

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROALGAL BİYOETANOL ÜRETİMİNDE
GIDA ATIKLARININ KULLANIMI

Irem KASAP

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROALGAL BİYOETANOL ÜRETİMİNDE GIDA ATIKLARININ KULLANIMI

Irem KASAP

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Mikroalgler biyoetanol üretiminde umut vaat eden ham maddelerdir. Bu bağlamda, mikroalglerden biyoetanol üretim sürecinin farklı yöntemlerle optimize edilerek nihai verimin artırılması gerekmektedir. Tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii* ve *Kluyveromyces marxianus* gibi mayaların 0.5 g/L havuç şekeri içeren BG-11 ortamında fotoheterotrofik koşullarda geliştirilen *Chlorella vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretim potansiyelleri ve soğan kabuğu atığı gibi düşük maliyetli gıda atıklarının fermantasyon iyileştirme potansiyeli araştırılmıştır. Yerel mayalar arasında *K. marxianus* en yüksek biyoetanol üretimi gerçekleştirmiştir. Bu kapsamda, biyoetanol konsantrasyonunu ve verimini artırmak amacıyla, farklı başlangıç biyokütle konsantrasyonları (50 g/L, 100 g/L, 200 g/L), soğan kabuğu atığı konsantrasyonları (%1-%5) ve mineral tuz ile azot kaynağı takviyeleri (pepton, maya ekstraktı, MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, ZnSO₄) optimize edilmiştir. 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu ve %3 soğan kabuğu takviyesinin fermantasyon ortamına eklenmesi ile biyoetanol üretiminde 4.29 ± 0.25 g/L'den 6.98 ± 0.12 g/L'ye, biyoetanol üretkenliğinde ise 0.36 g/L.h'den 0.58 g/L.h'ye artış elde edilmiştir. Bu çalışma, *K. marxianus*'un mikroalgal şekerleri metabolize etmedeki yüksek potansiyelini ve gıda atıklarının fermantasyon ortamında düşük maliyetli besin kaynağı olarak kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu öne sürmüştür.

Mayıs 2024, 73 sayfa

Anahtar kelimeler: biyoetanol, fermantasyon, mikroalg, gıda atıkları

ABSTRACT

Master Thesis

UTILIZATION OF FOOD WASTE IN MICROALGAL BIOETHANOL PRODUCTION

Irem KASAP

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

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Microalgae are promising raw materials in bioethanol production. In this context, it is necessary to increase the final yield by optimizing the bioethanol production process from microalgae with different methods. In the thesis study, the bioethanol production potential of local yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii* and *Kluyveromyces marxianus* from *Chlorella vulgaris* biomass cultivated under photoheterotrophic conditions in BG-11 medium containing 0.5 g/L carrot sugar and the fermentation improvement potential of low-cost food wastes such as onion peel waste were investigated. Among the local yeasts, *K. marxianus* produced the highest bioethanol concentration. In this context, in order to increase bioethanol concentration and yield, different initial biomass concentrations (50 g/L, 100 g/L, 200 g/L), onion peel waste concentrations (1%-5%) and supplements of mineral salts and nitrogen sources (peptone, yeast extract, MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, ZnSO₄) were optimized. With an initial biomass concentration of 200 g/L and the addition of 3% onion peel to the fermentation medium, bioethanol production increased from 4.29 ± 0.25 g/L to 6.98 ± 0.12 g/L, and bioethanol productivity increased from 0.36 g/L.h to 0.58 g/L.h. This study suggested the high potential of *K. marxianus* in metabolizing microalgal sugars and the high potential of using food waste as low-cost nutrient source in the fermentation process.

May 2024, 73 pages

Key Words: bioethanol, fermentation, microalgae, food waste

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle karşılaştığım zorluklarda bana yol gösteren ve bana ilham olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve engin bilgi ve tecrübeleriyle desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimi “Türkiye Bursları Lisansüstü Burs Programı” kapsamında desteklemiş olan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana destek olan, yardımını esirgemeyen değerli lisansüstü arkadaşlarım Aybüke KUT, Eda AÇIKEL ve diğer lisansüstü arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimde tanıdığım ilk günden beri benden manevi desteğini esirgemeyen, bana motivasyon veren çok değerli arkadaşım Elza İBRAHİMİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca verdiğim kararlarda arkamda duran, eğitimimi her zaman ön planda tutan sevgili babam Ercan KASAP'a, sevgili annem Aliye KASAP'a, sevgili ablam Ela KASAP'a, sevgili ağabeyim İsa KASAP'a sonsuz teşekkürlerimi sunar, yüksek lisans tezimi aileme ithaf etmeyi borç bilirim.

“Merhum kuzenim Sevil REXHEPI'nin anısına”

Irem KASAP
Ankara, Mayıs 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Etanol ve Özellikleri.....	4
2.2 Etanol Üretim Yöntemleri.....	5
2.3 Küresel Biyoetanol Üretimi.....	9
2.4 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ham Maddeler.....	11
2.4.1 Birinci nesil biyoetanol üretimi.....	12
2.4.3 Üçüncü nesil biyoetanol üretimi	13
2.4.4 Dördüncü nesil biyoetanol üretimi	14
2.5 Biyoetanol Fermantasyonunda Başlıca Kullanılan Mikroorganizmalar.....	14
2.5.1 Mayalar	14
2.5.2 Bakteriler	17
2.6 Fermantasyon Stratejileri	18
2.7 Mikroalglerin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	19
2.8 Mikroalglerin Gelişimin Etkileyen Faktörler.....	20
2.9 Kültivasyon Sistemleri.....	22
2.10 Kültivasyon Stratejileri	24
2.10.1 Fotoototrofik kültürasyon	24
2.10.2 Heterotrofik kültürasyon	25
2.10.3 Fotoheterotrofik kültürasyon	26
2.10.4 Miksotrofik kültürasyon	26
2.11 Mikroalglerin Hasat Edilmesinde Kullanılan Yöntemler	26
2.12 Mikroalgal Biyokütlenin Parçalanmasında Uygulanan Ön İşlem Yöntemleri.....	29

2.12.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön işlem yöntemleri	30
2.1.2.2 Kimyasal ön işlem yöntemleri	32
2.12.3 Biyolojik ön işlem yöntemleri.....	33
2.13 Mikroalgal Biyoetanol Üretimi ile İlgili Yapılan Bazı Literatür Çalışmaları	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Materyal	39
3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar	39
3.1.1.1 Mikroalg ve kültürasyon koşulları	39
3.1.1.2 Mayalar ve inkübasyon koşulları	39
3.1.2 Kullanılan gıda atıkları	40
3.2 Yöntem	40
3.2.1 Mikroalg biyokütlesinden fermente edilebilir şekerlerin eldesi	40
3.2.2 Fermantasyon deneyleri	41
3.2.2.1 En yüksek biyoetanol üretimi gerçekleştiren mayanın belirlenmesi.....	41
3.2.2.2 <i>C. vulgaris</i> başlangıç biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi	42
3.2.2.3 SKA'nın fermantasyon sürecindeki etkisi	42
3.2.2.4 Farklı fermantasyon ortamlarının biyoetanol üretimi açısından karşılaştırılması	42
3.2.3 Analitik yöntemler	42
3.2.3.1 Etanol konsantrasyonlarının ölçülmesi.....	42
3.2.3.2 İndirgen şeker konsantrasyonlarının ölçülmesi	43
3.2.3.3 Mikrobiyal gelişimin spektrofotometrik tayini	43
3.2.3.4 Kinetik parametrelerin hesaplanması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
4.1 <i>C. Vulgaris</i> Biyokütlesinden Biyoetanol Eldesi İçin En Uygun Mayanın Belirlenmesi	45
4.2 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Mikroalgal Biyoetanol Üretimine Etkisi.....	46
4.3 SKA'nın Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimine Etkisi	47
4.4 Farklı Fermantasyon Ortamlarının Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimi Açısından Karşılaştırılması.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
5.1 <i>C. vulgaris</i> Biyokütlesinden Biyoetanol Eldesi için En Uygun Mayanın Belirlenmesi.....	51

5.2 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Mikroalgal Biyoetanol Üretimine Etkisi	51
5.3 SKA'nın Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimine Etkisi	52
5.4 Farklı Fermantasyon Ortamlarının Biyoetanol Üretimi Açısından Karşılaştırılması	54
5.5 Sonuç ve Öneriler	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	73



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ATP	Adenozin trifosfat
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
Cm	Santimetre
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	Kobalt(II) nitrat heksahidrat
CO ₂	Karbondioksit
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
g	Gram
h	Saat
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
H ₃ BO ₃	Borik asit
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
Kg	Kilogram
m ³	Metreküp
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
MnCl ₂ · 4H ₂ O	Mangan (II) Klorür tetrahidrat
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Sodyum molibdat dihidrat
NaNO ₃	Sodyum nitrat
Nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
rpm	Dakikadaki devir
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

DNS	Dinitrosalisilik Asit
ED	Entner-Doudoroff Yolağı
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas Yolağı
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
PPP	Pentoz Fosfat Yolağı
PSSF	Ön Sakrifikasyon ve Eş Zamanlı Fermantasyon
SHF	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon
SKA	Soğan Kabuğu Atığı
SSCF	Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-fermentasyon
SSF	Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikolitik yol izi	7
Şekil 2.2 Entner-Doudoroff (ED)glikolitik yol izi	8
Şekil 2.3 Pentoz fosfat metabolik yol izi	9
Şekil 2.4 Mikroalglerin hücre duvarı yapısı.....	30
Şekil 4.1 <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> ve <i>C. boidinii</i> 'nin biyoetanol konsantrasyonları .	46
Şekil 4.2 50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında başlangıç indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonları	47
Şekil 4.3 Farklı SKA konsantrasyonlarının <i>K. Marxianus</i> 'un mikrobiyal gelişimi üzerindeki etkisi.....	48
Şekil 4.4 Farklı SKA konsantrasyonlarında fermantasyonun 6. Ve 12. Saatinde biyoetanol konsantrasyonlarının karşılaştırılması	49
Şekil 4.5 <i>K. marxianus</i> 'un farklı fermantasyon takviyeleri içeren besiyerleri varlığında biyoetanol üretiminin karşılaştırılması Ön işlem koşulları.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1 Fermantasyon deneylerinin kinetik parametre sonuçları	55
---	----



1. GİRİŞ

Enerji, günümüzde nüfus artışı ve insanoğlunun yaşayış biçimi nedeniyle hayatımızın en temel, fakat karşılanması bir o kadar zorlaşan ihtiyaçlarından biri haline gelmiştir. Fosil yakıtlar bu ihtiyacı karşılamada gerek ekonomik gerekse çevresel nedenlerden dolayı yetersiz kalmaktadır. Bu sorunun çözülmesinde yenilenebilir enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır (Lane ve Morrissey 2010; Carvalho vd. 2021).

Günümüzde en yaygın kullanılan biyoyakıtlardan biri biyoetanoldür. Sürdürülebilir ve çevre dostu bir gelecek vaat eden bu biyoyakıt, birçok farklı ham maddeden üretilmekle birlikte fosil yakıtlara nazaran çok daha az toksiktir ve çevre dostudur. Biyoetanol, benzine alternatif olarak veya benzinle çeşitli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. Yüksek oktan sayısına sahip olması nedeniyle yakıt olarak kullanımı yüksek buharlaşma ısı ve motor verimliliğine yol açmaktadır. Bu avantajlarından dolayı biyoetanol birçok farklı alanda tercih edilen bir biyoyakıttır (Hans vd. 2019; Xiang vd. 2022).

Biyoetanol üretimi, kullanılan ham madde tipine göre dört kategoriye ayrılmaktadır. Birinci nesil biyoetanol üretiminde ham madde olarak gıda ürünleri, ikinci nesilde lignoselülozik ham maddeler, üçüncü nesilde siyanobakteriler ve mikroalgler gibi fotosentetik mikrobiyal ham madde ve dördüncü nesilde genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar ve ham maddeler kullanılmaktadır (Jafari Olia vd. 2022; Cavellius vd. 2023). Diğer ham madde tiplerinden farklı olarak ekilebilir tarım arazilerine ve doğal kaynak sularına ihtiyaç duymayan, düşük maliyetli besin kaynakları kullanılarak geliştirilebilen, yüksek büyüme oranları ve karbonhidrat içeriğine sahip olan mikroalgler, biyoetanol üretiminde umut vaat eden ham madde kaynaklarıdır (Bader vd. 2020).

Mikroalgler farklı sucul habitatlarda yaşayan, ökaryotik, fotosentetik mikroorganizmalardır (Vale vd. 2020). Mikroalgler fotoototrofik, heterotrofik, fotoheterotrofik ve miksotrofik olmak üzere farklı koşullarda geliştirilebilirler. Kültivasyon sırasında kullanılan enerji ve besin kaynakları mikroalglerin biyokütle üretkenliğini, dolayısıyla üretilen biyoyakıtın nihai konsantrasyonunu ve kalitesini

etkilemektedir (Ghaffar vd. 2023). Bu kültivasyon tiplerinin arasında fotoheterotrofik kltivasyonun kullanımı oldukça avantajlıdır.

Fotoheterotrofik kültivasyonda enerji kaynağı ışık, karbon kaynağı ise organik bileşiklerdir. Kültivasyon ortamında organik bileşiklerin mevcudiyeti mikroalglerde biyokütle birikimini desteklemektedir (Abreu vd. 2022). Fakat mikroalgal biyoetanol üretimindeki en önemli dezavantaj, mikroalgal gelişim için gerekli olan organik bileşiklerin ve su ihtiyacının kültivasyon maliyetini önemli ölçüde artırmasıdır (Acebu vd. 2022).

Mikroalgal gelişim için gerekli organik bileşikler kültivasyon ortamına gıda atıkların eklenmesiyle sağlanabilmektedir. Gıda atıkları oldukça yaygın atıklardır ve bertarafı yakılarak veya depolanarak gerçekleşse de bu yöntemler çevresel sorunları da beraberinde getirmektedir. Fakat gıda atıkları yüksek besin içeriğine sahiptir ve birçok alanda kullanılabilmektedir (Talan vd. 2021).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu'na göre dünyada üretilen tüm gıdaların yaklaşık üçte biri kaybolmakta veya israf edilmektedir. Bu oran her yıl yaklaşık 1,3 milyar ton gıdaya eşdeğerdır. Ülkemizde ise, birleşmiş Milletler Gıda Atığı Index Raporu'na (2021) göre atıkların 7,7 milyon tonu gıda atıklarıdır. Bu veriler, ülkemizde atık yönetimine yönelik çalışmaların artırılması ihtiyacını vurgulamaktadır. Bu nedenle, tez çalışmasında havuç atıkları *Chlorella vulgaris*'in fotoheterotrofik kltivasyonunda organik karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Havuç (*Daucus carota*), ülkemizde yüksek miktarda endüstriyel üretimi olan bitkisel bir üründür. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre, ülkemizde 2023 yılı havuç üretimi 778 bin tondur. Havucun lkemizde yüksek miktarda üretimi, tez çalışmasında havuç atıklarının kullanımını avantajlı kılmaktadır.

Tez çalışmasında, havuç posası yanı sıra bir diğer yaygın gıda atığı olan soğan kabuğu atığı (SKA) kullanılmıştır. Soğan (*Allium cepa L.*) dünyada en çok yetiştirilen sebzelerden biridir. Giderek artan insan nüfusuna bağlı olarak, soğan üretimi de bu talebi karşılamak amacıyla her yıl artış göstermektedir. Üretimdeki bu artış, soğan atıklarını da

beraberinde getirerek CO₂ emisyonlarına neden olmakta ve çevreye zarar vermektedir (Hsueh vd. 2023). Soğan kabuğu, bertarafı yüksek maliyetli, yaygın bir atıktır. Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, S²⁻, K⁺, ve P³⁻ gibi elementlerle ve kuersetin gibi flavonoidlerle zengin olması (Tawfik vd. 2022; Hsueh vd. 2023) nedeniyle fermantasyon takviyesi olarak kullanılarak maya gelişimini destekleme potansiyeli incelenmiştir. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü 2023 verilerine göre, ülkemizde yıllık ortalama 2,6 milyon ton soğan üretimi yapılmaktadır. SKA'nın kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi, atık yönetimi konusunda avantaj sağlamak ve biyoetanol fermantasyonunun iyileştirilmesinde umut vaat etmektedir.

Tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Candida boidinii* gibi yerel mayalar kullanılarak fotoheterotrofik ortamda geliştirilen *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretimi yapılmıştır. Bu çalışmada *K. marxianus* literatürde ilk kez mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, gıda atıkları biyoetanol üretiminin farklı aşamalarında kullanılmıştır. *C. vulgaris*'in fotoheterotrofik kültürasyonunda havuç posası organik karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Mikroalglerin fotoheterotrofik gelişiminde havuç posası gibi gıda atıklarının kullanımı ile ilgili literatür çalışmaları oldukça sınırlıdır. Buna ek olarak, SKA'nın fermantasyon iyileştirilmesinde kullanılması ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Etanol ve Özellikleri

Etanol, diğer adıyla etil alkol, C_2H_5OH kimyasal formülüne sahip, toksisitesi düşük, şeffaf, renksiz bir sıvıdır. Etanol aynı zamanda çok iyi bir organik solvent, antifriz ve dezenfektandır ve bu özellikleri sayesinde kozmetik endüstrisi, kimya endüstrisi ve ilaç endüstrisi gibi birçok sektörde kullanılmaktadır (Segovia-Hernández vd. 2022). Etanolün birçok farklı ham maddeden elde edilebilmesi, sürdürülebilir ve çevre dostu olması nedeniyle biyoyakıt olarak kullanımı da oldukça yaygındır (Farias ve Maugeri-Filho 2021; Segovia-Hernández vd. 2022).

Etanol, mikrobiyal fermantasyon ile biyolojik olarak üretildiğinde biyoetanol olarak adlandırılmaktadır. Etanol aynı zamanda sentetik olarak da üretilmektedir ve biyolojik yolla üretilen etanol ile benzer özelliklere sahiptir (Kannah vd. 2020). Biyoetanol gelecekte petrolün yerini alma potansiyeli yüksek bir biyoyakıttır. Bu sıvı yakıtın atıklar, mikroorganizmalar ve tarım mahsülleri gibi ham maddeler kullanılarak biyolojik yolla üretilmesi sürdürülebilir ve çevre dostu bir gelecek için umut vaat etmektedir (Kassim vd. 2021). Biyoetanol aynı zamanda benzine belirli oranlarda eklenerek kullanılmaktadır. Biyoetanol ve benzinin karıştırılması karbon monoksit ve nitrojen oksit gibi sera gazlarının emisyonlarını azaltmada rol oynamaktadır (Xiang vd. 2022; Wang vd. 2023)

Etanolün molekül ağırlığı 46.07 g/mol, oktan sayısı 109, kaynama noktası 78.5°C, oksijen içeriği 34.7, yoğunluğu 795 kg/m³'tür (X. Wang vd. 2022). Bu fiziksel ve kimyasal özellikler benzinin özellikleriyle karşılaştırıldığında etanol daha yüksek oktan sayısına, daha yüksek oksijen içeriğine, daha düşük kaynama noktasına ve daha yüksek buharlaşma ısısına sahiptir. Yüksek oktan sayısı erken ateşlemeyi kolaylaştırmakta ve motor vuruntusunun önlenmesini sağlamaktadır. Etanol benzine belirli oranlarda eklendiğinde yüksek oksijen içeriğinden dolayı benzinin daha fazla yanmasına sebep olmakla birlikte, yanmamış hidrokarbon, azot oksit ve karbon monoksit emisyonlarını da azaltmaktadır.

Tüm bu özellikleri, etanolü daha çevre dostu bir yakıt yapmaktadır (Sawarkar vd. 2022; Wang vd. 2023).

Biyoetanol ve benzin karışımlarının kullanımının avantajları yanı sıra dezavantajları da mevcuttur. Etanol-benzin karışımlardaki etanol içeriğinde suyun neden olduğu motor korozyonunu önlemek adına kısıtlamalar mevcuttur. Ayrıca, etanol ve benzinin farklı yanma ısılarına sahip olması, karıştırıldıklarında benzinin tek başına kullanılmasına göre daha düşük litre başına kilometre performansına neden olmaktadır. Bu dezavantajlardan dolayı, biyoetanol kullanımını arttırmak ve enerji talebini karşılamak adına bu alanda daha fazla çalışmaların yapılması önem arz etmektedir (Xiang vd. 2022).

2.2 Etanol Üretim Yöntemleri

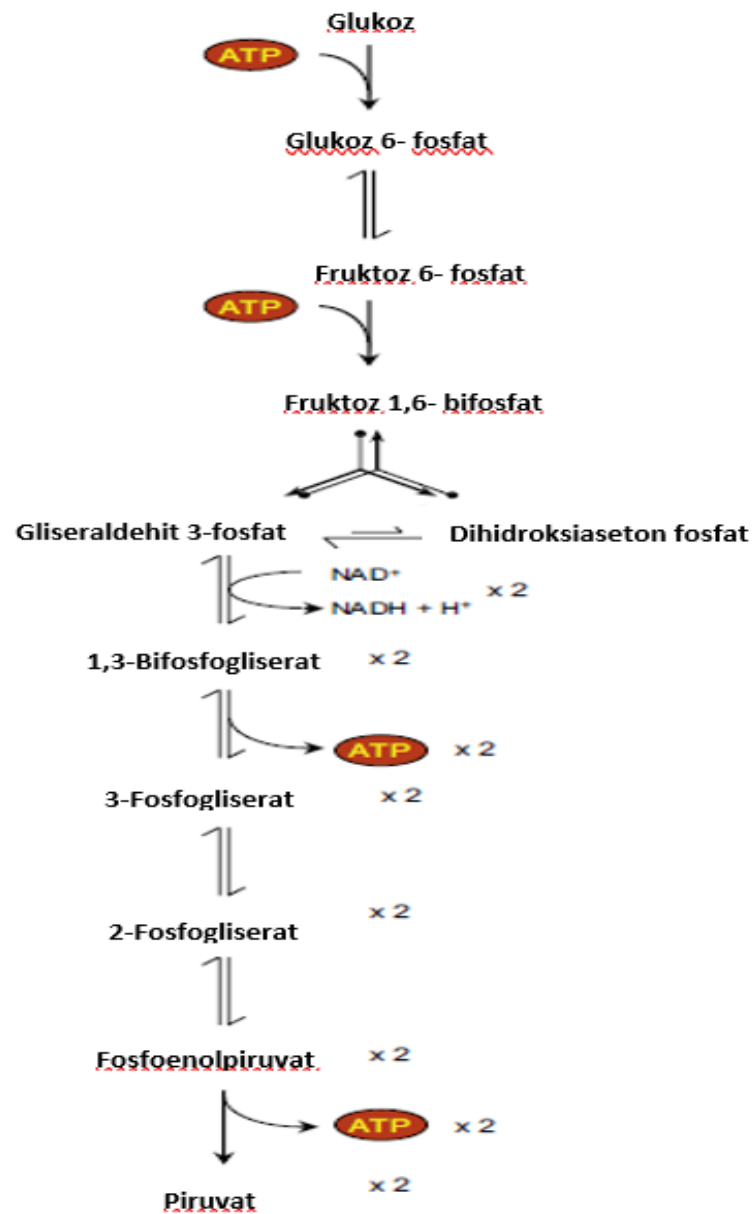
Etanol, petrokimyasal ve biyolojik olmak üzere iki şekilde üretilmektedir. Petrokimyasal olarak etanol, etilenin hidrasyonu sonucu üretilmektedir. Petrol endüstrisinin yan ürünü olan etilenin hidrasyonu ise direkt hidrasyon ve indirekt hidrasyon metodları kullanılarak yapılmaktadır (Syaera Hidzir vd. 2014). Etilenin direkt hidrasyonu yüksek sıcaklık ve basınçta, fosforik asit gibi katalizörler varlığında gerçekleşmektedir. Etilenin indirekt hidrasyonu ise daha eski bir yöntemdir. Bu yöntemde etilenin konsantre sülfürik asitte emilimi gerçekleştirilir. Bu reaksiyon sonucunda etanol ile birlikte dietil eter gibi ürünler de oluşmaktadır (Küüt vd. 2018). Petrokimyasal üretim şekli petrol bazlı ham madde olarak kullanımını içerdiği için sürdürülebilir bir üretim şekli değildir (Wei vd. 2007). Etanolün petrokimyasal üretimi biyoçeşitlilik ve ekosistemler üzerinde birçok olumsuz etkiye sahiptir. Sürdürülebilir bir gelecek için, etanol üretiminde çevreci yaklaşımların kullanılması önem arz etmektedir (Segovia-Hernández vd. 2022).

Biyolojik etanol üretimi, mikroorganizmaların fermantasyon yoluyla etanol oluşturmaya dayanmaktadır. Bu süreçte kullanılan ham maddedeki pentozlar ve heksozlar gibi fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkması için öncelikle bir ön işlem yöntemi uygulanmaktadır. Biyoetanol üretiminde en yaygın olarak mayalar kullanılmakla birlikte bakteriler ve funguslar da kullanılmaktadır (Behera vd. 2022).

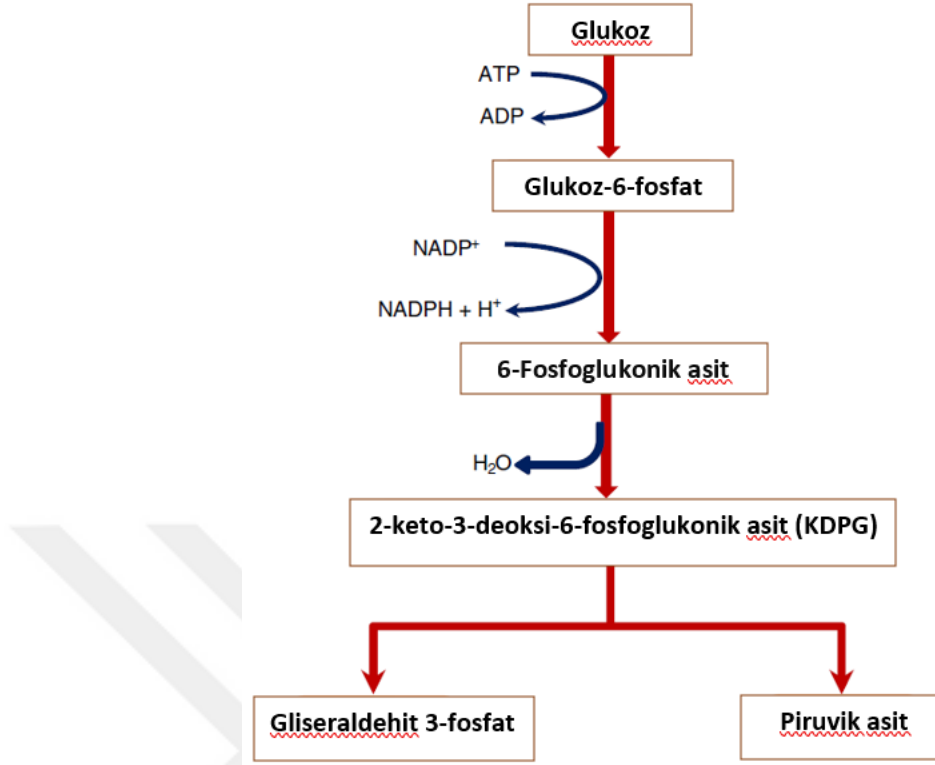
Biyoetanol fermantasyonunda ilk basamak glukozun piruvata okside edilmesidir. Bu süreç sonucunda açığa çıkan piruvat, piruvat dekarboksilaz enzimi ile önce asetaldehite, sonrasında alkol dehidrogenaz enzimi ile etanole dönüşmektedir. Anaerobik koşullarda gerçekleşen alkol fermantasyonunda 2 mol piruvattan 2 mol etanol ve 2 mol karbondioksit açığa çıkmaktadır (Behera vd. 2022; van Aalst vd. 2023).

Glukozun piruvata oksidasyonu için mikroorganizmalar tarafından kullanılan farklı metabolik yol izleri mevcuttur. Bu yol izlerinden biri Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikolitik yol izidir. Bu metabolik yol izi glukozun fosforile edilmesi ile başlar ve sonucunda glikoz-6-fosfat elde edilir. Bu molekül daha sonra fruktoz-6-fosfata dönüşür. Fruktoz-6-fosfat fruktoz-1,6-bifosfata dönüştürülür ve bu molekül sonrasında gliseraldehit-3-fosfat ve dihidroksiasetona dönüşmektedir. Bir dizi reaksiyon sonucunda üç karbonlu bir şeker olan gliseraldehit-3-fosfattan piruvat elde edilmektedir. EMP yol izinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda 1 mol glukozdan 2 mol ATP, 2 mol NADH ve 2 mol piruvat elde edilmektedir (Garrigues ve Salazar-Cerezo 2021).

Entner-Doudoroff (ED) biyoetanol üretiminde kullanılan bir başka metabolik yolaktır. Bu yolak *Zymomonas mobilis* tarafından kullanılan ve EMP yol izinden oldukça farklı bir yolaktır. *Z. mobilis*'de EMP yol izinin anahtar enzimlerinden biri olan fosfofruktokinaz enzimi bulunmadığından EMP yolağı ile glukozun piruvata okside edilmesi mümkün değildir. Dolayısıyla, glukozdan piruvata uzanan reaksiyonlar da farklılık göstermektedir. Entner-Doudoroff yol izinde piruvat 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat molekülünden direkt olarak ve EMP yol izine benzer şekilde gliseraldehit-3-fosfattan da indirekt olarak elde edilebilmektedir. Bu yol izinde 1 mol glukozdan yalnızca 1 mol ATP açığa çıkmaktadır (Wang vd. 2018; Xia vd. 2019).

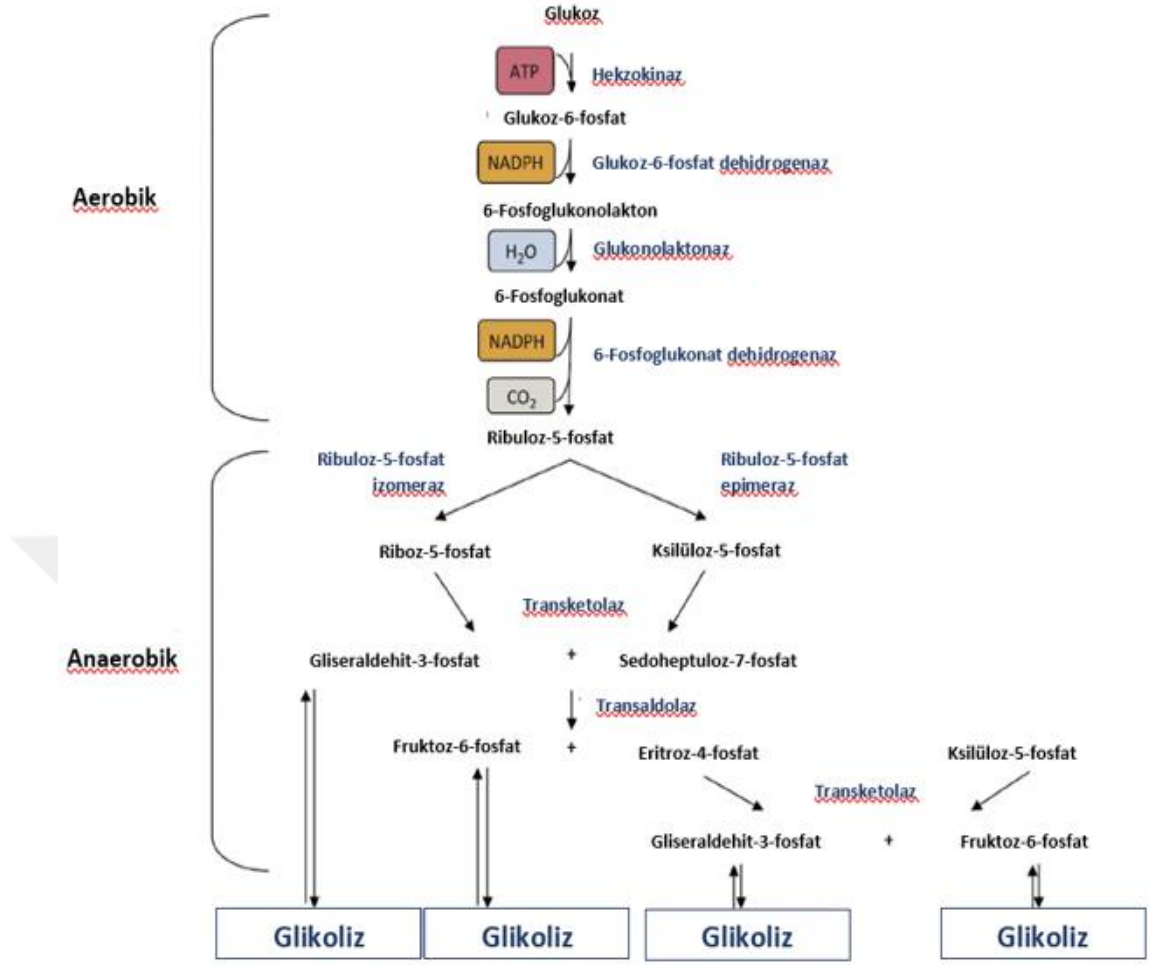


Şekil 2.1 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikolitik yol izi (Godbey 2022)



Şekil 2.2 Entner-Doudoroff (ED)glükolitik yol izi (Elbeshbishy 2014)

Biyoetanol üretiminde kullanılan bir diğer metabolik yolak ise ksiloz ve arabinoz gibi pentoz şekerlerin metabolize edildiği Pentoz fosfat (PPP) yol izidir. Bu yol izinde gerçekleşen reaksiyonlar oksidatif ve oksidatif olmayan reaksiyonlar şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Oksidatif reaksiyonlarda glukoz-6-fosfattan ribuloz-5-fosfatın üretimi için gerekli reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Oksidatif olmayan reaksiyonlar ise gliseraldehit-3-fosfat gibi glikolitik ara ürünlerin oluşumunu kapsamaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat sonrasında glikoliz sürecine katılarak gerekli reaksiyonlar sonucunda piruvata dönüşmektedir. Pentoz fosfat yol izi ATP üretmemesine rağmen mikroorganizma için önemli bir metabolik yol izidir. Oksidatif reaksiyonlar hücrel biyosentez için gerekli NADPH üretimini sağlarken, oksidatif olmayan reaksiyonlarda amino asit sentezi gibi birçok süreç için gerekli prekürsörlerin üretimi sağlanmaktadır (Patra ve Hay 2014; Rashida ve Laxman 2021; Zhou ve Lü 2021).



Şekil 2.3 Pentoz fosfat metabolik yol izi (Werner vd. 2016)

2.3 Küresel Biyoetanol Üretimi

Mevcut verilere göre günlük enerji ihtiyacı 200 milyon varil petrole eşdeğer olan dünyamızın enerji talebi giderek artmaktadır ve bu enerji talebinin %80'den fazlası fosil yakıtlardan karşılanmaktadır (Kusmiyati vd. 2023). Fakat, fosil yakıtlar çevreye zararlı, yenilenebilir olmayan ve rezervleri giderek azalan enerji kaynaklarıdır. Bu nedenle, bilim insanlarının biyoyakıtlar gibi yenilenebilir ve güvenli enerji kaynaklarına yönelik arayışları artmıştır (Azarpour vd. 2022). Bilim insanlarının yürüttükleri çalışmalar yanı sıra, ABD, Brezilya, Kanada, Çin ve birçok Avrupa ülkesi, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak ve yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyoetanol üretimini arttırmak

amacıyla çeşitli politikalar yürütmekte olup, bu bağlamda biyoetanole yönelik üretim hedefleri belirlemişlerdir (Zabed vd. 2017)

Günümüzde biyoyakıt sektörü biyoetanol tarafından domine edilmektedir. Fakat biyoetanolün içten yanmalı yakıt olarak kullanımı oldukça eskiye dayanmaktadır. 1900'lü yıllarda üretilen ve dünyanın ilk seri üretim arabası olan Ford Model T, biyoetanol ile çalışabilecek şekilde tasarlanmıştır (Walker, 2011). I. Dünya Savaşı'nda özellikle ABD'de yakıt ihtiyacının artmasıyla biyoetanol üretimine yoğun ilgi artmıştır. Savaş sonrasında motor yakıtı olarak benzin tercih edilse de biyoetanole karşı ilgi azalmamıştır. Biyoetanolün petrole bağımlılığı azaltma potansiyeli ve diğer birçok kullanım alanının olması popülerliğinin II. Dünya Savaşı'na kadar devam etmesine neden olmuştur. II Dünya Savaşı'nda yakıt kıtlığı nedeniyle etanol benzin ile karıştırılmaya başlanmış ve bu karışıma gazohol adı verilmiştir.

Fakat II. Dünya Savaşı'ndan sonra kurşunlu benzinin düşük maliyetli olması ABD'de biyoetanol üretimini sekteye uğratmış ve talep azalmıştır. 1970'li yıllarda Brezilya'nın biyoetanol kullanımına ilişkin programlar başlatmasıyla araçların %95 biyoetanol içeren yakıtla çalışması sağlanmıştır. Sonraki yıllarda şeker kıtlığı olması ve maliyetin artması nedeniyle biyoetanol üretimi düşse de biyoetanole ilgi azalmamıştır. Tüm bu gelişmelerle, ABD ve Brezilya günümüzde biyoetanol üretiminde lider konuma gelmişlerdir (Solomon vd. 2008; Niphadkar vd. 2018).

Yakın tarihteki global biyoetanol üretimi değerlendirildiğinde 2019 yılına kadar yükselişte olan biyoetanol üretimi, COVID-19 salgını nedeniyle sekteye uğramıştır. Salgın sırasında ulaşım için gerekli yakıtlara olan talebin azalması, üretimin ve kar oranlarının düşmesine neden olmuştur. Pandeminin yarattığı olumsuzluklara rağmen, 2021 yılında biyoetanol üretimi tekrar yükselişe geçmiştir (Mendiburu vd. 2022).

Renewable Fuels Association'a göre, 2022 yılında A.B.D. 15.400 milyon galon biyoetanol üretmiştir. Bu oran dünyadaki toplam biyoetanol üretiminin %55'ini kapsamaktadır. A.B.D.'den sonra 2022 yılında toplam üretimin %22'sini oluşturan 7.420 milyon galonluk bir üretimle Brezilya en çok biyoetanol üreten ikinci ülke konumunu

korumuştur. Avrupa Birliği ülkeleri ise toplam üretimin %5'ini oluşturan 1.330 milyon galonluk bir üretim gerçekleştirmişlerdir.

Günümüzde ülkelerin iklim değişikliği farkındalığı artmakta olup, insan faaliyetlerinin bu sürece olan katkısını azaltmayı hedefleyen politikalar sürdürülmektedir. İklim değişikliği ile mücadelede farkındalığın yaratılmasında Kyoto ve Paris anlaşmaları önemli rol oynamıştır. Bunların yanı sıra, Avrupa Birliği ülkeleri 2021-2030 dönemini kapsayan bir iklim ve enerji politikası üzerinde anlaşarak, Avrupa Birliği genelinde sera gazı emisyonlarının azaltılması ve yenilenebilir enerji kaynaklarının artırılması üzerine hedefler belirlemişlerdir. Bu anlaşma çerçevesinde 1990 yılı referans alınarak, 2050 yılına kadar sera gazı emisyonlarının %80 oranında azaltılması hedeflenmektedir (Bonenkamp vd. 2020).

Türkiye iklim krizi ile mücadelede önemli stratejiler belirlemiştir. Aralık 2015'te Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi (BMFCC) tarafından Paris'te düzenlenen 2015 Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Konferansı'nda Türkiye iklim krizi ile mücadele kapsamındaki taahhütlerini sunmuştur. Ülkemiz tarafından verilen taahhütlere göre, 2030 yılına kadar sera gazı emisyonlarının %21 oranında azaltılması hedeflenmektedir. Bu bağlamda Türkiye tarafından uygulanacak stratejiler alternatif enerjilerin kullanımının artırılmasını, atıkların azaltılmasını veya farklı sektörlerde değerlendirilmesini kapsamaktadır (Bayrakci Ozdingis ve Kocar 2018).

İklim krizi ile mücadelede biyoetanol gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı önemli bir oynamaktadır. Dolayısıyla, biyoetanol üretim sürecinin optimize edilerek olabildiğince düşük maliyetli ve çevreci olması elzemdir.

2.4 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ham Maddeler

Biyoetanol, kullanılan ham madde tipine göre dört nesile ayrılmaktadır. Birinci nesil biyoetanol üretiminde mısır, şeker kamışı gibi yenilebilen ham maddeler, ikinci nesilde buğday samanı, yer fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik ham maddeler, üçüncü nesilde

makro ve mikroalgler ile siyanobakteriler, dördüncü nesilde ise genetiği değiştirilmiş ham maddeler ve mikroorganizmalar kullanılarak biyoetanol üretimi yapılmaktadır (Bender vd. 2022).

2.4.1 Birinci nesil biyoetanol üretimi

Birinci nesil biyoetanol üretimi gıda kaynaklarının ham madde olarak kullanımına dayanmaktadır ve bu ham maddeler şeker veya nişasta bazlı olabilmektedirler. Birinci nesil biyoetanol üretiminde en yaygın kullanılan ham maddeler mısır ve şeker kamışıdır (Ayodele vd. 2020; Aghaei vd. 2022). Bunların yanı sıra, şeker bazlı ham maddelerden şeker pancarı ve tatlı sorgum gibi mahsuller ve hurma, üzüm gibi birçok meyve; nişasta bazlı ham maddelerden ise buğday, manyok ve patates gibi mahsuller de birinci nesil biyoetanol üretiminde tercih edilmektedirler (Zabed vd. 2017).

Şeker bazlı ham maddelerden ve nişasta bazlı ham maddelerden biyoetanol üretim süreci neredeyse aynıdır. Fakat nişasta bazlı ham maddelerde hidroliz basamağı da bulunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayaların ham maddedeki şekeri fermente edebilmesi için nişastanın glukozu parçalanması gerektiğinden hidroliz basamağı uygulanmaktadır. Nişasta bazlı ham maddelerin kullanımında hidroliz basamağı uygulanmadan fermentasyon yapılabilmesi için nişastayı fermente edebilen amilolitik mayalar da kullanılmaktadır. Fakat bu mayalar düşük etanol toleransına sahip olduklarından kullanımları dezavantajlıdır (Ferreira vd. 2018).

Birinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan ham maddeler gıda sektörü ile rekabet etmekte olduklarından dezavantajlıdır. Buna rağmen dünyada biyoetanol üretimi birinci nesil ham maddeler tarafından domine edilmektedir. ABD ve Brezilya gibi biyoetanol üretiminde lider konumda olan ülkeler mısır ve şeker kamışı kullanarak üretim yapmaktadırlar (Althuri ve Venkata Mohan 2022).

2.4.2 İkinci nesil biyoetanol üretimi

İkinci nesil biyoetanol üretiminde gıda olmayan mahsuller veya mahsul atıkları gibi lignoselülozik ham maddeler kullanılmaktadır (Sharma vd. 2020). Yaygın ham maddeler olmaları, düşük maliyetli olmaları ve gıda sektörüyle rekabet etmemeleri biyoetanol üretiminde avantaj sağlamaktadır (Chen vd. 2021). Lignoselülozik ham maddelerin yapı taşları selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Bunların arasında degrede edilmesi en zor olan lignindir ve selüloz ile hemiselülozun enzimatik hidrolizi ve mikrobiyal degradasyonunu engelleyerek fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır (Morales vd. 2015; Malik vd. 2022). Lignoselülozik ham maddelerdeki fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkarılması için uygun bir ön işlem yöntemi uygulanmalıdır. Bu basamağın yüksek maliyetli olması ikinci nesil biyoetanolün büyük çapta üretiminde en önemli sorunlardan biridir (Rastogi ve Shrivastava 2017).

2.4.3 Üçüncü nesil biyoetanol üretimi

Üçüncü nesil biyoetanol üretiminde ham madde olarak mikroalg ve siyanobakteri biyokütleleri kullanılmaktadır (Bader vd. 2020). Biyoetanol üretiminde potansiyeli yüksek ham maddeler olan mikroalgler, hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda karbonhidrat akümüle edebilmektedirler ve temel depo polisakkaritleri nişastadır. Bununla birlikte, mikroalgal hücrelerdeki karbonhidrat içeriği türler arasında farklılık göstermektedir. Yüksek karbonhidrat içerikleri mikroalgleri ticari öneme sahip kılan en önemli özelliklerden biridir (de Carvalho Silvello vd. 2022; Razzak vd. 2022).

Mikroalglerin ham madde olarak kullanımının birçok avantajı mevcuttur. Kültivasyonları nispeten kolaydır ve ekilebilir arazilere ihtiyaç duymadan birçok farklı kaynaktan gelişebilirler. Fosfor ve azotun yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu atık sularda gelişebilirler ve kültürasyon süreleri kısadır. Bitkilere kıyasla mikroalglerin fotosentetik verimlilikleri ve üretkenlikleri yüksektir (Bader vd. 2020; Hebbale ve Ramachandra 2022). Ayrıca, lignoselülozik ham maddelere kıyasla, hücre duvarlarında lignin bulunmaması ön işlem aşamasını kolaylaştırarak biyoetanol üretim maliyetini düşürmektedir (Ammar vd. 2020).

2.4.4 Dördüncü nesil biyoetanol üretimi

Dördüncü nesil biyoetanol üretimi genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların ve ham maddelerin kullanımını kapsamaktadır (Kumar vd. 2022). Dördüncü nesilde birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoetanol üretimindeki dezavantajların genetik mühendisliği yaklaşımları kullanılarak giderilmesi hedeflenmektedir. Bu yaklaşımlardan bazıları mikroorganizmaların fizyolojilerini, metabolik yollarını, karbon ve enerji dengelerinin manipüle edilmesini içermektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalar sürecin optimize edilmesi ve biyoetanol veriminin artırılmasını amaçlamaktadır (Aamer Mehmood vd. 2021). Genetik mühendisliği yaklaşımları kullanarak biyoyakıt üretimi umut vaat etse de uluslararası boyutta kabul görmesi gerekmektedir. Birçok ülkede tarım ve tıp alanında yapılan genetik mühendisliği çalışmaları tartışma konusu olduğundan, dördüncü nesil biyoetanol üretiminin kabul görmesi için sürecin tamamen güvenli olması gerekmektedir (Cavelius vd. 2023).

2.5 Biyoetanol Fermantasyonunda Başlıca Kullanılan Mikroorganizmalar

Birçok maya ve bakteri fermantasyon yaparak karbonhidratlardan etanol üretebilme yeteneğine sahiptir (Yang vd. 2007). Biyoetanol üretim sürecinde tercih edilecek mikroorganizmanın etanol veriminin yüksek olması, etanol toleransının yüksek olması, fermantasyon hızının yüksek olması ve geniş yelpazede şekerleri fermente edebilmesi gibi özelliklerinin olması önemlidir (Stewart vd. 1983).

2.5.1 Mayalar

Çeşitli şekerleri kullanabilme kapasiteleri, yüksek etanol toleransları, yüksek etanol verimleri ve düşük maliyetli besiyerlerinde gelişebilme gibi birçok avantajlı özelliğe sahip mayalar, günümüzde biyoetanol üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizmalardır. Mayalar fermantasyon sürecinde anahtar role sahiplerdir ve etanol verimini doğrudan etkilemektedirler (Mohd Azhar vd. 2017).

***Saccharomyces cerevisiae*:** *Saccharomyces cerevisiae* ticari önemi yüksek bir mayadır ve birçok endüstride kullanılmaktadır. GRAS bir mikroorganizma olması, genomunun oldukça iyi bilinmesi, kolay kültür edilmesi *S. Cerevisiae*'nin çeşitli endüstriyel alanlarda tercih edilme nedenlerindendir. Şarap ve bira gibi fermente içeceklerin üretiminde, gıda sektöründe, biyofarmasötik sektöründe ve biyoyakıt üretiminde yaygın olarak kullanılan faydalı bir mayadır (Salari ve Salari 2017; Parapouli vd. 2020; Xiao vd. 2023).

S. cerevisiae biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sahip olduğu birçok fizyolojik özellik, kullanımını diğer mikroorganizmalara kıyasla daha avantajlı kılmaktadır. Fermantasyon hızı oldukça yüksektir ve diğer etanolojenik mikroorganizmalara kıyasen etanol toleransı yüksektir. Bunların yanı sıra, *S. Cerevisiae* düşük Ph konsantrasyonlarına ve ozmotik strese dirençlidir. Tüm bu özellikler *S. Cerevisiae*'nin biyoetanol üretiminde tercih edilmesinin ana nedenleridir (Tesfaw ve Assefa 2014; Onyema vd. 2023; Qiu vd. 2023).

S. cerevisiae aynı zamanda önemli bir metabolik özellik olan Crabtree etkisine sahiptir. Bu özelliği sayesinde anaerobik koşullarda bile etanol fermantasyonu yapabilmektedir. Aerobik koşullarda solunum yaparak biyokütle birikimi yapmak yerine, etanol üreterek ekolojik nişinde şeker için rekabet halinde olan mikrobiyal türleri elimine etme avantajına sahiptir. *S. Cerevisiae* bu süreçte üretilen etanolü kullanarak biyokütle büyümesini desteklemektedir (Parapouli vd. 2020).

***Kluyveromyces marxianus*:** *Kluyveromyces marxianus* çeşitli enzimlerin üretimi, biyoyakıt üretimi, ilaç endüstrisi, yem ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan, büyük ölçüde ticari öneme sahip bir mayadır (Karim vd. 2020) Sahip olduğu litik enzimler sayesinde laktoz ve inulin gibi şekerleri metabolize edebilmesi, hızlı büyüme oranına sahip olması, termotolerant olması ve düşük Ph'lara tolere edebilmesi biyoteknoloji alanında kullanımını cazip kılmıştır (Lane ve Morrissey, 2010; Baptista ve Domingues 2022).

S. cerevisiae'nin aksine *K. Marxianus* Crabtree negatif bir mayadır. Bu durum biyoetanol üretimi için şekerlerin efektif kullanımını sınırlasa da *K. Marxianus*'un sahip olduğu diğer

birçok özellik biyoetanol üretiminde bu mayanın kullanımı desteklemektedir. Peynir altı suyu, meyve kabukları gibi düşük maliyetli ham maddelerdeki şekerleri metabolize edebilmesi özellikle ikinci nesil biyoetanol üretiminde kullanım potansiyelini artırmaktadır (Su vd. 2020).Çevre dostu ve sürdürülebilir enerji kaynakları olan biyoyakıtlar, fosil yakıtların yerini alarak bu enerji ihtiyacını karşılamada umut vaat etmektedirler (Morad 2023).

Günümüzde biyoetanol üretiminin yüksek sıcaklıklarda yapılması soğutma maliyetini düşürmesi, enerji tasarrufu sağlaması, düşük kontaminasyon riski ve yüksek fermantasyon oranları nedeniyle oldukça ilgi gören bir konudur (Fonseca vd. 2008).Termotolerant bir maya olan *K. Marxianus* bu uygulama için ideal olup, sıklıkla tercih edilmektedir. *K. Marxianus*'un bu özelliği eş zamanlı sakarifikasyon ve fermantasyon (SSF) ile ön sakrifikasyon, eş zamanlı fermantasyon (PSSF), konsolide biyoişleme (CBP) gibi fermantasyon stratejilerinde de kullanımını mümkün kılmaktadır (Baptista ve Domingues 2022).

Candida boidinii : Biyoteknolojik öneme sahip *Candida boidinii* Ascomycota filumuna mensup, metilotrofik, haploid bir mayadır. Oldukça yaygındır ve birçok doğal ortamdan izole edilebilmektedir. Ksilozu fermente ederek biyoetanol üretebildiğinden, lignoselülozik ham maddelerin efektif kullanımını sağlamaktadır (Osawa vd. 2009; Gonçalves vd. 2013; Camiolo vd. 2017).

Pichia stipitis: *Scheffersomyces stipitis* olarak da bilinen *Pichia stipitis*, beş ve altı karbonlu şekerleri metabolize edebilen, Crabtree negatif bir mayadır (Papini vd. 2012; Phaiboonsilpa vd. 2020). Lignoselülozik ham maddenin yapı taşlarından biri olan hemiselülozun hidroliz edilmesiyle açığa çıkan ksilozu efektif bir şekilde etanole fermente edebildiğinden özellikle ikinci nesil biyoetanol üretiminde tercih edilen bir mayadır (Silva vd. 2012). Ksilozun yanı sıra, mannoz, glukoz, galaktoz, sellobiyoz gibi çeşitli şekerleri metabolize edebilmektedir. Bu yeteneğinden dolayı endüstriyel öneme sahip bir mayadır (Jeffries ve Van Vleet 2009; Bellido vd. 2011).

2.5.2 Bakteriler

***Zymomonas mobilis*:** *Zymomonas mobilis* biyotanol üretiminde mayalara alternatif olarak kullanılan, Gram negatif, fakültatif anaerob, GRAS bir bakteridir. Yüksek konsantrasyonlarda etanol ürettiğinden avantajlı bir mayadır. Ayrıca, etanol ve glukoz toleransı *S. Cerevisiae*'ye kıyasen daha yüksektir. Fakat yalnızca glukoz, sukroz ve 17rüktozu metabolize edebildiğinden ham madde çeşitliliğini kısıtlamaktadır (Gunasekaran ve Chandra Raj 1999; Panesar, vd. 2006; Ajit vd. 2017).

Z. mobilis şekerleri metabolize etmek için Entner-Doudoroff yol izini kullanmaktadır. Bu metabolik yolda EMP yol izine göre daha az ATP ve daha az biyokütle üretimi yapıldığından, daha fazla karbon kaynağı etanol üretimine yönlendirilir ve daha yüksek bir glikoz akışı sağlanmaktadır. Bunun sonucunda, glikoz hızlı ve etkili bir şekilde etanole dönüştürülür ve *S. Cerevisiae*'ye kıyasen daha yüksek etanol verimi elde edilmektedir. *Z. Mobilis*'in metabolizması biyoetanol üretiminde kullanımını avantajlı hale getiren en önemli faktörlerden biridir (Wirawan vd. 2012)

***Escherichia coli*:** *Enterobacteriaceae* ailesine mensup, Gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteri olan *E. Coli*, hormonlar, proteinler, amino asitler ve biyoyakıtlar gibi birçok endüstriyel ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca, model bir organizmadır ve genetik mühendisliği çalışmalarının odak noktasıdır. Birçok çeşit şeker fermente edebilmesi biyoetanol üretiminde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Dien vd. 2003; Desmarchelier ve Fegan 2016; Koppolu ve Vasigala 2016).

E. coli anaerobik koşullarda glikozu metabolize ederek format, asetat ve etanol üretmektedir. Asetil-coA'nın etanole çevrilmesi sürecinde glikolizde üretilen NADH'dan daha fazla NADH tüketilmektedir. *E. Coli* açığa çıkan redoks dengesizliğini onarmak için asetil-coA'nın bir kısmını asetata okside eder. Bunun sonucunda etanol üretimi optimal konsantrasyonların altında kalmaktadır (Koppolu ve Vasigala 2016).

Termofilik bakteriler : Termofilik bakteriler biyoetanol üretiminde kullanımı oldukça cazip mikroorganizmalardır. Geniş Ph aralıklarında gelişim gösterirler ve besin açısından zengin kaynaklara ihtiyaç duymazlar. Hem pentoz hem de heksoz şekerleri metabolize etme yeteneğine sahiptirler. Yüksek sıcaklıkta geliştikleri için biyoreaktörleri soğutmaya gerek olmaması ve ham maddedeki şekerleri enzimatik hidroliz basamağına ihtiyaç duymadan fermente edebilmeleri üretim maliyetini büyük oranda düşürmektedir. Termofilik bakteriler kullanıldığında kontaminasyon riskinin düşük olması da önemli bir avantajdır. Biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan termofilik bakterilere *Thermoanaerobacter mathranii*, *T. Pseudoethanolicus*, *T. Pentosaceus* ve bazı *Clostridium* türleri örnek verilebilir (Soleimani vd. 2017; Joshi vd. 2018).

2.6 Fermantasyon Stratejileri

Biyoetanol üretiminde yüksek etanol konsantrasyonları ve verimine ulaşmak için farklı fermantasyon stratejileri mevcuttur. Bu stratejiler arasında SHF (ayrı hidroliz ve fermantasyon), SSF (simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon) ve SSCF (simultane sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon) yer almaktadır (Bender vd. 2022).

SHF yönteminde hidroliz ve fermantasyon basamakları ayrı olarak gerçekleşmektedir. İlk aşamada ham maddenin enzimatik hidrolizi gerçekleştirilir. Sonrasında açığa çıkan indirgen şekerlerin fermantasyonu için tercih edilen mikroorganizmalar eklenir. Bu yöntemin en temel avantajı enzimler için gerekli pH ve sıcaklık gibi parametrelerin optimize edilebilmesidir. Fakat bu yöntem oldukça zaman alan bir yöntemdir ve sürecin her iki aşaması da farklı reaktörlerde gerçekleştiği için maliyeti yüksektir (Ishizaki ve Hasumi 2013; Afedzi ve Parakulsuksatid 2023).

SHF yönteminin aksine, SSF yönteminde sakkarifikasyon ve fermantasyon aynı reaktörde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, süreç daha hızlı tamamlanmaktadır ve maliyeti daha düşüktür. SSF yönteminde şeker ve etanol verimliliğinin yüksek olması yanı sıra kontaminasyon riski de düşüktür. Bu sebeplerden dolayı SHF yönteminden daha çok tercih edilmektedir. Fakat bu fermantasyon stratejisinde de bazı dezavantajlar mevcuttur. Reaktör sıcaklığı mayanın gelişebileceği sıcaklığa göre optimize edildiğinden enzimlerin

efektif çalışabilmesi için gerekli sıcaklık sağlanamaz. Termofilik bakterilerin tercih edilmesiyle bu sorunun üstesinden gelinebilmektedir (Hasunuma ve Kondo 2012; Hans vd. 2019; Devos ve Colla 2022).

SSF yönteminde heksoz ve pentoz şekerlerin birlikte kullanılamaması düşük etanol verimine neden olmaktadır. SSF yönteminin daha gelişmiş bir modeli olan SSCF yönteminde, biyoetanol üretim süreci tek bir reaktörde gerçekleştirir ve ko-fermantasyon stratejisiyle heksoz şekerlerin yanı sıra pentoz şekerlerin de kullanımı teşvik edilmektedir. Dolayısıyla düşük maliyetli ve etanol verimi yüksek bir süreçtir. Heksoz ve pentoz şekerlerin ko-fermantasyonu için karışık kültür veya genetiği değiştirilmiş *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* ve *E. coli* gibi mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Büyük çaplı biyoetanol üretimine uygun bir yöntem olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır (Manzares 2010; Sharma vd. 2021; Bender vd. 2022).

2.7 Mikroalglerin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Oldukça yüksek çeşitlilik gösteren mikroalgler, ökaryotik, tek hücreli, fotosentetik mikroorganizmalardır. Mikroalgler tatlı sular, tuzlu sular ve atık sular gibi neredeyse her su habitatında yaşayabilmektedir (Vale vd. 2020; Su 2021). Fotosentetik verimleri oldukça yüksek olan mikroalgler, dünyadaki oksijen üretiminin yaklaşık olarak yarısının fazlasından sorumludurlar ve karasal bitkilere kıyasla çok daha yüksek ışık enerjisi yakalayabilmektedirler (Maity ve Mallick 2022).

Mikroalgler ürettikleri karbonhidratlar, proteinler, lipitler, pigmentler, vitaminler gibi primer ve sekonder metabolitler sayesinde birçok endüstride ham madde olarak kullanılmaktadırlar. Mikroalglerin farklı atıklarda gelişebilmesi, biyoakümülayon etkinliklerinin ve biyokütle üretkenliklerinin yüksek olması da biyoteknoloji alanında kullanımını avantajlı kılan önemli özelliklerdir. Mikroalgler temel olarak gıda, ilaç, sağlık, kozmetik gibi endüstrilerde yaygın olarak tercih edilen ham maddelerdir. Örneğin, ilaç ve kozmetik sektöründe önemli bir pigment olan karotenoid mikroalgler tarafından yüksek miktarlarda üretilmektedir (Castillo vd. 2021; Calijuri vd. 2022). Ayrıca mikroalgler polilaktik asit, polihidroksialkanoatlar gibi metabolitleri üretebilmeleri ve

nişasta içermeleri nedeniyle biyoplastik üretiminde umut vaat etmektedirler (Karan vd. 2019). Bunların yanı sıra, mikroalgal karbonhidratlar da son yıllarda biyoyakıtlar gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının üretiminde kullanılmaktadır (Maity ve Mallick 2022).

2.8 Mikroalglerin Gelişimin Etkileyen Faktörler

Kültür ortamında makronutrientler ve mikronutrient içeriği gibi besin faktörleri ve ışık yoğunluğu, sıcaklık, pH gibi çevresel parametreler mikroalgal türlerin biyokimyasal kompozisyonunu önemli derecede etkilemektedir (de Carvalho Silvello vd. 2022).

Besin Faktörleri: Azot, mikroalgal büyüme için temel besin kaynaklarından biridir. Mikroagler kültür ortamında nitrit, nitrat ve amonyum gibi inorganik azot kaynakları kullanılmaktadır (Maity ve Mallick 2022). Kültivasyon ortamında azot varlığı mikroalglerin primer metabolit üretimini arttırmaktadır. Dolayısıyla, yeteri azot koşulları içeren kültür ortamında hücrelerin fotosentetik aktivitesi ve büyüme oranları artmaktadır. Ayrıca, ortamda mevcut olan azot kaynakları mikroalgal hücre duvarındaki şeker kompozisyonunu da önemli ölçüde etkilemektedir. Azotun yetersiz olduğu koşullarda mikroalgal protein yıkımı yapılırken, hücrenin enerji rezervleri olan lipid ve karbonhidratların birikimi yapılmaktadır. Protein ve karbonhidrat birikimi mikroalg türüne göre değişiklik göstermektedir. Yağlı mikroalglerde lipid birikimi görülürken, diğer mikroalglerde nişasta gibi karbonhidratların birikimi gözlemlenmektedir (González-Fernández ve Ballesteros 2012; Debnath vd. 2021).

Fosfor, mikroalg hücrelerinin metabolik faaliyetlerinde önemli rol oynayan elementlerden biridir. Fosfor birçok hücresel komponent için gerekli bir elementtir. Kültür ortamında fosfor eksikliği azot eksikliğine benzer şekilde mikroalgal metabolizmayı karbonhidrat ve lipid akümülyasyonuna yöneltmektedir. Bazı mikroalg türleri, ortamda yeterli fosfor kaynağı bulunduğunda fosforu polifosfat granülleri formunda depolamaktadır. Ortamdaki fosfor azaldığında hücreler depoladıkları fosforu kullanmaktadır (Ran vd. 2019).

Kükürt, biyomoleküllerin, vitaminlerin ve elektron taşıyıcı moleküllerin sentezi için gerekli bir elementtir. Kültür ortamında kükürt eksikliğinin olması, azot ve fosfor eksikliğinin yarattığı etkiye benzer olarak karbonhidrat birikimine yol açmaktadır ve karbonhidrat akümülyasyonunu artırmak için kullanılan en temel stratejilerden biridir. Fakat bunun sonucunda hücre büyümesi ve biyokütle üretimi olumsuz etkilenmektedir. Kükürte benzer olarak demir de mikroalgler için oldukça önemli bir elementtir. Demir, mikroalg hücrelerindeki Fe-S kompleksi oluşumu için önemli bir element olup fotosentez sürecini doğrudan etkilemektedir. Demir eksikliği karbonhidrat ve lipid birikimini teşvik etmektedir. Fakat lipid birikimi Fe-S kompleksine ihtiyaç duyduğundan, demir eksikliğinde gecikmeli gerçekleşen bir süreçtir (Debnath vd. 2021; Wang vd. 2022).

Çevresel Faktörler: Mikroalglerin gelişimini etkileyen çevresel faktörlerden biri sıcaklıktır. Sıcaklığın mikroalgler üzerinde birçok farklı etkisi vardır. Sıcaklıktan etkilenen en önemli parametreler enzimatik aktivite, mikroalg büyüme hızı, CO₂ ve O₂ çözünürlüğüdür. Yüksek sıcaklık mikroalglerin büyüme hızını artırmaktadır. Fakat sıcaklık önemli derecede yükselmeye başladığında ortamdaki O₂ çözünürlüğü artışına bağlı olarak mikroalg hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Yüksek sıcaklığın bir diğer önemli etkisi ise protein denatürasyonudur ve buna bağlı olarak hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Sıcaklık koşulları aynı zamanda mikroalglerdeki karbonhidrat akümülyasyonunu da önemli derecede etkilemektedir. Dolayısıyla, sıcaklığın optimum seviyede tutulması önemli rol oynamaktadır. Mikroalg gelişim için optimum sıcaklığın 18-35°C arasında olduğu belirtilmiştir (Silvello vd. 2023; Vale vd. 2020).

pH mikroalglerin metabolizmasını doğrudan etkileyen bir diğer önemli faktördür. pH besiyeri ortamında CO₂ ve nutrientlerin çözünürlüğünü etkilemektedir. Ayrıca, fotosentez ile ilişkili yapıların da verimli çalışabilmesi ortam pH'ına bağlıdır. Yüksek pH seviyeleri ortamdaki CO₂'yi sınırlayarak mikroalgleri inhibe ederken, düşük pH seviyeleri fotosentetik enzimlerin aktivitesini sınırlar. Optimal pH seviyeleri mikroalg türüne spesifiktir. Dolayısıyla, kullanılan mikroalg türüne göre pH'ın optimum düzeyde tutulması biyokütle verimliliği açısından önemlidir (Gatamaneni vd. 2018; Qiu vd. 2017).

Işık, fotosentez sürecini direkt olarak etkileyen bir parametre olduğundan kültürasyon koşullarında dikkati alınması gereken en önemli faktörlerden biridir. Işık mikroalglerde ATP, NADPH üretiminde ve hücresel süreçler için gerekli moleküllerin sentezlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Işık yoğunluğunun optimum seviyeden yüksek olması mikroalglerde fotoinhibisyona yol açarak mikroalgal büyümeyi olumsuz etkilemektedir. Bu durum düşük biyokütle üretimine neden olacağından istenen bir durum değildir. Dolayısıyla, mikroalgal kültürasyonda ışık yoğunluğunun optimum seviyede olması gerekmektedir (Acebu vd. 2022).

2.9 Kültürasyon Sistemleri

Mikroalgerin gelişimi için uygun besinlerin ve çevresel faktörlerin sağlandığı kültürasyon sistemleri açık ve kapalı sistemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Liyanaarachchi vd. 2021). Her iki sistemin de farklı çeşitleri olmakla beraber, sahip oldukları avantaj ve dezavantajlar birbirlerinden farklılık göstermektedir. Hedeflenen nihai ürün ve kullanılacak olan mikroalg türüne göre bu sistemlerden biri tercih edilebilmektedir.

Açık Sistemler: Mikroalg kültürasyonunda bilinen en eski yöntemlerden biri açık sistemlerdir. Doğal koşullarda çalışan bu sistem oldukça basit ve düşük maliyetlidir (Ferreira vd. 2022). Açık sistemlerde mikroalglerin kültürasyonu büyük havuzlarda gerçekleştirilir ve dış ortamda mevcut olan ışık ile CO₂ mikroalgler tarafından kullanılır. Kültürasyon için gerekli besin maddeleri ise ortama ilave edilir (Yousuf 2019). Koşulların kontrol edilememesi ve tamamen doğal ortama bağımlı olması kültür ortamını kontaminasyona açık hale getirmektedir. Bunun yanı sıra, bu sistemlerin kullanımı için büyük arazilere ihtiyaç duyulmaktadır ve kültürasyon etkinliği büyük ölçüde iklim koşullarına bağlıdır (Narala vd. 2016). Açık sistemlerin dairesel havuzlar ve yarış pisti havuzları gibi farklı çeşitleri mevcuttur.

Dairesel havuzlar, özellikle Asya ülkelerinde büyük ölçekli mikroalg kültürasyonunda kullanılan açık sistemlerdir. Bu havuzların ortasında kültür ortamının sirkülasyonunu sağlayan bir karıştırıcı bulunmaktadır. Fakat bu havuzların kurulumu oldukça yüksek maliyetlidir ve karıştırıcı kullanımından dolayı enerji tüketimi yüksektir (Tan vd. 2020).

Yarış pisti havuzları, mikroalgal kùltivasyonda uzun yıllardır kullanılan, düşük maliyetli kùltivasyon sistemleridir. Yeterince etkili olmamakla birlikte kùltür ortamının sirkùlasyonu kanatlı bir çark aracılığı ile sağlanır. Dolayısıyla biyokùtle verimi de düşüktür. En büyük avantajları enerji tüketiminin düşük olması, düşük maliyetli olması ve kùltür ortamı olarak atık suların kullanılabilmesidir. Açık sistemlerde kullanılan diğer yöntemlerden farklı olarak dış ortamdan kaynaklı kontaminasyonun önlenmesi için üzeri kaplanabilmektedir. Bu yöntem sera kaplamalarına benzer materyaller kullandığından ışık penetrasyonu olumsuz etkilenmemektedir (Chisti 2007; Rawat vd. 2011).

Kapalı sistemler: Açık sistemler düşük maliyetli olduklarından yaygın olarak tercih edilseler de, kapalı sistemler kùltivasyon koşullarının kontrol edilebilmesi nedeniyle daha yüksek biyokùtle üretkenliği elde edilmesini sağlarlar (Christian Barbosa vd. 2020). Kapalı sistemler, fotobiyoreaktörler olarak da bilinmektedirler ve pH, sıcaklık, CO₂ ve O₂ gibi birçok parametre kolaylıkla optimize edilebildiğinden mikroalglerin gelişimi için oldukça uygundur. Ayrıca bu sistemlerde kontaminasyon riski de oldukça düşüktür. Birçok avantajlı olmasına rağmen kullanımı sınırlayan en büyük faktör yüksek maliyetli bir sistem olmasıdır. Bunun yanı sıra, reaktörlerde mikroalgal biyofilm oluşma riski de yüksektir. Bu durum ışık penetrasyonunu engellediğinden biyokùtle verimliliğini olumsuz etkileyebilmektedir (de Andrade vd. 2022). Fotobiyoreaktörlerin túbüler, düz plaka ve kolon tipi fotobiyoreaktörler gibi birçok çeşidi mevcuttur.

Túbüler fotobiyoreaktörler plastik, polietilen gibi birçok farklı materyalden oluşabilen, şeffaf, boru şeklinde, yatay ve dikey olarak kullanılabilen fotobiyoreaktörlerdir. Bu sistemlerde, kùltür ortamının belirli hızlarda fotobiyoreaktörde dolaşımı sağlanmaktadır. Yüksek oksijen konsantrasyonlarını önlemek amacıyla bu sistemlerden belirli düzeyde oksijen çıkışı yapılmaktadır. Yalnızca fototrofik ve fotoheterotrofik kùltivasyon koşullarında kullanıma uygundur. Ayrıca yüksek maliyet ve kontaminasyon riski gibi dezavantajları mevcuttur (De Vree vd. 2015; Aliyu vd. 2021).

Düz tabaka fotobiyoreaktörler, geniş yüzey alanına sahip, dikey konumda düzenlenmiş panellerden oluşmaktadır (Bhatt vd. 2022). Bu reaktörler ışık penetrasyonu optimal düzeyde olacak şekilde tasarlanmışlardır. Fakat oldukça geniş alanlara ihtiyaç duyulması,

kontaminasyon riskinin bulunması bu sistemlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bunun yanı sıra, sıcaklık ve havalandırma ile ilgili optimizasyon sorunları da büyük çaplı üretimde kullanımlarını sınırlamaktadır (Gupta vd. 2015; Show vd. 2017).

Kolon tipi fotobiyoreaktörler dikey konumlanmış şeffaf kolonlardan oluşmaktadır ve mikroalglerin kültivasyonunda koşulların kontrolünün en iyi yapılabildiği sistemlerdir. Kolonların dikey yönde konumlanmış olması gaz kabarcıklarının uygun dağılımını ve böylece sıvı sirkülasyonunu da sağlamaktadır. Kolon tipi fotobiyoreaktörlerde ışık penetrasyonu ve ışığın dağılımı da oldukça optimize edilmiştir. Düşük maliyetli olan bu kültivasyon sistemi yaygın olarak tercih edilmektedir (Tan vd. 2018; Aliyu vd. 2021).

2.10 Kültivasyon Stratejileri

Mikroalgler fotosentetik mikroorganizmalardır. Işık ve karbon kaynağı varlığında fotosentez yaparak biyokütlelerini artırır. Bununla birlikte, mikroalgler çevresel koşullara hızlıca adapte olabilen ve bu koşullar doğrultusunda metabolizmalarına yön verebilen mikroorganizmalardır. Farklı karbon ve enerji kaynakları varlığında da gelişebilmektedirler. Mikroalgler fototrofik, fotoheterotrofik, heterotrofik ve miksotrofik olmak üzere dört farklı kültivasyon koşulunda gelişim gösterebilmektedirler. Her bir kültivasyon modunun avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Besin kaynakları ve çevresel koşullar mikroalglerin hücre kompozisyonunu ve biyokütle üretkenliklerini önemli derecede etkilediğinden, kullanılan mikroalg ve elde edilmesi istenen nihai ürün göz önünde bulundurularak en uygun kültivasyon stratejisinin belirlenmesi oldukça önemlidir (Mata vd. 2010; Chew vd. 2018).

2.10.1 Fotoototrofik kültivasyon

En yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan fotoototrofik kültivasyon modunda mikroalgler, inorganik karbon kaynağı olarak CO₂, enerji kaynağı olarak da ışığı kullanarak gelişim gösterirler (Cheirsilp ve Torpee 2012). Açık ve kapalı sistemlerde kullanıma uygun bir kültivasyon modudur ve kontaminasyon riski oldukça düşüktür.

Fakat bu yöntemde bazı dezavantajlar da mevcuttur. Mikroalgal gelişime bağlı olarak oluşan bulanıklık ışık penetrasyonunu kısıtladığından biyokütle üretkenliği de önemli derecede azalmaktadır. Bununla birlikte, biyokütle üretkenliğinin düşük olması hasatlama maliyetini artıran bir faktördür. Biyokütle konsantrasyonun artırılması için mikroalgal kültivasyonun fabrikaların yakınlarında yapılması önerilmektedir. Böylelikle, fabrikalardan salınan yüksek konsantrasyonlarda CO₂ mikroalglerin gelişiminin artmasına neden olacaktır. Bu yöntem sayesinde bölgedeki çevre kirliliğinin de önüne geçilebilir (Ghaffar vd. 2023).

2.10.2 Heterotrofik kültivasyon

Heterotrofik kültivasyonda organik bileşikler hem karbon kaynağı hem de enerji kaynağı olarak kullanılır. Bu koşullarda gelişebilen mikroalglerin sayısı oldukça azdır. Bunlardan bazıları *Chlorella* türleri, *Tetraselmis* ve *Nechloris* gibi mikroalglerdir. Bu mikroalgler hem fotoototrofik hem de heterotrofik koşullarda gelişebilmektedir (Hu vd. 2018).

Heterotrofik kültivasyon büyük ölçekte üretim için oldukça uygundur ve düşük maliyetlidir. Bu yöntem için kompleks fermentörlere ihtiyaç duyulmaz ve birçok parametrenin kontrolü oldukça kolaydır. Zaman zaman fermentörlere organik karbon kaynağı ilavesi yapılabilmektedir ve bu kaynaklar genellikle asetat ve glukozdur. Fotoototrofik kültivasyon ile kıyaslandığında bu yöntem ışık gerektirmediğinden ışık ile ilgili optimizasyon sorunları elimine edilmektedir. Ayrıca, heterotrofik büyümede biyokütle yoğunluğu yüksektir, dolayısıyla bu şekilde kültive edilen mikroalglerin hasatlanması kompleks yöntemlerin kullanımını gerektirmemektedir. Fakat kontaminasyon riskinin yüksek olması, ek karbon kaynağı ilavelerinin maliyeti artırması, ışık varlığında üretilen önemli metabolitlerin heterotrofik metabolizmada üretilmemesi en büyük dezavantajlardandır. En önemli dezavantajı ise heterotrofik metabolizma sonucu CO₂ oluşumudur. Dolayısıyla çevre dostu değildir (Perez-Garcia vd. 2011; Hu vd. 2018).

2.10.3 Fotoheterotrofik kültivasyon

Fotoheterotrofik kültivasyonda mikroalglerin karbon kaynağı ihtiyaçı organik bileşiklerden sağlanırken, enerji ihtiyaçı ışıktan elde edilmektedir. Bu koşullarda kültür ortamına biyokütle artışıını destekleyen glukoz ve sukroz gibi organik karbon kaynakları eklenmektedir. Bunun yanı sıra, enerji kaynağı olarak ışığın kullanılması sayesinde ışığa ihtiyaçı duyan metabolitler de sentezlenebilmektedir. Bu durum heterotrofik büyümedeki önemli dezavantajlardan birini ortadan kaldırmaktadır (Kiran vd. 2014; Gaurav vd. 2024). Fakat ortamda organik karbon kaynaklarının mevcudiyeti kontaminasyon riskini artırmakta ve bu durum kültivasyonda önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ayrıca, fotoheterotrofik kültivasyonda büyük çaplı üretimler için özel reaktörlerin tasarlanması gerekmektedir (Chew vd. 2018)

2.10.4 Miksotrofik kültivasyon

Miksotrofik kültivasyonda mikroalgler enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak da hem organik hem de inorganik karbon kaynaklarını kullanmaktadır (Abreu vd. 2022). Miksotrofik metabolizma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada mikroalg heterotrofik gelişim göstererek ortamdaki organik karbon kaynaklarını tüketir. Bu kaynaklar azaldığında, fotoototrofik metabolizmaya geçerek CO₂ ve ışığ varlığında fotosentez yapar. Dolayısıyla mikroalgde hem fotoototrofik hem de heterotrofik büyüme gerçekleşir (Mahari vd. 2022). Bu kültivasyon stratejisi sayesinde mikroalglerde tek başına heterotrofi ve fotoototrofiden daha fazla biyokütle üretimi ve büyüme hızı gözlemlenmektedir. Bu durumun yüksek fotosentetik verimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu kültivasyon sisteminde mikroalglerde daha az fotoinhibisyon ve fotooksidatif hasar görülmektedir (Castillo vd. 2021; Huang vd. 2024).

2.11 Mikroalglerin Hasat Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Mikroalgler kültive edildikten sonra endüstriyel kullanımları için besiyeri ortamından ayrılmaları gerekmektedir. Bu işleme hasatlama denilmektedir. Mikroalglerin

hasatlanması genellikle santrifüjleme, sedimentasyon, flotasyon, filtrasyon ve flokulasyon gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Mikroalglerin yoğunluğu ve boyutu uygun hasat tekniğini seçmede belirleyici faktörlerdir. Bunun yanı sıra, elde edilen mikroalgal biyokütlenin kullanım alanı da hasat tekniğini seçmede önemlidir. Biyoetanol üretiminde kullanılan hasat tekniğinin düşük maliyet ve düşük enerji ihtiyacı gibi özelliklere sahip olması ve mikroalg hücrelerine karşı etkili olması gerekmektedir (Guldhe vd. 2016; Kusmiyati vd. 2023).

Santrifüjleme: Santrifüjleme, merkezkaç kuvveti kullanılarak mikroalgerin besiyeri ortamından ayrılmasına dayanır. Mikroalglerin hücre boyutu ve yoğunluğu santrifüjlemenin etkinliğini önemli derecede etkilemektedir. Bu hasatlama yönteminin hızlı ve etkili olması, tüm mikroalglere uygulanabilmesi gibi birçok avantajı mevcuttur. Fakat enerji tüketiminin oldukça yüksek olması ve maliyeti arttırması büyük çaplı biyokütle üretiminde sorun teşkil etmektedir. Ayrıca, uygun süre ve hızda kullanılmadığında mikroalg hücrelerine mekanik zarar verebilmektedir (Singh ve Patidar 2018; de Morais vd. 2023).

Sedimentasyon: Temel prensibi yerçekiminden yararlanılarak mikroalglerin doğal olarak çökmesine dayanan sedimentasyon yöntemi, düşük maliyetli ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroalg hücrelerinin yoğunluğu besiyeri ortamının yoğunluğundan daha fazla olduğundan çökme işlemi kendiliğinden gerçekleşir ve hücreler herhangi bir mekanik zarar görmez. Maliyeti ve enerji ihtiyacı düşük bir yöntemdir. Çeşitli hasatlama teknikleriyle birlikte uygulanabilmektedir. Fakat sedimentasyon oldukça yavaş bir süreçtir ve havuzlarda uygulandığında yüksek sıcaklık gibi iklim koşulları hücre bozunmasına neden olup nihai ürünü olumsuz etkileyebilir (Ghazvini vd. 2022).

Flotasyon: Bu hasatlama yönteminde gaz kabarcıkları süspansiyona eklenerek mikroalglere yapışması sağlanır. Buradaki temel mantık, mikroalgerin düşük yoğunluğa sahip olmalarından dolayı sıvının yüzeyine çıkmaları ve bu şekilde ayırma işleminin gerçekleşmesidir (Yin vd. 2020). Sedimentasyon ile karşılaştırıldığında hızlı, efektif ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Flokulasyon yöntemi ile birlikte kullanıldığında büyük çapta hasatlama için idealdir (Suparmaniam vd. 2019). Bazı mikroalg türlerinin hasat

edilmesinde kullanımının zor olduğu öne sürölse de, süreç optimize edilirse bu dezavantajın ortadan kaldırılabilmesi mümkündür (Laamanen vd. 2021).

Filtrasyon: Bu hasatlama yönteminde membran filtreleri kullanılarak biyokütlenin ayrılması sağlanmaktadır. Bu yöntem özellikle *Scenedesmus sp.*, *Dunaliella sp.* ve *Chlorella sp.* gibi küçük hücre boyutuna sahip mikroalgler için idealdir. Filtrasyon yönteminin vakum filtreleme, basınçlı filtreleme, mikrostrainerler, mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon vb. gibi birçok çeşidi mevcuttur. Bu yöntemler arasında ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon küçük hücre boyutuna sahip mikroalglerde kullanılırken, mikrostrainerler büyük boyutlara sahip mikroalglerde etkilidir. Fakat bu membran filtrelerinin kirlenmesine bağlı olarak devamlı temizlenmesi ve değiştirilmesi bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Buna rağmen, diğer hasat yöntemlerine göre oldukça etkili ve düşük maliyetlidir (Suparmaniam vd. 2019; Morais Junior vd. 2020).

Flokulasyon: Mikroalglerin hasatlanmasında oldukça etkili bir diğer yöntem flokulasyondur. Mikroalg hücrelerinin negatif yüklüdür ve bu durum birbirlerini itmelerine neden olur. Flokulasyon tekniğı bu durumu ortadan kaldırmak için mikroalglerin negatif yükünü nötralize etmeyi amaçlar ve hücrelerin flok oluşturmasını sağlar. Flokulasyonda üç temel mekanizma bulunmaktadır. Yük nötralizasyonu pozitif yüklü flokulantların kullanımı ile mikroalgal hücrelerin nötralizasyonunu, adsorpsiyon mekanizması katyonik polimerlerin kullanımı ile nötralizasyonu, adsorpsiyon köprüleri ise yüklü polimerlerin mikroalg hücrelerinin arasında köprü oluşturarak flokulasyonu temel almaktadır. Flokulasyon ile hasatlamada kimyasal flokulasyon, otoflokulasyon, biyoflokulasyon ve fiziksel flokulasyon gibi metodlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Vasistha vd. 2021)

Kimyasal flokulasyonda organik ve inorganik flokulantlar mikroalglerin negatif yükünü nötralize etmek için kullanılır. Özellikle biyoyakıt üretiminde kullanılacak mikroalgal biyokütlenin hasat edilmesinde tercih edilmektedir. Bu yöntemle yüksek konsantrasyonlarda mikroalg biyokütlesi düşük bir maliyetle hasat edilebilmektedir (Venkata Subhash vd. 2022)

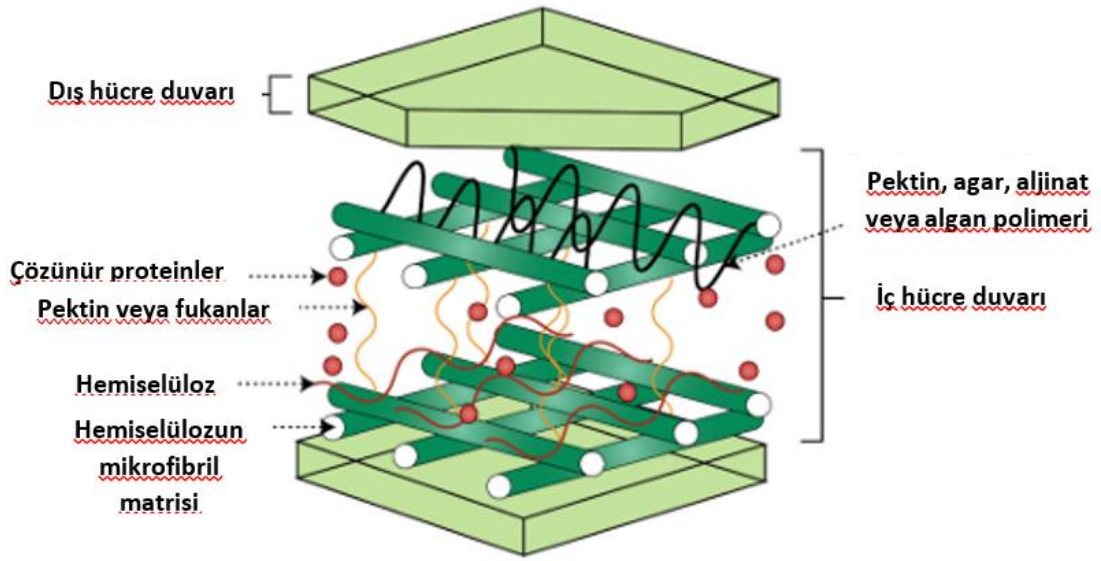
Otoflokulasyon, stres koşullarına maruz kalmış bazı mikroalglerde görülen bir mekanizmadır. pH koşullarında, azot konsantrasyonlarında ve çözünmüş oksijen seviyelerinde değişiklikler otoflokulasyona neden olan başlıca stres koşullarıdır. Fakat bu yöntem birçok dezavantaja sahip olduğundan efektif değildir. Bu süreç düşük enerji gerektirse de, yavaş ve maliyetli olabilmektedir. Ayrıca, az sayıda mikroalg otoflokulasyon özelliğine sahiptir. Bu nedenlerden dolayı tercih edilen bir metod değildir (Laamanen vd. 2021).

Biyoflokulasyon, mikroorganizmalar aracılığıyla mikroalgal hücrelerin flokulasyonudur. Bu yöntemde flokülant olarak mikroorganizmanın kendisi veya salgıladığı ekstraselüler biyopolimerler kullanılabilir. Kullanılan mikroorganizmalar arasında çeşitli bakteri, fungus, maya ve mikroalg türleri yer almaktadır. Bu yöntemin çalışma prensibi henüz bilinmemektedir (Pathak ve Pandey 2022).

Fiziksel flokulasyon ultrason ile flokulasyon, elektroflokulasyon, manyetik partikül ile flokulasyon gibi fiziksel yöntemler kullanılarak yapılan bir flokulasyon çeşididir. Herhangi bir kimyasal ajan eklenmeden gerçekleştirildiği için çevre dostu bir yöntemdir (Li vd. 2020).

2.12 Mikroalgal Biyokütlenin Parçalanmasında Uygulanan Ön İşlem Yöntemleri

Mikroalglerde karbonhidratlar genellikle hücre duvarında bulunmaktadır. Çift tabakalı hücre duvarına sahip mikroalglerin içerdiği karbonhidrat kompozisyonu türden türe değişiklik göstermektedir. Fakat dış tabaka genellikle pektin, agar ve aljinat gibi polisakkaritlerden oluşurken, iç tabakada selüloz, hemiselüloz ve glikoproteinler mevcuttur. Hücre duvarının yanı sıra, mikroalglerde karbonhidratlar plastidlerde de bulunurlar ve nişasta formunda depolanırlar (Chen vd. 2013).



Şekil 2.4 Mikroalglerin hücre duvarı yapısı (Zabed vd. 2019)

Biyoetanol üretiminde, mikroalglerde bulunan karbonhidratların kullanılması için biyokütlenin parçalanması ve polisakkaritlerin monomerlerine ayrışarak fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkması gerekmektedir. Ön işlem olarak bilinen bu aşama aynı zamanda şekerlerin çözünürlüğünü ve yüzey alanını artıran önemli bir süreçtir (Hernández vd. 2015) Dolayısıyla, fermantasyondan önce mikroalgal biyokütledeki fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkarılması için uygun bir ön işlem yöntemini seçmek elzemdir. Ön işlem aşaması fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik olmak üzere birçok farklı yöntemi içermektedir (Priya vd. 2023)

2.12.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön işlem yöntemleri

Fiziksel ön işlem yöntemlerinde mikroalg hücrelerin parçalanması ve karbonhidratların hidrolizi fiziksel ajanların kullanımı ile gerçekleşmektedir. Bu fiziksel yöntemler arasında mikrodalga, ultrasonikasyon, boncuk frezeleme, yüksek basınçlı homojenizasyon gibi birçok farklı ön işlem stratejisi mevcuttur. Biyoetanol üretiminde fiziksel ön işlem yöntemi, kullanılan mikroalgin fizyolojik özellikleri göz önünde bulundurularak tercih edilmelidir. Bunun yanı sıra, uygulanan işlemin süresi ve şiddeti de yöntemin etkili olmasında oldukça önemlidir (Lakatos vd. 2019; Priya vd. 2023).

Ultrasonikasyon: Ultrasonikasyon yönteminde farklı frekanslarda ses dalgaları kullanılarak ortamda hızlı oluşan ve patlayan mikrokabarcıklar oluşturulmaktadır. Bu mikrokabarcıkların oluşturduğu hidrodinamik kesme kuvvetleri mikroalgerin hücre duvarında kuvvet uygulayarak hücre yapısının bozulmasını sağlamaktadır. Böylelikle hücre bileşenleri açığa çıkmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı oldukça hızlı olması ve mikroalglerin kimyasal yapısında herhangi bir bozunmaya neden olmamasıdır. Fakat büyük çaplı üretimlerde kullanım zorluğu olması ve enerji tüketiminin yüksek olması bu ön işlem yönteminin kullanımını kısıtlamaktadır (Kusmiyati vd. 2023).

Boncuk frezeleme: Bu yöntem, mikroalgal biyokütlenin ön işleminde kullanılan en eski yöntemlerden olmakla birlikte, oldukça basit ve etkili bir yöntemdir. Boncuk frezeleme tekniğinde çelik, seramik, cam ve kuvars gibi materyallerden oluşan boncuklar mikroalgal biyokütle ile birlikte yüksek hızda çalkalanmaktadır. Çalkalama sonucunda mikroalg hücreleri ve boncuklar arasındaki fiziksel çarpışma, mikroalg hücrelerinin bozunmasına neden olmaktadır. Boncuk frezeleme yöntemini etkileyen en önemli unsurlar arasında boncukların sahip olduğu özellikler ve kullanılan mikroalg türünün sahip olduğu fizyolojik özelliklerdir. Fakat bu yöntem ekipmanın soğutulması gerekmesinden dolayı, özellikle büyük çaplı üretimde yüksek enerji sarfiyatına neden olmaktadır (Nagarajan vd. 2020; Agarwalla vd. 2023).

Yüksek basınçlı homojenizasyon: Bu yöntemde mikroalg hücrelerine yüksek basınç uygulanarak parçalanma sağlanmaktadır. Mikroalg hücreleri yüksek basınçta bir nozuldan yüksek hızda geçerken ani basınç düşmesi ve çarpışma kuvvetinin de etkisiyle mekanik bir parçalanma meydana gelir. Boncuk frezeleme yöntemine kıyasla, bu işlemde yüksek miktarlarda ısı açığa çıkmadığından kullanımı daha avantajlıdır. Böylelikle, büyük ölçekli uygulamalar için de uygun bir yöntemdir. Mikroalglerin nozulden geçiş hızı ve viskozitesi, uygulanan basınç gibi faktörler yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin başarısını etkilemektedir (Nagarajan vd. 2020)

Mikrodalga: Uygulanması oldukça basit olan bu yöntemde, mikrodalgada farklı frekanslarda manyetik dalgaların neden olduğu kinetik enerjiye bağlı olarak artan sıcaklık mikroalg hücrelerine homojen bir şekilde dağılarak mikroalg hücre duvarının

parçalanmasına neden olmaktadır (Onumaegbu vd. 2018) Kısa sürede etkili sonuçlar elde edilen bu yöntem birçok mikroalg türünün hücre duvarı parçalanmasında kullanılabilir. Fakat bu yöntemi uygularken dikkat edilmesi gereken en önemli unsur yüksek ısı uygularken protein denatürasyonuna neden olunmamasıdır. Dolayısıyla, bu aşamanın optimize edilmesi oldukça önemlidir. Prosesin toplam enerji ihtiyacı ve maliyetinin yüksek olması mikrodalga yönteminin en önemli dezavantajlarından (Ha vd. 2020; Agarwalla vd. 2023).

2.1.2.2 Kimyasal ön işlem yöntemleri

Kullanımı oldukça yaygın olan kimyasal ön işlem yöntemleri organik solventlerin, asidik ve alkali kimyasalların kullanıldığı, düşük maliyetli yöntemlerdir (Sirohi vd. 2021). Kimyasal ön işlem yöntemleri lignoselülozik ham maddelerde daha yüksek sıcaklık, basınç ve kimyasal konsantrasyonları gerektirmekle birlikte, birçok inhibitörün de oluşumuna neden olmaktadır. Fakat mikroalglerin hücre duvarında lignin bulunmamasından dolayı, kimyasal ön işlem yöntemleri daha hafif koşullarda uygulanabilmektedir. Yapılan birçok çalışma mikroalgal biyokütlenin asit veya alkali ön işlemi sonunda biyoyakıt üretiminin efektif olduğunu göstermektedir (Chen vd. 2013). Aşağıda mikroalglerden fermente edilebilir şekerlerin eldesi için yaygın olarak kullanılan kimyasal ön işlem yöntemlerinden bahsedilmiştir.

Asidik ve alkali kimyasallar: Asidik ve alkali kimyasallar ile ön işlem yöntemi oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir ve mikroalg hücrelerindeki nişasta ve selülozun parçalanmasında etkilidirler. Bu amaçla kullanılan en yaygın asitler sülfürik asit (H_2SO_4) ve hidroklorik asit (HCl), en yaygın alkali bileşikler ise sodyum hidroksittir (NaOH). Bu asit ve bazlar genellikle 120-150°C gibi sıcaklıklarda kullanılırlar. Bu yöntemde kullanılan asit veya bazın dozu, sıcaklık, uygulanan süre ve pH gibi parametreler mikroalgal karbonhidratların efektif hidrolizini etkileyen önemli faktörlerdir (Yoo vd. 2015; Sirohi vd. 2021)

Enzimatik hidrolize gerek kalmadan mikroalglerdeki nişasta ve selülozu etkili bir şekilde parçalamasına rağmen bu yöntemin bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin, asidik

veya bazik bileşiklerin kullanımından sonra fermentasyon ortamının pH'sının mayaların optimal pH aralığına ayarlanması gerekmektedir. Dolayısıyla, fazladan kimyasal kullanımı sürecin toplam maliyetini de artırmaktadır. Bunun yanı sıra, asit ve bazların fermentörlerde korozif etkileri de mevcuttur. Asidik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda kullanılması furfural ve hidroksimetil furfural gibi fermentasyon inhibitörlerinin oluşumuna yol açmaktadır (Sirohi vd., 2021; Yoo vd., 2015).

Süperkritik akışkanlar: Süperkritik akışkanların mikroalglerin hücre duvarının parçalanmasında kullanımı çevre dostu bir yaklaşımdır. Hem sıvı hem de gazların özelliklerini taşıyan bu akışkanlardan en yaygın kullanılanı CO₂'dir. Akışkan özellikleri ile sıcaklık, basınç, biyokütle konsantrasyonu gibi parametrelerin etkileşimi sonucu istenen ürününler kolayca ayrılmaktadır. Fakat bu yöntem oldukça maliyetlidir ve enerji tüketimi yüksektir. Dolayısıyla, büyük çaplı üretimlerde kullanımı da dezavantajlıdır (D'Hondt vd. 2017).

Amonyak lif patlaması (AFEX): AFEX yönteminde sıvı susuz amonyak, yüksek basınç ve belirli sıcaklık koşullarında mikroalg hücre duvarına nüfuz eder ve büyük porların oluşumuna yol açar (Phwan vd. 2018). Nem içeriği, basınç, reaksiyon süresi, kullanılan amonyak konsantrasyonu gibi parametreler sürecin efektif olması açısından önemlidir. AFEX yönteminin en önemli özelliklerinden biri amonyağın geri dönüşümünün sağlanabilmesidir. Bunun yanı sıra biyokütlenin amonyak ile muamele edilmesi sonucu furfural ve hidroksimetil furfural gibi inhibitörlerin oluşumu gözlenmemektedir (Kim, 2018). Fakat AFEX yönteminin kullanımı genellikle lignoselülozik ham maddelerde daha yaygındır (Phwan vd. 2018).

2.12.3 Biyolojik ön işlem yöntemleri

Birçok bakteri ve fungus mikroalglerle aynı ekolojik nişi paylaşırlar. Bu mikroorganizmalar ve mikroalgler arasındaki ilişki simbiyotik ve parazitik gibi olumlu veya olumsuz olabilmektedir. Simbiyotik ilişki söz konusu olduğunda mikroorganizmalar ve algler arasında bir besin alışverişi söz konusudur. Bunun yanı sıra, bakteri ve funguslar mikroalgler üzerinde gelişip, içerdikleri karbonhidratlar, lipidler ve proteinler gibi

makromolekülleri parçalayarak beslenme ihtiyaçlarını karşıladığı durumlar da söz konusudur. Hidrolitik mikroorganizmalar bazı enzimler salgılayarak mikroalglerdeki selüloz ve hemiselülozu degrades edebilmektedir. Dolayısıyla, biyolojik ön işlem yöntemleri fungus ve bakterilerin kendisini veya ürettiği enzimleri kullanarak mikroalgal biyokütlenin parçalanmasını hedeflemektedir. Diğer ön işlem yöntemleri ile karşılaştırıldığında, bu yöntemlerin uygulanması herhangi bir toksik bileşiğin oluşumuna neden olmadığı için daha çevre dostu yaklaşımları kapsamaktadır (Bhushan vd. 2023).

Biyolojik ön işlemede tüm hücre yöntemi: Adından da anlaşıldığı üzere, tüm hücre yöntemi fungus ve bakterileri hücrelerinin kullanıldığı yöntemleri içermektedir. Hidrolitik özelliklere sahip bakteriler mikroalgal biyokütlenin ön işlem sürecinde funguslara kıyasen daha çok tercih edilmektedirler. Birçok farklı hidrolitik bakteri grubu mikroalgal hücre duvarının parçalanmasında rol oynamaktadır. Bu gruplardan biri olan algisidal bakteriler, salgıladıkları enzimler aracılığıyla mikroalg hücre duvarını parçalamaktadırlar. Diğer bir grup ise laktik asit bakterilerinin yer aldığı silolama yapan bakterilerdir. Silolama yönteminde laktik asit bakterileri biyokütleyle eklenir ve ürettikleri asit sonucunda ortam pH'sını düşürerek polisakkaritlerin degradasyonunu kolaylaştırmaktadır. Selüloz ve hemiselülozun hidrolizinde etkin olan bu yöntemin uygulanması uzun zaman aldığından dezavantajlıdır (Barati vd. 2021).

Fungusların salgıladığı hidrolitik enzimler bakterilere göre çok daha fazladır. Fakat funguslar lignin degradasyonunda daha yaygın kullanılan mikroorganizmalar olduklarından lignoselülozik ham maddelerde kullanımları daha avantajlıdır. Bunun yanı sıra, fungusların kullanımı daha maliyetlidir ve gelişim süreleri bakterilere kıyasen daha uzundur. Bu nedenle mikroalgal biyokütlenin ön işleminde bakterilerin kullanımı daha avantajlıdır (Bhushan vd. 2023).

Tüm hücre yönteminde kullanılan bazı yaklaşımlar ise bakteri ve fungal konsorsiyumların kullanımını desteklemektedir. Bu yöntemde mikroalgal biyokütlenin ön işleminde konsorsiyumda bulunan mikroorganizmaların sinerjistik etkileşimlerinden yararlanılmaktadır. Bu sayede salgılanan metabolitler aracılığıyla polisakkaritlerin degradasyonu gerçekleşmektedir. Mikrobiyal konsorsiyumların yüksek hidroliz etkinliği

ve substrat kullanımı gibi önemli avantajları mevcuttur. Fakat, bu yöntemi uygulanmasının bazı teknik zorlukları mevcuttur. Örneğin, büyük çaplı uygulamalarda mikroorganizmaların sinjeristik etkileşimleri için gerekli koşulların sağlanması ve sürdürülmesi oldukça zordur (Zabed vd. 2019).

Biyolojik ön işlemden enzimlerin kullanımı: Bu yöntemde mikroorganizmaların kendilerinden ziyade ürettikleri hidrolitik enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler tek veya birçok enzimin bulunduğu enzim kokteylleri şeklinde mikroalgal biyokütleye uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda enzim kokteyllerinin biyokütlenin farklı polisakkaritlerin degradasyonunda oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (Zabed vd. 2019). Fakat enzimlerin aktivitesi kısa sürede azalarak kaybolmaktadır. Bu yüzden tek hücre yöntemi bakteri ve fungusların canlılığını koruduğu ve hidrolitik aktiviteye süreç boyunca devam ettikleri için daha avantajlıdır (Lü vd. 2013).

2.13 Mikroalgal Biyoetanol Üretimi ile İlgili Yapılan Bazı Literatür Çalışmaları

Acebu vd. (2022) yaptıkları çalışmada, *Chlorella vulgaris* ESP-31 ve *Chlorella sorokiniana* AK-1'in steril edilmiş ve steril edilmemiş domuz atık suyundan nutrient giderimi ve karbonhidrat akümülayon potansiyelini araştırmışlardır ve biyoetanol üretimi yapmışlardır. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlara göre *C. sorokiniana* AK-1 ve *C. vulgaris* ESP-31'in hem sterilize edilmiş hem de sterilize edilmemiş domuz atık suyunda gelişim gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmada *C. sorokiniana* AK1'e göre daha yüksek biyokütle oluşumu ve karbonhidrat konsantrasyonu gösteren *Chlorella vulgaris* ESP-31'in biyokütle ve karbonhidrat üretiminde iyileştirmelerini, %25 domuz atık suyu ve %25 BG-11 seyreltmesinde gözlemlenmiştir. Optimum inokulum miktarı, ışık yoğunluğu, hasat süresi gözlemlenerek optimum koşullarda 4.2 g/L etanol elde etmişlerdir.

Dhandayuthapani vd. (2022) tatlı sudan izole ettikleri mikroalglerin çiğ süt atık suyunda gelişimini gözlemlenmiştir. İzole edilen mikroalglerden çiğ süt atık suyunda en yüksek gelişimi *Chlorella sorokiniana*'nın gösterdiğini tespit etmişlerdir. Optimum koşullarda

%75 süt atık suyu içeren besiyeri ortamında geliştirilen *C. sorokiniana* NITTS3'ten elde edilen hidrolizatın fermentasyonu sonucu 13.67 g/L etanol elde etmişlerdir.

Onay (2019)yaptığı çalışmada *Hindakia tetrachotoma* ME03'n farklı konsantrasyonlarda kentsel atık su içeren besiyerinde gelişim potansiyelini incelemiştir ve mikroalgal biyokütleye farklı kimyasal ön işlem ve enzimatik hidroliz stratejileri uygulamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre HCl'nin mikroalgal biyokütlenin n işleminde en uygun yöntem olduğu görülmüş ve enzimatik hidrolizde ise en iyi sonuç B-glukozidaz/selülaz ve a-amilaz enzim kompleksi kullanıldığında elde edilmiştir. Ayrıca Onay, yaptığı çalışmada %50 atık su içeren besiyeri ortamında kültive edilmiş *H. tertrachotoma*'nın biyoetanol üretimi için uygun bir ham madde olduğunu belirtmiştir. Çalışmada, *S. cerevisiae* ile yapılan fermentasyon sonucunda 11.2 ± 0.3 g/L etanol üretimi elde etmiştir.

Constantino vd. (2021) yaptıkları çalışmada 14 farklı mikroalg türlerinden elde ettikleri biyokütleyi hidrotermal sülfürik asit ve amilolitik enzimler (sırasıyla amiloglukozidaz ve α -amilaz) ile muamele etmişlerdir. Bu n işlem kombinasyonu sonucunda kullanılan mikroalg türlerinin büyük bir çoğunluğunda 100 g biyokütleden en az 34.0 ± 1.0 g indirgen şeker elde etmişlerdir. Biyoetanol retimi için seçtikleri *Chlorella sorokiniana*, *Tetraselmis sp.*, *Skeletonema sp.* mikroalglerini *S. cerevisiae* ile fermentasyona tabi tutumuşlardır. Fermentasyon deneyleri sonucunda en yüksek biyoetanol verimini 0.464 ± 0.013 g/L.h olmak üzere *C. sorokiniana* hidrolizatı kullanıldığında elde etmişlerdir.

Bahlawan vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada *Chlorella sp.* biyokütlesinin enzimatik hidrolizi için α -amilaz ve glukoamilaz enzimlerini kullanmışlardır. En iyi glukoz verimini pH 5'te ve 80°C'de beş saat boyunca 3% glukoamilaz ile muamele ettiklerinde bulmuşlardır. *S. cerevisiae* ile fermentasyon sonucunda en yüksek biyotanol konsantrasyonunu fermentasyonun 30. Saatinde, 0.5 g maya konsantrasyonunda 4.80 g/L olarak elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada enzimatik hidrolizin mikroalg biyokütlesindeki polisakkaritlerin degradasyonunda etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Yu vd. (2020) yaptıkları çalışmada iki farklı mikroalg türünden ıslak torrefaksiyon ve seyreltik asit ön işlemleri sonucu elde ettikleri hidrolizatı biyoetanol üretiminde kullanmışlardır. *S. cerevisiae* kullanılarak karanlıkta, 220 saat boyunca 29°C’de gerçekleştirilen fermantasyon sonucu en yüksek verimi *C. vulgaris* ESP-31 hidrolizatından elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda en yüksek indirgen şeker konsantrasyonu 98.11 g/L iken, en yüksek etanol verimini %7.61 olarak saptamışlardır. Çalışmada elde edilen düşük etanol verimine ortamda oluşan fermantasyon inhibitörlerinin neden olduğunu açıklamışlardır.

Chandra vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada kültür ortamının azot, fosfor, magnezyum, lizin içeriğinin ve kültür ortamının başlangıç pH’sının *Scenedesmus acuminatus*’un karbonhidrat akümüasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kültür ortamının pH’sının 9 olduğu ve 0.5 g/L lizin takviyesinin yapıldığı kültürasyon koşullarında karbonhidrat üretkenliğinin 3 kat, biyoetanol üretiminin ise 43 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışma, lizin içeren atıkların düşük maliyetli biyoetanol üretiminde mikroalgler için besin kaynağı olarak kullanım potansiyelini vurgulamıştır.

Shenbagamuthuraman ve Kasianantham (2023) tarafından yapılan çalışmada *C. vulgaris* biyokütlesine mikrodalga radyasyonu ve asit ile hidroliz yöntemleri uygulanmıştır. Hidrolizatın %3 asit ve 5 dk radyasyon ile muamele edilmesi sonucunda 6.733 g/L indirgen şeker elde etmişlerdir. Fermantasyon süresi, inokulum konsantrasyonu ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyonu sonucu 3.299 g/L biyoetanol üretmişlerdir. Sürecin optimizasyonu için RSM ve ANN metodlarından faydalanmışlardır.

Beigbeder ve Lavoie (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 25 farklı mikroalg türünün çeşitli CO₂ konsantrasyonlarına karşı dayanıklılıklarını değerlendirmişler ve bu koşullara en dayanıklı tür olarak *Parachlorella kessleri* türünü belirlemişlerdir. Daha sonra, farklı ışık ve karanlık döngüleri ile CO₂ konsantrasyonlarının etkisini araştırmak amacıyla *P. kessleri*’yi farklı kültürasyon koşullarında geliştirmişlerdir. En yüksek büyüme hızı ve biyokütle üretkenliğini %2.5 domuz gübresi, %5 CO₂ ve 20 saat ışık 4 saat karanlık koşullarında gösteren *P. kessleri* hidrolizatından *S. cerevisiae* kullanılarak yapılan fermantasyon deneyleri sonucu 3.5 g/L biyoetanol elde etmişlerdir.

Jafari Olia vd. (2022) yaptıkları çalışmada *Chlorella* S4 biyokütlesine farklı koşullarda asit termal ön işlem uygulamışlardır. En iyi glukoz konsantrasyonunu biyokütleyi 121°C’de 20 dk boyunca %3 sülfürik asit ile muamele ettiklerinde elde etmişlerdir. *Chlorella* S4 hidrolizatının termotolerant *S. cerevisiae* ile fermantasyonu sonucunda 8.31 g/L biyoetanol elde etmişlerdir.

Bibi vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Closteriopsis acicularis* türünün farklı fosfat konsantrasyonlarında ve pH aralıklarında kültivasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın bulgularına göre *C. acicularis* en yüksek gelişimi 0.115 g/L fosfat konsantrasyonunda ve pH 9’da gerçekleştirmiştir. Aynı zamanda bu parametrelerin optimizasyonu sonucunda karbonhidrat akümülyasyonunda artış gözlemlenmiştir. RSM metodu ile optimize edilen parametreler uygulanarak mikroalg hidrolizatının fermantasyonu sonucu 14.9 g/L biyoetanol elde etmişlerdir.

Ngamsirisomsakul vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada *Chlorella* türlerinin biyoetanol üretiminde ham madde olarak kullanım potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada, mikroalg biyokütlenin asit-hidrotermal yöntemiyle ön işlem koşulları cevap yüzey analizi ile belirlemişlerdir. Çalışmada elde ettikleri bulgulara göre, 117°C’de %1.5 sülfürik asit içinde 20 dakika bekletilmiş %20 biyokütle kullanımı, ön işleme tabi tutulmamış biyokütleye kıyasen 3.5 kat daha yüksek etanol üretimi ile sonuçlanmıştır. Bu koşullarda ön işleme tabi tutulmuş ham maddenin kullanımı sonucu etanol üretimini 5.62 g/L bulmuşlardır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar

3.1.1.1 Mikroalg ve kültürasyon koşulları

Tez çalışmasında kullanılan *C. vulgaris* mikroalgal biyokütlesi Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınmıştır. *C. vulgaris* kültürasyonu için 0.5 g/L havuç şekeri içeren BG-11 besiyeri (1.5 g/L NaNO₃, 75 mg/L MgSO₄ · 7H₂O, 40 mg/L K₂HPO₄, 36 mg/L CaCl₂ · 2H₂O, 6 mg/L ferrik amonyum sitrat, 6 mg/L sitrik asit · H₂O, 1 mg/L Na₂EDTA · 2H₂O, 2.86 mg/L H₃BO₃, 20 mg/L Na₂CO₃, 1.81 mg/L MnCl₂ · 4H₂O, 0.39 mg/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.22 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0.04 mg/L Co(NO₃)₂ · 6H₂O ve 0.079 mg/L CuSO₄ · 5H₂O) hazırlanarak otoklavda (121°C’de 15 dakika) steril edilmiştir. 250 ml erlenlerde çalışma hacmi 100 ml olacak şekilde BG-11 besiyerinden aktarılıp önceden kültür edilmiş mikroalg stoğundan %10 oranında inokulum aktarılmıştır. Mikroalgler 7 gün boyunca 2400 lux ışık altında kültive edilmiştir. Kültivasyon sonunda hasatlama yapma amacıyla 5000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich/Rotofix 32A) edildikten sonra elde edilen yaş biyokütle etüvde 70°C’de 24 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen kuru biyokütle fermentasyon deneylerinde kullanılabilecek kadar dolapta saklanmıştır.

3.1.1.2 Mayalar ve inkübasyon koşulları

Fermentasyon aşamasında kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces marxianus* mayaları Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınmıştır. Mayaların Potato Dekstroz Agar (PDA/Merck) içeren katı ve yatkı besiyerlerine ekimleri yapılarak fermentasyon deneylerinde kullanılabilecek kadar stok kültürler halinde +4°C’de buzdolabında saklanmışlardır. Fermentasyon deneylerinden önce mayaların Yeast (3g/L) Pepton (10

g/L) Glukoz (20 g/L) besiyerine ekimleri yapılmıştır ve 30°C’de 24 saat çalkalamalı inkübatörde (Gerhardt THO 500/1) inkübe edilmişlerdir.

3.1.2 Kullanılan gıda atıkları

Tez çalışmasında mikroalgal gelişimi desteklemek amacıyla BG-11 besiyerine eklenen havuç şekerinin eldesi için Belso A.Ş.’den havuç posaları temin edilmiştir. Etüvde 24 saat boyunca 70°C’de kurutulan havuç posaları çapı 0.24 cm olacak şekilde endüstriyel değirmenden (Miprolab) geçirilmiştir. Havuç posalarından 100 g/L olacak şekilde sıvı stok hazırlanmıştır. Hazırlanan stok %1 seyreltik H₂SO₄ ile ön işleme tabi tutulup 121°C 15dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrasında elde edilen havuç posası hidrolizatı Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzülerek katı kısmı atılmış olup, sıvı kısmı BG-11 besiyerinde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

Fermantasyon deneylerinde mayaların gelişimini desteklemek amacıyla kullanılan soğan kabukları yerel pazarlardan temin edilmiştir. Etüvde 24 saat boyunca 70°C’de kurutulan soğan kabukları endüstriyel değirmen kullanılarak çapı 0.24 cm olacak şekilde toz haline getirilmiştir. Soğan kabuklarından 100 g/L olacak şekilde stok hazırlanmıştır. Hazırlanan stok %1 H₂SO₄ ile ön işleme tabi tutulup 121°C 15dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrasında elde edilen havuç posası hidrolizatı Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzülerek katı kısmı atılmıştır ve sıvı kısmı fermantasyon deneylerinde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikroalg biyokütlesinden fermente edilebilir şekerlerin eldesi

Fermantasyon deneylerinde mikroalgal biyokütleden fermente edilebilir şekerlerin elde edilmesi amacıyla seyreltik asit ön işlem yöntemi kullanılmıştır. Kuru mikroalgal biyokütle 15 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanıp homojenizatörde (IKA/T18 digital ULTRA TURRAX) 13000 rpm’de 1 dakika homojenize edildikten sonra fermente

edilebilir şekerlerin açığa çıkarılması için %1 H₂SO₄ seyreltik asit ile otoklav varlığında (121°C’de 15 dakika) muamele edilmiştir. Elde edilen mikroalgal hidrolizat fermantasyon deneylerinde kullanılabilecek kadar +4°C’de saklanmıştır.

Fermantasyon deneylerinde mayalar eklenmeden önce mikroalgal hidrolizatı 5000 rpm.’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatantın pH’sı 5’e getirilmiştir ve otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril edilen mikroalgal hidrolizat fermantasyon deneylerinde kullanılmıştır. Elde edilen hidrolizattaki başlangıç şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi için ortama maya eklemekten önce 1 ml’lik örnekler ependorf tüplerine aktararak -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Fermantasyon deneyleri

Fermantasyon deneyleri 30°C’de 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde (Gerhardt THO 500/1) gerçekleştirilmiştir ve fermantasyon boyunca besiyerlerinden 6, 12 ve 24 saat sonunda 1.5 ml’lik örnekler alınıp mikrobiyal gelişim, indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol konsantrasyonu takibi yapılması amacıyla ependorf tüplerine aktarılmıştır. Aktarılan örnekler 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35 R). Santrifüj sonucu elde edilen supernatant kısmı ayırılıp etanol ve indirgen şeker konsantrasyonlarının ölçümünde kullanılmıştır. Kalan pellet ise mayaların mikrobiyal gelişiminin ölçümünde kullanılmıştır.

3.2.2.1 En yüksek biyoetanol üretimi gerçekleştiren mayanın belirlenmesi

C. boidinii, *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* arasından mikroalgal biyokütledeki fermente edilebilir şekerleri kullanarak en yüksek etanol verimine ulaşan mayayı seçmek amacıyla fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. YPG ortamında geliştirilmiş olan mayalar 50 g/L mikroalg başlangıç biyokütle konsantrasyonu içeren fermantasyon ortamına 10% inokulum oranında eklenerek fermantasyon deneyleri başlatılmıştır.

3.2.2.2 *C. vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi

C. vulgaris başlangıç biyokütle konsantrasyonunun fermantasyona olan etkisinin belirlenmesi amacıyla ön işleme tabi tutulmuş, 50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L *C. vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonu içeren hidrolizatlar *K. marxianus* ile fermantasyona tabi tutulmuştur.

3.2.2.3 SKA'nın fermantasyon sürecindeki etkisi

SKA'nın fermantasyon sürecini iyileştirme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla %1, %2, %3, %4 ve %5 oranlarında soğan kabuğu stoğu 50 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu içeren mikroalgal hidrolizata eklenmiştir. Ortamın pH'sı 5'e ayarlandıktan sonra fermantasyon deneyleri başlatılmıştır.

3.2.2.4 Farklı fermantasyon ortamlarının biyoetanol üretimi açısından karşılaştırılması

Maya gelişiminin ve biyoetanol üretiminin artırılarak fermantasyon ortamının optimize edilmesi amacıyla farklı fermantasyon takviyelerinin maya gelişimi ve biyoetanol üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla %3 SKA içeren Besiyeri 1 ve farklı azot kaynakları ile mineral tuzlar (5 g/L pepton, 3 g/L maya ekstraktı, 0.5 g/L MgSO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂ ve 0.05 g/L ZnSO₄) içeren Besiyeri 2 ortamları karşılaştırılmıştır. Her iki besiyeri de 200 g/L *C. Vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonu içeren hidrolizata fermantasyon takviyesi eklenerek hazırlanmıştır. Her iki fermantasyon ortamının pH'sı 5'e ayarlandıktan sonra 121°C 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.2.3 Analitik yöntemler

3.2.3.1 Etanol konsantrasyonlarının ölçülmesi

Fermantasyon deneylerinde 6, 12 ve 24 saat sonunda alınan örneklerden etanol konsantrasyonu gaz kromatografisi (GC2010/Shimadzu) kullanılarak ölçülmüştür. Gaz

kromatografisi cihazında alev iyonlaştırıcı dedektör (FID), 60 metre uzunluğunda RTX-Wax (RESTEK) kolonu kullanılmıştır. Azot taşıyıcı gaz olarak kullanılırken, hidrojen ve kuru hava FID dedektöründe kullanılmıştır.

Cihazdaki FID dedektörünün sıcaklığı 160°C, kolonun başlangıç sıcaklığı 19 dakika içinde 50°C'den 150°C'ye yükselecek şekilde ayarlanmıştır. Kolon basıncı 200 kPa'ya getirilmiştir ve kolon akışı 1.86 mL/dakika, toplam akış ise 190.4 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Wistara vd., 2016). Etanol ölçümü başlatılırken 1 µL örnek 140 °C sıcaklıktaki enjeksiyon bloğuna enjekte edilmiştir. Etanol ölçümü sırasında oluşan pikler gözlenmiş olup, etanol standardına göre gaz kromatografisi cihazında bulunan yazılım tarafından hesaplanmıştır. Böylece, etanol konsantrasyonları g/L cinsinden elde edilmiştir.

3.2.3.2 İndirgen şeker konsantrasyonlarının ölçülmesi

Steril hale gelen besiyerlerinin başlangıç indirgen şeker konsantrasyonları ve fermantasyon deneyinin başlatılmasından itibaren 6, 12, 24 ve 48.'inci saatteki şeker konsantrasyonu 540 nm. dalga boyunda spektrofotometrik olarak dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile saptanmıştır (Miller vd. 1959).

3.2.3.3 Mikrobiyal gelişimin spektrofotometrik tayini

Mikrobiyal gelişimi takip etmek için besiyerlerinden 6, 12, 24 ve 48 saat sonunda örnekler alınmıştır. Mikrobiyal gelişim, spektrofotometre kullanılarak 600 nm. dalga boyunda, optik yoğunluk (OD) takibi yapılarak belirlenmiştir.

3.2.3.4 Kinetik parametrelerin hesaplanması

Fermantasyona etki eden kinetik parametrelerin hesaplanması aşağıdaki formüller kullanılarak yapılmıştır.

Teorik Etanol Verimi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Kim ve Lee 2007).

$$\text{Teorik etanol verimi (\%)} = \frac{E \text{ (g/L)}}{C_0 \text{ (g/L) } \times 0.511} \times 100$$

C_0 : başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu

E: etanol konsantrasyonu

Etanol Üretkenliği (Q_p) aşağıdaki kullanılarak hesaplanmıştır (Sanusi vd. 2020).

$$Q_p \text{ (g/L/h)} = \frac{E \text{ (g/L)}}{t}$$

E: etanol konsantrasyonu

t: maksimum etanol üretiminin gerçekleştiği spesifik zaman aralığı

Etanol Verimi ($Y_{P/S}$) aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Günan Yücel ve Aksu 2015).

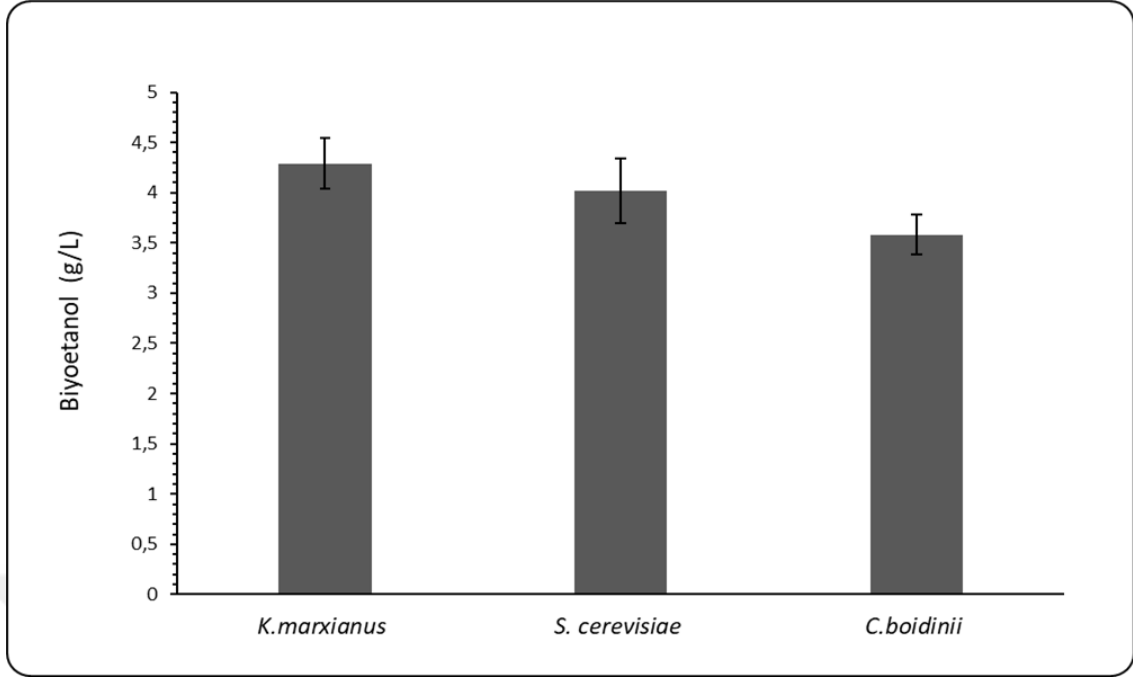
$$Y_{P/S} = \frac{\text{Maksimum etanol (g/L)}}{\text{Harcanan indirgen şeker (g/L)}}$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *C. Vulgaris* Biyokütlesinden Biyoetanol Eldesi İçin En Uygun Mayanın Belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ve *C. boidinii* mayalarının *C. vulgaris* biyokütlesinden elde edilen hidrolizattaki fermente edilebilir şekerleri kullanabilme ve biyoetanol üretme potansiyelleri incelenmiştir. 50 g/L mikroalg biyokütlesinin %1 seyreltik H₂SO₄ ile muamele edildikten sonra 121°C 15 dk otoklavlanması sonucu elde edilen hidrolizatın başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 9.51 ± 0.11 g/L olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.1 24 saatlik fermantasyon deneyi sonucunda her üç mayada elde edilen biyoetanol konsantrasyonlarını göstermektedir. Her üç mayada en yüksek biyoetanol konsantrasyonu fermantasyonun 12. saatinde elde edilmiştir. En yüksek biyoetanol üretimi 4.29 ± 0.25 g/L konsantrasyonunda *K. marxianus* ile elde edilmiştir. *K. marxianus*'u takiben, *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* de sırasıyla 4.02 ± 0.32 g/L ve 3.58 ± 0.20 g/L biyoetanol üretmişlerdir.



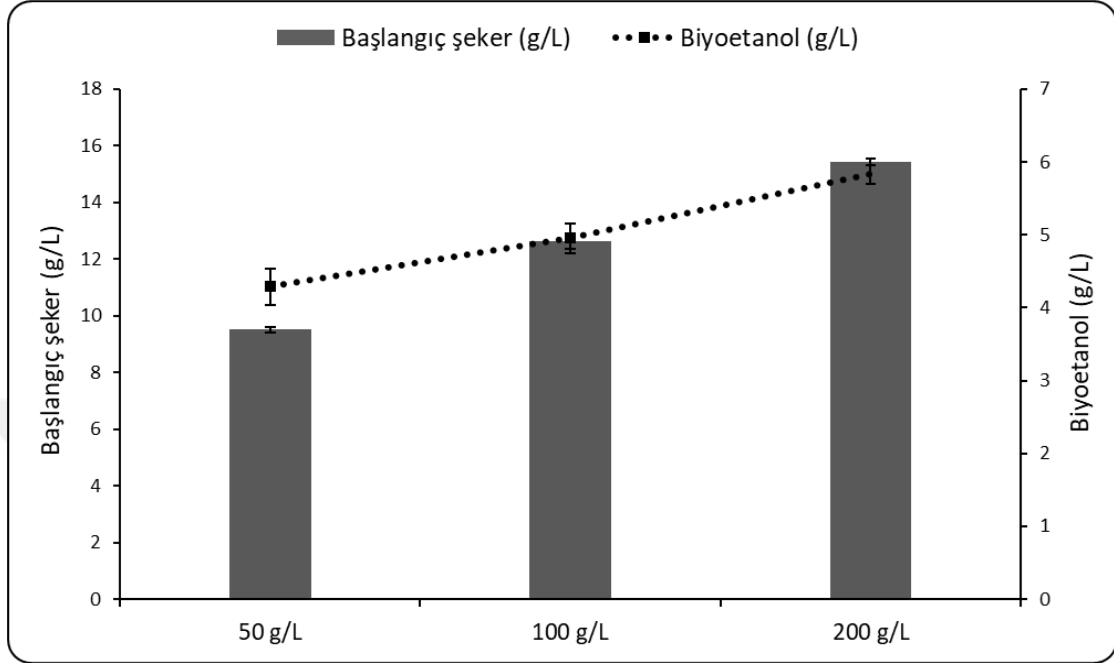
Şekil 4.1 *S. cerevisiae*, *K. marxianus* ve *C. boidinii*'nin biyoetanol konsantrasyonları (Ön işlem koşulları: %1 H₂SO₄, 121°C, 15 dakika, pH: 5; fermantasyon süresi: 12 saat, biyokütle konsantrasyonu: 50 g/L *C. vulgaris*)

Elde edilen sonuçlara göre, *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretiminin optimize edilmesi amacıyla sonraki fermantasyon deneylerinde en yüksek biyoetanol üretimi gerçekleştiren maya olan *K. marxianus* kullanılmıştır.

4.2 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Mikroalgal Biyoetanol Üretimine Etkisi

Mikroalgal biyoetanol üretiminde başlangıç biyokütle konsantrasyonunun biyoetanol üretimine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla 50 g/L, 100 g/L, 200 g/L *C. vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonu %1 seyreltik H₂SO₄ ile muamele edildikten sonra 121°C 15 dk otoklavlanmıştır. Ön işlem sonucunda elde edilen başlangıç şeker ve biyoetanol konsantrasyonları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Mikroalgal biyokütlenin hidrolizi sonucunda en yüksek başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 15.43 ± 0.13 g/L olarak 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda saptanmıştır. 100 g/L ve 50 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlarından sırasıyla 12.64 ± 0.28 g/L ve 9.51 ± 0.11 g/L indirgen şeker elde edilmiştir. 50 g/L mikroalg hidrolizatının fermantasyonu sonucu 4.29 ± 0.25 g/L, 100 g/L mikroalg hidrolizatının fermantasyonu sonucu 4.95 ± 0.21 g/L, 200

g/L mikroalg hidrolizatının fermantasyonu sonucu ise 5.83 ± 0.13 g/L biyoetanol üretimi saptanmıştır.



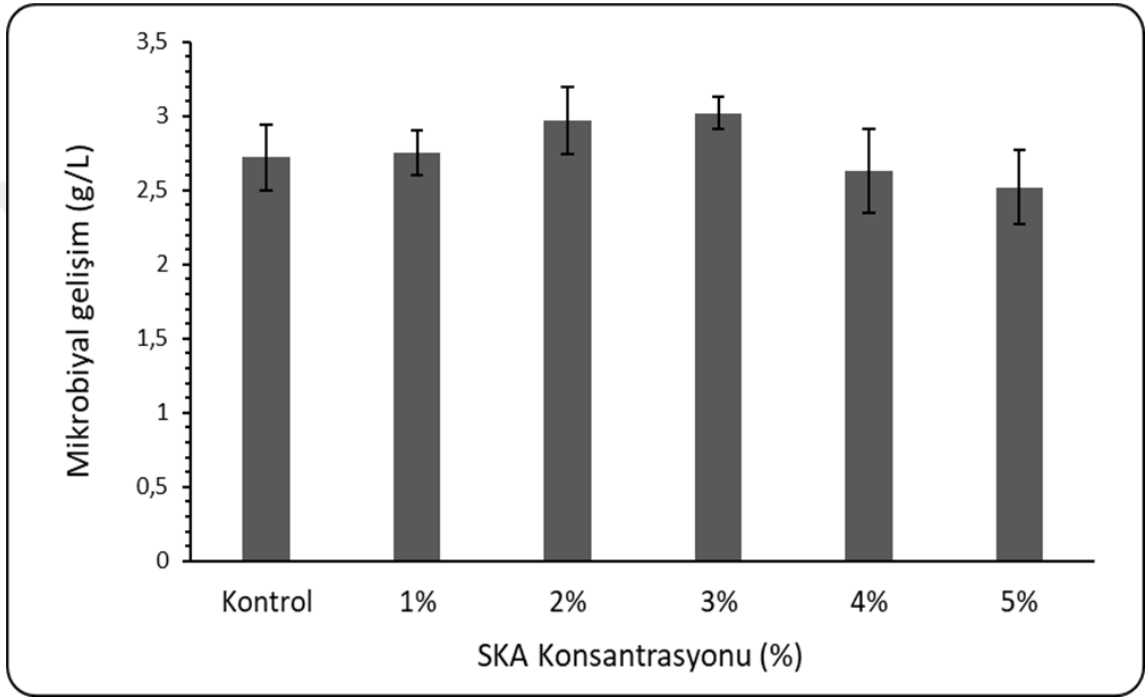
Şekil 4.2 50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında başlangıç indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonları (Ön işlem koşulları: %1 H₂SO₄, 121°C, 15 dakika, pH: 5; fermantasyon süresi: 12 saat)

4.3 SKA'nın Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimine Etkisi

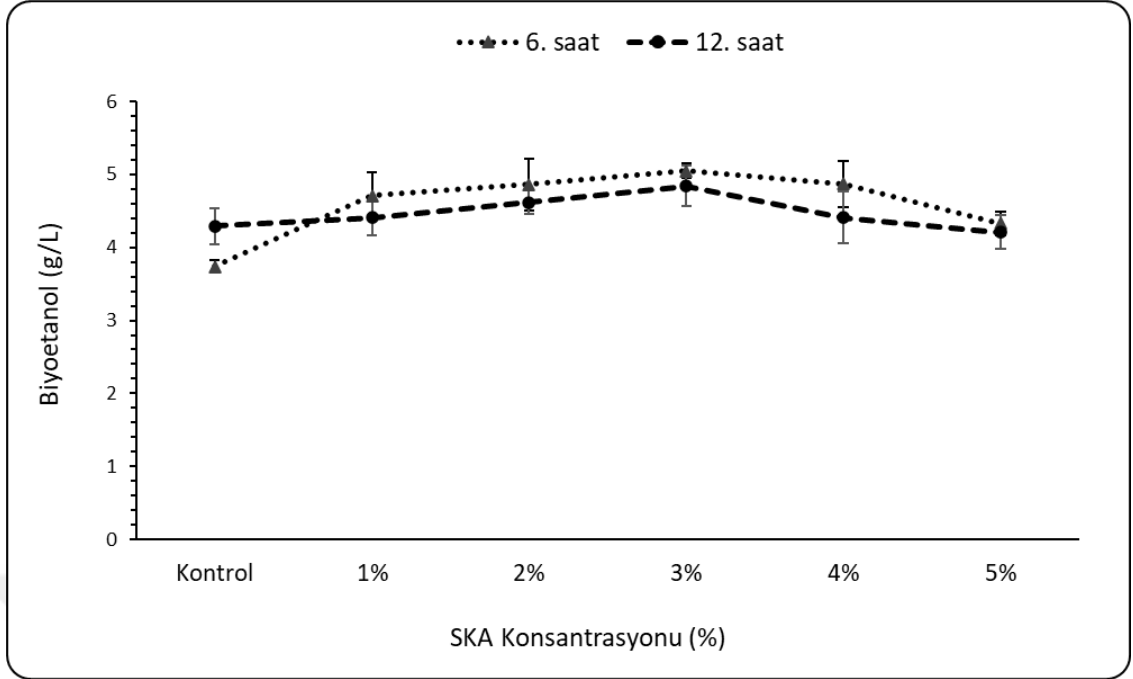
Tez çalışmasında yaygın olarak bulunan bir gıda atığı olan SKA'nın maya gelişimi ve biyoetanol üretimini iyileştirme potansiyeli incelenmiştir. 50 g/L *C. Vulgaris* biyokütlesi içeren hidrolizata %1, %2, %3, %4 ve %5 konsantrasyonlarında SKA eklenmiştir. SKA'nın fermantasyon sürecine olan etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi adına SKA içermeyen negatif kontrol ortamı da fermantasyona tabi tutulmuştur. Şekil 4.3'de farklı SKA konsantrasyonlarının fermantasyonun 24. Saatinde *K. Marxianus*'un mikrobiyal gelişimi üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek mikrobiyal gelişim %3 SKA kullanıldığında elde edilmiştir.

Şekil 4.4 farklı konsantrasyonlarda SKA'nın biyoetanol üretimine etkisini göstermektedir. SKA kullanıldığında en yüksek biyoetanol üretiminin yapıldığı

fermantasyon periyodunun kontrol deneyinden farklı olarak 6. Saatte elde edildiği görülmektedir. En yüksek biyoetanol üretimi 5.05 ± 0.10 g/L olarak %3 SKA kullanıldığında elde edilmiştir. %1, %2, %4 ve %5 soğan kabuğu hidrolizati kullanıldığında ise sırasıyla 4.71 ± 0.32 g/L, 4.86 ± 0.36 g/L, 4.87 ± 0.32 g/L, 4.33 ± 0.16 g/L biyoetanol üretimi saptanmıştır. Soğan kabuğunun kullanılmadığı kontrol ortamında ise fermentasyonun 12. Saatinde 4.29 ± 0.25 g/L biyoetanol elde edilmiştir.



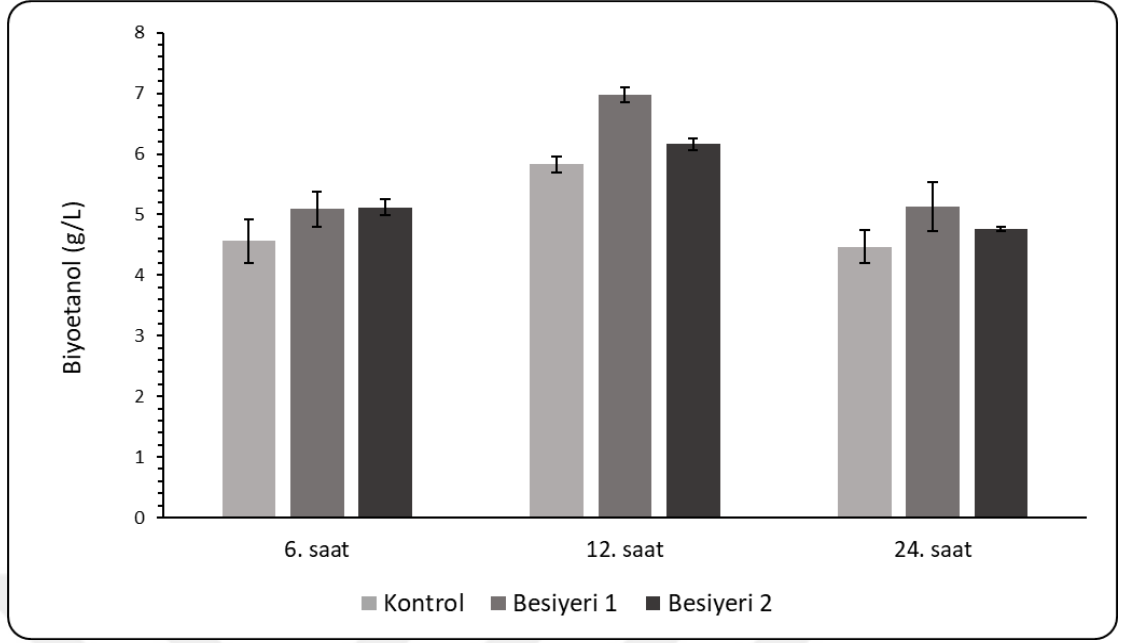
Şekil 4.3 Farklı SKA konsantrasyonlarının *K. Marxianus*'un mikrobiyal gelişimi üzerindeki etkisi (Ön işlem koşulları: %1 H_2SO_4 , $121^\circ C$, 15 dakika, pH: 5; fermentasyon süresi: 24 saat)



Şekil 4.4 Farklı SKA konsantrasyonlarında fermantasyonun 6. Ve 12. Saatinde biyoetanol konsantrasyonlarının karşılaştırılması (Ön işlem koşulları: %1 H₂SO₄, 121°C, 15 dakika, pH: 5; biyokütle konsantrasyonu: 50 g/L *C. Vulgaris*)

4.4 Farklı Fermantasyon Ortamlarının Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimi Açısından Karşılaştırılması

Tez çalışmasında, farklı fermantasyon ortamlarının maya gelişimi ve biyoetanol üretimi açısından değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan Besiyeri 1 (%3 SKA) ve Besiyeri 2 (5 g/L pepton, 3 g/L maya ekstraktı, 0.5 g/L MgSO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂ ve 0.05 g/L ZnSO₄) karşılaştırılmıştır. Her iki besiyerinin etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi amacıyla fermantasyon takviyesi içermeyen kontrol ortamı da fermantasyona dahil edilmiştir. Şekil 4.5 Besiyeri 1 ve Besiyeri 2 ortamlarının *K. marxianus*'un biyoetanol üretimine olan etkisini göstermektedir. Şekilde de görüldüğü üzere %3 SKA içeren Besiyeri 1'de fermantasyonun 12. Saatinde 6.98±0.12 g/L biyoetanol elde edilmiştir. Takviye eklenmeyen besiyeri kullanıldığında 5.83±0.13 g/L biyoetanol üretimi gözlenirken, Besiyeri 2'nin kullanımı sonucunda 6.16±0.09 g/L biyoetanol elde edilmiştir.



Şekil 4.5 *K. marxianus*'un farklı fermantasyon takviyeleri içeren besiyerleri varlığında biyoetanol üretiminin karşılaştırılması Ön işlem koşulları: %1 H_2SO_4 , 121°C, 15 dakika, pH: 5; biyokütle konsantrasyonu: 200 g/L *C. vulgaris*)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 *C. vulgaris* Biyokütlesinden Biyoetanol Eldesi için En Uygun Mayanın Belirlenmesi

Mikroalg biyokütlesindeki karbonhidrat içeriği ve konsantrasyonu değişmekle birlikte, başlıca bulunan monosakkaritler glukoz, ksiloz, fukoz, arabinoz ve mannozdur (de Carvalho Silvello vd. 2022). Mikroalg biyokütlesindeki karbonhidrat içeriği ve konsantrasyonunun değişken olması, biyoetanol üretiminde geniş aralıkta şekerleri metabolize edebilen mayaların kullanımını gerektirmektedir. *S. cerevisiae* yüksek etanol üretim kapasitesine sahip olmasına rağmen çeşitli şekerleri metabolize etme yeteneği oldukça düşüktür. Ksiloz, arabinoz, laktoz gibi şekerleri metabolize edememesi biyoetanol üretimindeki kullanımını kısıtlamaktadır (Pal ve Vij 2022).

Lignoselülozik ham maddelerden biyoetanol üretiminde yerel mayaların kullanımı ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Fakat, mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanılan mayaların çeşitliliği oldukça sınırlıdır. Tez çalışmasında yerel mayaların mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanım potansiyelleri incelenmiştir. *S. cerevisiae* yanı sıra, pentoz ve heksoz şekerleri metabolize edebilen *K. marxianus* ve *C. boidinii* gibi yerel mayaların *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretiminde kullanımı tercih edilmiştir.

5.2 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Mikroalgal Biyoetanol Üretimine Etkisi

Başlangıç biyokütle konsantrasyonu biyoetanol üretiminde oldukça önemli bir parametredir. Yüksek başlangıç biyokütle konsantrasyonunun kullanımı yüksek başlangıç şeker konsantrasyonlarının açığa çıkmasını, nihai etanol konsantrasyonunun artırılmasını ve su tüketimini düşürülmesini amaçlayan bir stratejidir (Modenbach ve Nokes 2013). Mikroalgal biyoetanol üretiminde yüksek başlangıç şeker konsantrasyonlarının kullanıldığı literatür çalışmaları sınırlıdır. Biyoetanol üretim sürecinin optimizasyonu ve daha yüksek verimde biyoetanol eldesi için bu parametrenin araştırılması önem arz etmektedir.

Tez çalışmasında, başlangıç biyokütle konsantrasyonunun mikroalgal biyoetanol üretimindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 50 g/L, 100 g/L ve 200 g/L *C.vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonları arasında en yüksek başlangıç şeker konsantrasyonu ve biyoetanol üretimi 200 g/L kullanıldığında elde edilmiştir. Benzer olarak, Condor vd. tarafından yapılan bir çalışmada en yüksek biyoetanol konsantrasyonu 200 g/L *C. Vulgaris* FSP-E başlangıç biyokütle konsantrasyonu kullanıldığında elde edilmiştir (Condor vd. 2022). Bir diğer çalışmada ise, benzer olarak, 200 g/L biyokütle konsantrasyonu kullanıldığında yüksek başlangıç şeker konsantrasyonlarına ulaşımlardır (Ngamsirisomsakul vd. 2019).

Yüksek biyokütle konsantrasyonları yüksek indirgen şeker ve biyoetanol üretimini hedeflense de bazı kısıtlama ve zorlukları da beraberinde getirmektedir. 200 g/L'den fazla başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında karıştırma sorunları ortaya çıkmaktadır ve buna bağlı olarak bir ölü bölge oluşumu görülmektedir (Kadhum vd. 2017). Bu zorluklar göz önünde bulundurularak, tez çalışmasında 200 g/L'yi aşan başlangıç biyokütle konsantrasyonları denenmemiştir.

5.3 SKA'nın Maya Gelişimi ve Biyoetanol Üretimine Etkisi

Fermantasyon ortamına besin takviyelerinin eklenmesi biyoetanol üretiminde verimi ve üretkenliği artırmaya yönelik önemli bir stratejidir. Bu bağlamda, tarım ve gıda endüstrilerinden açığa çıkan atıklar veya yan ürünler fermantasyon ortamında düşük maliyetli besin kaynakları olarak kullanılabilir (Kelbert vd. 2015). Soğan, dünyada en çok üretilen tarım 52ahsullerinden biridir. Fakat artan nüfusa bağlı olarak üretim taleplerinin karşılanmaya çalışılması sonucunda önemli miktarda soğan israfı oluşmakta ve bu durum da CO₂ emisyonlarına neden olmaktadır (Hsueh vd. 2023). Bu kapsamda, tez çalışmasında SKA fermantasyon takviyesi olarak değerlendirilmiştir. Maya gelişimi ve biyoetanol üretimine olan etkisinin araştırılması amacıyla farklı oranlarda SKA (%1-%5) fermantasyon ortamında kullanılmıştır.

SKA Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, S²⁻, K⁺, ve P³⁻ gibi elementlerle ve kuersetin, flavonoller ve vanilik asit gibi biyoaktif bileşikler açısından zengindir (Shabir vd. 2022; Tawfik vd. 2022).

Birçok çalışma soğan kabuğunun fenolik bileşikler bakımından zengin olduğunu göstermiştir. Özellikle flavonoid bakımından zengin beyaz soğanların yaklaşık olarak 366 mg/kg flavonoid içerdiği ve bu içeriğe kuersetinin de dahil olduğu tespit edilmiştir (Bains vd. 2023). Soğan kabuklarındaki kuersetin konsantrasyonunun ölçüldüğü bir çalışmada, soğan kabuğu ekstraktlarında 156 mg/g kuersetin olduğunu ve kuersetinin soğan kabuklarındaki flavonoid miktarının yaklaşık olarak %80'ini oluşturduğunu tespit etmişlerdir (M. Al-Ansari vd. 2023).

Fermantasyon sürecinin hızlanarak en yüksek etanol üretiminin fermantasyonun 6. Saatinde elde edilmesi SKA'nın mikrobiyal gelişimi destekleyen kompozisyonu ile açıklanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada biyogaz üretiminde soğan kabuğu atıklarını kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre soğan kabuğu atıklarındaki kuersetin varlığının fermantasyonu hızlandırdığını gözlemlemişlerdir (Tawfik vd. 2022). Bir başka çalışmada ise kuersetinin *S. Cerevisiae* üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kuersetinin redoks homeostazisini korumak, lipid peroksidasyonunu önlemek ve serbest radikalleri temizlemek gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla maya hücrelerinde oksidatif stres direncini artırabildiğini göstermişlerdir (Belinha vd. 2007). Böylelikle, fermantasyon sürecindeki hızlanma ve elde edilen verimin, fermantasyon ortamında kuersetinin etkilerine bağlı olarak oluşabileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında soğan kabuğu miktarının %3'ü aşmasıyla biyoetanol üretiminde düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüş, soğan kabuğu konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artan kuersetin miktarının mikrobiyal aktivite ve biyoetanol üretimi üzerindeki inhibitör etkisi üzerinden açıklanabilmektedir. Bu bulgularla uyumlu olarak Kumar vd. kuersetinin mikrobiyal gelişimi enerji metabolizması, sitoplazmik membran fonksiyonları ve nükleik asit biyosentezine etki ederek engellediğini belirtmişlerdir (Kumar vd. 2022). Böylelikle, tez çalışmasında sonraki aşamalarda mikrobiyal büyümeyi ve biyoetanol üretimini artırmak, ve fermantasyon sürecini optimize etmek amacıyla %3 SKA kullanılmıştır.

5.4 Farklı Fermantasyon Ortamlarının Biyoetanol Üretimi Açısından Karşılaştırılması

Tez çalışmasında fermantasyon ortamının iyileştirilmesi ve farklı besin kaynaklarının maya gelişimi ve biyoetanol üretimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla Besiyeri 1 ve Besiyeri 2 karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, SKA'nın biyoetanol üretiminde *K. Marxianus*'un gelişimini destekleyip biyoetanol üretimini artırmada efektif bir fermantasyon takviyesi olduğu görülmüştür.

Biyoetanol üretiminde fermantasyon takviyelerinin kullanımına yönelik birçok literatür çalışması mevcuttur. Nitiema-Yefanova vd. *S. Cerevisiae* S1 kaju elma suyu kullanılarak biyoetanol üretiminde fermente *Parkia biglobosa* tohumunu azot kaynağı olarak kullanmışlardır. Soğan kabuğu ile benzer olarak Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Zn^{2+} elementlerini içeren *P. Biglobosa*'nın kullanımı sonucu biyoetanol üretiminde %35 artış gözlemlenmiştir (Nitiema-Yefanova vd. 2021). Bir diğer çalışmada peynir altı suyu ve $K_2O_5S_2$ gibi maliyeti düşük tarımsal endüstriyel yan ürünlerin ve tuzların fermantasyon takviyesi olarak kullanım potansiyelini araştırmışlardır. Yapılan araştırma sonucunda bu ürünlerin fermantasyon takviyesi olarak kullanımının avantajlı olduğunu açıklamışlardır (Kelbert vd. 2015).

Tez çalışmasında 50 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu kullanıldığında %3 soğan kabuğu takviyesinin fermantasyon süresini 6. Saate düşürdüğü gözlemlenirken, aynı sonuç 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu kullanıldığında elde edilmemiştir. Fermantasyon süresinde bir değişiklik olmaması 200 g/L *C. Vulgaris* başlangıç biyokütle konsantrasyonunda yüksek şeker konsantrasyonlarının mevcut olmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 5.1 Fermantasyon deneylerinin kinetik parametre sonuçları

Fermantasyon ortamı	Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Biyoetanol Konsantrasyonu (g/L)	Qp (g/L.h)	Yp/s (g/g)	Teorik Etanol Verimi (%)
50 g/L <i>C. Vulgaris</i>	9.51±0.11	4.29±0.25	0.36	0.50	88
200 g/L <i>C. Vulgaris</i>	15.43±0.13	5.83±0.13	0.49	0.45	74
Besiyeri 1	15.67±0.34	6.98±0.12	0.58	0.48	87
Besiyeri 2	15.14±0.28	6.16±0.09	0.51	0.45	80

Çizelge 5.1’de 50 g/L *C. Vulgaris* ile yapılan fermantasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, başlangıç biyokütle konsantrasyonunun artırılmasının ve farklı fermantasyon takviyelerinin eklenmesinin biyoetanol üretiminde ve Qp değerinde artışa neden olduğu gösterilmektedir. Besiyeri 1, Besiyeri 2 ile karşılaştırıldığında soğan kabuğunun etkisinin çok daha fazla olduğu görülmektedir. 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu ve %3 soğan kabuğu kullanıldığında biyoetanol üretkenliği 0.36 g/L.h’den 0.58 g/Lh’ye artmıştır.

5.5 Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmasında *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *C. boidinii* gibi yerli mayalar kullanılarak havuç posası içeren BG-11 ortamında fotoheterotrofik koşullarda geliştirilen *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan mayalar arasında *K. marxianus*, mikroalgal biyokütlerdeki indirgen şekerleri kullanarak en yüksek biyoetanol konsantrasyonuna ulaşmıştır. Fermantasyon koşullarının iyileştirilerek daha yüksek biyoetanol konsantrasyonlarına ulaşmak amacıyla başlangıç biyokütle konsantrasyonu, SKA konsantrasyonu ve farklı takviyeler içeren fermantasyon ortamlarının karşılaştırılması gibi parametreler optimize edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, *K. marxianus* kullanılarak *C. vulgaris* biyokütlesinden biyoetanol üretimi için en optimal

koşulların 200 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda ve %3 SKA takviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu koşullarda biyoetanol üretiminde 1.6 kat artış gözlemlenmiş olup 6.98 ± 0.12 g/L biyoetanol üretilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar *K. marxianus*'un mikroalgal biyoetanol üretiminde kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu ve soğan kabuğu gibi düşük maliyetli gıda atıklarının fermantasyon ortamında maya gelişimini destekleyici ve biyoetanol üretimini artırıcı etkileri olduğunu vurgulamaktadır. Bu bağlamda, ileriki çalışmalarda gıda atıklarının biyoetanol üretim sürecindeki kullanım potansiyellerinin değerlendirilmesi, fermantasyon sürecini iyileştirmede daha çevreci ve düşük maliyetli yaklaşımların kullanımını mümkün kılabilir.



KAYNAKLAR

- 2021 BM Gıda İsrarı Raporu: Türkiye’de her yıl 7,7 milyon ton yiyecek çöpe atılıyor. (2021, March 5). BBC News Türkçe. <https://www.bbc.com/turkce/haberler-turkiye-56291957>
- 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.
- Acebu, P. I. G., de Luna, M. D. G., Chen, C. Y., Abarca, R. R. M., Chen, J. H., & Chang, J. S. (2022). Bioethanol production from *Chlorella vulgaris* ESP-31 grown in unsterilized swine wastewater. *Bioresource technology*, 352, 127086.
- Afedzi, A. E. K., & Parakulsuksatid, P. (2023). Recent advances in process modifications of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102961.
- Agarwalla, A., Komandur, J., & Mohanty, K. (2023). Current trends in the pretreatment of microalgal biomass for efficient and enhanced bioenergy production. *Bioresource Technology*, 369, 128330.
- Aghaei, S., Alavijeh, M. K., Shafiei, M., & Karimi, K. (2022). A comprehensive review on bioethanol production from corn stover: Worldwide potential, environmental importance, and perspectives. *Biomass and Bioenergy*, 161, 106447.
- Ajit, A., Sulaiman, A. Z., & Chisti, Y. (2017). Production of bioethanol by *Zymomonas mobilis* in high-gravity extractive fermentations. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 123-135.
- Al-Ansari, M. M., Al-Humaid, L., Aldawsari, M., Abid, I. F., Jhanani, G. K., & Shanmuganathan, R. (2023). Quercetin extraction from small onion skin (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* Don.) and its antioxidant activity. *Environmental Research*, 224, 115497.
- Aliyu, A., Lee, J. G. M., & Harvey, A. P. (2021). Microalgae for biofuels via thermochemical conversion processes: A review of cultivation, harvesting and drying processes, and the associated opportunities for integrated production. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100676.
- Althuri, A., & Mohan, S. V. (2022). Emerging innovations for sustainable production of bioethanol and other mercantile products from circular economy perspective. *Bioresource Technology*, 363, 128013.

- Ammar, E. M., Arora, N., & Philippidis, G. P. (2020). The prospects of agricultural and food residue hydrolysates for sustainable production of algal products. *Energies*, 13(23), 6427.
- Ayodele, B. V., Alsaffar, M. A., & Mustapa, S. I. (2020). An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first-and second-generation sugar-based feedstocks. *Journal of Cleaner Production*, 245, 118857.
- Azarpour, A., Zendehboudi, S., Mohammadzadeh, O., Rajabzadeh, A. R., & Chatzis, I. (2022). A review on microalgal biomass and biodiesel production through Co-cultivation strategy. *Energy Conversion and Management*, 267, 115757.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and biophysics reports*, 10, 52-61.
- Bader, A. N., Rizza, L. S., Consolo, V. F., & Curatti, L. (2020). Efficient saccharification of microalgal biomass by *Trichoderma harzianum* enzymes for the production of ethanol. *Algal research*, 48, 101926.
- Bahlawan, Z. A. S., Damayanti, A., Putri, R. D. A., Triwibowo, B., Prasetyawan, H., Aji, S. P. K., & Prawisnu, A. (2022). Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae. *Materials Today: Proceedings*, 63, S373-S378.
- Bains, A., Sridhar, K., Singh, B. N., Kuhad, R. C., Chawla, P., & Sharma, M. (2023). Valorization of onion peel waste: From trash to treasure. *Chemosphere*, 343, 140178.
- Baptista, M., & Domingues, L. (2022). *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnology Advances*, 60, 108027.
- Barati, B., Zafar, F. F., Rupani, P. F., & Wang, S. (2021). Bacterial pretreatment of microalgae and the potential of novel nature hydrolytic sources. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101362.
- Barbosa, R. C., Soares, J., & Martins, M. A. (2020). Low-cost and versatile sensor based on multi-wavelengths for real-time estimation of microalgal biomass concentration in open and closed cultivation systems. *Computers and Electronics in Agriculture*, 176, 105641.
- Behera, S. S., Saranraj, P., & Ray, R. C. (2022). Microbial bioethanol fermentation technologies—Recent trends and future prospects. *Biofuels and biorefining*, 75-108.
- Beigbeder, J. B., & Lavoie, J. M. (2022). Effect of photoperiods and CO₂ concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol. *Journal of CO₂ Utilization*, 58, 101934.

- Belinha, I., Amorim, M. A., Rodrigues, P., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., & Costa, V. (2007). al. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), 2446-2451.
- Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2011). Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, 102(23), 10868-10874.
- Bender, L. E., Lopes, S. T., Gomes, K. S., Devos, R. J. B., & Colla, L. M. (2022). Challenges in bioethanol production from food residues. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101171.
- Bhatt, A., Khanchandani, M., Rana, M. S., & Prajapati, S. K. (2022). Techno-economic analysis of microalgae cultivation for commercial sustainability: A state-of-the-art review. *Journal of Cleaner Production*, 370, 133456.
- Bhushan, S., Jayakrishnan, U., Shree, B., Bhatt, P., Eshkabilov, S., & Simsek, H. (2023). Biological pretreatment for algal biomass feedstock for biofuel production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(3), 109870.
- Bibi, F., Yasmin, H., Jamal, A., Al-Harbi, M. S., Ahmad, M., Zafar, M., ... & Ali, M. I. (2021). Deciphering role of technical bioprocess parameters for bioethanol production using microalgae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7595-7606.
- Bonenkamp, T. B., Middelburg, L. M., Hosli, M. O., & Wolffenbuttel, R. F. (2020). From bioethanol containing fuels towards a fuel economy that includes methanol derived from renewable sources and the impact on European Union decision-making on transition pathways. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 109667.
- Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., de Paula Pereira, A. S. A., Marangon, B. B., de Assis, L. R., & Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, 305, 135508.
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., ... & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in Genomic Sciences*, 12, 1-14.
- Carvalho, P., Costa, C. E., Baptista, S. I. L., & Domingues, L. (2021). Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy.
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: an alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108183.

- Cavelius, P., Engelhart-Straub, S., Mehlmer, N., Lercher, J., Awad, D., & Brück, T. (2023). The potential of biofuels from first to fourth generation. *PLoS Biology*, 21(3), e3002063.
- 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.
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, 110, 510-516.
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., ... & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., ... & Lü, X. (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and sustainable energy reviews*, 149, 111370.
- 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.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Condor, B. E., de Luna, M. D. G., Chang, Y. H., Chen, J. H., Leong, Y. K., Chen, P. T., ... & Chang, J. S. (2022). Bioethanol production from microalgae biomass at high-solids loadings. *Bioresource technology*, 363, 128002.
- Constantino, A., Rodrigues, B., Leon, R., Barros, R., & Raposo, S. (2021). Alternative chemo-enzymatic hydrolysis strategy applied to different microalgae species for bioethanol production. *Algal Research*, 56, 102329.
- 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.
- De Andrade, F. P., de Farias Silva, C. E., Medeiros, J. A., Vieira, R. C., de Sá Filho, M. L. F., & Santos, G. K. S. (2022). Consortium between microalgae and other microbiological groups: a promising approach to emphasise the sustainability of open cultivation systems for wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 50, 103211.
- de Carvalho Silvello, M. A., Gasparotto, G. A., & Goldbeck, R. (2023). Enzymatic hydrolysis of carbohydrate-rich *Chlorella vulgaris* for third-generation bioethanol production by cellulase-recombinant yeast. *Cleaner Chemical Engineering*, 6, 100111.

- de Carvalho Silvello, M. A., Gonçalves, I. S., Azambuja, S. P. H., Costa, S. S., Silva, P. G. P., Santos, L. O., & Goldbeck, R. (2022). Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresource Technology*, 344, 126304.
- de Morais, E. G., Sampaio, I. C. F., Gonzalez-Flo, E., Ferrer, I., Uggetti, E., & García, J. (2023). Microalgae harvesting for wastewater treatment and resources recovery: A review. *New Biotechnology*.
- De Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for biofuels*, 8, 1-12.
- Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150, 111464.
- Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2016). Pathogens in milk: Escherichia coli.
- Devos, R. J. B., & Colla, L. M. (2022). Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: A bibliometric and systematic study. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100924.
- Dhandayuthapani, K., Kumar, P. S., Chia, W. Y., Chew, K. W., Karthik, V., Selvarangaraj, H., ... & Show, P. L. (2022). Bioethanol from hydrolysate of ultrasonic processed robust microalgal biomass cultivated in dairy wastewater under optimal strategy. *Energy*, 244, 122604.
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63, 258-266.
- Elbeshbishy, Elsayed. (2014). Metabolic Pathways: Release of Energy (Anaerobic). 10.1016/B978-0-12-384730-0.00198-1.
- Farias, D., & Maugeri-Filho, F. (2021). Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. *Fuel*, 288, 119673.
- Ferreira, G. F., Pinto, L. F. R., Maciel Filho, R., & Fregolente, L. V. (2022). Maximizing unsaturated fatty acids production by using sugarcane agroindustry wastes in cultivation of *Desmodesmus* sp. in a flat plate photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 360, 117-124.
- 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.

- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79, 339-354.
- Garrigues, Sandra, ve Sonia Salazar-Cerezo. 2021. "Ethanol tolerance and production by Yeasts". *Encyclopedia of Mycology*, 447-57
- Gatamaneni, Bhalamurugan Loganathan, Valérie Orsat, ve Mark Lefsrud. 2018. "Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species". *Environmental Engineering Science* 35(10):1037-48. doi: 10.1089/ees.2017.0521
- Gaurav, K., Neeti, K., & Singh, R. (2023). Microalgae-based biodiesel production and its challenges and future opportunities: A review. *Green Technologies and Sustainability*, 100060.
- Ghaffar, I., Deepanraj, B., Sundar, L. S., Vo, D. V. N., Saikumar, A., & Hussain, A. (2023). A review on the sustainable procurement of microalgal biomass from wastewaters for the production of biofuels. *Chemosphere*, 311, 137094.
- Ghazvini, M., Kavosi, M., Sharma, R., & Kim, M. (2022). A review on mechanical-based microalgae harvesting methods for biofuel production. *Biomass and Bioenergy*, 158, 106348.
- Godbey, W. T. 2022. Fermentation, beer, and biofuels, In: *Biotechnology and its Applications*, 369-87
- Gonçalves, D. B., Batista, A. F., Rodrigues, M. Q. R. B., Nogueira, K. M. V., & Santos, V. L. (2013). Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. *Bioresource technology*, 146, 261-266.
- González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology advances*, 30(6), 1655-1661.
- 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.
- Gunasekaran, P., & Raj, K. C. (1999). Ethanol fermentation technology–*Zymomonas mobilis*. *Current Science*, 56-68.
- Gupta, P. L., Lee, S. M., & Choi, H. J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1409-1417.
- Ha, G. S., El-Dalatony, M. M., Kurade, M. B., Salama, E. S., Basak, B., Kang, D., ... & Jeon, B. H. (2020). Energy-efficient pretreatments for the enhanced conversion of microalgal biomass to biofuels. *Bioresource technology*, 309, 123333.

- Hans, M., Kumar, S., Chandel, A. K., & Polikarpov, I. (2019). A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. *Process biochemistry*, 85, 125-134.
- Hasunuma, T., & Kondo, A. (2012). Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*, 47(9), 1287-1294.
- Hebbale, D., & Ramachandra, T. V. (2022). Third-generation bioethanol: status, scope, and challenges. In *Handbook of Biofuels* (pp. 295-312). Academic Press.
- Hidzir, N. S., Som, A. S., & Abdullah, Z. (2014, August). Ethanol production via direct hydration of ethylene: A review. In *International conference on global sustainability and chemical engineering (ICGSE)* (pp. 1-6).
- Hsueh, C. C., Roxas, T. J., Chan, Y. H., Juan, C. N., Tayo, L. L., Chen, Y. Y., ... & Chen, B. Y. (2023). Feasibility study of value-added production from onion peel agricultural wastes for circular economy. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 145, 104851
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, 36(1), 54-67.
- Huang, K. X., Mao, B. D., Lu, M. M., Chen, D. Z., Qiu, J., & Gao, F. (2024). Effect of external acetate added in aquaculture wastewater on mixotrophic cultivation of microalgae, nutrient removal, and membrane contamination in a membrane photobioreactor. *Journal of Environmental Management*, 349, 119391.
- Ishizaki, H., & Hasumi, K. (2014). Ethanol production from biomass. *Research approaches to sustainable biomass systems*, 243-258.
- Jafari Olia, M. S., 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(C), 60-68.
- Jeffries, T. W., & Van Vleet, J. R. H. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS yeast research*, 9(6), 793-807.
- Joshi, Bishnu, Jarina Joshi, Tribikram Bhattarai, ve Lakshmaiah Sreerama. 2018. Currently Used Microbes and Advantages of Using Genetically Modified Microbes for Ethanol Production, In: Bioethanol Production from Food Crops: Sustainable Sources, Interventions, and Challenges, 293-316, Elsevier.
- Kadhum, H. J., Rajendran, K., & Murthy, G. S. (2017). Effect of solids loading on ethanol production: Experimental, economic and environmental analysis. *Bioresource technology*, 244, 108-116.

- Kannah, R. Y., Sivashanmugham, P., Kavitha, S., & Banu, J. R. (2020). Valorization of food waste for bioethanol and biobutanol production. In *Food waste to valuable resources* (pp. 39-73). Academic Press.
- Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green bioplastics as part of a circular bioeconomy. *Trends in plant science*, 24(3), 237-249.
- Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020). Kluyveromyces marxianus: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.
- Kassim, M. A., Meng, T. K., Kamaludin, R., Hussain, A. H., & Bukhari, N. A. (2022). Bioprocessing of sustainable renewable biomass for bioethanol production. In *Value-Chain of Biofuels* (pp. 195-234). Elsevier.
- Kelbert, M., Romani, A., Coelho, E., Pereira, F. B., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2015). Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. *Industrial crops and products*, 64, 16-24.
- Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*, 23(2), 309.
- Kim, T. H., & Lee, Y. Y. (2007). Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. In *Applied Biochemistry and Biotechnology: The Twenty-Eighth Symposium Proceedings of the Twenty-Eight Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held April 30–May 3, 2006, in Nashville, Tennessee* (pp. 81-92). Humana Press.
- Kiran, B., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy conversion and management*, 88, 1228-1244.
- Koppolu, V., & Vasigala, V. K. (2016). Role of Escherichia coli in biofuel production. *Microbiology insights*, 9, MBI-S10878.
- Kumar, M., Barbhai, M. D., Hasan, M., Punia, S., Dhumal, S., Rais, N., ... & Mekhemar, M. (2022). Onion (Allium cepa L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 146, 112498.
- Kumar, R., Dhurandhar, R., Chakraborty, S., & Ghosh, A. K. (2022). Downstream process: toward cost/energy effectiveness, In: *Handbook of biofuels* (pp. 249-260). Academic Press.
- Kusmiyati, K., Hadiyanto, H., & Fudholi, A. (2023). Treatment updates of microalgae biomass for bioethanol production: A comparative study. *Journal of Cleaner Production*, 383, 135236.
- 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., Desjardins, S. M., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2021). Harvesting microalgae for health beneficial dietary supplements. *Algal research*, 54, 102189.
- Lakatos, G. E., Ranglová, K., Manoel, J. C., Grivalský, T., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2019). Bioethanol production from microalgae polysaccharides. *Folia microbiologica*, 64, 627-644.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal biology reviews*, 24(1-2), 17-26.
- Li, S., Hu, T., Xu, Y., Wang, J., Chu, R., Yin, Z., ... & Zhu, L. (2020). A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110005.
- Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Malik, A. (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Research*, 57, 102353.
- Lü, F., Ji, J., Shao, L., & He, P. (2013). Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnology for biofuels*, 6, 1-11.
- Mahari, W. A. W., Razali, W. A. W., Manan, H., Hersi, M. A., Ishak, S. D., Cheah, W., ... & Lam, S. S. (2022). Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy. *Bioresource Technology*, 364, 128085.
- Maity, S., & Mallick, N. (2022). Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 345, 131153.
- Malik, K., Sharma, P., Yang, Y., Zhang, P., Zhang, L., Xing, X., ... & Li, X. (2022). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches. *Industrial Crops and Products*, 188, 115569.
- Manzanares, P. (2010). Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In *Bioalcohol Production* (pp. 205-223). Woodhead Publishing.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Mehmood, M. A., Shahid, A., Malik, S., Wang, N., Javed, M. R., Haider, M. N., ... & Boopathy, R. (2021). Advances in developing metabolically engineered microbial platforms to produce fourth-generation biofuels and high-value biochemicals. *Bioresource Technology*, 337, 125510..

- Mendiburu, A. Z., Lauermann, C. H., Hayashi, T. C., Mariños, D. J., 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*, 257, 124688.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Modenbach, A. A., & Nokes, S. E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. *Biomass and bioenergy*, 56, 526-544.
- Morad, M. H. (2023). Current Status and Future Perspectives of Efficient Catalytic Conversion of Bioethanol to Value-Added Chemicals and Fuels. *Arabian Journal of Chemistry*, 105560.
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., & Aroca, G. (2015). Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1349-1361.
- 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.
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, 4, 29.
- Ngamsirisomsakul, M., Reungsang, A., Liao, Q., & Kongkeitkajorn, M. B. (2019). Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Renewable Energy*, 141, 482-492.
- Niphadkar, S., Bagade, P., & Ahmed, S. (2018). Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238.
- Nitiema-Yefanova, S., Dossa, C. P. A., Gbohaïda, V., Kanfon, R. E., Mossi, I., & Beakou, B. H. (2020). Fermented *Parkia biglobosa* seeds as a nitrogen source supplementation for bioethanol production from cashew apple juice. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 14(9), 3441-3454.
- Onay, M. (2019). Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetrachotoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. *Fuel*, 239, 1315-1323.
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. (2018). Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 16-26.

- Onyema, V. O., Amadi, O. C., Moneke, A. N., & Agu, R. C. (2023). A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes–West African Natural Yeasts Contribution. *Food Chemistry Advances*, 2, 100162.
- 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.
- Ozdingis, A. G. B., & Kocar, G. (2018). Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2196-2203.
- Pal, U., & Vij, S. (2022). Adaptive evolution of *Kluyveromyces marxianus* MTCC1389 for high ethanol tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45, 102533.
- Panesar, P. S., Marwaha, S. S., & Kennedy, J. F. (2006). *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), 623-635.
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11, 1-16.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* 6 (1): 1–31.
- Pathak, V. V., & Pandey, V. C. (2022). Recent advancements in bioflocculation of microalgae for bioenergy applications. In *Algae and Aquatic Macrophytes in Cities* (pp. 137-147). Elsevier.
- Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(8), 347-354.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Phaiboonsilpa, N., Chysirichote, T., Champreda, V., & Laosiripojana, N. (2020). Fermentation of xylose, arabinose, glucose, their mixtures and sugarcane bagasse hydrolyzate by yeast *Pichia stipitis* for ethanol production. *Energy Reports*, 6, 710-713.
- 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.

- Priya, A., Naseem, S., Pandey, D., Bhowmick, A., Attrah, M., Dutta, K., ... & Daverey, A. (2023). Innovative strategies in algal biomass pretreatment for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 369, 128446.
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal research*, 28, 192-199.
- Qiu, Y., Wu, M., Bao, H., Liu, W., & Shen, Y. (2023). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for co-fermentation of glucose and xylose: current state and perspectives. *Engineering Microbiology*, 100084.
- Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., ... & Lan, X. (2019). Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource technology*, 291, 121894.
- Rashida, Z., & Laxman, S. (2021). The pentose phosphate pathway and organization of metabolic networks enabling growth programs. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100390.
- Rastogi, M., & 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.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.
- Razzak, S. A., Lucky, R. A., Hossain, M. M., & deLasa, H. (2022). Valorization of microalgae biomass to biofuel production: a review. *Energy Nexus*, 7, 100139.
- Renewable Fuels Association. 2023. 2023 Ethanol Industry Outlook. A.B.D.
- Renewable Fuels Association. 2023. 2023 Ethanol Industry Outlook.
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic physician*, 9(1), 3592.
- Sanusi, I. A., Suinyuy, T. N., Lateef, A., & Kana, G. E. (2020). Effect of nickel oxide nanoparticles on bioethanol production: process optimization, kinetic and metabolic studies. *Process biochemistry*, 92, 386-400.
- Sawarkar, A. N., Kirti, N., Tagade, A., & Tekade, S. P. (2022). Bioethanol from various types of banana waste: A review. *Bioresource Technology Reports*, 18, 101092.
- Segovia-Hernández, J. G., Sanchez-Ramirez, E., Ramirez-Marquez, C., & Contreras-Zarazúa, G. (2021). *Improvements in Bio-based Building Blocks Production Through Process Intensification and Sustainability Concepts*. Elsevier.

- Shabir, I., Pandey, V. K., Dar, A. H., Pandiselvam, R., Manzoor, S., Mir, S. A., ... & Trif, M. (2022). Nutritional profile, phytochemical compounds, biological activities, and utilisation of onion peel for food applications: A review. *Sustainability*, 14(19), 11958.
- Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*, 313, 123630.
- Sharma, S., Nair, A., & Sarma, S. J. (2021). Biorefinery concept of simultaneous saccharification and co-fermentation: Challenges and improvements. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 169, 108634.
- Shenbagamuthuraman, V., & Kasianantham, N. (2023). Microwave irradiation pretreated fermentation of bioethanol production from *Chlorella vulgaris* Biomasses: Comparative analysis of response surface methodology and artificial neural network techniques. *Bioresource Technology*, 390, 129867.
- Show, P. L., Tang, M. S., Nagarajan, D., Ling, T. C., Ooi, C. W., & Chang, J. S. (2017). A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 215.
- Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2012). Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, 37(1), 259-265.
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of environmental management*, 217, 499-508.
- 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.
- Soleimani, S. S., Adiguzel, A., & Nadaroglu, H. (2017). Production of bioethanol by facultative anaerobic bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 402-406.
- Solomon, B., & Luzadis, V. A. (Eds.). (2008). *Renewable energy from forest resources in the United States*. Routledge.
- Stewart, G. G., Panchal, C. J., Russell, I., & Sills, A. M. (1983). Biology of ethanol-producing microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1(3), 161-188.
- Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., & Len, C. (2020). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 24, 56-60.
- Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the total environment*, 762, 144590.

- Subhash, G. V., Rajvanshi, M., Kumar, G. R. K., Sagaram, U. S., Prasad, V., Govindachary, S., & Dasgupta, S. (2022). Challenges in microalgal biofuel production: A perspective on techno economic feasibility under biorefinery stratagem. *Bioresource Technology*, 343, 126155.
- 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.
- Talan, A., Tiwari, B., Yadav, B., Tyagi, R. D., Wong, J. W. C., & Drogui, P. (2021). Food waste valorization: Energy production using novel integrated systems. *Bioresource Technology*, 322, 124538.
- Tan, J. S., Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 11(1), 116-129.
- Tan, X. B., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Wong, C. Y., & Lee, K. T. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 17-30.
- Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü.2023. Kuru Soğan Ürün Raporu. Ankara
- Tawfik, A., Mostafa, A., Elsamadony, M., Pant, D., & Fujii, M. (2022). Unraveling the metabolic shift in anaerobic digestion pathways associated with the alteration of onion skin waste concentration. *Environmental Research*, 212, 113494.
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- United Nations Environment Programme (2021). Food Waste Index Report 2021. Nairobi.
- Vale, M. A., Ferreira, A., Pires, J. C., & Gonçalves, A. L. (2020). CO₂ capture using microalgae. In *Advances in carbon capture* (pp. 381-405). Woodhead Publishing.
- van Aalst, A. C., van der Meulen, I. S., Jansen, M. L., Mans, R., & Pronk, J. T. (2023). Co-cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* strains combines advantages of different metabolic engineering strategies for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering*, 80, 151-162.
- Vasistha, S., Khanra, A., Clifford, M., & Rai, M. P. (2021). Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110498.

- Walker, G. M. (2011). 125th anniversary review: fuel alcohol: current production and future challenges. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1), 3-22.
- Wang, X., Gao, J., Chen, Z., Chen, H., Zhao, Y., Huang, Y., & Chen, Z. (2022). Evaluation of hydrous ethanol as a fuel for internal combustion engines: A review. *Renewable energy*, 194, 504-525.
- Wang, X., He, Q., Yang, Y., Wang, J., Haning, K., Hu, Y., ... & Yang, S. (2018). Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. *Metabolic engineering*, 50, 57-73.
- Wang, X., Zhou, F., Fu, J., & Liu, J. (2023). Effect of ethanol on auto-ignition characteristics and laminar burning velocity of gasoline under elevated temperature and pressure. *Fuel Processing Technology*, 242, 107644.
- Wang, Y., Xu, H., Yang, J., Zhou, Y., Wang, X., Dou, S., ... & Yang, M. (2022). Effect of sulfur limitation strategies on glucose-based carbohydrate production from *Chlorella sorokiniana*. *Renewable Energy*, 200, 449-456.
- Wei, L., Pordesimo, L. O., & Batchelor, W. D. (2007). Ethanol production from wood: comparison of hydrolysis fermentation and gasification biosynthesis. In *2007 ASAE Annual Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Werner, C., Doenst, T., & Schwarzer, M. (2016). Metabolic pathways and cycles. In *The scientist's guide to cardiac metabolism* (pp. 39-55). Academic Press.
- Wirawan, F., Cheng, C. L., Kao, W. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2012). Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy*, 100, 19-26.
- Xia, J., Yang, Y., Liu, C. G., Yang, S., & Bai, F. W. (2019). Engineering *Zymomonas mobilis* for robust cellulosic ethanol production. *Trends in biotechnology*, 37(9), 960-972.
- Xiang, H., Xin, R., Prasongthum, N., Natewong, P., Sooknoi, T., Wang, J., ... & Fan, X. (2022). Catalytic conversion of bioethanol to value-added chemicals and fuels: A review. *Resources Chemicals and Materials*, 1(1), 47-68.
- Xiao, C., Pan, Y., & Huang, M. (2023). Advances in the dynamic control of metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Engineering Microbiology*, 100103.
- Yang, S. T., Liu, X., & Zhang, Y. (2007). Metabolic engineering—applications, methods, and challenges. In *Bioprocessing for value-added products from renewable resources* (pp. 73-118). Elsevier.
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., ... & Li, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for

- Yoo, G., Park, M. S., & Yang, J. W. (2015). Chemical pretreatment of algal biomass. *Pretreatment of biomass*, 227-258.
- Yousuf, A. (2020). Fundamentals of microalgae cultivation. In *Microalgae cultivation for biofuels production* (pp. 1-9). Academic Press.
- Yu, K. L., Chen, W. H., Sheen, H. K., Chang, J. S., Lin, C. S., Ong, H. C., ... & Ling, T. C. (2020). Bioethanol production from acid pretreated microalgal hydrolysate using microwave-assisted heating wet torrefaction. *Fuel*, 279, 118435.
- Yücel, H. G., & Aksu, Z. (2015). Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793-799.
- Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F. N., Qi, X., & Sahu, J. N. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 105-128.
- 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.
- Zhou, M., & Lü, X. (2021). Strategies on simultaneous fermentation of pentose and hexose to bioethanol. In *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production* (pp. 161-211). Woodhead Publishing.