

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROALG TABANLI BİYOETANOL ÜRETİMİNDE *Chlorella vulgaris*
BİYOKÜTLESİNİN KULLANIMI

Melike KARTAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROALG TABANLI BİYOETANOL ÜRETİMİNDE *Chlorella vulgaris* BİYOKÜTTESİNİN KULLANIMI

Melike KARTAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında yüksek şeker içeriğine sahip *Chlorella vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretilmiştir. Fermantasyon deneylerinde *Candida boidinii* mayası kullanılmıştır. Elde edilen indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonlarını en üst düzeye çıkarmak amacıyla mikroalg kültürasyonu koşulu, ön işlem yöntemi, başlangıç hammadde konsantrasyonu ve farklı azot kaynakları ile mineral tuzları gibi önemli parametreler optimize edilmiştir. En yüksek indirgen şeker konsantrasyonu atık havuç posası içeren fotoheterotrofik ortam koşulunda 16.23 g/L olarak belirlenmiş en yüksek biyoetanol üretimine ise %1 H₂SO₄ (v/v) ve 200 g/L başlangıç hammadde konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Ayrıca azot kaynakları ve mineral tuzlarının biyoetanol üretimini artırdığı saptanmıştır. *Chlorella vulgaris* yaş biyokütlesinden elde edilen en yüksek biyoetanol konsantrasyonu *Candida boidinii* için 4.54 g/L olarak bulunmuştur. Ayrıca teorik etanol verimi %54.69, Q_P değeri 0.38 g/L.h ve Y_{P/S} değeri 0.38 g/g olarak hesaplanmıştır.

Haziran 2023, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Chlorella vulgaris*, atık havuç posası, biyoetanol, fermantasyon, *Candida boidinii*

ABSTRACT

Master Thesis

USAGE OF *Chlorella vulgaris* BIOMASS IN MICROALGAE-BASED BIOETHANOL PRODUCTION

Melike KARTAL

Ankara University
Graduate Scholl of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

In this thesis study, bioethanol was produced from *Chlorella vulgaris* biomass with high sugar content. *Candida boidinii* yeast was used in fermentation experiments. In order to maximize the resulting reducing sugar and bioethanol concentrations, important parameters such as microalgae cultivation condition, pretreatment method, initial raw material concentration and different nitrogen sources and mineral salts were optimized. The highest reducing sugar concentration was determined as 16.23 g/L in the photoheterotrophic medium containing carrot pomace, and the highest bioethanol production was reached at 1% H₂SO₄ (v/v) and 200 g/L initial raw material concentration. It has also been found that nitrogen sources and mineral salts increase the production of bioethanol. The highest concentration of bioethanol obtained from the wet biomass of *Chlorella vulgaris* was found to be 4.54 g/L for *Candida boidinii*. In addition theoretical ethanol yield %54.69, the Q_P value is 0.38 g/L.h and Y_{P/S} are calculated as 0.38 g/g.

June 2023, 79 pages

Key Words: *Chlorella vulgaris*, waste carrot pulp, bioethanol, fermentation, *Candida boidinii*

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında bana öncülük eden, yol gösteren, her türlü desteği veren ve kendisini örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasında her konuda destek olan ve akademik gelişimime önemli katkı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının tüm aşamalarında yardımcı olan, bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ekin DEMİRAY'a (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu) ve Aybüke KUT'a desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çok değerli katkılarından dolayı Sayın Okul Müdürü Atila ULAŞ'a, Sayın Müdür Yardımcısı Pınar KOYUNCU'ya ve Sayın Müdür Yardımcısı Seyid Ahmet DAĞCI'ya (Ankara/Yenimahalle OSTİM ŞEHİT ŞÜKRÜ ÖNGÜN ORTAOKULU) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili lisansüstü arkadaşlarım Nazlıhan YILDIRIM, İrem KASAP, Eda AÇIKEL ve Badel ERGÖRÜNLÜ'ye manevi destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi her türlü desteği veren, sabır ve sevgileriyle her zaman yanımda olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim değerli babam Sayın Durmuş KARTAL'a, annem Sayın Nazlıhan KARTAL'a kardeşim Sayın Merve KARTAL'a ve varlığıyla beni mutlu eden en iyi dostum sevgili kardeşim Azra KARTAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli teyzem Sayın Nuray ÜLGER'e ve değerli manevi teyzem Sayın Rüya KUTLUCA'ya manevi desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bilime verdiği önemle bizlere örnek olan Cumhuriyetimizin kurucusu ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Melike KARTAL
Ankara, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Etanolün Özellikleri	5
2.2 Biyoetanol Üretiminin Tarihçesi	7
2.3 Dünyada Biyoetanol Üretim Durumu	8
2.4 Türkiye'de Biyoetanol Üretim Durumu	8
2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	9
2.5.1 Birinci grup biyoetanol	9
2.5.2 İkinci grup biyoetanol	10
2.5.3 Üçüncü grup biyoetanol	12
2.5.4 Dördüncü grup biyoetanol	20
2.6 Mikroalg Kültivasyon Koşulları ve Sistemleri	22
2.6.1 Fototrofik kültürasyon	23
2.6.2 Heterotrofik kültürasyon	24
2.6.3 Fotoheterotrofik kültürasyon	24
2.6.4 Miksotrofik kültürasyon	24
2.7 Mikroalg Biyokütlenin Hasadı ve Hasat Yöntemleri	25
2.7.1 Santrifüj	25
2.7.2 Flokülasyon	26
2.7.3 Sedimentasyon	27
2.7.4 Filtrasyon	27
2.7.5 Manyetik ayırma	28
2.7.6 Çözünmüş hava flotasyonu	28

2.7.7 Elektrokimyasal yöntemler	28
2.8 Mikroalgal Biyokütlenin Ön İşlem Yöntemleri	29
2.8.1 Fiziksel ön işlem	29
2.8.2 Fizikokimyasal ön işlem	30
2.8.3 Kimyasal ön işlem	32
2.8.4 Biyolojik ön işlem	33
2.9 Fermantasyon	33
2.9.1 Mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanılan etanolojenik mikroorganizmalar	33
2.9.2 Fermantasyon yaklaşımları	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1 Materyal	37
3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroalg ve kültürasyon koşulları	37
3.1.2 Tez çalışmasında karbon kaynağı olarak kullanılan zirai atık	37
3.1.3 Havuç posası şekeri ilavesi	38
3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan etanolojenik mikroorganizma.....	38
3.2 Yöntem	38
3.2.1 Zirai atığa uygulanan ön işlem yöntemi	38
3.2.2 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları	38
3.2.3 Farklı ön işlem yöntemlerinin biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesi	39
3.2.4 Başlangıç <i>Chlorella vulgaris</i> biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi	39
3.2.5 Farklı azot ve mineral tuzlarının fermente edilmiş <i>Chlorella vulgaris</i> besiyerlerine eklenmesi	39
3.2.6 Fermantasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi	40
3.3 Analitik Yöntemler	40
3.3.1 Mikroalgal gelişimin ölçülmesi	40
3.3.2 İndirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesi	40
3.3.3 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi	41
3.3.4 Maya gelişiminin ölçülmesi	41
3.3.5 Kinetik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43

4.1 Farklı Kùltivasyon Koşullarının Mikroalgal Gelişime Etkilerinin Belirlenmesi	43
4.2 Farklı Ön İşlem Yöntemlerinin Biyoetanol Üretimine Etkilerinin Belirlenmesi	44
4.3 Başlangıç <i>Chlorella vulgaris</i> Biyokùtle Konsantrasyonunun Belirlenmesi	47
4.4 Farklı Azot Kaynakları ve Mineral Tuzlarının Biyotanol Üretimine Etkisi	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
5.1 Farklı Kùltivasyon Koşullarının Mikroalgal Gelişime Etkilerinin Belirlenmesi	54
5.2 Farklı Ön İşlem Yöntemlerinin Biyoetanol Üretimine Etkisi	55
5.3 Başlangıç <i>Chlorella vulgaris</i> Biyokùtle Konsantrasyonunun Biyoetanol Üretimine Etkisi	56
5.4 Azot Kaynakları ve Mineral Tuzları Takviyesinin Biyoetanol Üretimine Etkisi	57
5.5 Sonuç ve Öneriler	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
cm	Santimetre
CH ₃ -CH ₂ -OH	Etanol
CO	Karbonmonoksit
CO ₂	Karbondioksit
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Kobalt(II) nitrat heksahidrat
Cu	Bakır
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
Fe	Demir
g	Gram
GHz	Gigahertz
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₃ BO ₃	Borik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HCl	Hidroklorik asit
Hz	Hertz

K	Kelvin
K	Potasyum
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
kg	Kilogram
KHz	Kilohertz
kJ	Kilojoule
kPa	Kilopascal
L	Litre
Lys	Lizin
m^3	Metreküp
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum sülfat heptahidrat
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Mn	Mangan
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Manganez (II) klorür tetrahidrat
Na	Sodyum
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum molibdat dihidrat
$NaNO_3$	Sodyum nitrat
NaOH	Sodyum hidroksit
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
NO_x	Nitrit oksit
P	Potasyum
rpm	Dakikadaki devir
Se	Selenyum

T	Sıcaklık
W	Watt
Zn	Çinko
ZnSO ₄	Çinko sülfat
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat
α	Alfa

Kısaltmalar

A.Ş.	Anonim Şirketi
AFDC	Alternatif Yakıtlar Veri Merkezi
CBP	Konsolide Biyoproses
DES	Derin ötektik çözücüler
DNS	Dinitrosalisilik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FID	Alev iyonlaştırıcı dedektör
FPU	Filtre kağıdı birimi (filiter paperrase unit)
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HTC	Hidrotermal Karbonizasyon
IL	İyonik sıvılar
PEF	Darbeli Elektrik Alanı
PLE	Hidrotermal Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
RFS	Yenilenebilir Yakıtlar Standardı
SFE	Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu
SHF	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon
SHCF	Ayrı Hidroliz ve Birlikte Fermantasyon
SSCF	Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Birlikte Fermantasyon
SSF	Eş Zamanlı Hidroliz ve Fermantasyon
U	Atomik kütle birimi
YPG	Maya özütü pepton glukoz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Mikroalgal Biyoetanol Üretim Aşamaları (Jambo vd. 2016)	16
Şekil 2.2 <i>C. vulgaris</i> hücresinin şematik yapısı (Safi vd. 2014)	17
Şekil 2.3 <i>Chlorella vulgaris</i> 'in hücre duvarı yapısı ve kimyasal bileşenleri (Ye vd. 2023)	18
Şekil 4.1 Farklı karbon kaynaklarının <i>C. vulgaris</i> mikroalginde mikrobiyal gelişime etkisi	44
Şekil 4.2 50 g/L başlangıç yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonuna etkisi	45
Şekil 4.3 50 g/L başlangıç yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin indirgen şeker konsantrasyonu ve mikrobiyal gelişime etkisi ...	46
Şekil 4.4 <i>C. boidinii</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonlarına etkisi	48
Şekil 4.5 <i>C. boidinii</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinin indirgen şeker konsantrasyonuna ve mikrobiyal gelişime etkisi	49
Şekil 4.6 200 g/L başlangıç yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde farklı besiyeri katkılaması yapılan ortamların varlığında <i>C. boidinii</i> 'nin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonuna etkisi	51
Şekil 4.7 200 g/L başlangıç yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde farklı besiyeri katkılaması yapılan ortamların varlığında <i>C. boidinii</i> 'nin indirgen şeker konsantrasyonuna ve mikrobiyal gelişime etkisi	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Benzin ve Biyoetanolün Kimyasal Özellikleri (Elfasakhany, 2018)	6
Çizelge 2.2 <i>C. vulgaris</i> ' te temel makro ve eser elementlerin içeriği (Cabrita vd. 2022)	19
Çizelge 2.3 <i>Chlorella vulgaris</i> 'in vitamin içeriği (Gelgör vd. 2022)	20
Çizelge 2.4 Enerji ve karbon kaynaklarına göre mikroalglerde gelişim koşulları (Abreu vd. 2022)	22
Çizelge 4.1 50 g/L başlangıç yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin biyoetanol üretimine etkisi	47
Çizelge 4.2 <i>C. boidinii</i> 'de üç farklı konsantrasyonlardaki yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinin biyoetanol üretimine etkisi	50
Çizelge 4.3 <i>C. boidinii</i> 'de farklı besiyeri katkılmalı ortamların yaş <i>C. vulgaris</i> biyokütlesinde biyoetanol üretimine etkisi	53

1. GİRİŞ

Dünyada enerji ihtiyacının artmasıyla birlikte enerji kıtlığı ve güvenliği küresel ölçekte problem haline gelmektedir (Neto vd. 2018). Bu enerji ihtiyacının karşılanması için fosil yakıtların kullanılması küresel ısınmayla birlikte sera etkisinin de gittikçe artmasına yol açmaktadır (Mohan vd. 2008). Sera etkisi de buz tabakalarının erimesine, okyanus seviyelerinin yükselmesine ve diğer çevresel sorunlara neden olmaktadır. Dünyadaki enerji kaynaklarının %80'inden fazlasını fosil yakıtlar oluşturmaktadır fakat fosil yakıt rezervleri ciddi oranda azalmakta ve sadece 50 yıl daha kullanılabileceği öngörülmektedir (Ladanai ve Vinterback, 2010). Bu nedenle son yıllarda yenilenebilir enerji kaynakları arayışı ciddi şekilde önem kazanmıştır.

Yenilenebilir enerji kaynaklarından olan biyoyakıtlar biyolojik kökenli olup çeşitli biyokütlelerden elde edilir (Rodionova vd. 2017) Biyoyakıtlar; ulaşım, elektrik üretimi ve ısıtma sektörlerinde fosil yakıtların yerine ya da fosil yakıtlarla birlikte kullanılabilir (Lapuerta vd. 2017).

Biyoyakıtların enerji kaynağı olarak kullanılması avantajlıdır çünkü biyoyakıtlar; başta CO₂ olmak üzere sera gazı emisyonlarını azaltır (Khan vd. 2022), ihtiyaç duyulan enerjinin karşılanmasında fosil yakıtlara bağımlılığı azaltır ve katı, sıvı ya da gaz formunda enerji sağlayabilir (Bharathiraja vd. 2017; Akter vd. 2020; Abd El-Malek vd. 2021).

Biyoyakıtlardan biri olan biyoetanol; benzine göre oktan sayısı ve buharlaşma ısısı daha yüksek olup tutuşma sıcaklığı daha geniştir. Bu özellikler içten yanmalı bir motorda yakıt olarak biyoetanol kullanımını daha avantajlı hâle getirir. Ayrıca biyoetanol %35'in üzerinde oksijen içerdiğinden dolayı araç motorunda daha verimli yanma sağlar (Manzetti ve Andersen, 2015).

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin yaygın olarak bulunabilmesi ve maliyeti çok önemlidir. Dört çeşit hammadde grubundan biyoetanol elde edilebilir.

Birinci grup biyoetanol üretiminde şeker kamışı, mısır, buğday ve çeltik gibi nişasta ile şeker içeren hammadde kaynakları kullanılır. Ancak bu grupta kullanılan hammaddelerin gıda ürünleri olması nedeniyle sürdürülebilirlik açısından dezavantajlıdır (Deviram vd. 2020). Ayrıca tarım alanlarının hammadde üretimi için kullanılması, gıda maliyetlerinde artışa neden olur. Bu gibi nedenlerden dolayı birinci grup biyoetanol üretimi genellikle tercih edilmemektedir. İkinci grup biyoetanol üretiminde tarımsal atıklar (Goh vd. 2010), orman atıkları (Jiang vd. 2019) ve otsu veya odunsu bitkiler (Zabed vd. 2016) gibi gıda olarak kullanılmayan lignoselülozik hammaddeler kullanılır. Lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenleri lignin, selüloz ve hemiselüloz olup termokimyasal ya da biyolojik süreçler ile biyoetanole dönüştürülebilir (Ma vd. 2019; Shi vd. 2019). Bu gruptaki hammaddelerin gıda piyasası ile rekabet etmemesi ve çevrede kolay bulunabilmesi avantajlıdır fakat bu hammaddelerin yapısında bulunan lignoselülozik yapının kolay parçalanamaması üretilen biyoetanol veriminin düşük maliyetinin ise yüksek olmasına neden olmaktadır (Govumoni vd. 2013). Üçüncü grup biyoetanol üretiminde makroalg, mikroalg ve siyanobakteri gibi fotosentetik organizmalar kullanılır. Bu organizmaların genellikle yüksek oranda karbonhidrat içermesi, çeşitli sucul ortamlarda yetiştirilebilmesi, yüksek oranda CO₂ fikse edebilmeleri ve yetiştirilmeleri için kullanılan alanın tarımsal arazilerden daha az yer kaplaması nedeniyle biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanım potansiyelleri yüksektir (Singh vd. 2011). Dördüncü grup biyoetanol üretiminde biyoetanol üretim kapasitesini artırmak, üretim sürecini hızlandırmak ve maliyetini düşürebilmek amacıyla genetik ya da metabolik modifikasyona uğratılmış hammadde veya fermentatif mikroorganizmalar kullanılır (Abdullah vd. 2019). Dördüncü grup biyoetanol üretimi verimlidir (Jouzani ve Taherzadeh 2015) fakat diğer gruplara göre yeni bir uygulama olup teknolojik altyapısı hâlâ gelişim aşamasındadır (Sikarwar vd. 2017) ayrıca yüksek maliyetlidir ve yüksek enerji gerektirir (Bhan vd. 2020).

Mikroalgler; tek ya da çok hücreli olabilen, fototrof ve mikroskobik organizmalardır. Basit üreme ve hücre büyüme sistemine sahip oldukları için hızlı çoğalabilirler ve uzun sürede hayatta kalabilirler. Çeşitli sucul ortamlarda yaygın olarak bulunurlar (Suparmaniam vd. 2019).

Mikroalgler, fotosentez için karasal bitkilerden 10-50 kat daha fazla güneş enerjisi yakalayabilir ve hücrelerine daha yüksek oranda CO₂ fikse edebilirler. Bu sayede daha yüksek oranda (~%20 - 40) karbonhidrat üretebilirler (Maity ve Mallick, 2022). Mikroalglerin hücre duvarında lignin bulunmadığı için ön işlemleri daha kolaydır (Racharaks vd. 2015). Büyüme oranları ve fotosentetik verimleri nispeten yüksek olup (Miao ve Wu, 2006; Hahn-Hägerdal vd. 2007) fototrofik, fotoheterotrofik, heterotrofik ve miksotrofik koşullarda gelişebilirler (Yeh ve Chang, 2012). Bu özellikleri sayesinde biyoetanol üretiminde hammadde olarak mikroalgal biyokütle kullanmak avantajlıdır.

Mikroalglerin tanımlanan yaklaşık 50.000 türü bulunmaktadır (Maia vd. 2020). Bu türlerden biri de biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan *C. vulgaris*'tir. *C. vulgaris* ökaryottur, tek hücrelidir ve Chlorellaceae familyasına aittir. Hem tatlı suda hem de denizlerde yaşayabilir (Cha vd. 2010). Yapısında yüksek oranda karbonhidrat biriktirebilir ve özel büyüme koşullarında karbonhidrat içeriği yaklaşık %50'ye kadar ulaşabilir (Ho vd. 2013).

Havuç (*Daucus carota* L.), ilk mevsiminde vejetatif olarak yetişen ve ikinci mevsiminde tohum üreten iki yıllık otsu bir bitki olup Apiaceae familyasına aittir (Rubatzky vd.1999). Bu bitkinin anavatanı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika ve Türkiye olup dünyada üretiminin büyük bir bölümü başta Avrupa ülkeleri olmak üzere Kuzey Yarımküre'dedir (Zohary vd. 2012). Ilıman bölgelerde genellikle ilkbahar ve yaz, tropik bölgelerde ise kış mevsiminde yetiştirilir (Surbhi vd. 2018).

Dünyada havuç üretim miktarları incelendiğinde FAO 2019 verilerine göre ilk sırada 18 milyon tonla Çin, ikinci sırada 2 milyon tonla Özbekistan, üçüncü sırada yaklaşık 1,5 milyon tonla ABD gelmektedir. Ülkemiz ise yaklaşık 666.27 bin ton üretim ile 10. sırada yer almaktadır (Anonim, 2019).

Meyve suyu atıklarından biri olan havuç posası, kuru ağırlığının %14.3'ü süktroz, %7.9'u glukoz, %5.4'ü fruktoz ve %16.8'i selülozdu (De Vrije vd. 2010). Yaygın olarak bulunur, ucuzdu ve zengin bir karbon kaynağıdır (Khoshkho vd. 2022). Bu özellikleri sayesinde mikroalglerin fotoheterotrofik gelişiminde karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

Yapılan bu tez çalışmasında *C. vulgaris* yaş biyokütlesinden yüksek konsantrasyonda fermente edilebilir şekerler elde etmek ve bu şekerlerden yüksek konsantrasyonda biyoetanol elde edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için *C. vulgaris* fototrofik (BG-11) ve fotoheterotrofik (BG-11 + 0.5 g/L glukoz ve BG-11 + 0.5 g/L havuç posası) kültürlerde 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca her 24 saatte bir bu besiyeri ortamlarından örnekler alınarak spektrofotometrik ölçümler ile mikrobiyal gelişim (OD) değerleri elde edildikten sonra bu mikroalgin gelişebildiği en iyi kültürasyon koşulu belirlenmiştir. Daha sonra *C. vulgaris* yaş biyokütlesinin optimum ön işlemini, başlangıç biyokütle konsantrasyonunu ve besiyeri katkılmasını belirlemek amacıyla 30 °C sıcaklıkta, pH 5.0'da, 100 rpm çalkalama hızında ve %10 (v/v) *C. boidinii* varlığında fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Her optimizasyon deneyinde fermantasyon ortamlarından 6, 12 ve 24. saatte örnek alınarak DNS yöntemi ile indirgen şeker konsantrasyonları, Gaz Kromatografisinde (GC) biyoetanol konsantrasyonları ve spektrofotometrede mikrobiyal gelişim (OD) değerleri analiz edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Etanolün Özellikleri

Etanol veya etil alkol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ molekül formülüne sahip renksiz, uçucu ve yanıcı bir alkoldür. Moleküler ağırlığı 46.07, kaynama noktası 351.37 K ve parlama noktası 289.6 K olup 294 K'de 789 kg/m^3 yoğunluğa sahiptir. Yapısında hidroksil grubu içerdiğinden dolayı hidrojen bağı oluşturmaya meyillidir. Bu özellik etanolün hem oksidasyon, dehidratasyon, ester oluşumu ve halojenasyon gibi önemli kimyasal reaksiyonlara kolayca girebilmesini (Küüt vd. 2019) hem de benzer moleküler ağırlığa sahip organik bileşiklerden daha viskoz ve daha az polar olmasını sağlar. Etanol ayrıca su, asetik asit, aseton, eter, etilen, glikol, gliserol ve toluen gibi organik çözücüler ile karıştırılabilir (Windholz, 1976; Tarif, 2000).

Etanol, petrolden etilenin hidrasyonu ile üretilabileceği gibi fermentatif mikroorganizmalar aracılığıyla biyokütleden de üretilir. Etanolün bu şekilde biyokütleden elde edilmesine biyoetanol denir. Etanol ile biyoetanolün kimyasal bileşimi aynıdır, sadece izotopik olarak farklıdır. Biyoetanol C 14 içerirken, etanol içermez (Melendez vd. 2022).

Biyoetanol, biyokütle bazlı yenilenebilir bir sıvı yakıttır. Biyoetanolün oktan sayısı ve buharlaşma ısısı benzinden daha yüksek olup tutuşma sıcaklığı daha geniştir (Manzetti ve Andersen, 2015). Oktan sayısının daha yüksek olması, biyoetanole daha yüksek sıkıştırma oranı ve daha kısa sürede tutuşma avantajı sağlar (Grad, 2006). Buharlaşma ısısının benzine göre daha yüksek olması ise daha fazla verim ve enerji çıkışı sağlar. Ayrıca biyoetanolün yapısında yaklaşık %35'ten fazla oksijen bulunduğu için araç motorundaki yanma verimi benzinden daha yüksektir. Yanma veriminin daha yüksek olması sayesinde atmosfere daha az oranda NO_x , CO ve CO_2 vs. salınır (Wyman 2018).

Biyoetanol motorlu taşıtlarda benzinle belirli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. Bu karışımlardan E15 (%85 benzin ve %15 biyoetanol) ve E85

(%15 benzin ve %85 biyoetanol) son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Özdemir ve Gündügar, 2019).

Biyoetanolün yakıt olarak kullanılması bazı özellikleri yönünden dezavantajlıdır. Örneğin; biyoetanolün enerji yoğunluğu, alev parlaklığı ve buhar basıncı benzinden daha düşüktür (Pumphrey vd. 2000). Ayrıca biyoetanol motor parçaları yüzeyinde aşındırma yapar (Baena vd. 2012; Lou vd. 2009). Bu dezavantajların etkisini azaltabilmek için biyoetanol araç motorunda benzinle ya da korozyon önleyici maddeler ile karışım halinde kullanılabilir (Okafor vd. 2007).

Çizelge 2.1 Benzin ve Biyoetanolün Kimyasal Özellikleri (Elfasakhany, 2018)

Özellik	Benzin	Biyoetanol
Kimyasal Formülü	C_8H_{15}	C_2H_5OH
Bileşim (C,H,O) (%)	86, 14, 0	52, 13, 35
Buharlaştırma ısısı (kJ/kg)	223.2	725.4
Oksijen içeriği (%)	0.0	34.7
Yoğunluk (kg/m ³)	760	790
Parlama noktası (°C)	-45 ila -38	21.1
Kendiliğinden tutuşma sıcaklığı (°C)	420	434
Kaynama noktası	25 - 215	78.4
Suda çözünürlük (ml/100 ml H ₂ O)	< 0.1	Tamamen çözünebilir

2.2 Biyoetanol Üretiminin Tarihçesi

Biyoetanolün üretimi ve alternatif yakıt olarak kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir (Halder vd. 2019). 1800'lü yıllarda mısır kullanılarak üretilen etanol lamba yağı olarak kullanılmıştır (Sticklen vd. 2007). Etanolün içten yanmalı motorlarda kullanımı ilk kez 1826'da ABD'de Samuel Morey tarafından gerçekleştirilmiştir. 1908'de Ford Model-T otomobili üretilmiş ve yakıt olarak etanol ile benzin karışımı kullanılmıştır (Solomon vd. 2007).

1940'lı yıllarda bazı petrol bulunan bölgelerin keşfedilmesiyle petrol fiyatları düşmüş bunun sonucunda biyoetanolün benzin karışımındaki oranı azalmıştır (Gnansounou ve Dauriat, 2005) fakat 1970'lerde küresel ölçekte petrol krizinin ortaya çıkması ve petrol fiyatının yükselmesi nedeniyle biyoetanolün yakıt olarak kullanımı yeniden önem kazanmıştır (Halder vd. 2019). Bu dönemde ABD'de yılda yaklaşık 90 milyon galon biyoetanol üretilmiştir. Brezilya'da ise 1975'te "Ulusal Alkol Programı (ProAlcool)" denen stratejik bir plan ile benzine alternatif olarak şeker kamışından büyük ölçekli biyoetanol üretimi hedeflenmiş (Gnansounou ve Dauriat, 2005) ve bunun sonucunda Brezilya'daki araçların yarısından fazlasında yakıt olarak %95 biyoetanol kullanılmıştır (Solomon vd. 2007).

1978'de ABD'de biyoetanol üretimini ve tüketimini artırmak amacıyla "1978 Enerji Vergisi Yasası" uygulamaya konulmuş ve bu yasa ile yakıt olarak %10'luk biyoetanol-benzin karışımı kullanılan araçların sahipleri, vergiden muaf tutulmuştur (Gnansounou ve Dauriat, 2005). 1984'te Brezilya'da yakıt olarak %96 biyoetanol ve %4 sudan oluşan hidratlı biyoetanol kullanılmıştır (Halder vd. 2019).

Günümüzde endüstriyel ülkelerinin çoğu; ekonomik, çevresel ve motor performansı yönünden avantajlı olması nedeniyle ticari ölçekte biyoetanol üretmektedir. 2005'te Brezilya'da yaklaşık 4.2 milyar galon biyoetanol üretilerek bunun yaklaşık 100 milyon galonu Hindistan'a ve ABD'ye ihraç edilmiştir (Solomon vd. 2007). Yine bu dönemde ABD enerji politikasında "Yenilenebilir Yakıtlar Standardı (RFS) yasa olarak kabul

edilmiş ve bu yasa ile biyoetanol üretimi 2006'da 4 milyar galon'a çıkarılmış, 2022'ye kadar yıllık 36 milyar galon biyoetanol üretilmesi hedeflenmiştir (Bagheri vd. 2016).

2.3 Dünyada Biyoetanol Üretim Durumu

AFDC kaynaklarına göre dünyada biyoetanol üretimi 2009-2019 yılları arasında ortalama %3.8 artarak 2019'da 115 milyar litreye ulaşmıştır (Anonymous 2020a). IEA kaynaklarına göre ise 2020'de COVID-19 salgını sonucu karantina uygulaması ortaya çıkınca ulaşım yakıtlarına yönelik talep düştüğünden dolayı biyoetanol üretimi azalmıştır. Bu dönemde yıllık biyoetanol üretiminde en büyük düşüş ABD ve Brezilya'da meydana gelmiştir (Anonymous 2020b).

2022 istatistiksel verilerine göre yıllık biyoetanol üretiminde ABD 15.400 milyon galon ile ilk sıradadır ve onu 7.420 milyon galon ile Brezilya daha sonra Avrupa ülkeleri, Hindistan, Çin, Kanada, Tayland, Arjantin ve diğer ülkeler takip etmektedir (Anonymous 2022). Biyoetanol üretmek için hammadde olarak Brezilya, Hindistan ve Kolombiya gibi tropik bölgelerde şeker kamışı kullanılırken ABD ve AB'de mısır kullanılmaktadır (Mendiburu vd. 2022).

Uluslararası Enerji Ajansı (IEA), 2023 yılında biyoyakıtların dünya çapında büyümesindeki payının üçte ikisini biyoetanolün oluşturacağını öngörmektedir (Voegelé, 2019).

2.4 Türkiye'de Biyoetanol Üretim Durumu

Ülkemizde petrol rezervi sınırlı olduğu için kullanım açısından yeterli değildir. Türkiye'de ihtiyaç duyulan petrolün %92'si ithalat ile karşılanmaktadır. Petrol ithalatı için milyarlarca dolar harcanması ve bu nedenle petrol fiyatlarının çok yüksek olması ülkemizin ekonomisini olumsuz etkilemektedir. Ülkemizin kalkınmasını önemli derecede etkileyen bu problem için biyoyakıt kullanımı alternatif bir çözüm yoludur. Bu alternatif biyoyakıtlardan biri de biyoetanoldür (Çetinkaya, 2021).

Türkiye’de biyoetanolün ticari amaçlı üretimi oldukça yenidir (Özdemir ve Günduğar, 2019). Ülkemizde biyoetanolü yakıt olarak üreten dört tesis bulunmaktadır. Bunlar: Konya Şeker, Tarkim A.Ş. Tezkim A.Ş. ve Türkşeker A.Ş. biyoetanol tesisleridir. Konya Şeker biyoetanol tesisinde yılda yaklaşık 84 milyon litre biyoetanol üretilmektedir. Bu tesiste hammadde olarak şeker pancarı melası kullanılmaktadır (Anonim, 2021a). Tarkim A.Ş. 2004’te faaliyete geçmiştir. Bu tesiste hammadde olarak mısır ve buğday atığı kullanılmaktadır (Anonim, 2021b). Tezkim A.Ş. biyoetanol tesisinde günlük biyoetanol üretimi yaklaşık 100.000 litredir ve bu tesiste hammadde olarak mısır atığı kullanılmaktadır (Anonim, 2021c). Türkşeker fabrikasında yılda yaklaşık 31 milyon litre biyoetanol üretilmektedir ve hammadde olarak şeker pancarı melası kullanılmaktadır (Anonim, 2017).

2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

2.5.1 Birinci grup biyoetanol

Birinci grup biyoetanol; buğday ve mısır gibi nişasta (Mohan vd. 2008) ya da şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker (Neto vd. 2018) içeren hammadde kaynaklarından üretilir. Küresel ölçekte birinci grup biyoetanol üreten Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya, hammadde olarak sırasıyla nişasta ve şeker bazlı mahsulleri kullanmaktadır (Ferreira vd. 2018). Hammadde olarak nişasta kullanılan biyoetanol üretimi; öğütme, jelatinizasyon, hidroliz, fermantasyon ve damıtma olmak üzere beş adımdan oluşurken (Szambelan vd. 2018) şeker kullanılan biyoetanol üretimi; öğütme, fermantasyon ve damıtma olmak üzere üç adımdan oluşur (Gomez-Flores vd. 2018).

Tatlı patates kullanılarak yapılan bir çalışmanın (Lee vd. 2012), fermantasyon aşamasında *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus* gibi aerobik mantarlar ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi fakültatif anaerobik maya aynı ve ayrı ortamlarda kullanılarak biyoetanol üretimine etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda aynı ortamda kullanılan fermentatif mikroorganizmaların biyoetanol toleransının ayrı ortamlardakine kıyasla arttığı gözlenmiş ve fermantasyonun 13. gününde, pH 4.0, 30 °C ve 150 rpm koşullarında biyoetanol konsantrasyonu %3.05 - 3.17 olarak belirlenmiştir.

Choi vd. (2010), hammadde olarak manyok nişastası, fermentatif mikroorganizma olarak *S. cerevisiae*'nin CHY1011 ve CHFY0901 suşlarını ayrı ayrı kullanarak biyoetanol üretmiştir. Çalışma SSF ortamında, %9.5 fermente edilebilir şeker varlığında, 32 °C'de, 66 saatte ve 2 Hz'lik çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda *S. cerevisiae* CHY1011 varlığında 89.1 g/L, *S. cerevisiae* CHFY0901 varlığında ise 83.8 g/L maksimum biyoetanol elde etmişlerdir.

Lareo vd. (2013), yaş ve kuru tatlı patatesler kullanarak biyoetanol üretimini karşılaştırmışlardır. Bunun için farklı oranlarda (1:8'den 1:2'ye kadar) su ile karıştırılmış yaş ve kuru tatlı patates, enzimatik ön işlem ve SSF yöntemini kullanmışlardır. Çalışma sonunda yaş ve kuru patatesin enzimatik ön işleminden elde edilen indirgeyici şeker verimlerinin birbirine yakın olduğunu, maksimum biyoetanol konsantrasyonunu ise su eklenmemiş yaş patates biyokütlesi varlığında yaklaşık 100 g/L olarak elde etmişlerdir.

Birinci grup biyoetanol üretiminin ticarileştirilmesi başarılı olmasına rağmen gıda mahsulleri üretimine uygun arazilerin kullanımını gerektirmesi, hammadde maliyetinin yüksek olması, biyoçeşitlilik üzerinde olumsuz etki bırakması ve tatlı su kaynakları yetersiz olan bazı bölgelerde problem oluşturması gibi dezavantajları vardır (Tokgöz, 2019; Tomei ve Helliwell, 2016; Banerjee vd. 2010).

2.5.2 İkinci grup biyoetanol

İkinci grup biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılan lignoselülozik biyokütle; zirai atıklar (Goh vd. 2010), orman atıkları (Jiang vd. 2019) ve şeker içeren otsu veya odunsu bitkiler (Zabed vd. 2016) olarak gruplara ayrılır. Lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenleri: lignin, selüloz ve hemiselülozdur (Shi vd. 2019).

Kakao kabuğu kullanılarak yapılan bir çalışmada 5.25 g kuru kakao kabuğu önce 70 mL deiyonize su ile hidrotermal ön işleme daha sonra enzimatik ön işleme tâbi tutularak fermente edilebilir şekerler elde edilmiştir. Fermantasyon ortamlarında *Candida tropicalis* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları ayrı ayrı kullanılmıştır. Çalışma

sonunda 69.7 mg/g fermente edilebilir şeker elde edilmiş, *C. tropicalis* ve *S. cerevisiae* varlığında ise sırasıyla 30.9 ve 45.2 g/kg biyoetanol üretilmiştir (Valladares-Diestra vd. 2022).

Şeker kamışı küspesi kullanılan bir çalışmada (Valladares-Diestra vd. 2021), önce 5 g kuru şeker kamışı küspesinin yapısındaki lignini parçalamak için (delignifikasyon) iki farklı sıcaklıkta (120 ve 160 °C), iki farklı sürede (1 ve 3 saat) ve 1/9 oranında imidazol daha sonra 15 FPU/g substrat selüloz ve 1206.7 U/g substrat ksilanaz (50 °C' de, 72 saat, 150 rpm) ile ön işleme tâbi tutulmuştur. Fermantasyon aşamasında *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Çalışma sonunda en yüksek delignifikasyon, ligninin yaklaşık %75'i ekstrakte edilerek 160 °C'de 1. ve 3. saatte elde edilmiştir. Maksimum biyoetanol konsantrasyonu ise 12. saatte %83.7 verimle 0.42 g biyoetanol/g glukoz'dur.

Bautista vd. (2019), biyoetanol üretiminde hammadde olarak mısır sapı kullanmışlardır. Fermantasyon 24, 48, 72, 96 ve 120 saatte *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda maksimum indirgeyici şeker konsantrasyonu 21.83 g/L, maksimum biyoetanol konsantrasyonu ise 72. saatte 47.66 g/L olarak elde edilmiştir.

Buğday samanı kullanılan bir çalışmada (Qiu vd. 2018), 10.0 g kuru kütle, %79.6 H₃PO₄ ve %1.9 H₂O₂ içeren 100.0 mL fosforik asit + hidrojen peroksit (PHP) solüsyonu ile 40.2 °C, 3 saat ve 180 rpm koşullarında ön işleme tâbi tutulmuştur. Ön işlemden sonra farklı kuru kütle (%10, 15 ve 20), enzim (CTec2) ve maya oranları kullanılarak eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda 13.2 mg protein/g selüloz CTec2 enzimi, 1.0 g/L maya ve %15.3 kuru kütle varlığında %88.2 verimle 69.9 g/L biyoetanol elde edilmiştir.

İkinci grup biyoetanol üretimi, hammadde temini yönünden birinci gruptan daha avantajlı olsa da nişasta ve şeker bazlı hammaddelerle kıyaslandığında lignoselülozik hammaddelerden biyoetanol üretimi daha maliyetlidir çünkü lignin, selüloz ve hemiselüloza kovalent ve hidrojen bağları ile sıkı bir şekilde bağlı olduğu için lignoselülozik hammaddenin ön işleminde yüksek enerji gereklidir. Ön işlemden sonra selüloz, enzimatik hidroliz ile glukozla dönüştürülür. Bu aşamada kullanılan selüloz

enziminin nişastayı hidrolize eden enzimlerden çok daha pahalı olması ikinci nesil biyoetanol üretiminin başka bir dezavantajıdır (Cardona vd. 2007).

2.5.3 Üçüncü grup biyoetanol

Üçüncü grup biyoetanol üretiminde makroalg, mikroalg ve siyanobakteri gibi fotosentetik organizmalar kullanılır (Maity ve Mallick, 2022).

Mikroalgler, tek hücreli ya da basit çok hücreli olabilen fotosentetik organizmalardır (Plaza vd. 2008). Ökaryotik ya da prokaryotik yapıda olan bu mikroorganizmalar, karbondioksiti (CO₂) fiksede ederek güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürme yeteneğine sahiptirler ve atmosferdeki oksijenin yaklaşık yarısını üretirler (Johansen, 2012). Sucul ortamlarda yetiştirmeye adapte olmuş bu mikroorganizmaların bazı türleri tatlı suda, diğerleri ise tuzlu suda bulunur (Maia vd. 2020). Mikroalglerin bilinen yaklaşık 50.000 türü vardır (Maity ve Mallick, 2022).

Mikroalgler fototrofik, heterotrofik, fotoheterotrofik ve miksotrofik koşullarda gelişebilirler. Fototrofik mikroalgler enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak inorganik karbon kullanır (Abreu vd. 2022). Heterotrofik mikroalgler enerji kaynağı olarak organik bileşenleri, karbon kaynağı olarak organik karbonları kullanır (Chen, 1996). Fotoheterotrofik mikroalgler enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak organik karbonları kullanır (Richmond, 1986). Miksotrofik mikroalgler ise enerji kaynağı olarak ışık ve organik bileşenleri, karbon kaynağı olarak organik ve inorganik karbonları kullanır (Richmond, 1986).

Mikroalglerde karbonhidrat; hücre duvarının dış tabakasında pektin, agar, aljinat, iç tabakasında selüloz, hemiselüloz ve hücrenin içinde nişasta hâlinde depolanır (Lam ve Lee, 2015). Mikroalg biyokütlesinde yoğun olarak bulunan karbonhidratlar nişasta ve selüloz olup lignin bulunmaz (Silva ve Bertucco, 2016; Velazquez-Lucio vd. 2018). Mikroalg hücre duvarında lignin bulunmadığı için ön işleme daha kolaydır (Shokrkar vd. 2017).

Sıcaklık, pH, ışık yoğunluğu ve besin gibi parametreler mikroalglerin biyokimyasal yapısını etkileyebilir. Bu sayede mikroalgal kültürasyon koşulları kontrol edilerek biyoetanol üretiminde gerekli olan fermente edilebilir şekerlerin elde edilme oranı yükseltilebilir (Dasan vd. 2019).

Üçüncü grup biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroalgler arasında: *C. vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Nannochloropsis sp.* ve *Porphyridium cruentum* bulunur.

C. vulgaris, Chlorellaceae familyasına aittir. 2-10 µm çapında ve küresel şekillidir. Kuru ağırlığının %12-55'i karbonhidrattır. Fotosentez verimi yüksektir. Büyüme hızı yüksektir. Bu özelliklerinden dolayı biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroalglerden biridir (Safi vd. 2014).

El-Souod vd. (2021) yaptıkları bir çalışmada, 100 g *C. vulgaris* kuru kütlesinin ön işlemlerinde %2 ve %5 NaOH, %2 ve %5 H₂SO₄, 250 W mikrodalga fırın ve ultrasonik homojenizer kullanmışlardır. Uyguladıkları ön işlemler sonunda en yüksek indirgeyici şeker konsantrasyonunu %2 H₂SO₄ varlığında 120 °C, 30 dakikada yaklaşık 24.77 g/100 g, maksimum biyoetanol konsantrasyonunu ise 5. günde 14.32 g/100 g kuru kütle olarak belirlemişlerdir.

Chlorella sp. kullanılarak yapılan bir çalışmada yüksek oranda fermente edilebilir şekerler elde etmek için *Chlorella sp.*'nin ön işleminde katı asit katalizörü kullanılmıştır. Bunun için farklı oranlarda kuru biyokütle ve katı asit katalizörü, 150-180 °C aralığında sıcaklıklar ve 10-50 dk. aralığında süreler uygulanmıştır. Çalışma sonunda en yüksek fermente edilebilir şeker verimi %5 kuru biyokütle ve biyokütlenin %40'ı olan katalizör varlığında, 160 °C, 45. dakikada 25.2 g/L olarak elde edilmiştir (Jeong vd. 2020).

Chlorella S4 kullanılan bir çalışmada ön işlem için farklı konsantrasyonlarda kuru kütle (%2, 4 ve 6) ve H₂SO₄ (%1.5, 3 ve 4.5 (v/v)) kullanılmıştır. Ön işlem sonunda en yüksek glukoz konsantrasyonu; %6 kuru kütle ve %3 H₂SO₄ (v/v) varlığında, 121°C 20 dk.

koşullarında yaklaşık %0.179, maksimum biyoetanol konsantrasyonu ise 48 saatlik fermantasyondan sonra yaklaşık %78.2 verimle yaklaşık 8.31 g/L olarak belirlenmiştir (Olia vd. 2022).

60 g/L *Chlorella* sp. kuru kütlesi kullanılan bir çalışmada, ön işlem için α -amilaz ile glukoamilaz enzimleri kullanılmış ve fermantasyon ortamına takviye olarak 5 g/L maya özütü, 5 g/L glukoz, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 5 g/L MgSO₄, ve 5 g/L pepton eklenmiştir. Ön işlem sonunda en yüksek glukoz konsantrasyonu; %3 glukoamilaz varlığında, 5. saatte, 80 °C ve pH 5.0 koşullarında %80.01 verimle 6.83 g/Lh, maksimum biyoetanol konsantrasyonu ise 0.5 g *S. cerevisiae* varlığında, 30. saatte ve pH 5.0 koşullarında 4.80 g/L olarak belirlenmiştir (Bahlawan vd. 2022).

Scenedesmus sp. mikroalgi Scenedesmaceae familyasına aittir. Kuru ağırlığının %10-52'si karbonhidrattır (Agustini vd. 2019). Büyüme hızı yüksektir. Yüksek miktardaki CO₂'e direnç gösterir (Soares vd. 2018).

Chandra vd. (2020), *Scenedesmus acuminatus* içeren kültür ortamlarına nitrat ile fosfat eksikliğini, magnezyum ile lizin takviyesini ve belirli pH değerlerini ayrı ayrı uygulayarak elde edilen indirgen şeker miktarlarını ve biyoetanol verimlerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda nitrat ile fosfat eksikliğinde indirgeyici şeker veriminin azaldığı, en yüksek indirgeyici şeker veriminin pH 9.0 + 0.5 g/L Lys koşulunda 576.1 mg/L olarak elde edildiği ve bu koşul ile biyoetanol veriminin %30.1'den %44.8'e yükseldiği belirlenmiştir.

Alam vd. (2019), *Scenedesmus raciborskii* mikroalgine 10 FPU/g substrat oranında farklı enzim mixleri ekleyerek ön işlem uygulamışlardır. Elde edilen en yüksek glukoz konsantrasyonunu; selüloz + α -amilaz + amiglukosidaz varlığında ve 72. saatte 6.0 g/L olarak belirlemişlerdir.

Chlorococcum sp. mikroalgi Chlorococcaceae familyasına aittir. Hücre boyutu 8 – 25 µm arasında değişir (Correia vd. 2020). Büyüme hızı yüksektir, açık sistemlerde yetiştirilmesi kolaydır. Yüksek sıcaklığa karşı toleransı fazladır (Zhang ve Lee, 1999).

Chlorococcum sp. kullanılarak yapılan bir çalışmada ön işlemler için farklı oranlarda NaOH, H₂SO₄ ve selüloz uygulanarak ve çeşitli pH değerlerinde tutularak elde edilen biyoetanol konsantrasyonları incelenmiştir, Çalışma sonunda 10 g *Chlorococcum sp.* kuru kütlesinden en yüksek biyoetanol konsantrasyonu; 0.015 g selüloz varlığında, 72. saatte, pH 4.8 ve 45°C koşullarında 1.9 g olarak elde edilmiştir (Rehman vd. 2019).

Juliarnita vd. (2018), *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* ve *Chlorococcum sp.* karışık kültürünün ön işleminde HCl asit ve farklı sıcaklık değerleri uygulayarak elde edilen maksimum fermente edilebilir şeker miktarını ve biyoetanol verimini incelemişlerdir. Çalışma sonunda en yüksek fermente edilebilir şeker konsantrasyonu 12.2 mg/L, maksimum biyoetanol oranı ise 80°C de %58 olarak belirlenmiştir.

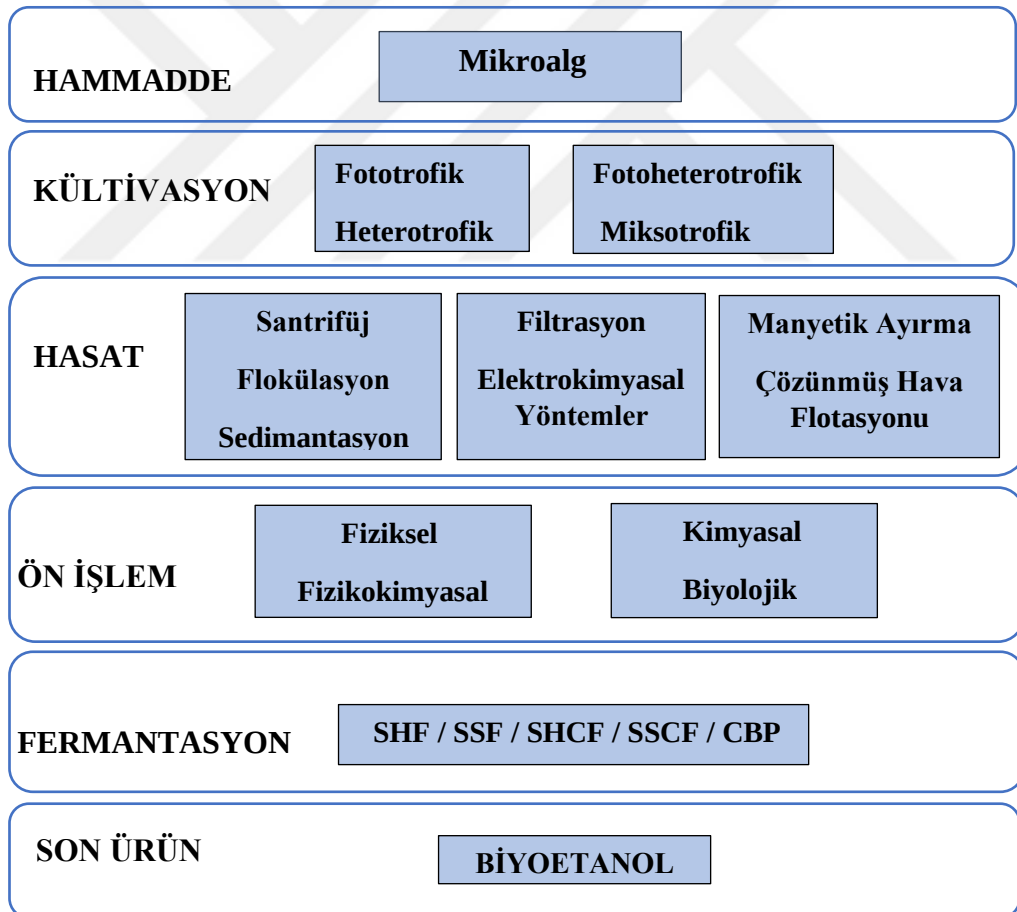
Nannochloropsis sp. mikroalgi Eustigmataceae familyasına aittir. Hücre boyutu 2 - 8 µm'dir. Kuru ağırlığının %28 – 40'ı karbonhidrattır (Rodolfi vd. 2009).

Rahman vd. (2019), *Nannochloropsis sp.*'nin kuru ve yaş kütlelerini kullanarak elde edilen glukoz ve biyoetanol konsantrasyonlarını karşılaştırmıştır. Kuru ve yaş kütlelerin ön işlemlerinde %3 H₂SO₄ kullanmışlardır. Çalışma sonunda yaş kütleden 3.3 g/L glukoz ve 3.07 g/L biyoetanol, kuru kütleden 2.29 g/L glukoz ve 1.00 g/L biyoetanol elde etmişlerdir. Bu sonuçlar biyoetanol üretiminde *Nannochloropsis sp.* yaş kütlesinin hammadde olarak kullanılmasında daha avantajlı olduğunu göstermiştir.

Phorphyridium cruentum mikroalgi Porphyridiaceae familyasına aittir. Tek hücreli kırmızı bir mikroalgdir. Karbonhidrat içeriği kuru ağırlığının %31 - 58'idir (Fuentes vd. 2000). Hücre boyutu 5 – 6 µm arasında değişir (Borowitzka, 2018).

Yapılan bir çalışmada *Porphyridium cruentum* biyokütlesinden elde edilen biyoetanol verimi; yetiştirme ortamı, SHF ve SSF yöntemlerine göre karşılaştırılmıştır. SSF yöntemi ile biyoetanol üretiminin daha verimli ve maksimum biyoetanol konsantrasyonunun tatlı suda yetişmiş *P. cruentum*'da daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tatlı suda yetişmiş *P. cruentum*'dan elde edilen biyoetanol verimi %80.3 iken tuzlu suda yetişmiş *P. cruentum*'da %74.2'dir (Kim vd. 2017).

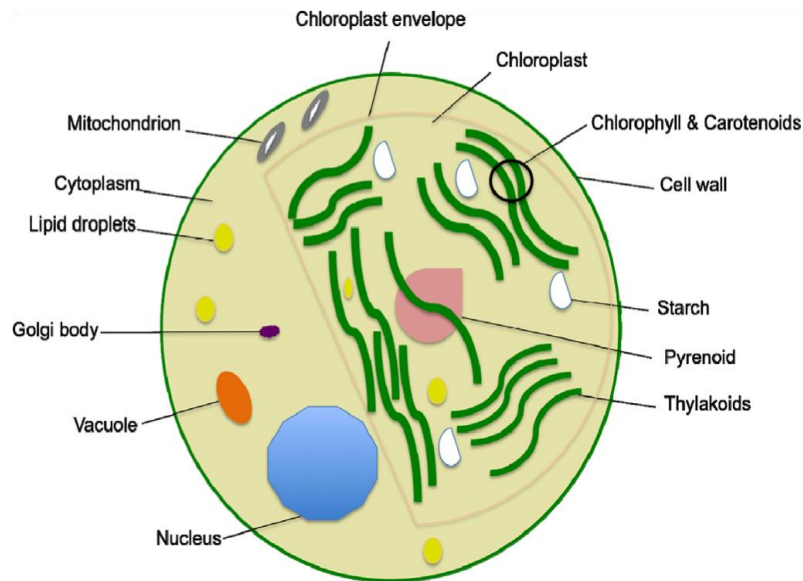
Biyoetanol üretiminde hammadde olarak mikroalgal biyokütle kullanmak avantajlıdır çünkü mikroalglerin fotosentetik verimi yüksektir, büyüme hızı yüksektir, yetiştirilme aşamasında kontrol edilebilen parametreler uygulanabilir ve tarım amaçlı kullanılabilen arazilere ihtiyaç duyulmaz (Maeda vd. 2018).



Şekil 2.1 Mikroalgal Biyoetanol Üretim Aşamaları (Jambo vd. 2016)

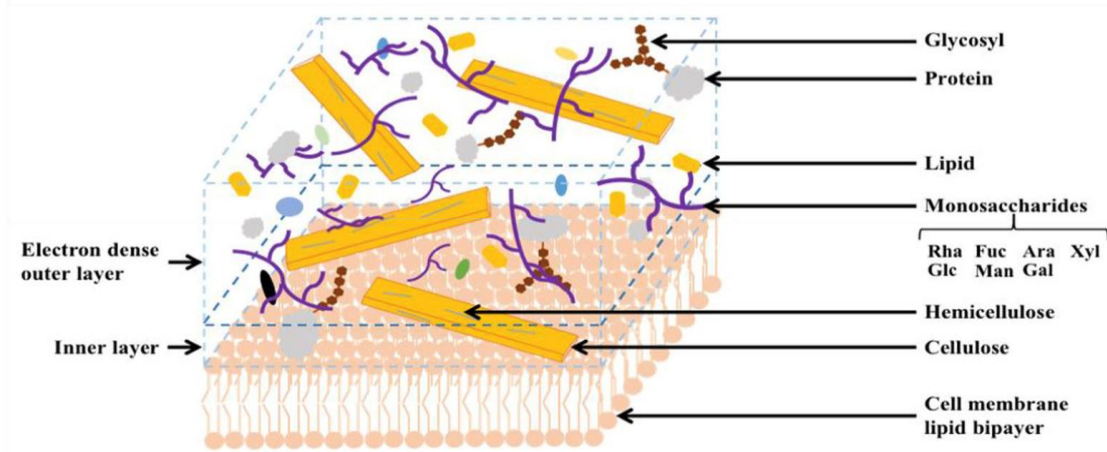
Biyoetanol üretiminde yaygın kullanılan mikroalglerden biri olan *C. vulgaris*; ökaryot, tek hücreli, flagella içermeyen yeşil bir mikroalgdir. Bilimsel sınıflandırması “Domain: Ökaryot, Alem: Protista, Şube: Chlorophyta, Sınıf: Trebouxiophyceae, Takım: Chlorellales, Aile: Chlorellaceae, Cins: Chlorella, Tür: *Chlorella vulgaris*” şeklinde olup 1890'da Hollandalı mikrobiyolog Dr. Martinus Willem Beijerinck tarafından keşfedilmiştir. Tatlı suda yetişmektedir ve yaklaşık 2.5 milyar yıldan fazla bir süredir yeryüzünde bulunmaktadır (Safi vd. 2014).

C. vulgaris hücresi 2 - 10 µm çapında olup küresel veya elips şeklindedir (Yamamoto vd. 2004). Tek hücreli veya maksimum 64 hücre koloni hâlinindedir. Sitoplazmasında su, çözünür proteinler ve mineraller ile mitokondri, çekirdek, vakuoller (Kuchitsu vd. 1987), kloroplast ve Golgi (Safi vd. 2014) gibi organeller bulunur. Kloroplastında; pirenoid, tilakoidler ve lipid globülleri bulunurken özellikle olumsuz büyüme koşullarında amiloz ve amilopektinden meydana gelen nişasta granülleri oluşabilir. Pirenoid, ribuloz-1,5 bifosfat karboksilaz oksijenaz (RuBisCO) içermekte olup karbondioksit fiksasyonunun merkezidir. Tilakoidlerde, diğer pigmentlerin rengini bastıran pigment olan klorofil sentezlenir. Lipid globülleri azot stresi durumunda sitoplazmada ve kloroplastta birikir (Hoek vd. 1995; Lee vd. 2018).



Şekil 2.2 *C. vulgaris* hücresinin şematik yapısı (Safi vd. 2014)

C. vulgaris hücre duvarı, elektron yoğun bir dış katman ve daha az yoğunluktaki bir iç katmandan oluşan tek tabakalı mikrofibriler yapıya sahip olup ana bileşeni glukozamin olan kitosan benzeri bir polisakkarit, selüloz, hemiselüloz, monosakkaritler, proteinler (~% 20), lipidler (%5–40), glikosil, mineraller ve vitaminler içerir (Safi vd. 2014; Ievina ve Romagnoli, 2020; Ye vd. 2023). Bu mikroalgin hücre duvarı kalınlığı büyüme evresine göre değişir. Yeni oluşan hücre duvarı yaklaşık 2 nm kalınlıkta olup (NEMcovA ve Kalina, 2000) gelişme evresinde kalınlığı 17-21 nm'ye ulaşana kadar sertleşir (Yamamoto vd. 2005) ve bu evrede glukozaminden meydana gelen bir mikrofibriler tabaka oluşur. Bu tabaka hücre duvarına sertlik verir (Safi vd. 2014). Olgun evrede ise hücre duvarı kalınlığı ve bileşimi, farklı büyüme ve çevre koşullarına göre değişkenlik gösterir (Atkinson vd. 1972; Burczyk ve Hesse, 1981).



Şekil 2.3 *Chlorella vulgaris*'in hücre duvarı yapısı ve kimyasal bileşenleri (Ye vd. 2023)

C. vulgaris'in temel biyokimyasal bileşenleri; karbonhidratlar, proteinler, lipidler, pigmentler, mineraller ve vitaminler olup (Safi vd. 2014) bu bileşenlerin oranı ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH, tuzluluk ve besin gibi etkenlere göre değişkenlik gösterir (Sharma vd. 2012a; Vitova vd. 2015). Yapısında çeşitli biyokimyasal bileşenler bulundurması sayesinde bu mikroalg takviye besin (Fradique vd. 2010), hayvancılık ile su ürünleri yemi (Becker, 2007), biyoyakıt (Safi vd. 2014), ilaç ve kozmetik endüstrilerinde (Rodriguez-Garcia ve Guil-Guerrero, 2008) yaygın olarak kullanılmaktadır.

C. vulgaris'te karbonhidratlar, nişasta ile selüloz gibi polisakkaritler ve bazı indirgen şekerler halinde bulunur. Nişasta bu mikroalgde en bol bulunan polisakkarittir, genellikle kloroplastta bulunur ve hücreler için enerji deposu görevi görür (Coronado-Reyes vd. 2020). Dirençli ve yapısal bir polisakkarit olan selüloz, bu mikroalgin hücre duvarını korur (Takeda, 1991). *C. vulgaris* hücre duvarında bulunan monosakkaritler; glukoz, galaktoz, fukoz, ksiloz, ramnoz, arabinoz ve mannozdur. Bu mikroalgin üstel fazında en fazla bulunan monosakkarit glukozdur (%70-75), ardından galaktoz ve mannoz gelir, durağan fazında ise en çok galaktoz (%65-75), ardından glukoz, arabinoz, mannoz ve glukuronik asit gelir. Bu mikroalgin hücre duvarında beta-1,3-glukan gibi lifsiz karbonhidratlar da bulunur (Ye vd. 2023). *C. vulgaris*'in toplam karbonhidrat değeri, özellikle azot eksikliğinde kuru ağırlığının %12-55'ine kadar yükselebilmektedir (Choix vd. 2012).

Çizelge 2.2 *C. vulgaris*' te temel makro ve eser elementlerin içeriği (Cabrita vd. 2022)

Toplam mineral içeriği (g/kg)	41.3
Temel makro elementler (g/kg)	39.9
Na	0.50
K	8.50
Mg	0.56
Ca	4.64
P	25.7
Temel eser elementler (mg/kg)	1190
Fe	644
Mn	163
Cu	25.4
Zn	357
Se	0.17

Çizelge 2.3 *C. vulgaris*'in vitamin içeriği (Gelgör vd. 2022)

Vitamin	(µg/100 g)
B1 (tiamin)	75.6 ± 48.5
B2 (riboflavin)	1.8 ± 0.1
B3 (niasin)	237.6 ± 161.2
B5 (pantotenik asit)	1928.9 ± 786.1
B6 (piridoksin)	N.D.
B7 (biyotin)	29.2 ± 9.2
B9 (folat)	66.5 ± 33.3
B12m (siyanokobalamin)	43.1 ± 15.3
C (askorbat)	4786.3 ± 1763.2

N.D. : Veri yok

Optimal koşullarda yetiştirilen bir *C. vulgaris* hücresi, eşeysiz üreme olan otosporülasyon ile çoğalır. Otoposporülasyonda ana hücre, 2 – 32 otopospor veya yavru hücreye bölünür, otoposporlar olgunlaşınca ana hücre duvarı yırtılıp yavru hücreler serbest kalır ve ana hücreden geriye kalan atıkları yavru hücreler besin olarak tüketir (Safi vd. 2014).

Biyoetanol üretiminde hammadde olarak *C. vulgaris* biyokütlesi kullanmak avantajlıdır çünkü bu mikroalg yüksek miktarda karbonhidrat içerir (Safi vd. 2014), büyüme hızı yüksektir, çoğalma süresi nispeten kısadır, zorlu ortam koşullarına dayanabilme ve çeşitli fiziko-kimyasal ortamlara adapte olabilme (Wirth vd. 2020) yeteneğine sahiptir (Singh vd. 2019), tatlı su ve toprak habitatlarında yaygın olarak bulunduğu için kolaylıkla temin edilebilir (Wirth vd. 2020).

2.5.4 Dördüncü grup biyoetanol

Dördüncü grup biyoetanol üretiminde biyoetanol üretimini artırmak amacıyla; düşük miktarda lignin ile selüloz ve yüksek miktarda şeker içeren biyokütle yetiştirilmesi, genetik modifikasyona uğratılmış fermentatif mayalar kullanarak biyoetanol üretiminin artırılması (Ziolkowska, 2020), mikroalglerin fotosentetik verimliliğinin artırılması

(Tandon ve Jin, 2017) ve mikroalglerin yapısındaki karbonhidrat miktarının artırılması (Abdullah vd. 2019) gibi yöntemler uygulanmaktadır.

Lee vd. (2020), arpa kalıntılarının yapısındaki lignin oranını azaltabilmek amacıyla arpadaki lignin oluşumundan sorumlu gen olan kafeik asit O-metiltransferaz 1 (HvCOMT1) oranının CRISPR/Cas9 aracılı mutajenezi ile azaltılmasını sağlamışlardır. Bunun için transgen içermeyen, homozigot HvCOMT1 mutanlığı elde etmişlerdir. Mutant tipin toplam lignin içeriği yabanıl tipten %14 daha düşük, fermente edilebilir şeker olan glukoz oranı ise %34 daha yüksek olarak belirlenmiştir. Yabanıl tipten elde edilen biyoetanol konsantrasyonu 10.7 g/L iken mutant tipten elde edilen biyoetanol konsantrasyonu 14.3 g/L'dir.

Ksiloz beş karbonlu (pentoz) bir şekerdir. *Saccharomyces cerevisiae*, pentozları fermente edemez. Gonçaves vd. (2014), bu mayanın ksilozu fermente edebilmesi için ksiloz redüktaz (KSİL1), ksilitol dehidrojenaz (KSİL2) ve ksilülokinaz (XKS1) genlerini, ana heksoz taşıyıcılara sahip olmayan bir *Saccharomyces cerevisiae* hxt-null suşuna plazmit aracılığıyla aktararak HXT1, HXT2, HXT5 ve HXT7 permeazlarının (taşıyıcıların) ksiloz, glukoz ve ksiloz + glukoz fermantasyonlarındaki etkilerini analiz etmişlerdir. Çalışma sonunda HXT1 taşıyıcısının, ksiloz + glukoz fermantasyonunda maksimum şeker tüketimini ve etanol üretimini olumlu etkilediğini, HXT7 taşıyıcısının ise ksiloz fermantasyonunu olumlu etkilediğini fakat ksiloz + glukoz fermantasyonunda sadece glukoz taşıdığını belirlemişlerdir.

Chlamydomonas reinhardtii, düşük yoğunluktaki ışık ortamında maksimum düzeyde ışık enerjisi yakalayabilen ve bu enerjiyi fotosentezde kullanabilen bir mikroalgdir fakat bu mikroalg yüksek yoğunluktaki ışık ortamında yakaladığı ışık enerjisinin çoğunu fotohasara karşı korunmak amacıyla ısı olarak açığa çıkardığı için fotosentezde kullanamaz. Mussnug vd. (2007), bu enerji kaybını azaltabilmek amacıyla RNAi teknolojisi ile bu mikroalgdeki ışık toplayan anten kompleksleri (LHC) gen ailesini aşağı regüle ederek *Chlamydomonas reinhardtii* Stm3LR3 mutanlığı elde etmişlerdir. Çalışma sonunda bu mutant mikroalgde LHC'ye bağlı ısı kaybının azaldığı, yüksek yoğunluktaki

ışık ortamında fotosentetik verimlilik ile ışık geçirme özelliğinin arttığı ve fotohasar riskinin azaldığı belirlenmiştir.

Dördüncü grup biyoetanol üretimi verimli ve ucuzdur fakat biyoetanol üretim süreci uzundur, üretimin başlangıcında maliyet yüksektir ve kullanılan teknoloji yeni olup gelişim aşamasındadır (Jouzani ve Taherzadeh 2015).

2.6 Mikroalg Kültivasyon Koşulları ve Sistemleri

Mikroalg biyoetanol üretiminin ilk aşaması kültivasyondur. Kültivasyon ile mikroalglerin geliştirilmesi ve çoğaltılması sağlanır. Besin maddeleri, ışık, pH ve sıcaklık gibi faktörler mikroalglerin yetiştirilmesinde önemlidir (Dassey ve Theegala, 2013) çünkü ışığın yoğunluğu, süresi ve spektral bileşimi fotosentez verimini doğrudan etkilemektedir. Mikroalg türlerinin gelişebildiği optimum sıcaklık genellikle 20 – 30 °C iken termofilik mikroalgler 40 – 80 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilir. Ayrıca mikroalglerin gelişebildiği kültür ortamının pH'ı genellikle 6.0 – 8.76 arasındadır. *C. vulgaris*' in gelişebildiği pH aralığı geniş iken çoğu mikroalg türünün gelişebildiği pH aralığı dardır (Khan vd. 2018). Mikroalgler; fototrofik, heterotrofik, fotoheterotrofik ve miksotrofik gibi ortam koşullarında gelişebilirler (Abreu vd. 2022).

Çizelge 2.4 Enerji ve karbon kaynaklarına göre mikroalglerde gelişim koşulları (Abreu vd. 2022)

Gelişim Tipi	Enerji Kaynağı	Karbon Kaynağı
Fototrofi	Işık	İnorganik karbon
Fotoheterotrofi	Işık	Organik karbon
Heterotrofi	Organik bileşenler	Organik karbon
Miksotrofi	Işık ve organik bileşenler	Organik ve inorganik karbon

2.6.1 Fototrofik kültivasyon

Fototrofik gelişimde mikroalgler enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak CO₂ gibi inorganik karbon kullanır. Fototrofik kültivasyon diğer sistemlere kıyasla ucuzdur (Javed vd. 2019) ayrıca bu kültivasyonda sera etkisine neden olan atmosferik karbondioksit kullanıldığı için çevresel avantajı vardır (Udayan vd. 2022) fakat bu gelişimde fotosentetik verimlilik ile elde edilen mikroalgall biyokütle oranı nispeten düşüktür (Abreu vd. 2022). Fototrofik kültivasyon, açık havuz, kapalı ve hibrit sistemlerde gerçekleştirilebilmektedir (Javed vd. 2019).

Açık havuz kültivasyon sistemi büyük ölçekli mikroalg üretiminde kullanılan en eski teknikler olup 1950’li yıllardan beri kullanılmaktadır (Borowitzka, 1999). Yaygın olarak kullanılan açık sistemler dairesel, eğimli, karıştırmasız ve yarış pisti tipi havuzlardır (Suali ve Sarbatly, 2012). Açık havuz kültivasyon sistemlerinin maliyeti nispeten ucuz olup büyük üretim kapasitesine sahiptirler fakat açık havuzlarda buharlaşma ile su kaybının fazla olması, mikroalglerin büyümelerine engel olan diğer mikroorganizmalar tarafından kolayca kontamine olabilmesi, sıcaklık ile güneş ışığının günlük ve mevsimlik değişimlerinin mikroalg üretimini etkilemesi ve mikroalglerin kltivasyonunda karıştırma işleminin homojen olarak yapılamaması gibi nedenlerden dolayı açık havuzlarda mikroalg üretim verimi kapalı fotobiyoreaktrlere kıyasla düşüktür (Richmond, 2003).

Kapalı kültivasyon sisteminde; ışık, sıcaklık, pH vs. gibi ortam koşulları stabil hlde tutularak mikroalglerin yetiştirilmesi sağlanır. Yaygın olarak kullanılan kapalı sistemler; tübüler, düz plaka, fermentör tipi ve içten aydınlatmalı fotobiyoreaktrlerdir (Suali ve Sarbatly, 2012).

Açık sistemlere kıyasla fotobiyoreaktörlerde daha iyi pH ve sıcaklık kontrolü, daha iyi ışık kullanım verimliliği, daha homojen karıştırma, daha az buharlaşma kaybı ve yüksek oranda biyokütle üretimi sağlanır. Ayrıca fotobiyoreaktörlerde kontaminasyon riski daha düşüktür fakat fotobiyoreaktörler genellikle yüksek maliyetlidir (Karemore vd. 2015).

Hibrit kültivasyon sistemi açık ve kapalı kültivasyon sistemlerinin kombinasyonudur. Bu sistemde maksimum oranda mikroalgal biyokütle elde edebilmek için mikroalgler önce bir fotobiyoreaktörde yetiştirilerek kontaminasyon riski büyük ölçüde azaltılır. Daha sonra açık sistem kullanılarak büyük ölçekte mikroalg üretimi sağlanır (Schenk vd. 2008). Bu sistem yüksek verimde ve daha az enerji tüketimi ile mikroalg gelişimini sağlar fakat maliyeti yüksektir (Dickinson vd. 2017; Javed vd. 2019).

2.6.2 Heterotrofik kültivasyon

Heterotrofik mikroalgler ışığa ihtiyaç duymadan enerji kaynağı olarak organik bileşen, karbon kaynağı olarak organik karbon kullanır (Kim vd. 2013). Heterotrofik kültivasyonda mikroalglerin gelişimi ışık enerjisinden bağımsızdır bu durum kültivasyon sürecini kolaylaştırır (Shamzi Mohamed vd. 2011). Bu kültivasyon ile daha yüksek oranda mikroalgal biyokütle elde edilebildiği için hasat maliyeti daha azdır (Iasimone vd. 2020) fakat bu kültivasyonda organik bileşenler kullanıldığından dolayı kontaminasyon riski daha fazladır ve maliyeti daha yüksektir (Franziska vd. 2011).

2.6.3 Fotoheterotrofik kültivasyon

Fotoheterotrofik koşulda gelişen mikroalgler enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak organik karbon substratları kullanırlar (Daneshvar vd. 2021). Bu kültivasyonda organik karbon substratlarının kullanılması biyokütle veriminin artmasına katkı sağlar. Örneğin yapılan bir çalışmada *D. dissociatus*'un biyokütle verimliliği ototrofik kültürde 0.23 g/l.d iken fotoheterotrofik kültürde 0.48 g/l.d olarak belirlenmiştir (Grama vd. 2016). Ancak bu koşulda mikroalglerin gelişimi için hem organik karbona hem de ışığa ihtiyaç duyulmasından dolayı maliyeti yüksektir (Chew vd. 2018).

2.6.4 Miksotrofik kültivasyon

Miksotrofik mikroalgler enerji kaynağı olarak ışık ve organik bileşenleri, karbon kaynağı olarak organik ve karbondioksit gibi inorganik karbonları kullanır. Bu ortamda gelişen

mikroalgler, hem fototrofik hem de heterotrofik koşullarda hayatta kalabilir (Mansa vd. 2018).

Miksotrofik koşulda gelişen mikroalglerden heterotrofik koşulda gelişenlere kıyasla daha yüksek oranda biyokütle elde edilebilir ve bu kùltivasyonda karbon kaynağı olarak CO₂ kullanılabildiğinden dolayı çevreye olumlu etkisi vardır (Shu ve Tsai, 2016) fakat bu kùltivasyonda kullanılabilen organik bileşenler kontaminasyona neden olabilir. Bu yüzden miksotrofik kùltivasyonda genellikle kapalı fotobiyoreaktörler kullanılır (Chew vd. 2018).

2.7 Mikroalgal Biyokùtlenin Hasadı ve Hasat Yöntemleri

Biyooetanol üretiminin hasat aşaması toplam maliyetin %20-30'unu oluşturabilmektedir (Uduman vd. 2010; Barros vd. 2015). Bu yüzden mikroalgal biyokùtlenin verimli ve düşük maliyetli olarak hasat edilmesi çok önemlidir (Udayan vd. 2022). Mikroalgal biyokùtleye uygulanacak ideal bir hasat yönteminde yüksek konsantrasyonda biyokùtle elde edilebilmeli, enerji ve bakım maliyeti düşük olmalıdır. Hasat edilecek mikroalg biyokùtlesinin yapısına, yoğunluğuna, büyüklüğüne vs. göre uygun hasat yöntemi seçilmelidir (Barros vd. 2015). Mikroalgal biyokùtle için uygulanan hasat yöntemleri arasında; santrifüjleme, filtrasyon, sedimantasyon, yüzdürme, elektrokimyasal ve flokülasyon bulunur. Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılanlar filtrasyon ve santrifüjlemedir (Suparmaniam vd. 2019).

2.7.1 Santrifüj

Santrifüj yöntemi mikroalgal biyokùtlenin hasadı için hem laboratuvar hem de ticari ölçekte kullanılabilen hızlı bir işlemdir. Sabit (örn. hidrosiklon) ve sabit olmayan (örn. santrifüjlü dekantörler, disk santrifüjler ve borulu santrifüjler) olmak üzere iki çeşit santrifüj sistemi vardır (Mathimani ve Mallick, 2018). Hidrosiklon tip santrifüj mikroalgal biyokùtlenin siklonik bir hareketle tekne boyunca aşağı doğru hareket ettirildiğı silindirik bir cihazdır. Dekanter santrifüj, yüksek hızda dönen ve mikroalgal

biyokütleyi özgül ağırlık farkına göre ayıran yatay ve konik tüplerdir (Najjar ve Abu-Shamleh, 2020). Disk santrifüjünde ince konik metal diskler üst üste olup mikroalgal biyokütle silindirin merkezinde toplanır. Silindirin dönüşü, biyokütlenin dışa ve daha sonra dibe doğru hareket etmesini sağlarken kültür sıvısı merkeze doğru hareket eder. Borulu santrifüjde drenaj sistemi yoktur ve genellikle laboratuvar çalışmalarında kullanılır (Udayan vd. 2022). Santrifüj, endüstriyel olarak tercih edilen bir hasat yöntemidir fakat bu yöntem oldukça enerji gerektirdiğinden dolayı maliyetlidir ve genellikle farmasötikler gibi biyoaktif bileşenler için kullanılır (Yasin vd. 2019).

2.7.2 Flokülasyon

Flokülasyon mikroalgal biyokütlenin bazı organik ve inorganik biyoflokülanlar aracılığıyla ya da ortamın pH'ının değiştirilerek (otoflokülasyon) elde edildiği hasat yöntemidir (Matter vd. 2019). Flokülasyon yönteminde flokülantların yardımıyla küçük boyutlu mikroalgal hücrelerin bir araya getirilerek hasat edilmesi sağlanır. Alüminyum sülfat veya demir sülfat gibi kimyasallar inorganik flokülant olarak kullanılır (Branyikova vd. 2018). Bu tür inorganik flokülantlar etkilidir fakat pahalıdır ve yüksek oranda kullanıldığında mikroalglerin hücre yapılarına zarar verir (Laamanen vd. 2016). Nişasta ve kitosan gibi organik flokülantlar, çevre ve mikroalg biyokütlesi üzerinde daha az olumsuz etki bırakır (Lee vd. 2015). Mikroalg biyokütlesinin hasadı için flokülant olarak inorganik metal tuzları kullanılabilir fakat hasat edilen biyokütle yapısındaki kalıntı tuzlar yüksek konsantrasyonda metal içerdiğinden dolayı genellikle tercih edilmez (Matter vd. 2019). Biyolojik flokülasyon yönteminde flokülant potansiyeli olan mikroorganizmalar ya da bu mikroorganizmalar tarafından salınan ekzopolimerik maddeler kullanılabilir (Yang vd. 2020).

Otoflokülasyon yöntemi, enerji ve proses açısından uygun maliyetlidir. Bu yöntemde mikroalg hücreleri, Ca^{2+} ve Mg^{2+} varlığında yüksek pH'da (9.0 'dan yüksek) floküle olur (Ummalyma vd. 2017). İşlem CO_2 ya da genellikle 1 M NaOH kullanılan alkali çözelti aracılığıyla indüklenir (Singh ve Patidar, 2018). Kültivasyon ortamının pH'ı, mikroalgler fotosentez sırasında ortamdan CO_2 kullandıkça bazik hale gelir. Bu yüksek pH, mikroalg hücrelerinin yüzeyindeki negatif yükleri nötr hâle getirerek topaklaşmalarına neden olur

(Okoro vd. 2019) fakat NaOH mikroalgal hücre yapısını değiştirdiği ve bu yöntemin kontrol edilebilirliği zor olduğu için endüstriyel olarak kullanımı tercih edilmez (Udayan vd. 2022).

2.7.3 Sedimentasyon

Sedimentasyon, mikroalgal hücreleri ayırmak için yerçekimi kullanılan bir hasat yöntemidir (Fasaei vd. 2018). Sedimentasyon hızı, partiküllerin boyutuna ve yoğunluğuna bağlıdır. Düşük yoğunluğa veya boyuta sahip partiküller çok yavaş çöker (Mennaa vd. 2019). Bu gibi durumlarda bir flokülant ilave edilip elektrostatik çekim oluşturularak hasat yapılabilir (Fuad vd. 2018). Sedimentasyon yöntemi basit, ekonomik ve enerji açısından verimlidir fakat özellikle atık suda yetiştirilen büyük ölçekli mikroalglerin hasadı için uygun değildir (Leite vd. 2020).

2.7.4 Filtrasyon

Filtrasyon yönteminde mikroalgal biyokütle bir membran ile sıvı kısımdan ayrılır. Sıvı kısım filtre gözeneklerinden geçerken katı kısım filtrede kalır (Mo vd. 2015). Bu yöntem ile düşük yoğunluğa sahip mikroalg biyokütlesi dahi hasat edilebilir. Bu hasat yönteminin ultrafiltrasyon, mikrofiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters osmoz gibi çeşitleri vardır (Castro-Munoz ve Garcia-Depraect, 2021). Mikrofiltrasyon membranlarının gözenek boyutu 0,1 - 10 μm , ultrafiltrasyon membranlarının gözenek boyutu 0,01 - 0,1 μm ve nanofiltrasyon membranlarının gözenek boyutu 0,01 - 0,001 μm arasındadır (Roy, 2019). Mikroalgal biyokütle için mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon membranları daha uygundur (Diaz-Montes ve Castro Munoz, 2019) fakat bu membranların gözenek boyutu çok küçük olduğu için yüksek basınç ve enerji gerektirir (Bilad vd. 2014). Ayrıca filtrasyon membranlarının gözenekleri zamanla tıkanđından dolayı hasat maliyetini artırır ve süresini uzatır (Udayan vd. 2022).

2.7.5 Manyetik ayırma

Bu yöntemde mikroalgal hücreler, manyetik bir alanda, manyetik parçacıklar aracılığıyla ortamdan izole edilir (Rakesh vd. 2020). Bu yöntem basittir ve enerji açısından verimlidir (Wang vd. 2014) fakat endüstride kullanılan büyük ölçekli manyetik ayırıcılar mikroalglerin yapısını olumsuz etkileyebildiğinden dolayı mikroalgal biyokütlenin hasadı için uygun değildir (Wang vd. 2015). Ayrıca bu yöntem ile büyük ölçekli mikroalgal biyokütle hasat etmek çok maliyetlidir (Udayan vd. 2022).

2.7.6 Çözünmüş hava flotasyonu

Çözünmüş hava flotasyonunda yüksek basınçta gaz kabarcıkları oluşturularak mikroalgal biyokütlenin sıvı kısımda yüzdürülmesi sağlanır (Torres vd. 2017). Bu yöntemde genellikle bir flokülant kullanılarak biyokütlenin toplanması ve hasat veriminin artırılması sağlanır (Zhang vd. 2016). Bu yöntem ile hasat kısa sürer ve büyük ölçekte mikroalgal biyokütle hasat edilebilir (Fasaei vd. 2018) fakat yüksek basınç gerektirdiğinden dolayı bu yöntemin enerji maliyeti yüksektir (Udayan vd. 2022).

2.7.7 Elektrokimyasal yöntemler

Mikroalgal biyokütlenin hasadı için elektrokoagülasyon, elektroflokülasyon ve elektroflotasyon gibi elektrokimyasal yöntemler uygulanabilmektedir (Misra vd. 2014). Elektrokoagülasyon yönteminde mikroalgal biyokütleyi bir araya toplamak için oksitleyici metal elektrotlar kullanılır (Hattab, 2015) fakat bu elektrotların periyodik

zaman aralığında değiştirilmesi gerekir bu da maliyeti artırır (Guldhe vd. 2015) ayrıca elektrotlarda metal eksilmesi nedeniyle hasat edilen mikroalgler kontamine olabilir (Udayan vd. 2022). Elektroflotasyon yönteminde süspansiyon halindeki mikroalg hücrelerini bir araya toplamak ve onları reaktörün yüzeyine çıkarmak için suyun elektrolizi ile üretilen kabarcıklar kullanılır (Geada vd. 2018).

2.8 Mikroalgal Biyokütlenin Ön İşlem Yöntemleri

Uygun koşullarda geliştirilen ve hasat edilen mikroalglerin hücre duvarını yıkmak ve yapısındaki fermente edilebilir şekerleri elde etmek için (Karpagam vd. 2021), fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik ön işlem yöntemleri kullanılır (Sankaran vd. 2020). Uygulanacak ön işlem yöntemi, mikroalgal biyokütlenin hücre duvarı bileşimine bağlıdır (Yoo vd. 2015). Yapılan çeşitli çalışmalarda ön işleme tâbi tutulmuş mikroalgal biyokütleden elde edilen fermente edilebilir şeker konsantrasyonunun, ön işleme tâbi tutulmamış mikroalgal biyokütleden daha fazla olduğu gösterilmiştir (Zhao vd. 2018; Sankaran vd. 2020; Costa vd. 2020; Nagarajan vd. 2020). Bu nedenle ön işlem, mikroalg tabanlı biyoetanol üretiminde önemli bir aşamadır (Sirohi vd. 2021).

2.8.1 Fiziksel ön işlem

Fiziksel ön işlem yöntemleri ile mikroalgal biyokütlenin boyutu, yüzey alanı, polimerizasyon derecesi ve kristallik indeksi değiştirilir (Jędrzejczyk vd. 2019). Fiziksel ön işlem yöntemleri nispeten kolaydır ve daha az çevresel soruna neden olur fakat bu yöntemler yüksek enerji gerektiren teknikler olduğu için maliyetleri yüksektir (Sankaran vd. 2020; Karpagam vd. 2021). Fiziksel ön işlem yöntemleri arasında öğütme, mikrodalga ile ön işlem, sonikasyon/ultrasonikasyon, ekstrüzyon ve Darbeli Elektrik Alanı (PEF) bulunur.

Öğütme, mikroalglerin hücre duvarını yıkmak için kullanılan fiziksel bir yöntemdir. Bu yöntemde bir kesme kuvveti oluşturmak amacıyla; kuvars, seramik, cam ve çelik gibi farklı boncuk türleri kullanılır. Mikroalgal biyokütle ve boncuklar arasındaki mekanik çarpışma ile hücre duvarının parçalanması sağlanır. Boncukların oluşturduğu kesme kuvveti ortamın ısınmasına neden olur. Bu yüzden özellikle ısıya dayanıksız bileşenlerin ön işleminde soğutma yapmak önemlidir ancak soğutma işlemi enerji tüketiminin artmasına neden olmaktadır (Nagarajan vd. 2020).

Mikrodalga ile ön işlem yönteminde yüksek sıcaklık ve basınç altında elektromanyetik dalgalar ve yük parçacıkları etkileşerek mikroalgal hücrenin parçalanmasına yol açar (Sirohi vd. 2021). Bunun için mikroalgal biyokütle 0.3 - 300 GHz frekans aralığında elektromanyetik dalgalar uygulanır. Mikrodalgalar mikroalgal hücrenin polar ve dielektrik molekülleri ile etkileşime girer. Bu durum mikroalg hücre duvarını parçalamak için basınç ile ısıyı artırır ve mikroalg hücre duvarının parçalanması sağlanır (D'Hondt vd. 2017).

Sonikasyon/ultrasonikasyon yönteminde; 10 KHz'den 20 MHz'e kadar ultrasonik dalgalarla mikroalg hücre duvarının parçalanması sağlanır. Bu yöntemde elektrik enerjisi fiziksel enerjiye dönüştürülür ve belirli bir basınç ve yüksek sıcaklık sonucunda şok dalgası olarak kavitasyon (kabarcık) yayılır (Naveena vd. 2015).

Ekstrüzyon, termal ve mekanik tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir. Ekstrüder makinesinde vidaların döndürüldüğü bu yöntemde döndürme işlemi ile vida ve kovan arasında sıcaklık ve basıncın artmasıyla büyük bir kesme kuvveti meydana gelerek mikroalgal biyokütlenin parçalanması sağlanır (Sankaran vd. 2020).

Darbeli Elektrik Alanı (PEF) yönteminde mikroalg hücrelerine yüksek voltajda elektrik uygulanarak önce gözenek oluşumu (elektroporasyon) ardından hücrelerin parçalanması sağlanır. Bu yöntem uygulanmadan önce mikroalgal hücrenin deiyonize olması önemlidir çünkü herhangi bir yüklü iyonun varlığı ön işlem verimini düşürür (Günerken vd. 2015).

2.8.2 Fizikokimyasal ön işlem

Fizikokimyasal ön işlem yönteminde mikroalgal hücrelerin parçalanması için fiziksel ve kimyasal işlemler birlikte kullanılır. Örneğin mikroalgal biyokütlenin parçalanmasında sıcaklık, basınç ve ultrason gibi fiziksel parametreler ile asitler ve çözücü maddeler gibi kimyasal parametreler beraber uygulanır (Sun vd. 2018). Bu ön işlem yönteminin verimliliği, mikroalglerin hücre duvarı bileşimine bağlıdır (Costa vd. 2020). Fizikokimyasal ön işlem yöntemleri arasında; Hidrotermal, Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu

(PLE), Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu (SFE) ve Hidrotermal Karbonizasyon (HTC) bulunur.

Hidrotermal ön işlem yönteminde hücre duvarını parçalamak için mikroalgal biyokütleyle belirli bir sıcaklık aralığında yüksek basınçlı su uygulanır (D'Hondt vd. 2017). Uygulanan sıcaklık derecesi ve ön işlem süresi mikroalg türüne göre farklılık gösterir (Nagarajan vd. 2020).

Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE) yönteminde mikroalgal biyokütleyle 35 – 200 bar basınç ve 50 – 200 °C sıcaklık parametreleri uygulanır (Grosso vd. 2015). Çözünürlüğü artırmak için su, dimetil eter ve propan gibi çözücüler kullanılabilir (Costa vd. 2020).

Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu (SFE) ön işleminde, kullanılan çözücü maddeye belirli bir basınç ve sıcaklık uygulanarak çözücü madde gaza benzer bir süper kritik sıvı haline getirilir (Aliev ve Abdulagatov, 2017; Gallego vd. 2018). Bu yöntemde yaygın olarak kullanılan çözücü maddeler; süper kritik metanol, CO₂ ve etanoldür (Halim vd. 2011; Deshmukh vd. 2019). Mikroalglerden çeşitli bileşenler elde etmek için süper kritik bir sıvı olarak genellikle 31.2 °C sıcaklıkta ve 73.8 bar basınçta CO₂ uygulanır (Gallego vd. 2018; Figueiredo vd. 2019). Süperkritik - CO₂ yöntemi ile mikroalgal biyokütleden lipidler ya da trigliseritler (TGA'lar) ekstrakte edilir (Soh vd. 2018).

Hidrotermal Karbonizasyon (HTC) yönteminde mikroalgal biyokütlenin hücre duvarını yıkmak için 374 °C'den düşük olan su buharı kullanılır (Zhang vd. 2012a, 2012b).

Yüksek sıcaklık uygulanması farklı asit ve inhibitörlerin salınmasına neden olur (Sankaran vd. 2020). Bu inhibitörleri ortadan kaldırmak için buhar arıtma, sıcak su ve buhar patlaması (160 – 240 °C) gibi çeşitli hidrotermal fazlar uygulanır (Ruiz vd. 2008). Bu yöntem ile mikroalgal biyokütleden organik kimyasallar, şekerler, uçucu bileşikler, hidrokömür ve alkoller elde edilir (Marin-Bautista vd. 2019).

2.8.3 Kimyasal ön işlem

Kimyasal ön işlem; nispeten kolay, uygun maliyetli ve kısa süreli olan yöntemlerden biridir. Bu ön işlemde, mikroalgal hücreyi parçalamak ve içeriğindeki polimerleri çözündürmek amacıyla asit, alkali ve organik çözücüler gibi kimyasal maddeler kullanılır. Kimyasal ön işlemin mikroalgal biyokütleye uygulanması nispeten kolaydır (Chen vd. 2013a, 2013b).

Asit ön işlemi ile mikroalgal biyokütleden elde edilen fermente edilebilir şeker verimi, alkali ön işlem ve bazı fiziksel ön işlemler (sonikasyon, homojenizasyon, çırpma) ile elde edilen fermente edilebilir şeker veriminden daha yüksektir (Miranda vd. 2012; Sivaramakrishnan ve Incharoensakdi, 2018). Ayrıca asit ön işlemi enzimatik ön işleminden daha kısa sürede gerçekleşir ve asit ön işleminde kullanılan kimyasal maddeler enzimatik ön işleminde kullanılan enzimlerden daha ucuzdur (Velazquez vd. 2018).

Asit ön işleminde konsantre ve seyreltik asitler kullanılabilir. Konsantre asit ön işlemi, konsantre asitler (%30 - 72) kullanılarak daha düşük sıcaklıklarda (yaklaşık 40 °C) gerçekleştirilir. Bu yöntem yüksek verimde şeker sağlama ve daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirilme avantajına sahiptir (Taherzadeh ve Karimi, 2007) fakat konsantre asitler toksik etkilere sahiptir ve bu asitlerin aşındırma etkisi yüksektir. Bu yüzden konsantre asit ile ön işlem hakkında yapılan çalışmalar çok azdır. Diğer yandan mikroalgal biyokütlenin ön işleminde seyreltik asit uygulanması başarılı sonuçlar verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılanı ise seyreltik sülfürik asittir (H_2SO_4) (Li vd. 2014).

Alkali ön işlemde; sodyum, potasyum, kalsiyum ve amonyum hidroksit gibi kimyasallar kullanılır. Bu yöntem lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde yaygın olarak uygulanmaktadır (Brodeur vd. 2011). Alkali ön işlem esas olarak lignoselülozik biyokütlenin yapısındaki ligninin uzaklaştırılmasında ve içerdiği polisakkaritlerin hidrolizinde kullanılır (Chang ve Holtzapple, 2000). Mikroalgal biyokütle yapısında lignin bulunmadığından dolayı alkali ön işlem mikroalgler için nadiren kullanılır (Li vd. 2014).

İyonik sıvılar (IL) düşük erime noktalarına sahip ve karbonhidrat, pigment, lipid ve protein gibi moleküllerin parçalanmasında çözücü olarak kullanılabilen tuzlardır. Ön işlem için iyonik sıvıların kullanılması yüksek maliyetli olmaları ve biyolojik olarak parçalanamamaları açısından dezavantajlıdır (Sirohi vd. 2021).

Derin ötektik çözücüler (DES), iyonik sıvılara alternatif olarak geliştirilen çözücülerdir. Organik tuzlar (kolin klorür, kolin asetat), amid, aminler, alkol ve karboksilik asitler gibi hidrojen bağı donörleri derin ötektik çözücüler olarak kullanılabilir. Bu çözücüler doğada biyolojik olarak parçalanabildiğinden dolayı çevre dostudur (Zhang vd. 2012a, 2012b).

2.8.4 Biyolojik ön işlem

Biyolojik ön işlem yönteminde mikroalgal hücre duvarını parçalamak ve çeşitli biyomolekülleri serbest bırakmak için belirli hidrolitik mikroorganizmalar ya da bu mikroorganizmaların enzimleri kullanılır (Sirohi vd. 2020; Madhavan vd. 2021). Biyolojik ön işlemler kimyasal ön işlemlere kıyasla düşük enerji gerektirir, daha etkilidir ve çevre dostudur (Ummalyma vd. 2019) fakat biyolojik ön işlem yöntemlerini kullanmak yüksek maliyet gerektirir (Sirohi vd. 2021).

2.9 Fermantasyon

Ön işlem basamağında açığa çıkan fermente edilebilir şekerlerden biyoetanol elde edebilmek için fermantasyon aşamasına geçilir. Etanol fermantasyonu; belirli sıcaklık ve pH koşullarında, fermentatif mikroorganizma varlığında fermente edilebilir şekerlerin biyoetanole ve diğer yan ürünlere metabolik olarak dönüşümüdür (Dalatony vd. 2016).

2.9.1 Mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanılan etanolojenik mikroorganizmalar

Fermantasyonda *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces fragilis* ve *K. marxianus* gibi mayalar ya da *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* gibi bakteriler yaygın olarak kullanılır (Phwan vd. 2018).

Saccharomyces cerevisiae, altı karbonlu şekerleri (heksoz) biyoetanole dönüştürebilir, yüksek orandaki biyoetanole ve inhibitörlere karşı toleransı yüksektir. Bu özellikleri sayesinde endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Phwan vd. 2018). Bu maya pek çok fermente edilebilir şekeri verimli bir şekilde biyoetanole dönüştürebilmesine rağmen beş karbonlu şekerleri (pentoz) fermente edemez (Khan vd. 2017).

Pichia stipitis ortamda oksijen bolsa biyokütlesini artırır, oksijen az ise biyoetanol üretir. (Agbogbo vd. 2008). Fermantasyonda beş karbonlu şekerleri kullanarak biyoetanol üretir fakat bu mayanın yüksek osmotik basınca karşı direnci düşük olduğu için yüksek orandaki şeker varlığında biyoetanol üretemez (Girio vd. 2010).

Kluyveromyces marxianus çok çeşitli şeker substratlarından (laktoz, glukoz, ksiloz, inülin, arabinoz, galaktoz) biyoetanol üretebilir ve düşük pH'a toleranslıdır (Madeira-Jr ve Gombert, 2018). Bu maya yüksek sıcaklıklarda gelişebildiğinden dolayı eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) ve sakkarifikasyon öncesi ve eş zamanlı fermantasyonda (PSSF) yaygın olarak kullanılır (Baptista ve Domingues, 2022) fakat bu mayanın biyoetanol direnci *S. cerevisiae*'ye kıyasla düşüktür ve genellikle 50 g/L ve üzeri biyoetanol konsantrasyonlarında gelişmemektedir (Fonseca, 2008).

Candida boidinii, Ascomycota filumuna ait bir mayadır (Ramirez, 1953). Hücreleri uzun oval ya da silindirik şeklinde olup tek, çift ya da zincir halinde bulunabilir. Toprak, deniz, ve şeker bakımından zengin birçok ağaç türünün özsuğu gibi doğal ortamlarda yaygın olarak bulunur (Kurtzman vd. 2011). *C. boidinii* çoğunlukla ksilitol (Bedö vd. 2021) ve format dehidrojenaz enzimi (Schirwitz vd. 2007) üretiminde kullanılan, ksiloz tüketen bir mayadır. Ancak yeni izole edilmiş *C. boidinii*, hem pentoz (ksiloz) hem de heksoz (glukoz) kullanarak biyoetanol üretebilir (Feher vd. 2021).

Escherichia coli Gram (-) bir bakteridir ve genetik modifikasyonlara yatkın olması sayesinde biyoetanol üretiminin artırılması için yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Zabed vd. 2017). Bu bakteri arabinoz dahil olmak üzere pek çok farklı substrattan biyoetanol üretebilir (Xiros vd. 2016) fakat bu bakteri biyoetanol üretiminde biyoetanolin yanı sıra organik asitler de üretir ve biyoetanole karşı toleransı düşüktür

(Van vd. 2011). Ayrıca bu bakterinin gelişebildiği pH ve sıcaklık aralığı dardır (Achinas ve Euverink, 2016).

Klebsiella oxytoca, pH 5.0'a kadar hayatta kalabilen Gram negatif bir bakteridir (Phwan vd. 2018). Genetik modifikasyonlara yatkın olması sayesinde biyoetanol üretiminin artırılması için yapılan araştırmalarda kullanılabilir (Zabed vd. 2017) fakat bu bakteriden elde edilen biyoetanol verimi *E. coli*'den daha düşüktür (Dien vd. 2003).

Zymomonas mobilis Gram negatif ve fakültatif anaerob bir bakteridir. Yüksek verimde biyoetanol üretir, yüksek orandaki biyoetanolle dirençlidir ve geniş pH aralığına toleranslıdır (Karsch vd. 1983; Rogers vd. 2007) fakat bu bakteri ksilozu fermente edemez ve inhibitörlere karşı toleransı düşüktür (Garver ve Liu, 2014).

2.9.2 Fermantasyon yaklaşımları

Fermantasyonun gerçekleştirilmesi için Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon (SHF), Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon (SSF), Ayrı Hidroliz ve Birlikte Fermantasyon (SHCF), Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Birlikte Fermantasyon (SSCF), ve Konsolide Biyoproses (CBP) gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır (Phwan vd. 2018). SHF yönteminde enzimatik hidroliz ve fermantasyon işlemi ayrı ortamlarda gerçekleştirilir. Bu yöntemde enzimatik hidroliz ve fermantasyon işleminin kendi optimal koşullarında

gerçekleştirilmesi avantajlıdır (Tomas-Pejo vd. 2008) fakat enzimatik hidroliz gerçekleşirken ortamın kontaminasyona açık hale gelmesi dezavantajlıdır (Mohapatra vd. 2017).

SSF yönteminde enzimatik hidroliz ve fermantasyon eş zamanlı olarak gerçekleştirilir. Bu sayede ortamda oluşan şekerler eş zamanlı olarak mikroorganizmalar tarafından biyoetanolle dönüştürülür (Lin ve Tanaka, 2006) fakat enzimatik hidroliz sıcaklığı ile mikroorganizmalar için gerekli sıcaklığın birbirine optimize edilme gereksiniminin olması dezavantajlıdır (Harun vd. 2011).

SHCF yönteminde hidroliz ve fermantasyon işlemleri kendi optimal koşullarında ayrı ortamlarda gerçekleşir. Aynı ortamda pentoz ve heksozları fermente edebilen mikroorganizmalar kullanılır. Böylece pentoz ve heksozlar birlikte fermente edilir bu da kontaminasyon riskini azaltır (Harun vd. 2011).

SSCF yönteminde hem pentoz hem de heksoz şekerlerinden faydalanmak amaçlanır (Wyman, 1996). Bunun için genellikle termotolerant mayalar aynı ortamda kullanılır ya da genetiği değiştirilmiş yüksek sıcaklığa dayanıklı mikroorganizmalar kullanılır (Buruiana vd. 2013).

CBP yönteminde selülozu direkt biyoetanole dönüştürecek mikroorganizmalar kullanılır (Sarkar vd. 2012). Selülaz ve biyoetanol aynı reaktörde üretilir (Hamelinck vd. 2005). Böylece fermantasyonda kullanılacak selülaz enzimi ortamdaki mikroorganizmalar tarafından üretildiği için selülaz maliyeti olmaz fakat bu yöntemde fermantasyon süresi uzundur ve biyoetanol verimi düşüktür (Sarkar vd. 2012).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroalg ve kültürasyon koşulları

Tez çalışmasında *C. vulgaris* mikroalginin yaş biyokütlesi kullanılmıştır. Bu mikroalg Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kültürasyonu gerçekleştirmek için içerisinde 90 mL azotlu BG-11 (Rippka 1988; Park vd. 2014), BG-11 + 0.5 g/L glukoz ve BG-11 + 0.5 g/L havuç posası şekeri bulunan 250 mL'lik erlenlerin her birine 10 ml *C. vulgaris* ekilmiştir. Daha sonra bu erlenler 30 °C ve 2400 lux soğuk beyaz flüoresan lamba altında 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra mikroalgal biyokütle 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj kullanılarak hasat edilmiştir.

BG-11 Besiyeri Bileşenleri: 1.5 g/L NaNO₃, 36 mg/L CaCl₂.2H₂O, 40 mg/L K₂HPO₄, 75 mg/L MgSO₄.7H₂O, 6 mg/L sitrik asit H₂O, 6 mg/L ferrik amonyum sitrat, 2.86 mg/L H₃BO₃, 1 mg/L Na₂EDTA.2H₂O, 1.81 mg/L MnCl₂.4H₂O, 20 mg/L Na₂CO₃, 0.39 mg/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0.22 mg/L ZnSO₄.7H₂O, 0.0494 mg/L Co(NO₃)₂.6H₂O ve 0.079 mg/L CuSO₄.5H₂O.

3.1.2 Tez çalışmasında karbon kaynağı olarak kullanılan zirai atık

Tez çalışmasında kullanılan havuç posası BELSO A.Ş.'den temin edilmiştir. Bu zirai atık etüvde bir gece 80 °C sıcaklıkta (Nüve FN400, Turkey) kurutulup laboratuvar tipi değirmende (Miprolab) por çapı 0.20 mm olacak şekilde öğütüldükten sonra planlanan deneylerde kullanılabilecek kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.3 Havuç posası şekeri ilavesi

Tez çalışmasında fotoheterotrofik kültürasyon için ayrı ortamlara 0.5 g/L glukoz ve 0.5 g/L havuç posası şekeri kullanılarak *C. vulgaris* mikroalginin gelişimi incelenmiştir.

3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan etanolojenik mikroorganizma

Tez çalışmasında etanolojenik mikroorganizma olarak *C. boidinii* mayası kullanılmıştır. Bu maya Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Zirai atığa uygulanan ön işlem yöntemi

Öğütülmüş havuç posası içeriğindeki şekerlerin mikroalgin kullanabileceği şekilde olması amacıyla ön işlem uygulanmıştır (Sharma vd. 2009). Bunun için 100 g/L kurutulmuş havuç posasına %1 H₂SO₄ (v/v) ilave edilerek 121 °C’de 15 dk. otoklavlanmıştır (ALP, Germany). Otoklavdan sonra Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzme işlemi yapılarak süpernatant kısmı stok halinde 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları

C. boidinii mayasının stok kültüre alınmasında patates dekstroz agar (PDA/Merck) yatık besiyeri kullanılmıştır ve 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır. Her fermantasyon deneyinden önce maya özütü (3 g/L/Scharlau), pepton (10 g/L/Merck) ve glukoz (20 g/L/Merck) içeren 100 mL YPG besiyeri hazırlanmıştır. Daha sonra aseptik koşullar altında bu mayadan bir öze dolusu kadar alınıp 100 mL YPG besiyeri içeren 250 mL’lik Erlenmeyerlere inoküle edilerek 30 °C’de 100 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca çalkalamalı etüvde (Gerhardt Thermoshaker) inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3 Farklı ön işlem yöntemlerinin biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesi

Optimum ön işlemi belirlemek amacıyla 50 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi %1 H₂SO₄ (v/v) ve %1 NaOH (v/v) ile 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavda (ALP) ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlemden sonra numuneler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir daha sonra pellet kısmı uzaklaştırılmıştır. Böylece yaş biyokütle fermantasyon deneyleri için hazır hale getirilmiştir.

3.2.4 Başlangıç *Chlorella vulgaris* biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi

C. vulgaris biyokütlesinin optimum başlangıç konsantrasyonunun belirlenmesi için üç farklı *C. vulgaris* konsantrasyonu (50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L), %1 H₂SO₄ (v/v) ile otoklavda (ALP) 121 °C'de 15 dakika boyunca ön işleme tâbi tutulmuştur. Ön işlem sonrası hidrolizatların pelet ve süpernatant kısımları soğutmalı santrifüj (Rotina 35 R) aracılığıyla ayrılarak süpernatant kısımlarının pH değeri sodyum hidroksit (NaOH/Merck) ile 5.0'a ayarlanmıştır. Daha sonra tekrar 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak fermantasyon deneyleri için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5 Farklı azot ve mineral tuzlarının fermente edilmiş *Chlorella vulgaris* besiyerlerine eklenmesi

Biyoetanol üretimine organik ve inorganik azot kaynakları ile bazı mineral tuzlarının etkisini belirlemek amacıyla *C. vulgaris* içeren besiyerine ek olarak iki farklı besiyeri daha hazırlanmış ve 200 g/L *C. vulgaris* biyokütlesinden hazırlanan her iki besiyerinin de pH değeri 5.0'a ayarlanmıştır. Bunlardan ilki Besiyeri-1 olarak isimlendirilmiştir. Besiyeri-1 ortamına; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O ve 0.05 g/L ZnSO₄.7H₂O eklenmiştir. Hazırlanan diğer besiyeri Besiyeri-2 olarak isimlendirilmiştir ve bu besiyeri ortamına ise 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH₂PO₄ ve 0.2 g/L NH₄Cl eklenmiştir. Bu besiyerleri daha sonra fermantasyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.6 Fermantasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi

Fermantasyon deneyleri 15 mL çalışma hacminde, 30 mL'lik bölmeli şişelerde 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon deneyleri için kullanılan tüm besiyerlerinin pH'ı 5.0'a ayarlanmıştır. YPG besiyerinde 24 saat inkübe edilen *C. boidinii* mayası fermantasyon için kullanılan besiyerlerine %10 (v/v) oranında inoküle edilmiştir. Fermantasyon ortamlarından belirli aralıklarla (6, 12 ve 24 saat) 2 ml'lik Ependorf tüplerine 1.5 ml örnek alındıktan sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Rotina 35 R) edilerek pellet kısımları mikrobiyal gelişim ölçümlerinde, süpernatant kısımları ise biyoetanol ve indirgen şeker konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3 Analitik Yöntemler

3.3.1 Mikroalgal gelişimin ölçülmesi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında 12 günlük kültivasyon boyunca üç farklı ortamda yetiştirilen *C. vulgaris* kültürlerinden 24 saatte bir örnekler alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV 2001, Japan) gelişimleri ölçülmüştür (Church vd. 2017). Daha sonra bu gelişimleri yaş biyokütle standartına göre hesaplanarak g/L cinsinden belirlenmiştir.

3.3.2 İndirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesi

Toplam indirgen şeker konsantrasyonu, dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi ile spektrofotometrede (Shimadzu) 540 nm dalga boyunda belirlenmiştir. DNS yönteminde 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS), indirgen şeker ile reaksiyona girmesi sonucu turuncu rengindeki 3-amino, 5-nitrosalisilik aside dönüşür. Sıcaklık ve incelenen örneğin yoğunluğuna bağlı olarak bu renk, tonlarına göre çeşitlilik gösterir. Meydana gelen bu rengin farklı tonları sayesinde spektrofotometrik ölçümler yapılarak incelenen örnekteki indirgen şeker miktarı belirlenir (Miller 1959).

3.3.3 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi

Fermantasyonda kullanılan besiyerlerinden farklı zamanlarda (6, 12, ve 24. saat) alınan 1.5 mL örnekler 4 °C ve 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımlarının içerdiği biyoetanol konsantrasyonları, Gaz Kromatografisi (Shimadzu GC-2010) cihazında belirlenmiştir. GC analizinden önce süpernatant yeni tüplere aktarılıp gaz kromatografisi için hesaplanmıştır. Bunun için GC cihazında bulunan alev iyonizasyon dedektörü (FID), 0.25 mm çap ve 60 metre uzunluğundaki RTX-Wax (RESTEK) kolonu, taşıyıcı gaz olarak azot (N) ve FID dedektöründe yer alan kuru hava ile hidrojen (H) kullanılmıştır. Her biyoetanol konsantrasyonu ölçümünde, 1 µL örnek 140 °C sıcaklıktaki enjeksiyon portuna enjekte edilmiştir. Alev iyonlaşma dedektörünün sıcaklığı 160 °C’ ye getirilmiş, kolonun başlangıç sıcaklığı ise 50 °C’ye getirilerek 19 dakika içerisinde 150 °C’ye çıkacak şekilde ayarlanmıştır. Kolon basıncı 200 kPa, kolon akışı 1.86 mL/dakika, toplam akış ise 190.4 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Wistara vd. 2016). Cihazda gözlemlenen pikler, daha önce yapılan biyoetanol standartına göre GC cihazında bulunan yazılım aracılığıyla hesaplanarak biyoetanol konsantrasyonları g/L cinsinden belirlenmiştir.

3.3.4 Maya gelişiminin ölçülmesi

Maya gelişimini ölçmek için besiyerlerinden 1.5 ml örnek alınıp 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra belirli saatlerdeki (6, 12 ve 24 saat) örnekte bulunan mikrobiyal gelişim 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra bu örneklerin yaş ağırlıkları saptanmış ve standart eğri oluşturulmuştur. Oluşturulan standart eğriye göre mikrobiyal gelişim g/L cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.5 Kinetik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler

Teorik biyoetanol verimi hesaplanırken aşağıdaki denklemden yararlanılmıştır (Kim vd. 2008).

$$\text{Teorik Etanol Verimi (\%)} = \frac{\text{Etanol (g/L)}}{\text{Başlangıç İndirgen Şeker (g/L)} \times 0.511} \times 100$$

Etanol (g/L): Maksimum etanol üretim zamanının gözlendiği süredeki etanol konsantrasyonu
Başlangıç İndirgen Şeker (g/L): Fermantasyon öncesi ortamda bulunan indirgen şeker konsantrasyonu
0.511: Sabit değer

Etanol üretkenliği (Q_p) hesaplanırken aşağıdaki denklem kullanılmıştır (Roca ve Olsson 2013).

$$\text{Etanol Üretkenliği } Q_p \text{ (g/Lh)} = \frac{\text{Maksimum Etanol (g/L)}}{h}$$

Maksimum Etanol (g/L): Belirli bir saatte elde edilen maksimum etanol konsantrasyonu
h: saat

Etanol verimi ($Y_{P/S}$) ise aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Chiranjeevi vd. 2014).

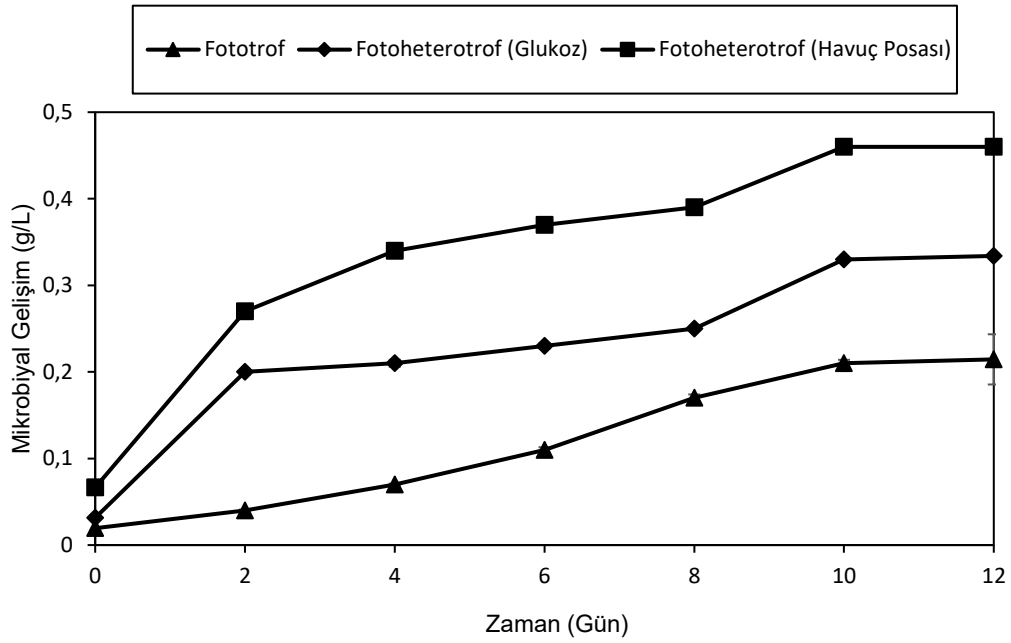
$$\text{Etanol Verimi } Y_{P/S} \text{ (g/g)} = \frac{\text{Maksimum Etanol (g/L)}}{\text{Sarf Edilen İndirgen Şeker (g/L)}}$$

Maksimum Etanol (g/L): Belirli bir saatte elde edilen maksimum etanol konsantrasyonu
Sarf Edilen İndirgen Şeker (g/L): En yüksek etanol konsantrasyonunun belirlendiği zaman dilimindeki kullanılan şeker konsantrasyonu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Farklı Kùltivasyon Koşullarının Mikroalgal Gelişime Etkilerinin Belirlenmesi

C. vulgaris'in farklı kùltivasyon koşullarındaki mikrobiyal gelişim sonuçlarına göre besiyeri ortamlarının tümünde mikrobiyal gelişimin arttığı gözlenmiştir. Bu mikroalgin ilk mikrobiyal gelişim değeri fototrofik kùltürde 0.02 g/L, glukoz içeren fotoheterotrofik kùltürde 0.03 g/L ve havuç posası içeren fotoheterotrofik kùltürde 0.07 g/L olarak belirlenmiştir. İlk mikrobiyal gelişim değeri fototrofik kùltüre ait olmasına rağmen en yüksek mikrobiyal gelişim değeri havuç posası içeren fotoheterotrofik kùltürden elde edilmiştir. Bu durumun nedeni fototrofik kùltürde *C. vulgaris*'in gelişimini destekleyen organik karbon kaynağı bulunmazken fotoheterotrofik kùltürde bulunması şeklinde açıklanabilir. 8. günden sonra mikrobiyal gelişim hızlanmış, 10. gün sonunda tüm gruplarda neredeyse maksimum noktasına ulaşmış ve 10 gün sonra büyümede anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Böylece *C. vulgaris* gelişimi ile ilgili yapılan deneyler 12. günde sonlandırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen mikrobiyal gelişim değerleri fototrofik koşulda 0.21 g/L, 0.5 g/L glukoz içeren fotoheterotrofik koşulda 0.33 g/L, 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik koşulda ise 0.46 g/L olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

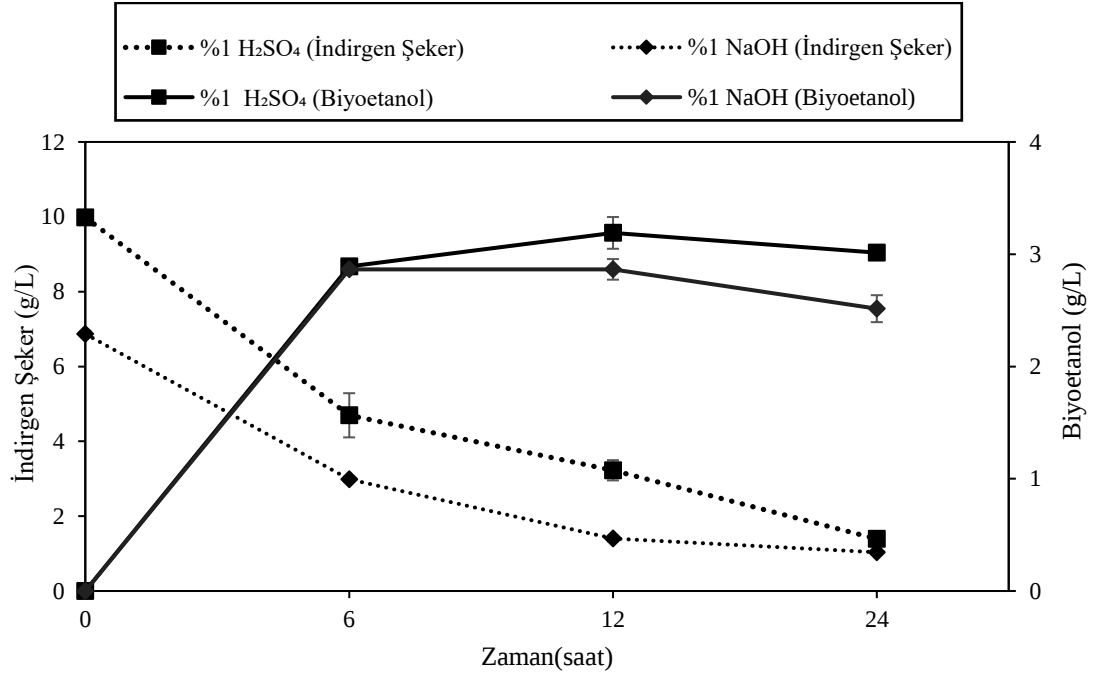


Şekil 4.1 Farklı karbon kaynaklarının *C. vulgaris* mikroalginde mikrobiyal gelişime etkisi (BG-11 besiyeri; 0.5 g/L glukoz; 0.5 g/L havuç posası şekeri; 2400 lüx; 30 °C; pH:7; inkübasyon süresi, 12 gün)

Elde edilen sonuçlara göre maksimum mikrobiyal gelişim 0.5 g/L havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik kültürasyon koşulunda saptandığından dolayı sonraki deneyler bu kültürasyon koşuluna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2 Farklı Ön İşlem Yöntemlerinin Biyoetanol Üretimine Etkilerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında optimum ön işlem belirlenmiştir. Bunun için 50 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi, %1 H₂SO₄ (v/v), %1 NaOH (v/v) ve *C. boidinii* kullanılarak harcanan indirgen şeker ve elde edilen biyoetanol konsantrasyonları ile mikrobiyal gelişim değerleri incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.

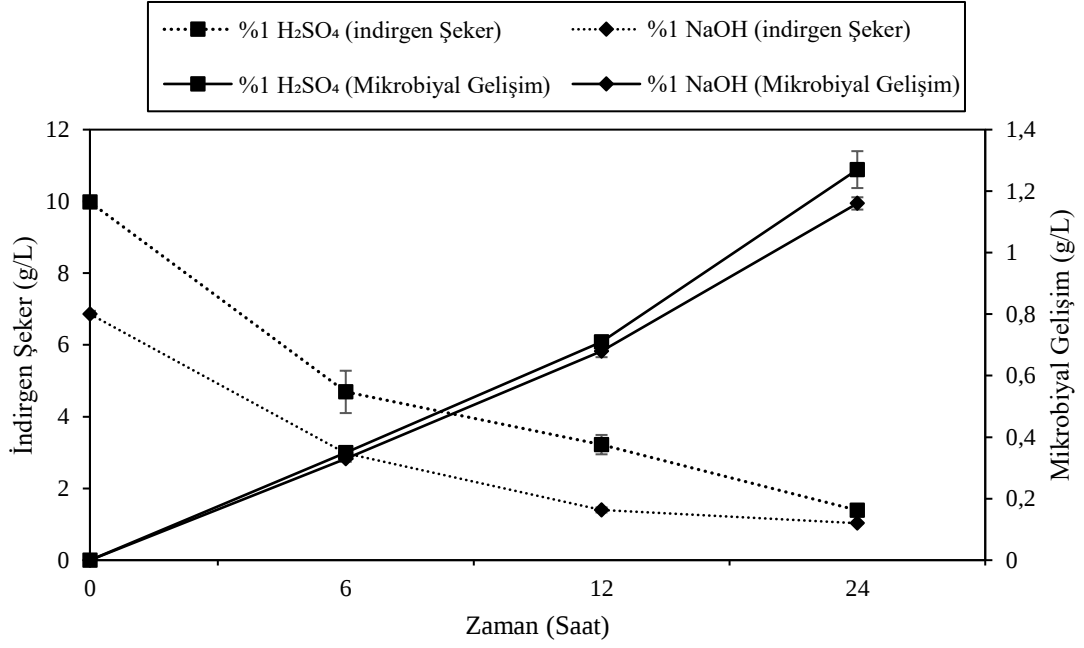


Şekil 4.2 50 g/L başlangıç yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonuna etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄ ve %1 NaOH, 121 °C, 15 dk pH:5, T: 30 °C)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi 50 g/L başlangıç *C. vulgaris* biyokütlesinin %1 H₂SO₄ ile ön işlemleri sonunda 9.98 g/L, %1 NaOH ile ön işlemleri sonunda ise 6.86 g/L indirgen şeker içerdiği belirlenmiştir. Hem %1 H₂SO₄ hem de %1 NaOH varlığında maksimum biyoetanol konsantrasyonu 12. saatte sırasıyla 3.29 g/L ve 2.93 g/L olarak elde edilmiş ve bu fermantasyon süresinden sonra biyoetanol konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır.

Maksimum indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonu %1 H₂SO₄ varlığında elde edildiğinden dolayı ileri çalışmalarda *C. vulgaris* biyokütlesinin ön işleminde %1 H₂SO₄ (v/v) ile 121 °C ve 15 dakika otoklavlama ön işlemleri kullanılmıştır.

İki farklı ön işlemler yönteminin mikrobiyal gelişime etkisi incelendiğinde %1 H₂SO₄ ön işlemlerinden elde edilen mikrobiyal gelişim değerinin %1 NaOH ön işlemlerinden elde edilen mikrobiyal gelişim değerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *C. boidinii* 24 saatlik fermantasyon süresi sonunda %1 H₂SO₄ varlığında 1.27 g/L, %1 NaOH varlığında ise 1.16 g/L yaş ağırlığa ulaşmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 50 g/L başlangıç yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin indirgen şeker konsantrasyonu ve mikrobiyal gelişime etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄ ve %1 NaOH, 121 °C, 15 dakika pH:5, T: 30 °C)

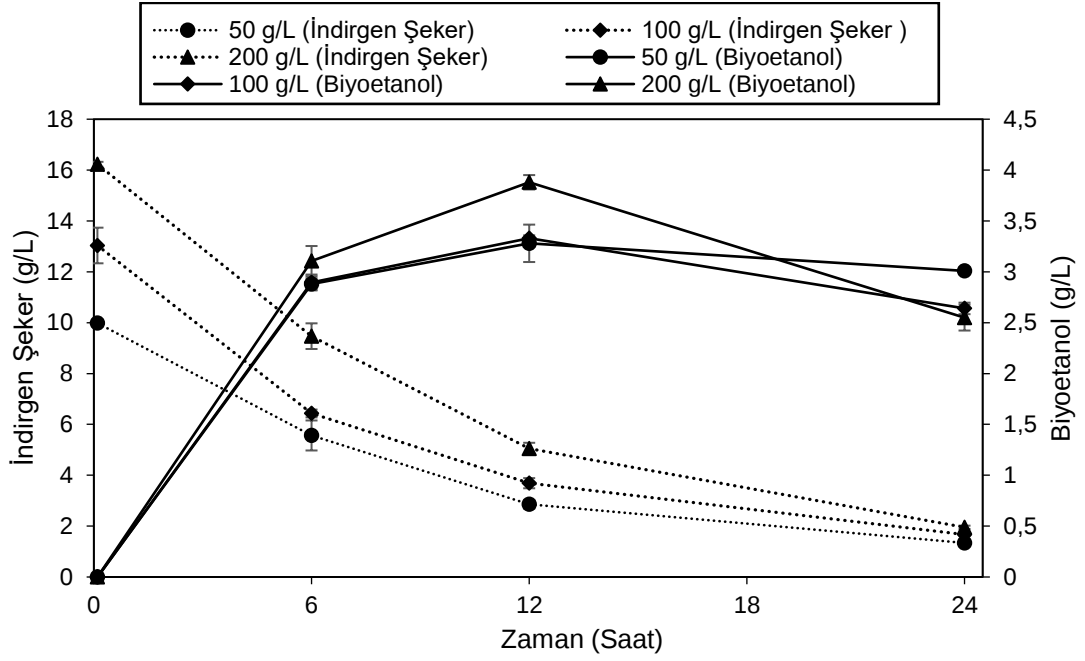
Farklı ön işlem yöntemlerinin biyoetanol üretimine etkisi belirlenirken bazı kinetik parametreler de [teorik etanol verimi (%), etanol üretkenliği (Q_P) ve fermantasyon verimi ($Y_{P/S}$)] hesaplanmıştır. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde 12 saatlik fermantasyon süresinin sonu baz alınmıştır. 50 g/L *C. vulgaris* konsantrasyonunda, teorik etanol verimi, Q_P ve $Y_{P/S}$ değerleri %1 H₂SO₄ varlığında sırasıyla %65.10, 0.26 g/L.h ve 0.49 g/g olarak hesaplanırken aynı değerler %1 NaOH varlığında sırasıyla %72.95, 0.24 g/L.h ve 0.45 g/g olarak bulunmuştur. En yüksek teorik etanol veriminin %1 NaOH ön işlemi ile elde edilmesinin nedeni NaOH ön işlemi ile elde edilen indirgen şeker konsantrasyonunun H₂SO₄ ön işlemi ile elde edilenden daha düşük olmasıdır. Kinetik parametreler ile belirlenen sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 50 g/L başlangıç yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde iki farklı ön-işlem yönteminin biyoetanol üretimine etkisi (Ön işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, T: 30°C)

Ön-işlem	Maksimum Biyoetanol (g/L) _{12s}	Teorik Verim (%) _{12s}	Q _P (g/L.h) _{12s}	Y _{P/S} (g/g) _{12s}
1% H ₂ SO ₄	3.29 ±0.14	65.10 ± 2.80	0.26 ± 0.01	0.49 ± 0.01
1% NaOH	2.93 ±0.09	72.95 ± 2.29	0.24 ± 0.01	0.45 ± 0.02

4.3 Başlangıç *Chlorella vulgaris* Biyokütle Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında başlangıç *C. vulgaris* biyokütle konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkisi incelenmiştir. Bunun için üç farklı konsantrasyondaki (50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L) *C. vulgaris* biyokütlesi, %1 H₂SO₄ (v/v) ile ön işleme tâbi tutulmuştur. Ön işlem sonunda artan başlangıç biyokütle konsantrasyonlarına paralel olarak indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonları da artmıştır. Elde edilen indirgen şeker konsantrasyonları *C. boidinii*'nin tolerans sınırının altında olduğundan dolayı 200 g/L gibi bir yüksek biyokütle konsantrasyonu bu mayanın büyümesinin ve biyoetanol üretiminin inhibe olmasına neden olmamıştır (Osawa vd. 2009). 50 g/L biyokütle konsantrasyonundan 9.98 g/L, 100 g/L biyokütle konsantrasyonundan 13.03 g/L ve 200 g/L biyokütle konsantrasyonundan 16.23 g/L indirgen şeker elde edilmiştir. Başlangıç indirgen şeker konsantrasyonları ile *C. boidinii*'de biyoetanol üretimleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



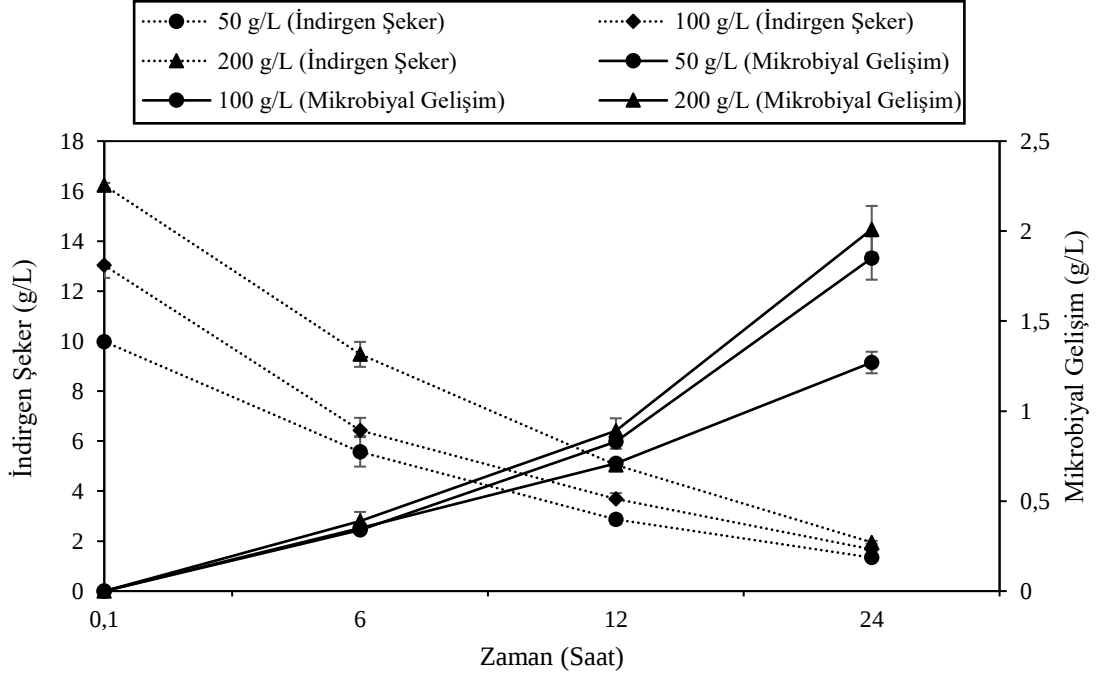
Şekil 4.4 *C. boidinii*'de farklı konsantrasyonlardaki yaş *C. vulgaris* biyokütlesinin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonlarına etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH: 5, T: 30 °C)

Farklı *C. vulgaris* biyokütle konsantrasyonlarının biyoetanol üretimine etkisinin incelendiği deneylerde, en yüksek biyoetanol konsantrasyonu 200 g/L *C. vulgaris* varlığında 3.89 g/L, en düşük biyoetanol konsantrasyonu 50 g/L *C. vulgaris* varlığında 3.29 g/L olarak belirlenmiş ve 100 g/L *C. vulgaris* varlığında ise 3.32 g/L olarak bulunmuştur. Kullanılan farklı *C. vulgaris* biyokütle konsantrasyonlarının hepsinde *C. boidinii* için en yüksek biyoetanol miktarı 12. saat sonunda saptanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda en yüksek biyoetanol konsantrasyonu 200 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi varlığında saptandığından dolayı sonraki deneylerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlardaki *C. vulgaris* biyokütlesinin mikrobiyal gelişime etkisi incelendiğinde 200 g/L *C. vulgaris* varlığındaki mikrobiyal gelişim değerinin 50 g/L ve 100 g/L *C. vulgaris* biyokütlesine kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. *C. boidinii* 24 saatlik fermentasyon süresi sonunda 200 g/L *C. vulgaris* varlığında 2.01 g/L yaş ağırlığa

ulaşırken 100 g/L *C. vulgaris* varlığında 1.85 g/L, 50 g/L *C. vulgaris* varlığında ise 1.27 g/L olarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 *C. boidinii*'de farklı konsantrasyonlardaki yaş *C. vulgaris* biyokütlesinin indirgen şeker konsantrasyonuna ve mikrobiyal gelişime etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, T: 30 °C)

Başlangıç *C. vulgaris* konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkisi belirlenirken teorik etanol verimi (%), etanol üretkenliği (Q_p) ve fermantasyon verimi ($Y_{P/S}$) gibi kinetik parametreler de hesaplanmıştır. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde 12 saatlik fermantasyon süresinin sonu baz alınmıştır. 50 g/L *C. vulgaris* varlığında *C. boidinii*'de teorik etanol verimi %65.10 iken 100 g/L *C. vulgaris* varlığında %50.31'e, başlangıç *C. vulgaris* konsantrasyonu 200 g/L'ye çıkarıldığında ise teorik etanol veriminin %47.39'a düştüğü belirlenmiştir.

C. boidinii'de 50 g/L *C. vulgaris* varlığında Q_p değeri 0.26 g/L.h olarak hesaplanırken 100 g/L *C. vulgaris* varlığında Q_p değeri 0.28 g/L.h ve 200 g/L *C. vulgaris* varlığında Q_p değeri 0.32 g/L.h olarak hesaplanmıştır.

50 g/L *C. vulgaris* varlığında *C. boidinii*'de $Y_{p/s}$ değeri 0.49 g/g olarak bulunurken 100 g/L *C. vulgaris* varlığında $Y_{p/s}$ değeri 0.35 g/g olarak bulunmuştur. Başlangıç *C. vulgaris* konsantrasyonu 200 g/L'ye çıkarıldığında ise $Y_{p/s}$ değeri 0.35 g/g olarak hesaplanmıştır. Kinetik parametreler ile belirlenen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

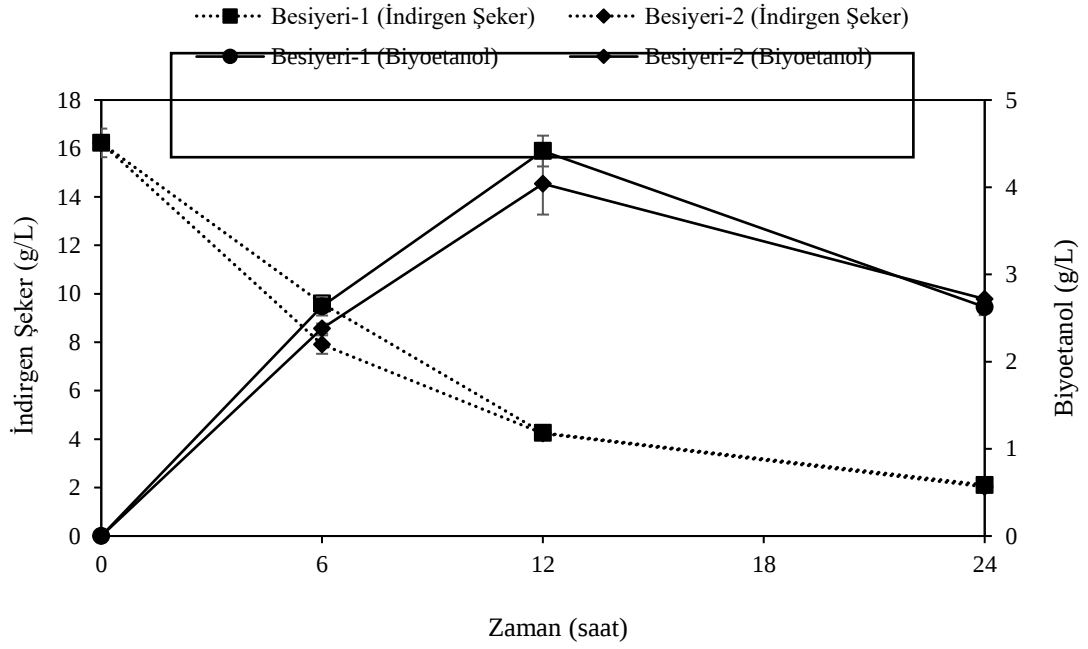
Çizelge 4.2 *C. boidinii*'de farklı konsantrasyonlardaki yaş *C. vulgaris* biyokütlesinin biyoetanol üretimine etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, T:30 °C)

Başlangıç Biyokütle	İndirgen Şeker (g/L) _s	Maksimum Biyoeanol (g/L) _{12s}	Teorik Verim (%) _{12s}	Q _P (g/L.h) _{12s}	Y _{P/S} (g/g) _{12s}
50 g/L	9.98 ± 0.12	3.29 ± 0.14	65.10 ± 2.80	0.26 ± 0.01	0.49 ± 0.01
100 g/L	13.03 ± 0.70	3.32 ± 0.01	50.31 ± 0.42	0.28 ± 0.002	0.35 ± 0.005
200 g/L	16.23 ± 0.10	3.89 ± 0.05	47.39 ± 0.34	0.32 ± 0.002	0.35 ± 0.01

4.4 Farklı Azot Kaynakları ve Mineral Tuzlarının Biyoetanol Üretimine Etkisi

C. vulgaris ortamına yapılan farklı katkılarının biyoetanol üretimine etkisini belirlemek amacıyla iki farklı besiyeri kullanılmıştır, Besiyeri-1; 200 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi, 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O ve 0.05 g/L ZnSO₄.7H₂O ile Besiyeri-2 ise 200 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi, 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH₂PO₄ ve 0.2 g/L NH₄Cl ile hazırlanmıştır.

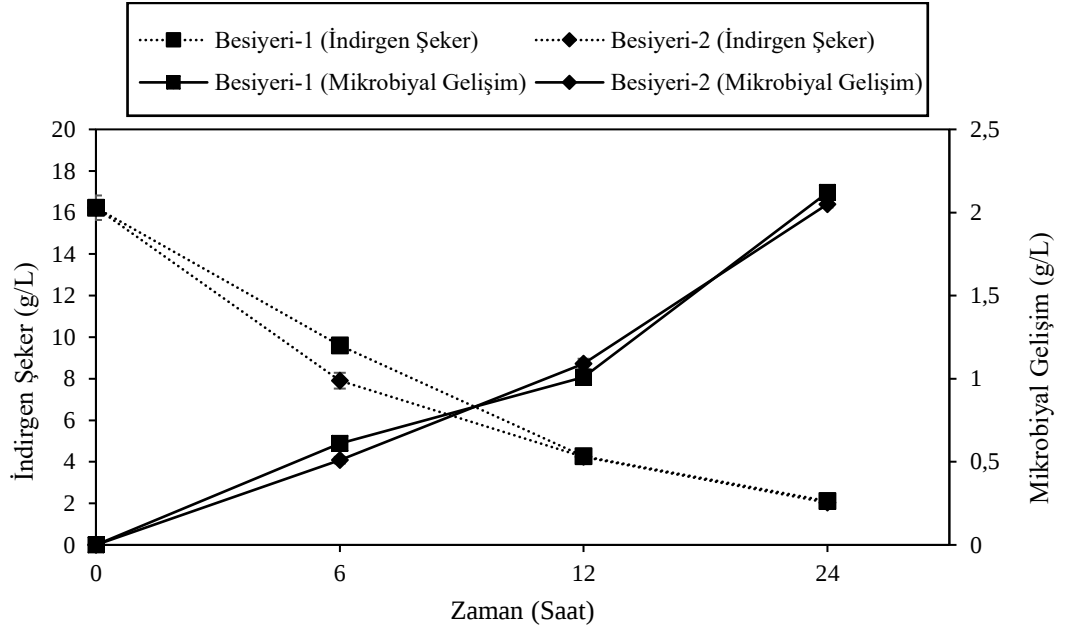
Yapılan deneylerde her iki besiyerinin de *C. boidinii*'de biyoetanol üretimini artırdığı gözlenmiştir. En yüksek biyoetanol üretimi her iki besiyeri için 12 saatlik fermantasyon süresi sonunda saptanmıştır. Besiyeri-2'ye kıyasla Besiyeri-1'de 1,06 kat daha yüksek konsantrasyonda biyoetanol üretildiği belirlenmiştir. Maksimum biyoetanol konsantrasyonu Besiyeri-1'de 4.54 g/L iken Besiyeri-2'de 4.29 g/L olarak hesaplanmıştır. Her iki besiyerinde elde edilen biyoetanol konsantrasyonları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 200 g/L başlangıç yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde farklı besiyeri katkılanması yapılan ortamların varlığında *C. boidinii*'nin indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonuna etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, Besiyeri-1; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O ve 0.05 g/L ZnSO₄. 7H₂O. Besiyeri-2; 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH₂PO₄ ve 0.2 g/L NH₄Cl T: 30 °C)

Fermantasyon sürecinde Besiyeri-1 ve Besiyeri-2'de bulunan indirgen şeker konsantrasyonları azalmıştır. 12 saat sonunda Besiyeri-1'de 4.26 g/L Besiyeri-2'de ise 4.24 g/L indirgen şeker kaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.6 ve 4.7'de gösterilmiştir.

200 g/L *C. vulgaris* içeren besiyerine yapılan farklı katkılanmalar sonucunda *C. boidinii*'nin mikrobiyal gelişiminin her iki besiyeri ortamında da arttığı belirlenmiş ve en fazla mikrobiyal gelişimin Besiyeri-1'de olduğu gözlenmiştir. 24 saatlik fermantasyon sonunda *C. boidinii*'nin yaş ağırlığı 200 g/L *C. vulgaris* varlığında 2.01 g/L iken Besiyeri-1'de 2.12 g/L, Besiyeri-2'de ise 2.05 g/L yaş ağırlığa ulaşmıştır. Sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 200 g/L başlangıç yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde farklı besiyeri katkılamaşı yapılan ortamların varlığında *C. boidinii*'nin indirgen şeker konsantrasyonuna ve mikrobiyal gelişime etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, Besiyeri-1; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O ve 0.05 g/L ZnSO₄. 7H₂O. Besiyeri-2; 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH₂PO₄ ve 0.2 g/L NH₄Cl T:30 °C)

Farklı azot kaynakları ve mineral tuzlarının biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesinde teorik etanol verimi (%), etanol üretkenliği (Q_p) ve fermantasyon verimi ($Y_{P/S}$) gibi kinetik parametreler de hesaplanmıştır. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde 12 saatlik fermantasyon süresinin sonu baz alınmıştır.

Çizelge 4.3 *C. boidinii*'de farklı besiyeri katkılamalı ortamların yaş *C. vulgaris* biyokütlesinde biyoetanol üretimine etkisi (Ön-işlem: %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika, pH:5, Besiyeri-1; 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂.2H₂O ve 0.05 g/L ZnSO₄. 7H₂O. Besiyeri-2; 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH₂PO₄ ve 0.2 g/L NH₄Cl T:30 °C)

Besiyeri	İndirgen Şeker (g/L)	Maksimum Biyoetanol (g/L) _{12s}	Teorik Verim (%) _{12s}	Q _P (g/L.h) _{12s}	Y _{P/S} (g/g) _{12s}
Besiyeri-1	16.23	4.54	54.74	0.38	0.38
	± 0.10	±0.18	±2.13	±0.01	±0.01
Besiyeri-2	16.23	4.29	51.73	0.36	0.36
	± 0.10	±0.35	±4.26	±0.02	±0.03

Kinetik parametreler incelendiğinde *C. boidinii*'ye Besiyeri-1 ve Besiyeri-2'nin, sadece 200 g/L fermente edilmiş *C. vulgaris* içeren besiyerine kıyasla olumlu etki yaptığı gözlenmiştir. Bu mayanın sadece 200 g/L fermente edilmiş *C. vulgaris* içeren besiyerinde teorik etanol verimi, Q_p ve Y_{p/s} değerleri sırasıyla %47.39, 0.32 g/L.h ve 0.35 g/g olarak hesaplanırken aynı değerler Besiyeri-1'de sırasıyla %54.74, 0.38 g/L.h ve 0.38 g/g, Besiyeri- 2'de ise %51.73, 0.36 g/L.h ve 0.36 g/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve 4.3). Bu sonuçlar fermente edilmiş *C. vulgaris* biyokütlesinin azot kaynakları ve mineral tuzları ile takviye edilmesinin *C. boidinii*'de biyoetanol üretimini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir ve az farkla da olsa Besiyeri-1 ortamından daha yüksek biyoetanol elde edilmesinin nedeni: bu ortamın Besiyeri-2'den farklı olarak biyoetanol üretkenliğinin artmasında önemli etkisi olan pepton (Da Cruz vd. 2003), magnezyum, kalsiyum ve çinko içermesi olduğu düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

C. vulgaris, yapısında biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılan çeşitli şekerler bulundurması, çeşitli kùltivasyon koşullarında gelişebilmesi, olumsuz koşullarda büyüme oranının yüksek olması ve ön işleminin nispeten kolay olması gibi özellikleri sayesinde biyoetanol üretiminde kullanılabilecek en uygun hammaddelerden biridir. Yapılan tez çalışmasında *C. vulgaris* mikroalginin belirli koşullarda mikrobiyal gelişimi incelenmiştir. Mikrobiyal gelişiminin en yüksek olduğu koşul belirlendikten sonra bu mikroalgin yaş biyokütlesinden yüksek konsantrasyonda indirgen şeker ve biyoetanol elde etmek için fermantasyon deneylerinde önemli parametreler optimize edilmiştir.

5.1 Farklı Kùltivasyon Koşullarının Mikroalgal Gelişime Etkilerinin Belirlenmesi

Kùltivasyon koşulları mikroalglerin gelişimini doğrudan etkilediğinden dolayı (Aziz vd. 2020) bu çalışmada *C. vulgaris* mikroalginin gelişimi için fototrofik ve fotoheterotrofik kùltürler kullanılmıştır. Fotoheterotrofik kùltivasyonda karbon kaynağı olarak ayrı ayrı glukoz ve havuç posasından yararlanılmıştır. Çalışma sonunda fototrofik gelişim değerin fotoheterotrofik gelişim değlerinden daha düşük olduğu gör÷lm÷ştür. Bu sonuç literatürde *Dactylococcus sp.* kullanılan bir çalışma (Grama vd. 2016) ile uyumludur ve bu mikroalgin fotoheterotrofik gelişiminde pahalı bir kimyasal olan gliserol kullanılmıştır. Tez çalışmasında en yüksek mikrobiyal gelişim ise havuç posası şekeri içeren fotoheterotrofik koşulda belirlenmiştir. Fotoheterotrofik ortamda kullanılan havuç posası ve glukoz konsantrasyonları (0.5 g/L) aynı olmasına rağmen havuç posası içeren ortamdaki mikrobiyal gelişimin daha yüksek olması havuç posasında glukoz ek olarak ksiloz gibi diğfer fermente edilebilir şekerler, sel÷loz, hemisel÷loz, çeşitli vitaminler ile mineraller, karotenoid ve üronik asit gibi bileşenler bulunması ve bu bileşenlerin mikroalg gelişimini desteklemesi (Sharma vd. 2012b; Clementz vd. 2019) ile açıklanabilir.

5.2 Farklı Ön İşlem Yöntemlerinin Biyoetanol Üretimine Etkisi

Mikroalg hücre duvarının parçalanmasında ve fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkarılmasında uygulanan ön işlem, biyoetanol üretiminin en önemli aşamalarından biridir (Phwan vd. 2019). Ön işlem yöntemlerinin optimizasyonu fermantasyon ortamına salınan şeker miktarını arttırarak hem elde edilen biyoetanol konsantrasyonunun artmasını hem de biyoetanol üretim maliyetinin düşmesini sağlar (Rastogi ve Shrivastava 2017). Bu nedenle tez çalışmasında %1 H₂SO₄ ve %1 NaOH ile ön işlem yöntemlerinin *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretimine etkileri karşılaştırılmıştır.

C. vulgaris biyokütlesinde gerçekleştirilen ilk parametre, kullanılan %1 H₂SO₄ ve %1 NaOH çözeltilerinin 50 g/L başlangıç biyokütle varlığında optimizasyonu olmuştur. Mikroalgal biyokütlenin ön işleminde yüksek oranda fermente edilebilir şekerler elde etmek ve inhibitör oluşumunu en aza indirmek için genellikle asit ve alkali gibi kimyasal ajanlar kullanılır (Yoo vd. 2015). Gerçekleştirilen bu deneyde %1 NaOH ön işlemi ile 6.86 g/L indirgen şeker elde edilirken %1 H₂SO₄ ön işlemi sonunda 9.98 g/L indirgen şeker elde edilmiştir. Literatürde de mikroalgal biyokütlenin ön işleminde seyreltik sülfürik asit ön işleminin seyreltik sodyum hidroksit ön işleminden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin *C. vulgaris* mikroalginin kullanıldığı bir çalışmada (Abou El-Souod vd. 2021) 100 g kuru biyokütle %2 H₂SO₄ (100–120 °C, 120 dk.) ve %2 NaOH (120 °C, 30 dk.) ile otoklavda ön işleme tabi tutulmuştur. Çalışma sonunda %2 H₂SO₄ ön işlemi ile 24.77 g, %2 NaOH ön işlemi ile 21.54 g indirgen şeker elde edilmiştir. *Scenedesmus sp.* kullanılan başka bir çalışmada ise Yirgu vd. (2021), %5 kuru biyokütleyi 3N H₂SO₄ ve 3N NaOH ile otoklavda (121 °C, 20 dk.) ön işleme tabi tutmuştur. Çalışma sonunda 3N H₂SO₄ ön işlemi ile daha yüksek indirgen şeker elde etmişlerdir ve bu ön işlem ile elde ettikleri indirgen şeker konsantrasyonu 122.49 mg/g'dır. (0.122 g/g). Seyreltik asit ön işleminin seyreltik alkali ön işleminden genellikle daha etkin olmasının sebebi, seyreltik alkali ön işleminde polisakkaritler arası bağların koparıldığı fakat bu polisakkaritler tam olarak parçalanamadığından dolayı indirgen şekerlere dönüştürülebilmesi (Zheng vd. 2009) ve seyreltik asit ön işleminde mikroalg hücre duvarında bulunan selüloz ve hemiselülozun etkili bir şekilde parçalanıp indirgen şekerlere dönüştürülebilmesi (Wyman vd. 2005) nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca *Chlorella sp.* mikroalgi kullanılan bir çalışmada (Choi ve Lee, 2016), %10 kuru biyokütle, %1 H₂SO₄ ile su banyosunda (100 °C, 15 dk.) ön işleme tabi tutulmuştur. Çalışma sonunda 1.03 g/L indirgen şeker elde edilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında da literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak seyreltik asit ön işlemleri ile daha etkin indirgen şeker sağlandığından dolayı ileri çalışmalarda ön işlemler %1 H₂SO₄ varlığında gerçekleştirilmiştir.

5.3 Başlangıç *Chlorella vulgaris* Biyokütle Konsantrasyonunun Biyoetanol Üretimine Etkisi

Biyoetanol üretiminde başlangıç mikroalgal biyokütle konsantrasyonu hem ön işlem verimini hem de maliyeti etkilediğinden dolayı optimum değerdeki başlangıç biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi önemlidir (Ho vd. 2013). Biyokütle konsantrasyonunun optimum değerden düşük olması fermente edilebilir şeker miktarının ve biyoetanol üretim veriminin daha az olmasına neden olurken (Han vd. 2011) optimum değerden yüksek olması ön işlem veriminin düşmesine neden olmaktadır (Ho vd. 2013). Bu yüzden gerçekleştirilen tez çalışmasında başlangıç biyokütle konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkilerinin araştırılması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L) *C. vulgaris* biyokütlesi içeren besiyeri hazırlanmıştır. Çalışma sonunda *C. boidinii* mayası için en yüksek indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonu 200 g/L *C. vulgaris* yaş biyokütle varlığında sırasıyla 16.23 g/L ve 3.89 g/L olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.3). Literatürde de *Chlorella sp.* biyokütlesi kullanılan bir çalışmada Ngamsirisomsakul vd. (2019), en yüksek indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonunu 200 g/L kuru biyokütle varlığında sırasıyla 25.38 g/L ve 5.10 g/L olarak elde etmişlerdir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında literatürde yapılan çalışma ile uyumlu olarak 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda daha etkin indirgen şeker ve biyoetanol elde edildiğinden dolayı deneyin diğer aşamasında başlangıç biyokütle konsantrasyonu olarak 200 g/L *C. vulgaris* biyokütlesi kullanılmıştır.

5.4 Azot Kaynakları ve Mineral Tuzları Takviyesinin Biyoetanol Üretimine Etkisi

Azot kaynakları ve mineral tuzları; mikroorganizmaların gelişiminde, fermantasyonun hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesinde ve yüksek miktarda biyoetanol elde edilmesinde önemli derecede etkilidir (Pereira vd. 2010). Pepton ile maya özütü mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olan ve biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan organik azot kaynaklarıdır (Deesuth vd. 2012; Li vd. 2017). Metal tuzları ise mikroorganizmaların büyümesinde ve şekerlerin biyoetanolle daha verimli olarak dönüştürülmesinde önemli etkilere sahip olup fermantasyon yolağındaki pek çok enzimin kofaktörü olarak da görev yaparlar (Palukurty vd. 2008; Xue vd. 2008). Mg^{2+} , K^{+} , Zn^{2+} ve Ca^{2+} fermantasyona önemli derecede katkı sağlayan mineral tuzları arasındadır (Walker, 2004). Bu yüzden *C. vulgaris* biyokütlesinden elde edilen biyoetanol konsantrasyonunu artırmak amacıyla farklı azot ve mineral tuzları içeren iki farklı besiyeri hazırlanmıştır. Bunlardan birinci besiyeri ortamı 200 g/L fermente edilmiş *C. vulgaris* biyokütlesi, 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve 0.05 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; ikinci besiyeri ortamı ise 200 g/L fermente edilmiş *C. vulgaris* biyokütlesi, 1 g/L maya özütü, 0.4 g/L KH_2PO_4 ve 0.2 g/L NH_4Cl içermektedir. Çalışma sonunda her iki besiyeri ortamında da biyoetanol üretiminin kontrol besiyerine göre arttığı ve en fazla artışın Besiyeri-1 ortamında olduğu belirlenmiştir. *C. boidinii*'de maksimum biyoetanol konsantrasyonu 12 saatlik fermantasyon süresi sonunda Besiyeri-1 ve Besiyeri-2 ortamında sırasıyla 4.54 g/L ve 4.29 g/L olarak saptanmıştır. Besiyeri-2 ortamında mineral tuzu olarak sadece KH_2PO_4 bulunurken Besiyeri-1 ortamında buna ek olarak $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve $ZnSO_4$ gibi çeşitli mineral tuzları bulunması ve azot kaynağı olarak Besiyeri-1'de maya özütüne ek olarak biyoetanol üretkenliğini artıran pepton bulunurken diğerinde bulunmaması nedeniyle Besiyeri-1 ortamının biyoetanol üretiminde daha etkin olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.6). Literatürde de mikroalgal biyoetanol üretiminde azot kaynakları ve mineral tuzları takviyesinin biyoetanol üretimini artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. *Pseudochoricystis ellipsoidea* kuru kütesinden biyoetanol üretildiği bir çalışmada Gao vd. (2012), fermantasyon ortamına 100 g/L glukoz, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$ ve 1.0 g/L $MgSO_4$ eklemişlerdir. Çalışma sonucu kontrol grubunda etanol üretilmediğini, takviye içeren ortamda önemli miktarda etanol üretildiğini ve bu takviye ortamına ayrıca 3 g/L maya özütü ilave

edilmesiyle *S. cerevisiae*'de glukoz tüketimini ve etanol üretimini artırdığını belirlemişlerdir. *Scenedesmus acuminatus* kuru kütlesinden biyoetanol üretildiği başka bir çalışmada ise (Chandra vd. 2020), kültürasyon ortamına Mg tuzu ilave edilmesi sonucu biyoetanol konsantrasyonunun 109.8 mg/L'den (0.11 g/L) 150.6 mg/L'ye (0.15 g/L) yükseldiği belirlenmiştir.

5.5 Sonuç ve Öneriler

Biyoetanol, çevresel problemlere yol açan ve sürdürülebilir olmadığından dolayı enerji krizine neden olan fosil yakıtlara alternatif olarak kullanılabilecek yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir. Bu yüzden bu çevre dostu yakıtın üretimi hakkında çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalardan biri de üretimde kullanılacak hammaddedir. *C. vulgaris* mikroalgi de biyoetanol üretimi için çok uygun bir hammaddedir çünkü yapısında biyoetanolün hammaddesi olan çeşitli şekerler bulundurur ve optimize edilen belirli kültür koşullarında bu şekerlerin oranı yükseltilebilir. Bu mikroalg kozmopolit bir tür olduğundan dolayı temin edilmesi kolaydır. Gelişebildiği sıcaklık ve pH aralığı geniştir. Çeşitli fiziko-kimyasal ortamlara adapte olabilmesi sayesinde zorlu ortam koşullarına karşı dayanıklıdır. Ülkemizde temel besin maddesi olarak tüketilmediğinden dolayı gıda piyasasında rekabete neden olmaz ve ekonomiyi de olumsuz etkilemez. Hücre duvar yapısında lignin içermemesi sayesinde kolaylıkla parçalanabilir ve böylece biyoetanol üretim süreci hem daha kısa zamanda gerçekleşir hem de daha düşük maliyetle biyoetanol elde edilebilir. Bu yüzden yapılan tez çalışmasında *C. vulgaris* yaş biyokütlesi seyreltik asit ön işlemi ile parçalanarak elde edilen indirgen şekerler biyoetanol üretiminde kullanılmıştır. Ayrıca fermantasyon için çeşitli şekerleri biyoetanole dönüştürebilen *C. boidinii* mayası kullanılarak ve önemli bazı parametreler optimize edilerek biyoetanol konsantrasyonu %16.7 artırılmıştır. Bu tez çalışması ile biyoetanol üretimi için literatürde ilk defa *Chlorella vulgaris* mikroalginin gelişmi zirai bir atık olan havuç posası kullanılarak 2.2 kat artırılmıştır. Ayrıca *Candida boidinii* mikroalg tabanlı biyoetanol üretiminde ilk kez bu çalışmada kullanılıp biyoetanol üretim kapasitesi belirlenmiştir. Bu yüzden çalışma sonunda elde edilen tüm veriler literatüre katkı sağlar niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Malek, F., Rofeal, M., Zabed, H. M., Nizami, A. S., Rehan, M., & Qi, X. (2021). Microorganism-mediated algal biomass processing for clean products manufacturing: Current status, challenges and future outlook. *Fuel*, 122612.
- Abdullah, B., Muhammad, S. A. F. A. S., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and sustainable energy reviews*, 107, 37-50.
- Abou El-Souod, G. W., Morsy, E. M., Hassan, L. H., & El-Sheekh, M. M. (2021). Efficient Saccharification of the Microalga *Chlorella vulgaris* and its Conversion into Ethanol by Fermentation. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45, 767-774.
- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112247.
- Achinas, S., & Euverink, G. J. W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 44-53.
- Agbogbo, F. K., & Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology letters*, 30(9), 1515-1524.
- Agustini, N. W. S., Hidhayati, N., & Wibisono, S. A. (2019, August). Effect of hydrolysis time and acid concentration on bioethanol production of microalga *Scenedesmus* sp. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 308, No. 1, p. 012029). IOP Publishing.
- Akter, S., Zabed, H. M., Sahu, J. N., Chowdhury, F. I., Faruq, G., Boyce, A. N., & Qi, X. (2020). Bioethanol production from water-soluble and structural carbohydrates of normal and high sugary corn stovers harvested at three growth stages. *Energy Conversion and Management*, 221, 113104.
- Alam, M. A., Yuan, T., Xiong, W., Zhang, B., Lv, Y., & Xu, J. (2019). Process optimization for the production of high-concentration ethanol with *Scenedesmus raciborskii* biomass. *Bioresource technology*, 294, 122219.
- Aliev, A. M., & Abdulagatov, I. M. (2017). The study of microalgae *Nannochloropsis salina* fatty acid composition of the extracts using different techniques. SCF vs conventional extraction. *Journal of Molecular Liquids*, 239, 96-100.
- Anonim. 2017. www.turkseker.gov.tr/sekerfabrikalari.aspx (Erişim Tarihi: 22.05.2023).
- Anonim. 2019. www.fao.org (Erişim Tarihi: 05.04.2021).
- Anonymous. 2020a. Propane, B. E. E. N. G., & Electricity, H. Alternative Fuels Data Center.

- Anonymous. 2020b. Renewables, I. E. A. (2020). Analysis and Forecast to 2025. *International Energy Agency (IEA): Paris, France*.
- Anonim 2021a. <https://konyaseker.com.tr/tr/icerik/detay/2085/biyoetanol-uretim-tesisi> (Erişim Tarihi: 05.09.2022).
- Anonim 2021b. www.tarimsalkimya.com.tr (Erişim Tarihi: 07.09.2022).
- Anonim 2021c. www.tezkim.com.tr (Erişim Tarihi: 10.09.2022).
- Anonymous 2022. www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/ (Erişim Tarihi: 10.04.2023).
- Atkinson, J. A., Gunning, B. E. S., & John, P. C. L. (1972). Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta*, 107(1), 1-32.
- Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Liu, H. Y., Zaini, N., ... & Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109621.
- Baena, L. M., Gómez, M., & Calderón, J. A. (2012). Aggressiveness of a 20% bioethanol–80% gasoline mixture on autoparts: I behavior of metallic materials and evaluation of their electrochemical properties. *Fuel*, 95, 320-328.
- Bagheri, H., Espi, E., & Larre Cacho, M. T. (2016). Fuel ethanol at a key economic and technological junction in the USA. *Available at SSRN* 2789612.
- Bahlawan, Z. A. S., Damayanti, A., Putri, R. D. A., Triwibowo, B., Prasetiawan, H., Aji, S. P. K., & Prawisnu, A. (2022). Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of Chlorella microalgae. *Materials Today: Proceedings*.
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 4(1), 77-93.
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41, 1489-1500.
- Baptista, M., & Domingues, L. (2022). Kluyveromyces marxianus as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnology Advances*, 108027.
- Baudelet, P. H., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25, 333-371.
- Bautista, K., Unpaprom, Y., & Ramaraj, R. (2019). Bioethanol production from corn stalk juice using Saccharomyces cerevisiae TISTR 5020. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 41(13), 1615-1621.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210.

- Bedö, S., Fehér, A., Khunnonkwao, P., Jantama, K., & Fehér, C. (2021). Optimized Bioconversion of xylose derived from pre-treated crop residues into xylitol by using *Candida boidinii*. *Agronomy*, 11(1), 79.
- Bhan, C., Verma, L., & Singh, J. (2020). Alternative fuels for sustainable development. In *Environmental Concerns and Sustainable Development* (pp. 317-331). Springer, Singapore.
- Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Praveenkumar, R., Chakravarthy, M., & Yuvaraj, D. (2017). Biobutanol—An impending biofuel for future: A review on upstream and downstream processing techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 788-807.
- Bilad, M. R., Arafat, H. A., & Vankelecom, I. F. (2014). Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. *Biotechnology advances*, 32(7), 1283-1300.
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of biotechnology*, 70(1-3), 313-321.
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of microalgae. In *Microalgae in health and disease prevention* (pp. 23-72). Academic Press.
- Branyikova, I., Prochazkova, G., Potocar, T., Jezkova, Z., & Branyik, T. (2018). Harvesting of microalgae by flocculation. *Fermentation*, 4(4), 93.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, 2011.
- Burczyk, J., & Hesse, M. (1981). The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. *Plant Systematics and Evolution*, 138(1), 121-137.
- Buruiana, C. T., Garrote, G., & Vizireanu, C. (2013). BIOETHANOL PRODUCTION FROM RESIDUAL LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: A REVIEW—PART 2. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI--Food Technology*, 37(1).
- Cabrita, A. R., Guilherme-Fernandes, J., Valente, I. M., Almeida, A., Lima, S. A., Fonseca, A. J., & Maia, M. R. (2022). Nutritional Composition and Untargeted Metabolomics Reveal the Potential of *Tetrademus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oceanica* as Valuable Nutrient Sources for Dogs. *Animals*, 12(19), 2643.
- Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, 98(12), 2415-2457.
- Castro-Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2021). Membrane-based harvesting processes for microalgae and their valuable-related molecules: A review. *Membranes*, 11(8), 585.
- Cetinkaya, A. E. (2021). Potential solutions and challenges of renewable energy for the economic and technical aspects of energy system independence: the case of Turkey.

- Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D. G., Lee, D. U., & Pan, C. H. (2010). Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 793-797.
- Chandra, N., Shukla, P., & Mallick, N. (2020). Role of cultural variables in augmenting carbohydrate accumulation in the green microalga *Scenedesmus acuminatus* for bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101632.
- Chang, V. S., & Holtzapple, M. T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In *Twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 5-37). Humana Press, Totowa, NJ.
- Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in biotechnology*, 14(11), 421-426.
- Chen, C. Y., Bai, M. D., & Chang, J. S. (2013a). Improving microalgal oil collecting efficiency by pretreating the microalgal cell wall with destructive bacteria. *Biochemical engineering journal*, 81, 170-176.
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., ... & Chang, J. S. (2013b). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332-344.
- Chiranjeevi, T., Uma, A., Radhika, K., Baby Rani, G., Prakasham, R. S., Srinivasa Rao, P., & Umakanth, A. V. (2014). Enzymatic hydrolysis of market vegetable waste and subsequent ethanol fermentation-Kinetic evaluation. *Journal of Biochemical Technology*, 5(4), 775-781.
- Choi, G. W., Um, H. J., Kim, Y., Kang, H. W., Kim, M., Chung, B. W., & Kim, Y. H. (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch. *Biomass and bioenergy*, 34(8), 1223-1231.
- Choi, W. Y., & Lee, H. Y. (2016). Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. By high-pressure homogenization. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 81-89.
- Choix, F. J., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme and microbial technology*, 51(5), 300-309.
- Clementz, A., Torresi, P. A., Molli, J. S., Cardell, D., Mammarella, E., & Yori, J. C. (2019). Novel method for valorization of by-products from carrot discards. *Lwt*, 100, 374-380.
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juarez-Campos, B., & Gonzalez-Hernandez, J. C. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*.

- Correia, N., Pereira, H., Silva, J. T., Santos, T., Soares, M., Sousa, C. B., ... & Silva, J. (2020). Isolation, identification and biotechnological applications of a novel, robust, free-living *Chlorococcum* (*Oophila*) *amblystomatis* strain isolated from a local pond. *Applied Sciences*, 10(9), 3040.
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Moraes, L., Zapparoli, M., & Morais, M. G. (2020). Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value-added product recovery. *Bioresource technology*, 301, 122727.
- D'hondt, E., Martin-Juarez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., ... & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 133-154). Woodhead Publishing.
- Da Cruz, S. H., Batistote, M., & Ernandes, J. R. (2003). Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(4), 349-355.
- Dalatony, M. M., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A., Kim, H., Salama, E. S., & Jeon, B. H. (2016). Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 219, 98-105.
- Daneshvar, E., Ok, Y. S., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S. M., Hong, H., ... & Bhatnagar, A. (2021). Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresource technology*, 329, 124870.
- Dasan, Y. K., Lam, M. K., Yusup, S., Lim, J. W., & Lee, K. T. (2019). Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. *Science of the total environment*, 688, 112-128.
- Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource technology*, 128, 241-245.
- De Vrije, T., Budde, M.A., Lips, S.J., Bakker, R.R., Mars, A.E., Claassen, P.A., 2010. Hydrogen production from carrot pulp by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Int. J. Hydrogen Energy* 35 (24), 13206–13213.
- Deviram, G., Mathimani, T., Anto, S., Ahamed, T. S., Ananth, D. A., & Pugazhendhi, A. (2020). Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. *Journal of Cleaner Production*, 253, 119770.
- Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Processing Technology*, 191, 232-247.
- Diaz-Montes, E., & Castro-Munoz, R. (2019). Metabolites recovery from fermentation broths via pressure-driven membrane processes. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 14(4), e2332.

- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., ... & El-Halwagi, M. M. (2017). A review of biodiesel production from microalgae. *Clean technologies and environmental policy*, 19(3), 637-668.
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 258-266.
- Elfasakhany, A. (2018). Exhaust emissions and performance of ternary iso-butanol–bio-methanol–gasoline and n-butanol–bio-ethanol–gasoline fuel blends in spark-ignition engines: Assessment and comparison. *Energy*, 158, 830-844.
- Fasaei, F., Bitter, J. H., Slegers, P. M., & Van Boxtel, A. J. B. (2018). Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, 31, 347-362.
- Fehér, A., Bedö, S., & Fehér, C. (2021). Comparison of Enzymatic and Acidic Fractionation of Corn Fiber for Glucose-rich Hydrolysate and Bioethanol Production by *Candida boidinii*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 65(3), 320-330.
- Ferreira, J. A., Brancoli, P., Agnihotri, S., Bolton, K., & Taherzadeh, M. J. (2018). A review of integration strategies of lignocelluloses and other wastes in 1st generation bioethanol processes. *Process Biochemistry*, 75, 173-186.
- Figueiredo, A. R., da Costa, E., Silva, J., Domingues, M. R., & Domingues, P. (2019). The effects of different extraction methods of lipids from *Nannochloropsis oceanica* on the contents of omega-3 fatty acids. *Algal Research*, 41, 101556.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339-354.
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1656-1664.
- Franziska, H., Andrew, B., Nicole, L., Andreas, K., Stefan, Z., Uwe, L., & Uwe, M. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production.
- Fuad, N., Omar, R., Kamarudin, S., Harun, R., Idris, A., & WAKG, W. A. (2018). Mass harvesting of marine microalgae using different techniques. *Food and Bioproducts Processing*, 112, 169-184.
- Fuentes, M. R., Fernández, G. A., Pérez, J. S., & Guerrero, J. G. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345-353.
- Gao, M. T., Shimamura, T., Ishida, N., & Takahashi, H. (2012). Investigation of utilization of the algal biomass residue after oil extraction to lower the total production cost of biodiesel. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(3), 330-333.
- Gead, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J. A., ... & Vicente, A. A. (2018). Electrotechnologies applied to microalgal

- biotechnology–Applications, techniques and future trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 656-668.
- Gallego, R., Montero, L., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2018). Green extraction of bioactive compounds from microalgae. *Journal of Analysis and Testing*, 2(2), 109-123.
- Garver, M. P., & Liu, S. (2014). Development of thermochemical and biochemical technologies for biorefineries. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 457-488). Elsevier.
- Gelgör, R. D., Ozcelik, D., & Haznedaroglu, B. Z. (2022). Effects of baking on the biochemical composition of *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 65, 102716.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Gnansounou, E., & Dauriat, A. (2005). Ethanol fuel from biomass: A review.
- Goh, C. S., Tan, K. T., Lee, K. T., & Bhatia, S. (2010). Bio-ethanol from lignocellulose: status, perspectives and challenges in Malaysia. *Bioresource technology*, 101(13), 4834-4841.
- Gomez-Flores, R., Thiruvengadathan, T.N., Nicol, R., Gilroyed, B., Morrison, M., Reid, L.M., Margaritis, A., 2018. Bioethanol and biobutanol production from sugarcorn juice. *Biomass Bioenergy* 108, 455-463.
- Goncalves, D. L., Matsushika, A., Belisa, B., Goshima, T., Bon, E. P., & Stambuk, B. U. (2014). Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and microbial technology*, 63, 13-20.
- Govumoni, S. P., Koti, S., Kothagouni, S. Y., Venkateshwar, S., & Linga, V. R. (2013). Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. *Carbohydrate polymers*, 91(2), 646-650.
- Grad, P. (2006). Biofuelling Brazil: An overview of the bioethanol success story in Brazil. *Refocus*, 7(3), 56-59.
- Grama, B. S., Agathos, S. N., & Jeffries, C. S. (2016). Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1611-1618.
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., & Andrade, P. B. (2015). Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*, 13(5), 3182-3230.
- Guldhe, A., Misra, R., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2016). An innovative electrochemical process to alleviate the challenges for harvesting of small size microalgae by using non-sacrificial carbon electrodes. *Algal Research*, 19, 292-298.

- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology advances*, 33(2), 243-260.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(5), 937-953.
- Halder, P., Azad, K., Shah, S., & Sarker, E. (2019). Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production. In *Advances in eco-fuels for a sustainable environment* (pp. 211-236). Woodhead Publishing.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource technology*, 102(1), 178-185.
- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and bioenergy*, 28(4), 384-410.
- Hattab, M., Ghaly, A., & Hammouda, A. (2015). Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: critical review and comparative analysis. *J Fundam Renew Energy Appl*, 5(2), 1000154.
- Ho, S., Chen, C., Lee, D., & Chang, J. (2011). Perspectives on microalgal CO₂ - emission mitigation systems — A review. *Biotechnology Advances*, 29(2), 189-198.
- Ho, S. H., Li, P. J., Liu, C. C., & Chang, J. S. (2013). Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource technology*, 145, 142-149.
- Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., & Jahns, M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge university press.
- Iasimone, F., Seira, J., Desmond-Le Quemener, E., Panico, A., De Felice, V., Pirozzi, F., & Steyer, J. P. (2020). Bioflocculation and settling studies of native wastewater filamentous cyanobacteria using different cultivation systems for a low-cost and easy to control harvesting process. *Journal of environmental management*, 256, 109957.
- Ievina, B., & Romagnoli, F. (2020). Potential of species as feedstock for bioenergy production: a review. *Environmental and Climate Technologies*, 24(2), 203-220.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769.
- Javed, F., Aslam, M., Rashid, N., Shamair, Z., Khan, A. L., Yasin, M., ... & Bazmi, A. A. (2019). Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel*, 255, 115826.
- Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M., & Grams, J. (2019). Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Second and third generation of feedstocks* (pp. 143-196). Elsevier.

- Jeong, G. T., Kim, S. K., & Oh, B. R. (2020). Production of fermentable sugars from *Chlorella* sp. by solid-acid catalyst. *Algal Research*, 51, 102044.
- Jiang, Y., Lv, Y., Wu, R., Sui, Y., Chen, C., Xin, F., ... & Jiang, M. (2019). Current status and perspectives on biobutanol production using lignocellulosic feedstocks. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100245.
- Jouzani, G., & Taherzadeh, M. J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 152-195.
- Juliarnita, I. G. A., Hadisoebroto, R., & Rinanti, A. (2018). Bioethanol production from mixed culture microalgae biomass with temperature hydrolysis variation. In *MATEC Web of Conferences* (Vol. 197, p. 13010). EDP Sciences.
- Karemore, A., Ramalingam, D., Yadav, G., Subramanian, G., & Sen, R. (2015). Photobioreactors for improved algal biomass production: analysis and design considerations. In *Algal biorefinery: An integrated approach* (pp. 103-124). Springer, Cham.
- Karpagam, R., Jawaharraj, K., & Gnanam, R. (2021). Review on integrated biofuel production from microalgal biomass through the outset of transesterification route: a cascade approach for sustainable bioenergy. *Science of The Total Environment*, 766, 144236.
- Karsch, T., Stahl, U., & Esser, K. (1983). Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, advantages and disadvantages. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 18(6), 387-391.
- Khan, M. I., Lee, M. G., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2017). Pretreatment optimization of the biomass of *Microcystis aeruginosa* for efficient bioethanol production. *Amb Express*, 7(1), 1-9.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-21.
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C., & Ala'a, H. (2022). Challenges and perspectives on innovative technologies for biofuel production and sustainable environmental management. *Fuel*, 325, 124845.
- Khoshkho, S. M., Mahdavian, M., Karimi, F., Karimi-Maleh, H., & Razaghi, P. (2022). Production of bioethanol from carrot pulp in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* and beet molasses inoculum; a biomass based investigation. *Chemosphere*, 286, 131688.
- Kim, T. H., Taylor, F., & Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource technology*, 99(13), 5694-5702.
- Kim, S., Park, J. E., Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource technology*, 144, 8-13.

- Kim, H. M., Oh, C. H., & Bae, H. J. (2017). Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource technology*, 233, 44-50.
- Kuchitsu, K., Oh-Hama, T., Tsuzuki, M., & Miyachi, S. (1987). Detection and characterization of acidic compartments (vacuoles) in *Chlorella vulgaris* 11h cells by ³¹P-in vivo NMR spectroscopy and cytochemical techniques. *Archives of microbiology*, 148(2), 83-87.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Küüt, A., Ritslaid, K., Küüt, K., Ilves, R., & Olt, J. (2019). State of the art on the conventional processes for ethanol production. *Ethanol*, 61-101.
- Laamanen, C. A., Ross, G. M., & Scott, J. A. (2016). Flotation harvesting of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 75-86.
- Ladanai, S., & Vinterbäck, J. (2010). Certification criteria for sustainable biomass for energy.
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2015). Bioethanol production from microalgae. *Handbook of marine microalgae*, 197-208.
- Lapuerta, M., Barba, J., Sediako, A. D., Kholghy, M. R., & Thomson, M. J. (2017). Morphological analysis of soot agglomerates from biodiesel surrogates in a coflow burner. *Journal of Aerosol Science*, 111, 65-74.
- Lareo, C., Ferrari, M. D., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie, V., Ramírez, M. B., & Martínez-Garreiro, J. (2013). Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. *Springer Plus*, 2(1), 1-11.
- Lee, W. S., Chen, I. C., Chang, C. H., & Yang, S. S. (2012). Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 39(1), 216-222.
- Lee, Y. C., Lee, K., & Oh, Y. K. (2015). Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, 184, 63-72.
- Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge university press
- Lee, J. H., Won, H. J., Hoang Nguyen Tran, P., Lee, S. M., Kim, H. Y., & Jung, J. H. (2021). Improving lignocellulosic biofuel production by CRISPR/Cas9-mediated lignin modification in barley. *GCB Bioenergy*, 13(4), 742-752.
- Leite, L. D. S., & Daniel, L. A. (2020). Optimization of microalgae harvesting by sedimentation induced by high pH. *Water Science and Technology*, 82(6), 1227-1236.
- Li, K., Liu, S., & Liu, X. (2014). An overview of algae bioethanol production. *International Journal of Energy Research*, 38(8), 965-977.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6), 627-642.

- Lou, X., Yang, D., & Singh, P. M. (2009). Film breakdown and anodic dissolution during stress corrosion cracking of carbon steel in bioethanol. *Journal of the Electrochemical Society*, 157(2), C86.
- Ma, J., Shi, S., Jia, X., Xia, F., Ma, H., Gao, J., & Xu, J. (2019). Advances in catalytic conversion of lignocellulose to chemicals and liquid fuels. *Journal of Energy Chemistry*, 36, 74-86.
- Madeira-Jr, J. V., & Gombert, A. K. (2018). Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcane-based biorefinery. *Biomass and bioenergy*, 119, 217-228.
- Madhavan, A., Arun, K. B., Binod, P., Sirohi, R., Tarafdar, A., Reshmy, R., ... & Sindhu, R. (2021). Design of novel enzyme biocatalysts for industrial bioprocess: Harnessing the power of protein engineering, high throughput screening and synthetic biology. *Bioresource Technology*, 325, 124617.
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M., & Tanaka, T. (2018). Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Current opinion in biotechnology*, 50, 111-120.
- Maia, J. L., Cardoso, J. S., da Silveira Mastrantonio, D. J., Bierhals, C. K., Moreira, J. B., Costa, J. A. V., & de Moraes, M. G. (2020). Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2739-2749.
- Maity S., & Mallick, N. (2022). Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 131153.
- Mansa, R. F., Sipaut, C. S., Yasir, S. M., Dayou, J., & Joannes, C. (2018). Comparative studies of cell growth, total lipid and methyl palmitate of *Ankistrodesmus* sp. in phototrophic, mixotrophic and heterotrophic cultures for biodiesel production. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*, 8(1), 438-450.
- Manzetti, S., & Andersen, O. (2015). A review of emission products from bioethanol and its blends with gasoline. Background for new guidelines for emission control. *Fuel*, 140, 293-301.
- Marin-Batista, J. D., Villamil, J. A., Rodriguez, J. J., Mohedano, A. F., & De la Rubia, M. A. (2019). Valorization of microalgal biomass by hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. *Bioresource technology*, 274, 395-402.
- Mathimani, T., & Mallick, N. (2018). A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel—key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 1103-1120.
- Matter, I. A., Bui, V. K. H., Jung, M., Seo, J. Y., Kim, Y. E., Lee, Y. C., & Oh, Y. K. (2019). Flocculation harvesting techniques for microalgae: a review. *Applied Sciences*, 9(15), 3069.

- Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A., & El Salous, A. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160, 112260.
- Mendiburu, A. Z., Lauermann, C. H., Hayashi, T. C., Mariños, D., da Costa, R. B. R., Coronado, C. J., ... & de Carvalho Jr, J. A. (2022). Ethanol as a renewable biofuel: Combustion characteristics and application in engines. *Energy*, 124688..
- Mennaa, F. Z., Arbib, Z., & Perales, J. A. (2019). Urban wastewater photobiotreatment with microalgae in a continuously operated photobioreactor: growth, nutrient removal kinetics and biomass coagulation–flocculation. *Environmental technology*, 40(3), 342-355.
- Miao, X., & Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology*, 97(6), 841-846.
- Misra, R., Guldhe, A., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2014). Electrochemical harvesting process for microalgae by using nonsacrificial carbon electrode: A sustainable approach for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 255, 327-333
- Mo, W., Soh, L., Werber, J. R., Elimelech, M., & Zimmerman, J. B. (2015). Application of membrane dewatering for algal biofuel. *Algal research*, 11, 1-12.
- Mohan, S. V., Babu, V. L., & Sarma, P. N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource technology*, 99(1), 59-67.
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S. S., & Thatoi, H. (2017). Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass–A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1007-1032.
- Mussnug, J. H., Thomas-Hall, S., Rupprecht, J., Foo, A., Klassen, V., McDowall, A., ... & Hankamer, B. (2007). Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion. *Plant biotechnology journal*, 5(6), 802-814.
- Nagarajan, D., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2020). Pretreatment of microalgal biomass for efficient biohydrogen production–Recent insights and future perspectives. *Bioresource technology*, 302, 122871.
- Najjar, Y. S., & Abu-Shamleh, A. (2020). Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. *Algal Research*, 51, 102046.
- Naveena, B., Armshaw, P., & Tony Pembroke, J. (2015). Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-13.
- NEMcovA, Y. V. O. N. N. E., & Kalina, T. (2000). Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).(With 14 figures in the text). *Archiv für Hydrobiologie-Supplementband Only*, 136, 95-106.

- Neto, A. C., Guimarães, M. J. O., & Freire, E. (2018). Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. *Journal of cleaner production*, 184, 168-178.
- Ngamsirisomsakul, M., Reungsang, A., Liao, Q., & Kongkeittakajorn, M. B. (2019). Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Renewable Energy*, 141, 482-492.
- Okafor, P. C., Osabor, V. I., & Ebenso, E. E. (2007). Eco-friendly corrosion inhibitors: inhibitive action of ethanol extracts of *Garcinia kola* for the corrosion of mild steel in H₂SO₄ solutions. *Pigment & Resin Technology*.
- Okoro, V., Azimov, U., Munoz, J., Hernandez, H. H., & Phan, A. N. (2019). Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109364.
- Olia, M. S. J., Azin, M., & Moazami, N. (2022). Application of a statistical design to evaluate bioethanol production from *Chlorella* S4 biomass after acid-Thermal pretreatment. *Renewable Energy*, 182, 60-68.
- Osawa, F., Fujii, T., Nishida, T., Tada, N., Ohnishi, T., Kobayashi, O., ... & Yoshida, S. (2009). Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, 26(9), 485-496.
- Özdemir, Z. Ö., & Gündüğer, K. (2019). Birinci, İkinci Nesil Biyoetanol Üretimi ve Türkiye'deki Biyoetanol Üretiminin Durumu & Kapasitesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(3), 1290-1298.
- Park, W. K., Moon, M., Kwak, M. S., Jeon, S., Choi, G. G., Yang, J. W., & Lee, B. (2014). Use of orange peel extract for mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*: increased production of biomass and FAMES. *Bioresource technology*, 171, 343-349.
- Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2018). Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81-94.
- Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.
- Pumphrey, J. A., Brand, J. I., & Scheller, W. A. (2000). Vapour pressure measurements and predictions for alcohol–gasoline blends. *Fuel*, 79(11), 1405-1411.
- Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., ... & Zhang, J. (2018). Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings. *Bioresource technology*, 268, 355-362.
- Racharaks, R., Ge, X., & Li, Y. (2015). Cultivation of marine microalgae using shale gas flowback water and anaerobic digestion effluent as the cultivation medium. *Bioresource Technology*, 191, 146-156.
- Rahman, Q. M., Zhang, B., Wang, L., Joseph, G., & Shahbazi, A. (2019). A combined fermentation and ethanol-assisted liquefaction process to produce biofuel from *Nannochloropsis* sp. *Fuel*, 238, 159-165.

- Rakesh, S., TharunKumar, J., Sri, B., Jothibas, K., & Karthikeyan, S. (2020). Sustainable cost-effective microalgae harvesting strategies for the production of biofuel and oleochemicals. *Highlights in bioscience*, 3(July), 1-8.
- Ramírez, C. (1953). Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos. *Microbiol Española*, 6, 249-53.
- Rastogi, M., and Shrivastava, S. 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80; 330-340.
- Rehman, Z. U., & Anal, A. K. (2019). Enhanced lipid and starch productivity of microalga (*Chlorococcum* sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production. *Biotechnology Reports*, 21, e00298.
- Rodriguez-Garcia, I., & Guil-Guerrero, J. L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food chemistry*, 108(3), 1023-1026.
- Rogers, P. L., Jeon, Y. J., Lee, K. J., & Lawford, H. G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Biofuels*, 263-288.
- Richmond, A. (Ed.). (1986). *CRC Handbook of microalgal mass culture* (pp. 1-528). Boca Raton: CRC press.
- Richmond, A. (2003). Growth characteristics of ultrahigh-density microalgal cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 8(6), 349-353.
- Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., ... & Allakhverdiev, S. I. (2017). Biofuel production: challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8450-8461.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Roy, M., & Mohanty, K. (2019). A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. *Algal Research*, 44, 101683.
- Rubatzky, V. E., Quiros, C. F., & Simon, P. W. (1999). *Carrots and related vegetable Umbelliferae*. CABI publishing.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., & Castro, E. (2008). Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and microbial technology*, 42(2), 160-166.
- Saeedeh Movaghar Khoshkho, Majid Mahdavian, Fatemeh Karimi, Hassan Karimi-Maleh, Parisa Razaghi. (2022). Production of bioethanol from carrot pulp in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* and beet molasses inoculum; a biomass based investigation. *Chemosphere* 286, 131688.

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W. H., & Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable energy*, 37(1), 19-27.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... & Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, 1(1), 20-43.
- Schirwitz, K., Schmidt, A., & Lamzin, V. S. (2007). High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Science*, 16(6), 1146-1156.
- Shamzi Mohamed, M., Zee Wei, L., & B Ariff, A. (2011). Heterotrophic cultivation of microalgae for production of biodiesel. *Recent patents on biotechnology*, 5(2), 95-107.
- Sharma, H. K., Kaur, J., Sarkar, B. C., Singh, C., & Singh, B. (2009). Effect of pretreatment conditions on physicochemical parameters of carrot juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(1), 1-9.
- Sharma, R., Singh, G. P., & Sharma, V. K. (2012a). Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3(5), 1-6.
- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., & Attri, S. (2012b). Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *Journal of food science and technology*, 49(1), 22-32.
- Shi, N., Liu, D., Huang, Q., Guo, Z., Jiang, R., Wang, F., ... & Wen, F. (2019). Product-oriented decomposition of lignocellulose catalyzed by novel polyoxometalates-ionic liquid mixture. *Bioresource technology*, 283, 174-183.
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, 200, 380-386.
- Shu, C. H., & Tsai, C. C. (2016). Enhancing oil accumulation of a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* using fish waste hydrolysate. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 67, 377-384.
- Sikarwar, V. S., Zhao, M., Fennell, P. S., Shah, N., & Anthony, E. J. (2017). Progress in biofuel production from gasification. *Progress in Energy and Combustion Science*, 61, 189-248.
- Silva, C. E., & Bertucco, A. (2016). Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. *Process Biochemistry*, 51(11), 1833-1842.

- Singh, A., & Olsen, S. I. (2011). A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. *Applied Energy*, 88(10), 3548-3555.
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, 217, 499-508.
- Singh, R., Upadhyay, A. K., Singh, D. V., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2019). Photosynthetic performance, nutrient status and lipid yield of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum humicola* under UV-B exposure. *Current Research in Biotechnology*, 1, 65-77.
- Sirohi, R., Pandey, J. P., Singh, A., Sindhu, R., Lohani, U. C., Goel, R., & Kumar, A. (2020). Acid hydrolysis of damaged wheat grains: Modeling the formation of reducing sugars by a neural network approach. *Industrial crops and products*, 149, 112351.
- Sirohi, R., Ummalyma, S. B., Sagar, N. A., Sharma, P., Awasthi, M. K., Badgujar, P. C., ... & Pandey, A. (2021). Strategies and advances in the pretreatment of microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*, 341, 63-75.
- Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2018). Utilization of microalgae feedstock for concomitant production of bioethanol and biodiesel. *Fuel*, 217, 458-466.
- Soares, J., Kriiger Loterio, R., Rosa, R. M., Santos, M. O., Nascimento, A. G., Santos, N. T., ... & Arêdes Martins, M. (2018). *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. *Annals of Microbiology*, 68(1), 35-45.
- Soh, L., Lane, M. K. M., Xiang, J., Kwan, T. A., & Zimmerman, J. B. (2018). Carbon dioxide mediated transesterification of mixed triacylglyceride substrates. *Energy & Fuels*, 32(9), 9624-9632.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R., & Halvorsen, K. E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and bioenergy*, 31(6), 416-425.
- Sticklen, M. B. (2007). Feedstock crop genetic engineering for alcohol fuels. *Crop science*, 47(6), 2238-2248.
- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316-4342.
- Sun, C., Xia, A., Liao, Q., Fu, Q., Huang, Y., Zhu, X., ... & Murphy, J. D. (2018). Improving production of volatile fatty acids and hydrogen from microalgae and rice residue: effects of physicochemical characteristics and mix ratios. *Applied Energy*, 230, 1082-1092.
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109361.
- Surbhi, S., Verma, R. C., Deepak, R., Jain, H. K., & Yadav, K. K. (2018). A review: Food, chemical composition and utilization of carrot (*Daucus carota* L.) pomace. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 2921-2926.

- Szambelan, K., Nowak, J., Szwengiel, A., Jelen, H., Łukaszewski, G., 2018. Separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation methods in bioethanol production and formation of volatile by-products from selected corn cultivars. *Ind. Crops Prod.* 118, 355-361.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2(3), 472-499.
- Takeda, H. (1991). Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 27(2), 224-232.
- Tandon, P., & Jin, Q. (2017). Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 1089-1099.
- Tarif, H. T. (2000). CRC handbook of chemistry and physics.
- Tokgoz, S. (2019). The food-fuel-fiber debate. In *Biofuels, Bioenergy and Food Security* (pp. 79-99). Academic Press.
- Tomas-Pejo, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M., & Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1122-1131.
- Tomei, J., & Helliwell, R. (2016). Food versus fuel? Going beyond biofuels. *Land use policy*, 56, 320-326.
- Torres, D. M., Araújo, A. L. C., de Oliveira, R., & de Brito, A. C. (2017). Dissolved air flotation (DAF) for biomass recovery from algal ponds. *Water Practice and Technology*, 12(3), 534-540.
- Udayan, A., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B. I., & Sim, S. J. (2022). Mass cultivation and harvesting of microalgal biomass: Current trends and future perspectives. *Bioresource technology*, 344, 126406.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, 2(1), 012701.
- Ummalyma, S. B., Gnansounou, E., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Sahoo, D. (2017). Bioflocculation: an alternative strategy for harvesting of microalgae—an overview. *Bioresource technology*, 242, 227-235.
- Ummalyma, S. B., Supriya, R. D., Sindhu, R., Binod, P., Nair, R. B., Pandey, A., & Gnansounou, E. (2019). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—Current trends and future perspectives. In *Second and third generation of feedstocks* (pp. 197-212).
- Valladares-Diestra, K. K., de Souza Vandenberghe, L. P., Torres, L. A. Z., Nishida, V. S., Zandoná Filho, A., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R. (2021). Imidazole green solvent pre-treatment as a strategy for second-generation bioethanol production from sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 420, 127708.

- Valladares-Diestra, K. K., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2022). A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk. *Bioresource Technology*, 346, 126635.
- Van Zyl, W. H., Chimphango, A. F. A., Den Haan, R., Görgens, J. F., & Chirwa, P. W. C. (2011). Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. *Interface Focus*, 1(2), 196-211.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Sáenz-Galindo, A., CervantesCisneros, D.E., Aguilar, C.N., Ruiz, H.A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Res. J.* 17, 780–791.
- Vitova, M., Bisova, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 33(6), 1204-1218.
- Voegele, E. (2019). IEA predicts growth in global ethanol production through 2023.
- Wang, S. K., Wang, F., Hu, Y. R., Stiles, A. R., Guo, C., & Liu, C. Z. (2014). Magnetic flocculant for high efficiency harvesting of microalgal cells. *ACS applied materials & interfaces*, 6(1), 109-115.
- Windholz, M., Budavari, S., Stroumstos, L. Y., & Fertig, M. N. (1976). *The Merck index. An encyclopedia of chemicals and drugs* (No. 9th edition).
- Wirth, R., Pap, B., Böjti, T., Shetty, P., Lakatos, G., Bagi, Z., ... & Maróti, G. (2020). *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 557572.
- Wistara, N. J., Pelawi, R., and Fatriasari, W. 2016. The effect of lignin content and freeness of pulp on the bioethanol productivity of Jabon wood. *Waste and biomass valorization*, 7(5); 1141-1146.
- Wyman, C. (1996). *Handbook on bioethanol: production and utilization*. CRC press.
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E., & Viikari, L. (2005). Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, 1, 1023-1062.
- Wyman, C. E., Cai, C. M., & Kumar, R. (2019). Bioethanol from lignocellulosic biomass. In *Energy from organic materials (biomass)* (pp. 997-1022). Springer, New York, NY.
- Xiros, C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2016). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Advances in bioenergy: the sustainability challenge*, 11-31.
- Yamada, T., & Sakaguchi, K. (1982). Comparative studies on *Chlorella* cell walls: Induction of protoplast formation. *Archives of Microbiology*, 132(1), 10-13.
- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117(4), 257-264.

- Yamamoto, M., Kurihara, I., & Kawano, S. (2005). Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221(6), 766-775.
- Yang, L., Zhang, H., Cheng, S., Zhang, W., & Zhang, X. (2020). Enhanced microalgal harvesting using microalgae-derived extracellular polymeric substance as flocculation aid. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(10), 4069-4075.
- Yasin, N. H. M., Shafei, N. I., Rushan, N. H., Sepian, N. R. A., & Said, F. M. (2019). The effect of microalgae harvesting on lipid for biodiesel production. *Materials Today: Proceedings*, 19, 1582-1590.
- Ye, J., Yang, C., Xia, L., Zhu, Y., Liu, L., Cao, H., & Tao, Y. (2023). Protoplast Preparation for Algal Single-Cell Omics Sequencing. *Microorganisms*, 11(2), 538.
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource technology*, 105, 120-127.
- Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., & Khan, M. M. (2021). Pretreatment and optimization of reducing sugar extraction from indigenous microalgae grown on brewery wastewater for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15.
- Yoo, G., Park, M. S., & Yang, J. W. (2015). Chemical pretreatment of algal biomass. *Pretreatment of biomass*, 227-258.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751-774.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.
- Zhang, D. H., & Lee, Y. K. (1999). Ketocarotenoid production by a mutant of *Chlorococcum* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *Biotechnology letters*, 21(1), 7-10.
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., & Jérôme, F. (2012a). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.
- Zhang, Y., Fu, X., & Chen, H. (2012b). Pretreatment based on two-step steam explosion combined with an intermediate separation of fiber cells-optimization of fermentation of corn straw hydrolysates. *Bioresource Technology*, 121, 100-104.
- Zhang, X., Wang, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2016). Harvesting microalgal biomass using magnesium coagulation-dissolved air flotation. *Biomass and Bioenergy*, 93, 43-49.
- Zhao, X., Luo, K., Zhang, Y., Zheng, Z., Cai, Y., Wen, B., ... & Wang, X. (2018). Improving the methane yield of maize straw: focus on the effects of

pretreatment with fungi and their secreted enzymes combined with sodium hydroxide. *Bioresource technology*, 250, 204-213.

Zheng, Y., Pan, Z., & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International journal of agricultural and biological engineering*, 2(3), 51-68.

Ziolkowska, J. R. (2020). Biofuels technologies: An overview of feedstocks, processes, and technologies. *Biofuels for a more sustainable future*, 1-19.

Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press.

