olarak detaylandırılmakla kalmayıp, aynı zamanda literatürde yer alan çalışmalar yardımıyla da tartışılmıştır. Bu makale KKF işlemleriyle ilgilenen araştırmacılara ışık tutacağı gibi tarıma dayalı sanayi atıklarına katma değer kazandırılması konusunda da üreticilere yol gösterecektir.

**Anahtar kelimeler:** Katı-kültür fermantasyonu, tarıma dayalı sanayi atıkları, çevresel etkenler, inert yatak, biyoişlemler

## UTILIZATION OF AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES BY SOLID-STATE FERMENTATION: OVERVIEW OF IMPORTANT PROCESSING FACTORS

### Abstract

Solid-state fermentation (SSF) is a very ancient technology employed by the eastern countries, has attracted the attention of western countries in recent decades. Due to the engineering and environmental aspects, solid-state fermentation has shown much promise in the development of several products and bioprocesses; however it is still in competence with the submerged fermentation (SmF) technique. This review covers the definition and brief history of the SSF technique, advantages and limitations of the use of agro-industrial residues followed by the list of recently used inert supports. A significant part of this review concerns some of the important factors affecting the SSF processes such as; inoculum size, incubation time and temperature, moisture content and water activity, initial pH, particle size, agitation and inoculum type. The effect of each factor on SSF processes is not only detailed theoretically but also discussed via specific studies from the literature. This article will enlighten potential researchers dealing with applied SSF processes as well as the manufacturers concerning in adding value to the agro-industrial residues.

**Keywords:** Solid-state fermentation, agro-industrial residues, environmental factors, inert supports, bioprocessing

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ canantari@iyte.edu.tr, ☎ (+90) 232 750 6316, 📠 (+90) 232 750 6196

## GİRİŞ

Katı-kültür fermantasyonu (KKF), birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Bu tanımların hepsi, bu işlemin mevcut olmayan ya da yok denecek kadar az olan serbest akan sıvı faza sahip katı maddelerle ilgili olduğu konusunda hemfikirlerdir (1). Mikroorganizmaların geliştirilmesi için katı substratların kullanılması, antik çağlara kadar uzanmaktadır. Bilinen en eski KKF uygulamasının Mısırlılar tarafından M.Ö. 2600'de ekmek yapımı olduğu bildirilmiştir. Diğer antik KKF uygulamaları arasında *Penicillium roqueforti* ile peynir yapımı ve tempeh, sorgum, miso, soya sosu, sake ve koji gibi doğuya özgü gıda ve içeceklerin işlenmesi yer almaktadır. Haşlanmış pirinç ya da diğer tahılların *Aspergillus oryzae* ile fermantasyonu sonucu elde edilen önemli bir geleneksel enzim preparatı olan koji, halen soya sosu sanayiinde ve miso ve sake fermantasyonunda starter kültür olarak kullanılmaktadır (2).

KKF, kullanılan mikroorganizmanın türüne bağlı olarak doğal KKF ve saf kültür KKF olarak ikiye ayrılmıştır. Endüstriyel işlemlerde hedef ürünün üretilmesi için çoğunlukla saf kültürler kullanılırken tarıma dayalı sanayi atıklarının biyodönüşüm işlemlerinde (kompost yapımı, silaj) karışık kültürler tercih edilmektedir.

KKF son yıllarda pek çok biyoişlem ve ürünün geliştirilmesi açısından umut vaat etmektedir. Bu derlemede KKF'nin derin (submerged) kültür fermantasyonu (DKF) tekniği karşısındaki avantaj ve dezavantajları ele alınacaktır.

### Substrat

KKF işlemlerinde tarıma dayalı sanayi atıkları genellikle enzimlerin üretilmesi için en iyi substratlar olarak kabul edilir. Bunun ana nedeni, tarıma dayalı sanayi atıklarının düşük maliyetli olması ve dolayısıyla KKF'nin toplam işlem maliyetini düşürmede sağladığı avantajdır. İkinci neden ise bu atıkların mikroorganizmaların gelişiminde gerekli olan besinleri sağlamasıdır. Örneğin, meyve posaları genellikle karbonhidrat içeriği açısından zengindir. Elma posasının %48,0 ile 62,0 arasında karbonhidrat içerdiği (kuru ağırlık bazında) bildirilmiştir (3). Bunun yanı sıra son zamanlarda yapılan bir çalışmada şeftali, kayısı ve portakalın karbonhidrat içeriği sırasıyla %22,1, %22,9 ve %33,9 olarak bildirilmiştir (4).

Bazı durumlarda, tarıma dayalı sanayi atıklarının mikroorganizma tarafından belirli bir biyoürünün sentezini sağlayan indükleyici bileşeni içerdiği de görülmektedir.

Tarıma dayalı sanayi atıklarının makromoleküler matris yapıları nedeniyle göreceli olarak daha iyi

su tutma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Hücre metabolizmasına ait olan pek çok biyokimyasal işlemin ortamda bulunan su miktarıyla yakından ilişkili olması nedeniyle substratın su tutma kapasitesi de KKF işlemleri için önemli bir etken haline gelmektedir. Su tutma kapasitesi, bir substrattan diğerine değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, şeker kamışı küspesi, pirinç kepeği, mısır kepeği (5) ve buğday kepeği (6) için sırasıyla 50 mL, 15 mL, 20 mL ve 13 mL su/10 g kuru madde üzerinden su tutma kapasitesi bildirilmiştir.

Manyok ve şeker kamışı gibi en yaygın kullanılan tarıma dayalı sanayi atıkları, lifli yapıları nedeniyle KKF işlemi sırasında parçacık arası oksijen transferi için yeterli boşluk olmasını sağlamaktadır. Tarıma dayalı sanayi atıkları, genellikle ham substratın istenilen hale dönüştürülmesi için gerekli ön işlem ya da hazırlık işlemlerine imkân sağlamaktadır. Brijwani ve Vadlani (7), yakın zamanda gerçekleştirdikleri bir çalışmada, ön işlemin soya kabuklarının fizyokimyasal özellikleri (kristalleşme, yatak porozitesi, hacimsel özgül yüzey) ile *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus oryzae* kültürlerinin katı-kültür fermantasyonunda selülotik enzimlerin üretimi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu yazarlar, ön işlemlerin (hafif asit, alkali ve buhar) substratın holoselülozik bileşiminde (selülozik ve hemiselülozik) ihmal edilebilir bir değişime neden olsa da kristalleşmeyi ve yatak porozitesini geliştirdiğini gözlemlemiştir (7). Geliştirilmiş bu substrat ile *T. reesei* kültürünün kullanımı sonucunda, işlem görmemiş substrata nazaran daha fazla selüloz aktivitesi (filtre kâğıdı,  $\beta$ -glukosidaz, endoselülaz) meydana gelmiştir. Bu da göstermektedir ki, seçilen tarıma dayalı sanayi atığının fizyokimyasal durumu, besin bileşeninin mikroorganizmalar tarafından daha iyi değerlendirilebilmesi için değiştirilebilir.

Tarıma dayalı sanayi atıklarının KKF işlemlerinde kullanılması, yüksek katma değerli biyoürünlerin üretilmesini sağlamakla kalmayıp bu ürünlerin atıklarının bertarafının neden olduğu kirlilik sorunlarına da çözüm getirmektedir.

Tarıma dayalı sanayi atıklarının kullanımı, KKF işlemi açısından bazı kısıtlamaları da beraberinde getirmektedir. Bunlardan en kritik olanı, substratın fiziksel, kimyasal ya da besin bileşeninde ürün partileri ve çeşitleri arasında değişkenlik olmasıdır (8). Bu sorun, besin farklılıklarının kabul edilemez olduğu işlemlerde substratın karbon/azot oranının kontrol altına alınmasıyla kısmen de olsa aşılabilir. Tarıma dayalı sanayi atıkları ile gerçekleştirilen KKF işlemlerinde karşılaşılabilecek diğer sorunlar arasında karıştırma güçlüğü, substrattaki geometrik

ve fiziksel değişimler ve hedef molekülün substratın karmaşık bileşenleri ile etkileşimi nedeniyle biyokütle ölçümünün zorluğu gibi engeller yer almaktadır. Çeşitli KKF işlemlerinde yeni tarım dayalı sanayi atıklarının kullanımı üzerine son zamanlarda yapılan çalışma örnekleri Çizelge 1'de verilmektedir.

arasında, bir başka deyişle katı substrat ile nemlendirme maddesi arasında enzim üretimine yol açan metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri açısından bir denge olmasıdır.

*Inkübasyon Süresinin ve Sıcaklığının Etkisi*  
İşlemin hedeflerini izlemek için KKF işlemiyle ilgili kinetik bir çalışma yapılmalıdır. Bir başka deyişle,

Çizelge 1. Tarımsal sanayi atıklarının kullanıldığı çeşitli KKF uygulama örnekleri

Mikroorganizma	Substrat	Biyöürün	Kaynak
<i>Penicillium canescens</i>	Soya küspesi	Ksilanaz	(9)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bezelye ezmesi	Likenaz	(10)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Balıkçılık atıkları, biraçılık atıkları, elma atıkları (posa ve pulp) kâğıt endüstrisi atıkları	Ligninolitik	(11)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Hintyağı atığı	Tannaz ve fitaz	(12)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Keçiyoynuzu kabuğu	Biyöetanol	(13)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Keten tohumu küspesi	Fitaz	(14)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Asya hurma çekirdeği	Pullulan	(15)

Tarım dayalı sanayi atıkları içerisinde KKF deneylerinde en yaygın kullanılan substrat, buğday kepeğidir. KKF ile buğday kepeği kullanılarak üretilen bazı biyöürünler arasında ksilanaz (9), poligalakturonaz (16),  $\alpha$ -amilaz (17) ve  $\alpha$ -galaktosidaz (18) yer almaktadır.

Inert katı yataklar da KKF işlemlerinde substrat olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2'de KKF tekniği ile çeşitli biyöürünlerin üretiminde kullanılan inert katı yatak örnekleri verilmektedir.

düzenli olarak homojen ve temsili örnekler alınmalı ve ürün metabolitesi, hücre biyokütlesi ya da sporlarının miktarı işlem boyunca belirlenmelidir. Bu şekilde oluşturulan zamana karşı grafikler, fungal gelişim, enzim üretimi, besin ve oksijen tüketimi gibi çeşitli parametrelerdeki değişimi ortaya koyacaktır. İşlem amacına ulaşıldığı anda inkübasyon sonlandırılmalıdır. Yetersiz sürenin enzimin düşük enzim aktivitesiyle sentezlenmesine yol açması, aşırı inkübasyonun ise kontaminasyon

Çizelge 2. Çeşitli KKF uygulamalarında kullanılan inert substrat örnekleri

Mikroorganizma	İnert Substrat	Biyöürün	Kaynak
<i>Aspergillus terreus</i>	Poliüretan köpük	Lovastatin	(19)
<i>Aspergillus niger</i>	Perlit	Selülaz	(20)
<i>Bacillus pumilus</i>	Poliüretan köpük	Alkali proteaz	(21)
<i>Aspergillus niger</i>	Muz sapı	Sitrik asit	(22)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Şeker kamışı küspesi	Hindistan cevizi aroması	(23)
<i>Aspergillus niger</i>	Poliüretan köpük	Tannaz	(24)
<i>Verticillium lecanii</i>	Poliüretan köpük ve aktif karbon	Fungal spor	(25)

### KKF'yi etkileyen önemli etkenler

#### *İnokülüm Oranının Etkisi*

Literatürde pek çok araştırmacı tarafından inokülüm oranının (ya da konsantrasyonunun) fungal şuşların ürettiği enzim verimini etkileyebileceği ortaya konulmuştur. Kumar ve diğerleri (26), *Fusarium moniliforme* kullanılarak mango kabuklarından poligalakturonaz elde edilmesi için önemli KKF koşullarını optimize etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, inokülüm konsantrasyonunun %14,1 katkı ile diğer etkenlere kıyasla önemli bir etken olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, inokülüm düzeyindeki artışın poligalakturonaz sentezini %12 (m/V)'ye kadar arttırdığı görülmüştür. İnokülüm oranı açısından önemli bir husus, spor miktarıyla mevcut oksijen ve besin miktarı

riskini arttırması nedeniyle özellikle enzim üretim işlemlerinde inkübasyon süresini optimize etmek büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, metabolik ısı oluşumu nedeniyle üretilen enzimin yapısı bozulabilir ya da inhibitör etkisi bulunan ikincil metabolitlerin birikmesi, salgılanan proteazlar ya da ortam pH'ındaki değişimler nedeniyle enzim fungal gelişmenin ilerleyen aşamalarında inhibe olabilir (27). Bu nedenle, uzun inkübasyon süresi üreticiye daha fazla maliyet getirmekte ve işlemin verimini düşürmektedir.

Sıcaklık, biyolojik işlemlerin gelişimini etkileyerek protein yapısında bozulmaya, enzim inhibisyonuna, belirli bir metabolitin üretimi ile ilgili inhibisyona veya oluşuma ya da hücre ölümlerine neden olabilen önemli bir parametredir (28). Günümüzde,

KKF işlemlerinde hem fungal gelişim hem de metabolit üretiminin sıcaklık etkenine duyarlı olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, fungal gelişimin desteklenmesi ve fermantasyon ortamından hedeflenen enzimin elde edilmesi amacıyla inkübasyon sıcaklığının optimize edilmesi gerekmektedir. Ancak gelişim için gerekli optimum sıcaklık ile ürün oluşumu için gerekli optimum sıcaklığın birbirinden farklı olabileceği unutulmamalıdır. Bununla birlikte, bu iki optimum sıcaklık birbiriyle uyumlu olmalıdır; örneğin biyoişlemede mezofil bir fungusun kullanıldığı durumlarda ürün oluşum sıcaklığının 20 ile 55 °C arasında olması gerekmektedir (1).

KKF'de kritik bir konu, sıcaklığın kontrol edilmesi ve işlem sırasında oluşan aşırı ısının uzaklaştırılmasıdır. Isı, mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sonucunda ortaya çıkar ve fermantasyon boyunca substratın düşük termal geçirgenliği ya da yetersiz havalandırma/soğutma koşulları nedeniyle ortamda yoğunlaşır. Isının uzaklaştırılmasında başarısız olunması ve termal gradyanın oluşması halinde substratın yapısındaki nem kaybı nedeniyle substrat büzülebilir. Bunun neticesinde de gözenekli yapıda azalma, ısı transferinde zayıflama, substratın iç katmanları arasındaki oksijen transferinde düşüş ve besin çözünürlüğünde azalma meydana gelir. Bu nedenle, inkübasyon sıcaklığı, optimize edilmesi ve ölçek büyütme stratejilerinde dikkatli şekilde değerlendirilmesi gereken kritik bir parametredir (29).

#### *Nem İçeriği ve Su Aktivitesinin Etkisi*

KKF sistemlerinde su; (i) katı matris içerisinde bağlı biçimde, (ii) partiküllerin yüzeyine absorbe edilmiş ince bir tabaka halinde ya da (iii) katı maddelerin kılcal bölgeleri içinde daha gevşek halde bağlı bulunur. Suyun diğer bir biçimi olan serbest su ise katı substratın su doyum kapasitesi aşıldığında ortaya çıkar.

Mikroorganizmaların gelişimi ya da metabolit üretimi için kritik metabolik aktiviteleri olan (i) biyokütle gelişimi ve metabolik reaksiyonlar, (ii) enzim aktiviteleri ve (iii) besin maddesi, hücre dışı metabolit ve gaz taşınımı aktivitelerinde yer alması dolayısıyla suyun KKF sistemleri için önemi büyüktür (30).

Fungal gelişim ya da enzim üretimi için gerekli optimum nem içeriği, substratın türüne bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Optimum düzeyin altındaki nem içeriği, besin difüzyonunun, mikrobiyel gelişimin ve enzim stabilitesinin azalması, bu düzeyin üstündeki nem içeriği ise partiküllerin yığılması, gaz taşınımının sınırlanması ve bakteriye rekabetin oluşması ile sonuçlanabilir.

Fungal gelişim ya da metabolitlerin salgılanması için gerekli nem içeriği, genellikle %40 ile 80 arasında değişiklik gösterse de bu miktar substratın yapısına da bağlıdır. Örneğin, pektinaz üretimi için *Aspergillus niger* suşları, ayıklanmış ayçiçeği tablası için %65 (31), buğday kepeği için %70 (16) ve kaju fıstığının kuru kabuğu için %50 oranında optimum nem içeriği gerektirir (32). Bu durum, substratın su tutma kapasitesi ile optimum nem içeriği (%) arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, mikrobiyel gelişim ve hedeflenen metabolitin salınımı için belirlenen optimum nem içeriği de birbirinden farklı olabilir.

Her mikrobiyel grubun kendine özgü bir su aktivitesi aralığı ve optimum nem içeriği mevcuttur. Bakteriler, funguslara nazaran daha yüksek su aktivitesi gerektirmekte ve böylece fungusların KKF işlemlerinde bakterilerle rekabette avantajlı durumda olmasını sağlamaktadır. Su aktivitesi aynı zamanda substratın su bağlama özelliklerine ve su tutma kapasitesine de oldukça bağlıdır. Su emme kapasitesi ise, belli bir miktar kuru substrata serbest sıvı gözükmeyen eklenebilecek su miktarı (mL) olarak tanımlanır (5).

#### *KKF'de Ortamın Başlangıç pH Değerinin Etkisi*

KKF ortamının başlangıç pH'ı zayıf asit ya da baz, tampon ya da mineral tuz içeren nemlendirici madde eklenerek ayarlanabilir. Bununla birlikte, mikroorganizmaların metabolik aktivitesi doğrultusunda işlem süresince pH değerinde kaymalar meydana gelebilir. Örneğin, amonyum tuzu gibi bir substratın tüketimi nedeniyle pH değeri düşebilir ya da ortamdaki üre hidrolizi, pH'ın alkali olmasına neden olabilir (30). Mikroorganizmalar tarafından sitrik, asetik ya da laktik asidin salınımı da pH'ın düşmesinin nedenleri arasında yer alır. Öte yandan, hazırlanan ortamda mevcut olan organik asitlerin asimilasyonu pH'ın artmasına neden olacaktır. pH değişiminin ne yönde olacağı çoğunlukla mikroorganizmanın türüne bağlıdır. Katı substratın tipi, işlem süresince pH değerindeki değişimler açısından büyük önem taşır. Tamponlama özelliğine sahip bazı katı substratlar, pH değerinin değişimine karşı direnç gösterme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, fungusların gelişimi ve istenen metabolik aktivite ile uyumlu olacak iyi bir tamponlama kapasitesine sahip büyüme ortamı oluşturulması kritik önem taşımaktadır.

KKF işlemlerinde pH'ın kontrolünde yaşanan ana zorluk, serbest suyun yokluğu nedeniyle katı ortamda pH'ın kaydedilmesi için elektrot olmamasıdır. pH ölçümünde kullanılan yaygın yöntem, örneğin damıtık su ile süspansiyonundan sonra bir potansiyometrik elektrot ya da pH

elektrotunun kullanılmasıdır. Stabil bir pH değerinin sağlanması gerektiği durumlarda, araştırmacılar yeterli miktarda azot bileşeni (üre, amonyak tuzları),  $Ca^{2+}$  tuzu ya da alkalın çözeltisi karışımıyla ortamı tamponlar. Fermantasyon süreci ilerledikçe, uygun miktarda asit ya da baz soğutma suyu yoluyla ortama eklenir (30).

Patil ve Dayanand (31), ayıklanmış ayçiçeği tablası ve *Aspergillus niger* DMF45 suşunu kullanarak gerçekleştirdikleri KKF işleminde başlangıç pH değerinin (0 ile 6,5 arasında) endo ve ekzo-poligalakturonaz üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. Söz konusu çalışmada, en yüksek ekzo-poligalakturonaz aktivitesi, pH 5,0 değerinde gözlemlenmiş ve 4,0'un altı ve 5,5'in üzerindeki pH değerlerinde bu aktivitede kayda değer düşüş meydana gelmiştir.

#### *Substratın Parçacık Büyüklüğünün Etkisi*

Substratın parçacık büyüklüğü, KKF işlemlerinde mikrobiyel gelişme ve ısı ile kütle transferi üzerindeki etkisi nedeniyle önemli bir etkidir. Substratın ya da matrisin türü, yüzey alanının hacime oranı ile boşluk oranı olmak üzere iki kritik değeri etkiler. Substratın yüzeyi, KKF'nin gerçekleştirdiği yerdire ve parçacıkların büyüklüğü, mikrobiyel girişim için mevcut bulunan toplam yüzey alanını belirleyen temel etkidir. Sabit geometride parçacık büyüklüğü azaldıkça yüzey alanının hacime oranının arttığı açıktır. Bununla birlikte, hava tarafından doldurulan boşluk oranı substratın iç kısımları yoluyla oksijen transferinde kritik bir role sahiptir. Bu noktada etkin bir KKF işleminin gerçekleştirilebilmesi için substratın parçacık büyüklüğünün deneysel olarak optimize edilmesi gerektiğinin altı çizilmelidir. Daha küçük parçacıkların kullanılması daha büyük yüzey alanının mikrobiyel etkinliğe maruz kalmasını sağlayarak ürün veriminde artışla sonuçlanabilir. Bununla birlikte, optimum aralığın altında büyüklükte parçacıkların kullanılması substratın yığılmasına neden olarak boşluk oranını düşürecek ve yetersiz oksijen transferi nedeniyle gelişimin zayıflamasına neden olacaktır. Öte yandan, optimum aralığın üzerinde büyüklükteki parçacıklar uygun solunum ve havalandırma özellikleri ile partiküller arası boşluğun daha fazla olmasını sağlar. Bu nedenle daha büyük parçacıkların mikrobiyel girişim için daha sınırlı yüzey alanı anlamına geldiği söylenebilir (33).

Patil ve Dayanand (31), kurutulmuş ve öğütülmüş ayçiçeği tablalarından elde ettikleri kuvvetli bir *A. niger* suşuyla KKF işlemi yoluyla pektinaz üretimi gerçekleştirmiştir. Söz konusu çalışmada, parçacık büyüklüğünün 100 ile 600  $\mu m$  arasında

geniş bir aralıkta olduğu ve 500 mm büyüklüğünün özellikle de ekzo-pektinaz üretimi için uygun olduğu gözlemlenmiştir. Parçacık büyüklüğü bu değer altında azaldıkça ekzo-pektinaz aktivitesi de kademeli olarak düşüş göstermiştir. Aynı zamanda 600 mm düzeyinde de bu aktivitenin yaklaşık %12 azaldığı görülmüştür. Çok geniş aralıkta parçacık büyüklüğüne sahip öğütülmüş şeker kamışı küspesi (<1, 1-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12, 12-14, 14-16 ve 16-20 mm) kullanan Roses ve Guerra (34) da buna benzer bir sonuç elde etmiştir. Söz konusu çalışmada toplam şeker tüketim profili her parçacık büyüklüğü için benzer olsa da toplam amilaz aktivitesi kademeli olarak 6-8 mm düzeyinin altında ve üzerinde seyretmiştir.

#### *Karıştırmanın Etkisi*

KKF ortamında karıştırmanın ana rolü, katı substratın homojenliğini korumaktır. Substratın homojenliği, sıcaklığın fermantasyon ortamının her bölgesine iyi şekilde dağıtılması yoluyla verimlilik azaltıcı termal gradyanların önlenmesi anlamına gelmektedir. Bunun yanı sıra, etkin bir karıştırma, metabolik aktivitelerden kaynaklanan ısının dağılmasını sağlar. Karıştırmanın bir diğer rolü, substrata homojen su eklenmesini desteklemektir. İsteğe bağlı bu işlem ile buharlaşma nedeniyle su kaybı önlenir (35).

Fermantasyon işleminde karıştırmanın gerekli olup olmadığı substrat seçimi sırasında göz önünde bulundurulmalıdır. Fermantasyon ortamının havalandırılması ve karıştırılması işlemlerinin etkinliğini korumak açısından seçilen katı substratın yığılma ya da topaklanmaya neden olmaması gerekir. Substratın seçimiyle ilgili diğer bir önemli nokta ise substratın karıştırmanın neden olduğu kesme kuvvetine dirençli olması ve bundan fiziksel olarak etkilenmemesidir (35).

Diğer taraftan, karıştırmanın substrat ve fungus morfolojisi üzerinde olumsuz etkileri olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle, karıştırma ile ilgili ana dezavantaj, fungus ile katı substrat arasındaki bağın bozulmasıdır. Bunun yanı sıra, uygun şekilde yapılmayan karışımlar, kesme kuvveti nedeniyle fungus miselyumlarının gelişimini engelleyebilir. Bu durumda yüksek kesme geriliminden kaçınılmalı ve karıştırmanın ısı bertarafı ile miselyumu bozucu etkisi arasındaki dengeyi sağlayabilmek amacıyla aralıklı bir karıştırma strateji benimsenmelidir (1).

Sonuç olarak, ölçek büyütme stratejileri çerçevesinde substrat seçimi, biyoreaktör yerleşimi, fungus morfolojisi, solunum oranı ve ısı bertarafı gerekliliği ile ilgili olarak iyi düşünülmüş bir karıştırma rejiminin oluşturulması önemlidir. Bu noktada biyoreaktörün türü ayırt edici nitelik taşır. Statik koşullara sahip

tepsi türü biyoreaktörlerde karıştırma gerekli değilken delikli tamburlu biyoreaktörler ve yatay kanatlı karıştırıcılar, sürekli ya da aralıklı karıştırma sağlayacak şekilde tasarlanmıştır.

Katı substratın karıştırılmasının fermantasyon işlemi üzerine etkisi ile ilgili yapılan araştırma sayısı sınırlıdır. Lee ve diğerleri (36) nin yeni bir katı kültür biyoreaktörü olan FERMOSTAT içerisinde şeker kamışı küspesi ve hurma çekirdeği küspesi karışımında geliştirdikleri *Aspergillus niger* USM AI 1 suşuyla selülaz enzimi ürettiği çalışma bunlardan biridir. Bu çalışmada karıştırma yoğunluğunun selülaz üretimi üzerine etkisi 6, 12 ve 24 saat aralıklarıyla incelenmiş ve fermantasyon işleminde kullanılan karıştırma yoğunluğu azaldıkça selülaz üretiminin arttığı gözlemlenmiştir. Söz konusu araştırmacılar, bunun sebebinin fungusların katı substrata olan bağının bozulması ve kesme kuvveti nedeniyle fungus miselyumlarının zarar görmesi olarak açıklamıştır. Öte yandan Gasiorek (37), sürekli karıştırma ile elde edilen biyokütle konsantrasyonunun kesintili karıştırma ile elde edilenden daha yüksek olduğunu ortaya koyarak karıştırmanın miselyuma zarar verici etkisi olduğu yönündeki genel kanıyı çürütmüştür.

#### *Inokülüm Türünün Etkisi*

KKF işleminde en önemli etkenlerden biri, büyük ölçüde mikroorganizmanın türüne ve işlemin ölçüğüne bağlı olan inokülüm türünün seçimidir. İplikli fungus, KKF işlemlerinde en çok tercih edilen mikroorganizma olup genellikle spor ya da vejetatif (miselyal) inokülüm olmak üzere iki farklı inokülüm türü seçeneği sunar. Öte yandan, miselyum inokülümü, belirlenmiş bir katı ortamda ya da derin kültürde sıvı aşı kültürü olarak da hazırlanabilir. Her iki durumda da inokülümün büyüklüğü ve canlılığı fermantasyon için yeterli düzeyde olmalıdır (38).

Spor inokülasyonu; biyodönüşüm tepkimelerinde biyokatalist görevi görmesi, inokülüm hazırlanması koordinasyonundaki elverişliliği ve daha fazla esneklik sunması, daha sonra kullanımı sağlamak açısından daha uzun süre depolanabilmesi, biyodönüşüm substrat ve ürünlerinin toksik etkilerine karşı daha yüksek dirence sahip olması ve transferler süresince meydana gelebilecek yanlış uygulamalara karşı direncinin yüksek olması gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, adaptasyon süresinin uzun olması ya da spor oluşumu ve vejetatif gelişim için optimum koşulların farklı olmasından dolayı spor inokülasyonu fermantasyon süresini uzatabilir (35, 39). Buna rağmen, enzim üretiminin hedeflendiği çoğu fungal KKF işleminde spor inokülasyonu tercih

edilmektedir (11, 26, 40). Fungus morfolojisi (pellet ya da serbest miselyumlar), aşı kültürü ortamının bileşimi ve viskozitesi, karıştırma ve havalandırma özellikleri ve aşı kültürünün yaşı, KKF için sıvı aşı kültürünün hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken unsurlardır.

Büyük ölçekli işlemlerde inokülüm üretimi, artan kapasitede bir dizi inokülüm fermentörü kullanılarak sağlanır. Bu durumlarda, sporların agar ortamı yüzeyinde test tüpü, Petri kabı ya da kültür şişesi içerisinde laboratuvar ölçeğinde üretimi kullanışsız olabileceğinden kontrollü koşullarda biyoreaktörlerde fermente edilen uygun sıvı aşı kültürleri tercih edilebilir. Buna alternatif olarak sporların düşük maliyetli katı substrat kullanarak üretimi verilebilir. Costa ve diğerleri (41), *Aspergillus niger*'in iki suşunu kullanarak yağlı çıkarılmış pirinç kepeğinden amiloglukosidaz ve ekzo-poligalakturonaz üretiminin optimizasyonu üzerine çalışarak bu alternatifi test etmiştir. Söz konusu çalışmada incelenen etkenlerden biri, inokülüm türü olup bu amaçla araştırmacılar spor inokülümü ile fermente edilmiş kepeği karşılaştırmış ve bunun sonucunda inokülümün türünün her iki enzimin üretimi için önemli bir etken olduğunu bulmuştur. Bununla birlikte, maksimum amiloglukosidaz aktivitesi, spor süspansiyon inokülümü ile elde edilirken maksimum Ekzo-poligalakturonaz aktivitesi fermente edilen kepekte gözlemlenmiştir.

#### **Sonuç**

Endüstriyel ya da farmakolojik açıdan önemli pek çok biyoyürünün KKF teknikleriyle, özellikle de fungal metabolizmaların kullanılmasıyla üretildiği bildirilmiştir. Düşük maliyetleri ve yüksek bulunabilirlikleri nedeniyle tarıma dayalı sanayi atıkları en popüler substratlardır. Bununla birlikte, mikrobiyel gelişimin ve ürün sentezinin sürdürülebilmesi için optimize edilmesi gereken bazı önemli etkenler mevcuttur. Bu açıdan bakıldığında, substrat türünün ve fermantasyon ortamı formülasyonunun seçilen mikroorganizmanın gelişimini ve hedef ürün sentezini destekleyici şekilde seçilmesi önem kazanmaktadır. Mikroorganizma ve substrat türünün seçiminde, öncelikle mikrobiyel gelişimi ve ürün oluşumunu önemli ölçüde etkileyen çevresel etkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Erlen ya da laboratuvar tipi fermentör düzeyinde KKF işlemi yoluyla ürün oluşumunun optimizasyonunda istatistikî analiz tekniklerinin başarılı şekilde uygulanabileceği pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. İşlemin optimize edilmesinin amacı, büyük ölçekli işlemler için temel oluşturarak üretkenlik ve verimi arttırmaktır ve bu nedenle de pilot ve büyük ölçekli işlemlerde ölçüm ve kontrol

aşamalarını göz önüne alarak optimum parametrelerin seçilmesi gerekmektedir. DKF tekniğinden farklı olarak, hemen hemen her KKF işlemi substrat, mikroorganizma ve ürün özelliklerinin gereksinimlerini karşılamak üzere kendine özgü bir biyoreaktör tasarımı gerektirmektedir. Günümüzde pek çok araştırma grubu, ölçek arttırma aşamasında karşılaşılan mühendislik sorunlarına deneysel ya da modelleme yaklaşımı yardımıyla çözüm getirme üzerine çalışmaktadır. Mühendislik ve biyokimya çalışmalarındaki gelişmelerin bu alanlara ait bir KKF teknolojisi ve analitik izleme yöntemleri oluşturulması ile sonuçlanacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, KKF tekniği, göreceli olarak düşük enerji gereksinimi, daha az su girdi ve çıktısı gerektirmesi ve tarıma dayalı sanayi atıklarının değerlendirilmesi yoluyla üreticilerin kirlilik ile ilgili sorunlarını çözmesi nedeniyle çevre dostu üretim işlemlerine artan ihtiyacı uygun şekilde karşılamaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Bhargav S, Panda BP, Ali M, Javed S. 2008. Solid-state fermentation: an overview. *Chem Biochem Eng Q* 22, 49-70.
2. Couto SR, Sanroman MA. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. *J Food Eng* 76, 291-302.
3. Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD. 2011. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J* 54, 83-92.
4. Ucuncu C, Tari C, Demir H, Büyükkileci AO, Ozen B. 2013. Dilute-acid hydrolysis of apple, orange, apricot and peach pomaces as potential candidates for bioethanol production. *J Biobased Mater Bioenergy* 7, 376-389.
5. Camilios-Neto D, Bugay C, Santana-Filho AP, Joslin T, de Souza LM, Sasaki GL, Mitchell DA, Krieger N. 2011. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1395-1403.
6. Demir H. 2012. Production of pectinase from *Aspergillus sojae* by solid-state fermentation. Ph.D. Dissertation, Izmir Institute of Technology, Department of Food Engineering, Izmir, Turkey, 206 p.
7. Brijwani K, Vadlani PV. 2011. Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. *Enz Res* doi:10.4061/2011/860134.
8. Singhania RR, Soccol CR, Pandey A. 2008. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. In: *Current developments in solid-state fermentation*, Pandey A, Larroche C, Soccol CR (eds). Springer, Delhi, pp 412-442.
9. Antoine AA, Jacqueline D, Thonart P. 2010. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 160, 50-62.
10. Chaari F, Kamoun A, Bhiri F, Blibech M, Ellouze-Ghorbel R, Ellouz-Chaabouni S. 2012. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. *Ind Crops Prod* 40, 192-198.
11. Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, Verma M, Surampalli RY. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Eng J* 49, 388-394.
12. Madeira Jr JV, Macedo JA, Macedo GA. 2011. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresour Technol* 102, 7343-7348.
13. Mazaheri D, Shojaosadati SA, Mousavi SM, Hejazi P, Saharkhiz S. 2012. Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Appl Energy* 99, 372-378.
14. Rani R, Ghosh S. 2011. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresour Technol* 102, 10641-10649.
15. Sugumaran KR, Gowthami E, Swathi B, Elakkiya S, Srivastava SN, Ravikumar R, Gowdhaman D, Ponnusami V. 2013. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from asian palm kernel: a novel substrate. *Carbohydr Polym* 92, 697-703.
16. Freitas P, Martin N, Silva D, Silva R, Gomes E. 2006. Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus* sp. N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp. N12 on solid-state fermentation. *Braz J Microbiol* 37, 302-306.
17. Balkan B, Ertan F. 2010. The production of a new fungal alpha-amylase degraded the raw starch by means of solid-state fermentation. *Prep Biochem Biotechnol* 40, 213-228.
18. Liu CQ, Chen QH, Tang B, Ruan H, He GQ. 2007. Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of alpha-galactosidase in solid-state fermentation. *Lett Appl Microbiol* 45, 206-212.

19. Banos JG, Tomasini A, Szakács G, Barrios-González J. 2009. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *J Biosci Bioeng* 108(2), 105-110.
20. Gamarra NN, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. 2010. Cellulase Production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 545-551.
21. Hongzhang C, Hui W, Aijun Z, Zuohu L. 2006. Alkaline protease production by solid state fermentation on polyurethane foam. *Chem Biochem Eng Q* 20(1), 93-97.
22. Javed S, Asgher M, Sheikh MA, Nawaz H, Jamil A. 2011. Enhanced citric acid production by *Aspergillus niger* EB-3 mutant using an inert solid support in molasses medium. *Afr J Biotechnol* 10(55), 11784-11791.
23. Penha MP, Leao MHMR, Leite SGF. 2012. Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by solid state fermentation (SSF). *Bioresour* 7(2), 2366-2375.
24. Renovato J, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Durán LV, Bergman C, Rodríguez R, Aguilar CN. 2011. Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. *Appl Biochem Biotechnol* 165, 382-395.
25. Xu X, Yu Y, Shi Y. 2011. Evaluation of inert and organic carriers for *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 33, 763-768.
26. Kumar YS, Varakumar S, Reddy OVS. 2010. Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using *Fusarium moniliforme* in solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 1973-1980.
27. Pal A, Khanum F. 2010. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 101, 7563-7569.
28. Rodriguez-Leon JA, Soccol CR, Pandey A, Roddiguez DE. 2008. Factors affecting solid-state fermentation. In: *Current developments in solid-state fermentation*, Pandey A, Larroche C, Soccol CR (eds). Springer, Delhi, pp 230-252.
29. Raghavarao K, Ranganathan T, Karanth N. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13, 127-135.
30. Bellon-Maurel V, Orlaiac O, Christen P. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem* 38, 881-896.
31. Patil S, Dayanand A. 2006. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresour Technol* 97, 2340-2344.
32. Alcantara SR, Almeida FAC, Silva FLH. 2010. Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: water activity and influence of nitrogen source. Second International Congress on Industrial Biotechnology, 11-14 April, Padua, Italy, <http://www.aidic.it/ibic2010/webpapers/21Alcantara.pdf> (accessed 17 June 2014).
33. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem* 35, 1153-1169.
34. Roses RP, Guerra NP. 2009. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1929-1939.
35. Krishna C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25, 1-30.
36. Lee CK, Darah I, Ibrahim CO. 2011. Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. *Biotechnol Res Int* doi: 10.4061/2011/658493.
37. Gasiorek E. 2008. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. *Chem Papers* 62, 141-146.
38. Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. 2006. Introduction to solid-state fermentation bioreactors. In: *Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation*, Mitchell DA, Krieger N, Berovic M (eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 33-45.
39. Ramachandran S, Larocche C, Pandey A. 2008. Production of spores, In: *Current developments in solid-state fermentation*, Pandey A, Larroche C, Soccol CR (eds). Springer, Delhi, p 232.
40. Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti Y, Srinophakun P. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J Chem Technol Biotechnol* 83, 1012-1018.
41. Costa JAV, Colla E, Magagnin G, Santos LO, Vendruscolo M, Bertolin TE. 2007. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *Braz Arch Biol Technol* 50, 759-766.