

## Yeni Bir Maya ile *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh, 1820 Taksonundan Biyoetanol Üretimi

Aylin ÇAĞMAN<sup>1</sup>, Hüseyin ERDUĞAN<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye.

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye.

\*Sorumlu Yazar: [herdugan@gmail.com](mailto:herdugan@gmail.com)

**Araştırma Makalesi**

Geliş 14 Mayıs 2019; Kabul 15 Ağustos Eylül 2019; Basım 15 Aralık 2019.

**Alıntılama:** Çağman, A., & Erduğan, H. (2019). Yeni bir maya ile *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh, 1820 taksonundan biyoetanol üretimi. *Acta Aequatica Turcica*, 15(4), 524-534. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.564986>

### Özet

Bu çalışmada Çanakkale Boğazı kıyılarından toplanan kahverengi alglere ait *Cystoseira barbata* taksonu kullanılarak biyoetanol eldesi araştırılmıştır. Biyoetanol yenilenebilir, ekonomik ve sürdürülebilir enerji kaynağı olması bakımından değerlidir. Ayrıca CO<sub>2</sub> emisyon değerlerini azalttığı da bilinmektedir. İlk olarak bu taksondan elde edilen sodyum alginat kullanılmış, sonrasında ise tallusun kendisi öğütülerek kullanılmıştır. Maya olarak maya 1, maya 2 ve ticari maya suşları kullanılmıştır. CO<sub>2</sub> miktarının artışına bağlı olarak ölçüm aralığı belirlenerek dakikalık, saatlik ve günlük ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda üç maya örneği de *C. barbata* taksonunu karbonhidrat kaynağı olarak kullanmıştır. Fakat kullanma sürelerinde farklılık gözlenmiştir. Alg örneğini en uzun sürede kullanan maya, maya 1 olarak adlandırılan mayadır. Maya 2 olarak adlandırılan mayanın ise üçüncü günde 10000 ppm seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan mayalar içinde en verimli ve en kısa sürede etki gösteren maya 2 olarak isimlendirilen mayanın olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Cystoseira barbata*, alg, maya, biyoetanol, CO<sub>2</sub>.

**Bioethanol Production from *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh, 1820 Taxa with a New Yeast.**

### Abstract

In this study, bioethanol production was investigated by using *Cystoseira barbata* taxa belonging to the brown algae collected from the coasts of the Dardanelles. Bioethanol is valuable as a renewable, economic and sustainable energy source. It is also known to reduce CO<sub>2</sub> emissions. Firstly, sodium alginate obtained from this taxon was first used, and then tallus itself was used by grinding. Yeast 1, yeast 2 and commercial yeast strains were used as yeast. Depending on the increase in the amount of CO<sub>2</sub>, the measurement interval was determined and minute, hourly and daily measurements were made. As a result of the measurements, the three yeast samples used *C. barbata* taxa as a source of carbohydrates. However, differences in usage periods of carbohydrates source were observed. The yeast, which uses the algae sample for the longest period of time, is yeast called yeast1. Yeast, called yeast 2, is determined to reach 10000 ppm on the third day. In the study, it was found that yeast called yeast 2 which is the most efficient and has an effect in the shortest time in the yeasts used.

**Keywords:** *Cystoseira barbata*, algae, yeast, bioethanol, CO<sub>2</sub>.

### GİRİŞ

Algler, sucul ekosistemin büyük bir kısmını oluşturmakta ve barındırdıkları metabolitler ile önemli bir hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Deniz suyu, tatlı su ve atık sular gibi değişik ortamlarda yaşayabilirler. Farklı enerji kaynaklarına yönelim ile günümüz dünyasında güneş enerjisine ilgi fazladır. Algler güneş ışığını en etkili kullanan canlılar olup birçok alg türü fotoototrofik özellik göstererek yağ üretimini gerçekleştirirler.

Fosil yakıtlar hala günümüzün en önemli yakıtlarındandır. Ancak bu yakıtların sürdürülemez bir kaynak olarak görülmesinin asıl sebebi atmosferde sera gazlarının birikmesi ve küresel ısınmaya neden olmalarıdır (Demirbaş, 2005; Searchinger vd., 2008; Gouveia ve Oliveira, 2009; Sirajunnisa ve Surendiran, 2016).

Fosil yakıtların yakılması sonucunda çevreye salınan CO<sub>2</sub> gazının üçte biri okyanuslar tarafından emilerek absorbe edilebilmekte ve bu da okyanuslardaki pH değerini asidik hale getirmektedir. Böylelikle mercan resiflerinin ve deniz ekosistemi biyo-çeşitliliğinin yok olmasına, buna bağlı olarak

da kara ekosisteminin ciddi derecede olumsuz etkilenmesine neden olurlar (Mata vd., 2010; Hacisalihoğlu vd., 2009; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016).

Günümüz dünyasında teknolojinin hızla gelişmesi ile birlikte enerji ihtiyacı artarak devam etmektedir. Fosil yakıtlar enerji sektöründe ve küresel ekonomide başrolde olup, temel enerji ihtiyacının yaklaşık olarak %80-88'ini karşılamaktadırlar (Adıgüzel, 2013; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016; Saad vd., 2019). Fosil yakıt rezervlerinin tükenmeye başlaması ve olumsuz etkilerinden dolayı son yıllarda bilim insanları fosil yakıtlara alternatif olabilecek, yenilenebilir ve çevreye minimum zarar verecek alternatif yakıt kaynaklarına yönelmiştir.

Birinci nesil biyoyakıt kaynakları yaklaşık olarak otuz yıldır yok sayılmıştır (Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). Bu nesil yakıtlar için hammadde olarak şeker kamışı, şeker pancarı, buğday, pekmez, arpa ve mısır kullanılmış ancak gıda arzı ve yakıt arasında büyük problemler oluşturmuştur (Singh vd., 2011; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). Biyoetanol üretiminin en basit ve kompleks olmayan yöntemi, şeker içeren hammadde stokundan direkt olarak fermente edilmesidir. Bu nesil biyoyakıt kaynaklarında, beslenme stokundan biyoetanol üretim maliyetinin düşük olmasına karşın, hammadde maliyeti fazladır (John vd., 2011; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* şeker içerikli kaynaklardan alkol üretmede kullanılan temel maya türüdür. Biyoetanol üretimi için *S. cerevisiae* kullanılmasının sebebi; yüksek etanol fermantasyon hızı, güçlü invertaz üretimi, melastaki inhibitör bileşenlerine yüksek tolerans göstermesi, kolay üreme ve korunabilir olmasıdır. Diğer bir maya türü de çok yaygın olarak kullanılmasa da *Schizosaccharomyces pombe* taksonudur (Yığıtoğlu vd., 2012).

Birinci nesil biyoyakıtlar ile alakalı asıl problem, tarım arazilerinden elde edilen ürünlerin sürekli ve artan bir şekilde devam eden nüfusun gıda ihtiyacının karşılanması mı yoksa biyoetanol üretimi için kullanılması mıdır? (Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016).

Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde biyoetanol üretimi için hammadde stokunu oluşturan şeker kamışı, mısır ve şeker pancarının yüksek oranlarda kullanılması gıda kıtlığına ve yüksek gıda fiyatlarına yol açabileceği belirtilmiştir (Wu vd., 2014; Hong vd., 2014; John vd., 2011; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılında yaklaşık olarak 220 trilyon litre dizel kullanılmıştır. Bu miktarın soya fasulyesi ile karşılanabilmesi için 367 milyon hektar alan gerekmektedir. ABD'nin belirtilen ekilebilir tarım alanı ise 930 milyon hektardır (Leite vd., 2013; Başak vd., 2014). Tarım ürünlerinden yakıt elde edilmesi için çok büyük arazilere ihtiyaç duyulması, maliyetin yüksek olması ve uzun süreler gerektirmesi bu nesil için dezavantajları oluşturur.

Birinci nesil biyoenerji kaynaklarında karşılaşılan bir diğer problemde, hammadde stokunu oluşturan ürünlerin sürekli olarak ekilmesi, gübreleme ve zirai ilaçlar ile tarım alanlarının tahrip olması, erozyon, bitki biyo-çeşitliliğinin azalması, yüzey sularının kirlenmesi ile ötrofikasyona neden olmasıdır (Singh vd., 2011; John vd., 2011; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). Ayrıca enerji bitkilerinin yetiştirilmesi için kullanılan tarım arazilerinde çok yüksek miktarlarda suya ihtiyaç vardır (Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016; Canan ve Ceylan, 2017).

Biyoetanol yenilenebilir, ekonomik ve sürdürülebilir olması ayrıca CO<sub>2</sub> emisyonunu azaltması nedeniyle fosil yakıtlara alternatif olarak düşünülmektedir (Hill vd., 2006; Najafi vd., 2009; Koçtürk ve Onurbaş Avcıoğlu, 2012; Altunbay vd., 2016)

Günümüz dünyasında gıda hammaddeleri ile rekabet oluşturan enerji bitkilerinden elde edilen biyoetanol yerine, gıda dışı tarım atıklarından doğaya zarar vermeyen ikinci nesil, biyoetanol üretimi tercih edilmeye başlanmıştır. Gıda biyokütlesine alternatif olarak ortaya çıkan tarımsal atıklar (mısır sapı, buğday çöpü) ile lignoselülozik (odun, çim, saman vb.) biyokütleden elde edilen etanol ikinci nesil biyokütle kavramını oluşturmaktadır. Biyoyakıt üretiminde son 20 yılda bu lignoselülozik biyokütle biyoyakıt hammaddesi olarak dikkat çekmiştir (Ullah vd., 2015; Wu vd., 2014; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016). Enerji bitkilerine kıyasla karbonhidrat içeriğinden dolayı biyoyakıt için daha uygun bir alternatif oluştururlar (Hong vd., 2014; Özdemir vd., 2009; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016).

Polimerce zengin selüloz, hemiselüloz, lignin içeren maddeler lignoselülozik maddeler bitkisel hücre duvarını oluşturan en önemli yapısal bileşenlerdir. Dünya nüfusunun artışıyla birlikte gıda ve enerji ihtiyacını karşılayabilecek hammadde stoğunun yetersiz kalması ile lignoselülozik maddelerin kullanımı önem kazanmıştır (Ünlü ve Durmaz Hilmioğlu 2014).

Şeker moleküllerinin çeşitli enzimler yardımıyla selülozdan ayrıldığında lignoselülozik etanol oluşur. Birinci nesil biyokütle kaynakları olan enerji bitkilerine kıyasla, lignoselülozik biyoküteller sera gazı emisyonlarının azaltılmasında daha etkilidirler. Fosil bir yakıt olan petrol ile karşılaştırıldığında

ise, bu nesil lignoselülozik biyoetanol sera gazı emisyonlarını %90 azaltabilir (Demain vd., 2005; Adıgüzel, 2013; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016).

İkinci nesil biyokütle hammaddesini oluşturan nişasta ve selüloz, şeker içeren hammaddelere göre daha ucuz olsa da, bu hammaddelerin mayalanabilir şekerlere dönüşümü, yüksek maliyetli selüloza bağlı olarak genel dönüşüm süresini kısıtlamaktadır. Bu sebeple, bu hammaddelerden düşük verim ve yüksek hidroliz maliyeti günümüz teknolojileri ile büyük ölçeklerde olumsuz etkiler göstermiştir (John vd., 2011; Fu vd., 2010; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016). Buna ek olarak selülozik atıklarda bulunan ligninin hidrofobik etkisini ortadan kaldırmak için ayrıca ön işleme gereksinim duyulur, çünkü lignin etanol üretimini olumsuz etkileyerek var olan selülozu örtmektedir. Ön işlem, biyoetanol üretimi maliyetinin artmasına sebep olur (Hong vd., 2014; Özdemir vd., 2009; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016).

Üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak adlandırılan algler, içeriğindeki yüksek miktarda lipit ve karbonhidratlar ile yakıt üretimi için, enerji bitkilerine alternatif olabilecek tek seçenek olarak görülmektedirler. Bazı mikroalglerin hücre duvarlarında bulunan çeşitli polisakaritler (selüloz, mannalar, ksilanlar ve sülfatlanmış glikan vb.) basit şekerlere ayrılıp etanole dönüştürülebilmektedir (Chaudhary vd., 2014; Nguyen ve Vu, 2012; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016).

Algleri diğer biyoetanol kaynaklarından daha üstün kılan birçok neden vardır. Oksijenin temel üreticileri olmaları, enerji bitkileri gibi araziye gereksinim duymamaları, daha az su tüketmeleri, hemen hemen her ortamda yetişebilir olmaları, insan-gıda ilişkisini etkilememeleri, ticari olarak önemli ürünler üretmeleri, yüksek fotosentez etkinliğine sahip olmaları ve karbondioksiti emmeleri gibi birçok neden algleri alternatiflerine göre avantajlı kılar (Adıgüzel, 2013; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). Ayrıca yosunlardan elde edilen biyoyakıtın verimi daha yüksektir (Georgianna ve Mayfield, 2012).

Alg hammadde stoklarının sıvı yakıtlara ve gaz haline dönüştürülmesi de diğer bitki stoklarında olduğu gibi direkt yada çeşitli biyokimyasal veya termokimyasal dönüşüm yöntemleri ile gerçekleşir (Amin, 2009; Demirbaş, 2009; Rittmann, 2008; Pitman vd., 2011). Direkt olarak yanma ile kurutulmuş alg biyokütlesi enerji üretimi için kullanılabilir (Kadam, 2002; Pitman vd., 2011). Gaz yada yağ bazlı yakıtların elde edilmesi ise proliz, gazlaştırma, hidrojenasyon ve alg biyokütlesinin sıvılaştırılması gibi termokimyasal dönüştürme yöntemleri ile gerçekleşir (McKendry, 2002; Miao ve Wu, 2004; Pitman vd., 2011).

Biyokütlenin fermantasyonu ve anaerobik sindirimi ile biyokimyasal dönüştürme işlemleri sonucunda biyoetanol ve metan elde edilmektedir (McKendry, 2002; Pitman vd., 2011). Ayrıca biyofotoliz yöntemi ile alglerden hidrojen üretilebilir (Melis, 2002; Pitman vd., 2011).

Alglerden biyoetanol üretiminin en önemli basamağı, türlerin taranması ve uygun olanların seçilmesidir.

Chlorophyceae, Eustigmatophyceae, Haptophyceae ve siyanobakterilerin suşları genel olarak biyoyakıt üretimi ve diğer endüstriyel organikleri üretmede sıkça tercih edilen gruplardır (Larkum vd., 2011; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016). Mikroalg grupları içerisinde ki bazı türler, rezerv polimerler olarak fermente edilebilir şekerler gibi yüksek miktarda karbonhidrat içeriğine sahiptirler. Bu türler biyoetanol üretimi için en uygun adaylardır (Nguyen ve Vu, 2012; Sirajunnisa ve Surendhiran 2016).

Biyoetanol üretimin de makroalglerin tercih edilmesi daha uygundur. Bunun nedeni ise makroalgler yapılarında, mikroalgler gibi yüksek miktarlarda lipid içermeleri yerine, alkol bazlı yakıt üretimi için fermente edilebilen yüksek oranlarda doğal şeker ve karbonhidratları barındırmalarıdır (FAO 2017).

Makroalglerle yapılan çalışmaların kırmızı ve kahverengi alglerde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu konuda kırmızı alglerden etanol üretiminde *Gelidium amansii* (J.V.Lamouroux) J.V.Lamouroux (Wi vd., 2009), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva in P.C.Silva (Khambhaty vd., 2012; Meinita vd., 2012a,b), *Gracilaria salicornia* (C.Agardh) E.Y.Dawson (Wang vd., 2011), *Gracilaria verrucosa* (Sahoo vd., 2013; Kim vd., 2015) gibi taksonlar kullanılmıştır.

Kahverengi alglerden *Laminaria hyperborea* (Gunnerus) Foslie (Horn vd., 2000), *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl & G.W.Saunders (Adams vd., 2009), *Laminaria japonica* (Lee ve Lee 2012; Jang vd., 2012), *Laminaria digitata* (Hudson) J.V.Lamouroux (Gallagher vd., 2011), *Sargassum sagamianum* Yendo (Jung vd., 2011), *Sargassum spp.* C.Agardh, (Borines vd., 2013), *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Delgenes vd., 1988; Kim vd., 2013), *Cystoseira indica* (Thivy & Doshi) Mairh ve *Scinaia hatei* (Khan vd., 2015) taksonları çalışılmıştır.

Yeşil alglerden ise *Ulva lactuca* L. (Bruhn vd., 2011; López-Contreras vd., 2013), *Cladophora* spp. (Trung vd., 2013), *Ulva reticulata* (Yoza ve Masutani, 2013), *Spirogyra*, *Cladophora* ve *Gracilaria* (Ahmed vd., 2010) taksonları çalışılmıştır.

Biyoetanol kavramı yeni bir kavram değildir. 1970'lerde dünyada başlayan yakıt sıkıntısı ile ortaya çıkmış ve günümüzde de bu konu ile ilgili çalışmalar halen artarak devam etmektedir (Adıgüzel, 2013; Sirajunnisa ve Surendhiran, 2016). İlk olarak ise 18. Yüzyılın sonlarında Gay-Lussac'ın (1815) fermantasyon formülünü ortaya koyması ile anlaşılmasına başlanmıştır.

Farklı hammadde kaynakları üzerinde yoğunlaşmış ancak avantajları ve dezavantajları göz önüne alındığında en uygun hammadde kaynağı ve çevreye duyarlı bir yakıt olmasından dolayı da alglerden faydalanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh taksonu farklı maya suşları kullanılarak biyoetanol eldesi araştırılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal olarak Çanakkale ili Kepez ilçesi sahillerinde yayılış gösteren *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh taksonu ile maya 1, maya 2 ve ticari maya (yaş maya) suşları kullanılmıştır.

Örnekleme Ocak 2016 tarihinde kepez sahilinden 0-1 metre derinliklerden yapılmıştır. Kahverengi algler, bulunduğu ortamın koşullarına göre ve üreme dönemlerinde kendileri için gerekli olan polisakaritleri daha fazla biriktirirler (Koçoğlu, 2010). Örnekler bu nedenle soğuk dönemde toplanmıştır. Kahverengi algin tercih edilmesinin sebebi yapısında lignin bulundurması nedeniyle şekerleri serbest bırakması için öğütme, ezme gibi basit bir ön işlemlerin yeterli olmasıdır. Aynı zamanda alginik asit içeriğinin yüksek olması ve Çanakkale kıyılarında bol bulunmasıdır.

Biyoetanol üretimi için kullanılan mayalar ise ÇOMÜ Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Dr. Tülay TURGUT GENÇ'in Maya laboratuvarında test ettikleri ve henüz literatür ismini vermedikleri üreme hızına göre Maya 1 (M 1) ve Maya 2 (M 2) adlarını verdikleri maya suşları ve ticari maya seçilmiştir.

Örnekler önce musluk suyu ile yıkandıktan sonra epifitlerinden temizlenmiştir. Oda sıcaklığında 48 saat boyunca kuramaya bırakılmıştır. Alg örnekleri nem alabileceği düşünülerek 60°C'de 2 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Kuru örnekler ilk önce blender ile öğütülmüştür. Daha sonra havanda dövülerek toz haline getirilmiştir (Borines vd., 2013).

Kullanılan ön işlem ve ekstraksiyon basamakları Koçoğlu (2010) tarafından yapılan tez çalışmasından alınmıştır.

Ön işlem basamağında; 20 g öğütülmüş kuru örnek oda sıcaklığında 300 ml %2'lik formaldehit çözeltisi içerisinde 24 saat süre ile muamele edilmiştir. 24 saat sonrasında yosun materyali saf su ile yıkanmıştır.

Daha sonra 24 saat süre ile 0,2 N'lik 300 ml HCl çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Alg materyali sonrasında tekrar saf su ile yıkanıp, süzümüştür.

Ekstraksiyon basamağı; materyal 70 °C de ısı kontrolü yapılarak 400-500dev/dk hızındaki manyetik karıştırıcıda, 1000 ml'lik beherde 3 saat süre ile %3'lük Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi içinde ekstrakte edilmiştir.

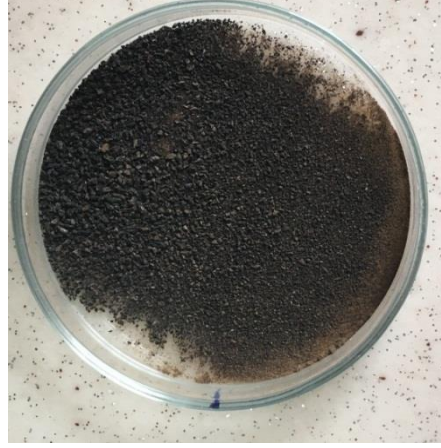
Ekstraksiyon işleminin sonrasında özüt ilk olarak tek katlı fitoplankton bezinde süzülerek, alg kalıntılarından ayrılmıştır. Daha sonra süzüntü tekrar 2 katlı fitoplankton bezi ile süzümüştür (Şekil 1).



Şekil 1. Süzülmüş özüt.

Süzme işleminin ardından geriye kalan çözelti üzerine 600 ml etanol eklenerek sodyum alginat şeklinde çöktürülmüştür. Elde edilen jel halindeki sodyum alginat süzülerek alınmıştır. Petriye alınan

jel halindeki sodyum alginat 50°C de etüvde kurutulmuştur. Daha sonra kurumuş sodyum alginat havanda dövülerek öğütülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Kurutulup, öğütülmüş Na-alginat.

Elde edilen sodyum alginat petriye eklendikten sonra M 1 ve M 2 mayalarının ekimi yapılmıştır (Şekil 3). Bunun amacı mayaların sodyum alginatı besin kaynağı olarak kullanıp kullanmayacağını test etmektir.

Ekim için; 100 ml su, 2 gr agar ve 3 gr öğütülmüş ve toz haline getirilmiş sodyum alginat petriye dökülmüştür. Petriler 30 °C sıcaklıkta 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Geçen sürenin ardından petrilerde üreme görülmemiştir.



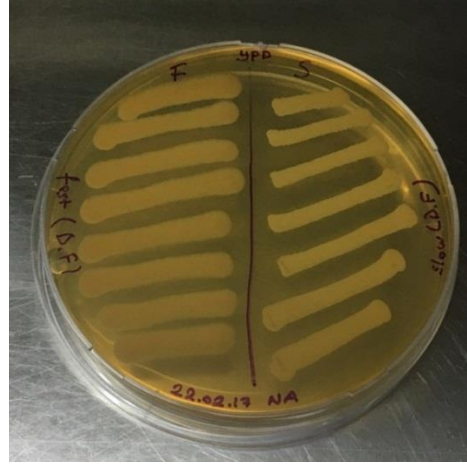
Şekil 3. Na-alginat ve M 1- M 2 mayalarının ekimi.

Petriler de üreme olmadığı için sodyum alginat yerine direkt olarak kurutulmuş ve öğütülmüş alg örneği kullanılmıştır.

2 gr agar ve 3 gr toz halinde ki alg parçaları son hacim 100 ml olacak şekilde otoklavlanmıştır. Ardından 100 ml 3 petriye eşit miktarda dağıtılarak kurumaya bırakılmıştır.

- 1.Petriye; M 1 adı verilen maya suşu özeyle ekilmiştir.
- 2.Petriye; M 2 adı verilen maya suşu özeyle ekilmiştir.
- 3.Petriye herhangi bir şey ekilmedi ve kontrol olarak bırakılmıştır.

Petriler 30°C sıcaklıkta 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Geçen sürenin ardından petrilerde üreme görülmüştür (Şekil 4).



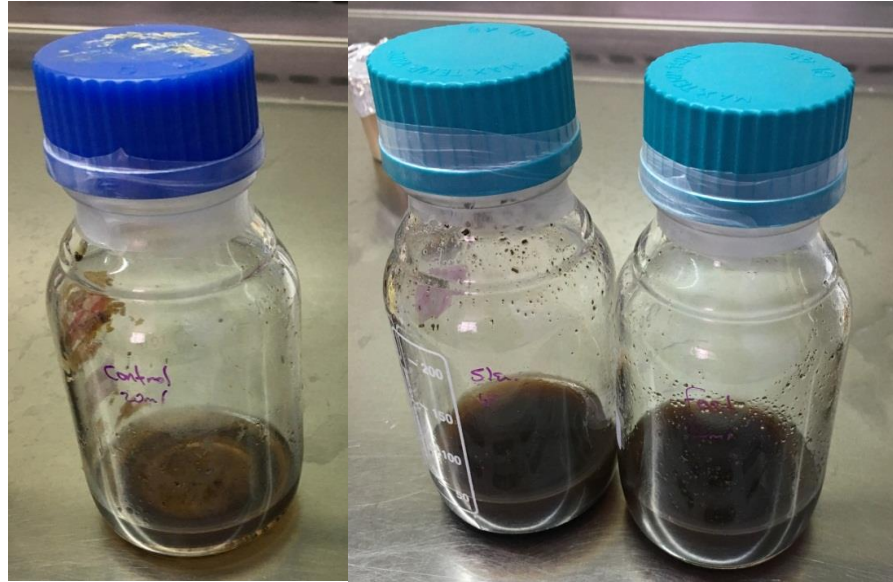
Şekil 4. Alg ve M 1- M 2 mayalarının ekimi.

Üreyen maya hücreleri tekrardan yeni petrilere ekilerek çoğalmaya devam edip etmedikleri kontrol edilmiştir. Çoğalan M 1 ve M 2 mayaları için sıvı kültür denemeleri yapılmıştır. Sıvı kültürlerin içeriği de; 100 ml distile su ve 3gr alg örneği eklenerek yapılmıştır. Bu karışımdan;

40 ml örnek çekilip ağzı kapaklı şişeye aktarılmıştır ve M 1 mayası eklenmiştir

40 ml örnek çekilip ağzı kapaklı şişeye aktarılmıştır ve M 2 mayası eklenmiştir.

Kalan 20 ml örnek ağzı kapaklı şişeye aktarılarak maya eklenmemiştir ve kontrol için hazırlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Kontrol, M 1 ve M 2 örnekleri.

Hazırlanan kapaklı şişeler kapaklar kapatıldıktan sonra parafilm ile çevresi sarılarak hava girişi engellenmiştir. 30°C sıcaklıkta 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası şişelerde üremenin olup olmadığı sadece görsel olarak belirlenmiştir. Absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülemedi. M 1 ve M 2 mayalarının olduğu şişeler, kontrol şişesine göre bulanık kahverengi bir renk olarak gözlemlenmiştir.

Toz haline getirilmiş alg parçaları aynı işlemlerden geçirilerek tekrar petrilere ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Geçen sürenin ardından petrilere üreme görülmüştür. Üreyen M 1 ve M 2 mayaları için sıvı kültür denemeleri yapılmıştır (Şekil 6).

Sıvı kültür denemelerine başlamadan önce mayanın alg ortamına alışması için; 25mL dH<sub>2</sub>O, maya ve 0,25 gr toz alg örneği eklenerek 24 saat oda sıcaklığında 120 rpm'de inkübe edilmiştir. 24 saat

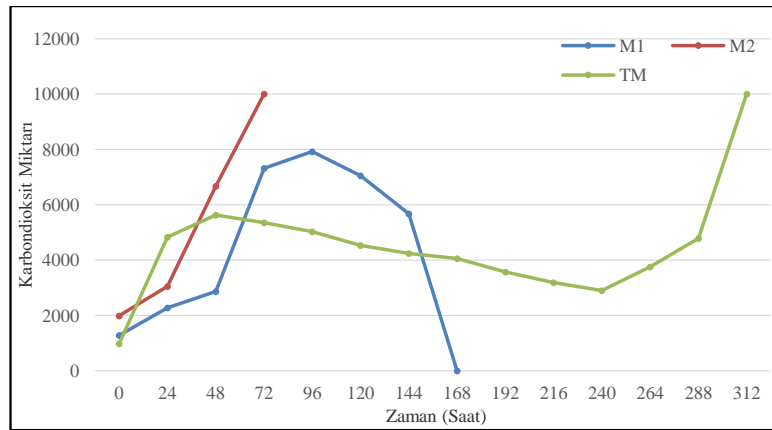
sonunda bekletilen örnekten 100 µl alg içeren örnek sıvı besiyerine aktarılmıştır. 100 mL dH<sub>2</sub>O, 1 gr toz alg örneği üzerine eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında 120 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Testo 535 marka CO<sub>2</sub> ölçüm cihazı (0-10000 ppm aralığında) flaska yerleştirilip oksijen girişi bloke edilmiştir. Yapılan bu işlemler M 1, M 2 ve ticari maya için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Flask, Sartorius marka CERTOMAT MO II model çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Cihaz oda sıcaklığında ve 90-100 rpm’de çalıştırılmıştır. CO<sub>2</sub> miktarının artışına bağlı olarak ölçüm aralığı belirlenerek dakikalık, saatlik ve günlük ölçümler yapılmıştır.



Şekil 6. Deney düzeneği

## BULGULAR

Çalışmada kullanılan maya 1 (M1), maya 2 (M2) ve ticari mayaya (TM) ait sonuçlar şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. M 1, M 2 ve TM mayalarının CO<sub>2</sub> ölçüm grafiği

Elde edilen bulgular incelendiğinde, M 1 mayası *C. barbata* taksonunu, karbonhidrat kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir. 8 gün içerisinde toplam 154 ölçüm yapılmıştır. CO<sub>2</sub> ölçümleri 1 dakika aralıklarla yapılmıştır. Toplam ölçümlerin 120 tanesi birer dakika aralıklarla alınmıştır. Ölçüm aralığının çok kısa olması ve sonuçların birbirine çok yakın çıkması nedeniyle ölçüm aralığı 10 dakikaya çıkarılmış ve 21 ölçüm alınmıştır. 10 dakikalık ölçümler sonucunda da CO<sub>2</sub> miktarın da büyük bir artış gözlemlenmeyip değerlerin oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Ölçüm süresi 4 saate çıkarıldığında 6 ölçüm yapılmış ve ölçüm sonuçlarının değerleri yine birbirine yakın çıkmıştır. Ölçüm aralığı 24 saate çıkarılıp 7 ölçüm daha yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değeri 5. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. 6., 7., ve 8. gün de CO<sub>2</sub> değeri düşmeye başlayıp 8. gün sonunda ölçüm alınamamıştır. Ölçüm sonuçlarında elde edilen en yüksek CO<sub>2</sub> değeri 7924 (5. gün) olarak tespit edilmiştir.

M 2 mayası ile yapılan ölçümlere bakıldığında, 3 gün içerisinde toplam 150 ölçüm yapılmıştır. Ölçüme 10 dakika aralıklar ile başlanmıştır. CO<sub>2</sub> ölçüm süresi 1 dakika olup, 103 ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümlerde CO<sub>2</sub> değerinin artarak devam ettiği gözlenmiştir. Ölçüm aralığı 30 dakikaya çıkarılmış ve yine 1 dakika ölçüm süresi ile 15 ölçüm yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değeri artmaya devam etmiş olup, ölçüm aralığı 1 saate çıkarılmış ve 32 ölçüm yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değerinde herhangi bir düşme olmadan artmaya devam etmiş ve 3. gün yapılan son ölçüm değeri 10.000 değerinin üstüne çıkmıştır. Bu durum M 2 mayasının algi hızlı bir şekilde karbonhidrat kaynağı olarak kullandığını göstermektedir.

Ticari maya ile yapılan ölçümlere bakıldığında, 13 gün içerisinde toplam 88 ölçüm yapılmıştır. Ölçümlere 10 dakika aralıklarla başlanmıştır. Yine CO<sub>2</sub> ölçüm süresi 1 dakika olarak ayarlanıp, 49 ölçüm yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değerinin yavaş bir şekilde artmaya devam ettiği gözlenmiştir. Ölçüm aralığı 30 dakikaya çıkarılarak 10 ölçüm daha yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değeri yine artmaya devam etmiş ancak hızlı bir değişim gözlenmemiştir. Daha sonra ölçüm aralığı 1 saate çıkarılmış ve 11 ölçüm yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değerinde ki artışın devam ettiği görülmüştür. Ölçüm aralığı 6 saate çıkarılıp 8 ölçüm daha yapılmıştır. CO<sub>2</sub> değerlerinde fazla bir değişim tespit edilememiştir. Ölçüm aralığı 24 saate çıkarılmış ve 10 ölçüm daha yapılmıştır. 4. günde CO<sub>2</sub> değerinin düşmeye başladığı görülmüştür. Ancak CO<sub>2</sub> değerinin 12. günde tekrar artışa geçtiği belirlenmiştir. 13. gün sonunda CO<sub>2</sub> değeri 10.000 değerinin üzerinde olduğu için ölçüm alınamamıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Algler farklı maya ve bakteri suşları kullanılarak biyoetanol üretimi için önemli bir hammadde kaynağıdır. Kahverengi algler kullanılarak yapılan biyoetanol elde edilmesine ilişkin çalışmalar tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1. Kahverengi algler kullanılarak yapılan çalışmalar**

Alg Türü	Maya/Bakteri	Verim
<i>Saccharina latissima</i>	<i>Saccharomyces ceravisiae</i>	% 45
<i>Sargassum spp.</i>	<i>S. ceravisiae</i>	% 89
<i>Saccharina japonica</i>	<i>Pichia angophore Bacillus sp. JS-1</i>	7,7 g/L
<i>Laminaria digitata</i>	<i>P. angophore</i>	167 ml
<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>P. angophore KCTC 17547</i>	12,98 g/L
<i>Laminaria japonica</i>	<i>S. ceravisiae</i>	2,59 g/L
<i>Sargassum sagamianum</i>	<i>Pichia stipitis</i>	~9-10 g/L
<i>Sargassum japonica</i>	<i>Defluviitalea phaphyphila</i>	0,25 g/g
<i>Laminaria japonica</i>	<i>Zymobacter palmae</i>	0,38 g

Tablo 1'de verilen çalışmalarda işlem süresi 1 saat ile 200 saat arasında değişmektedir. Yaptığımız çalışmada işlem süresi M 2 örneğinde 56,5 saat, M 1 örneğinde 171,83 saat ve ticari maya örneğinde ise 312 saatte maksimum değere ulaşılmıştır. M 1 örneğinde ise 570. dakikadan itibaren 1693 ppm seviyesinden 7924 ppm seviyesine 5990. dakikada ulaştığı belirlenmiştir. Daha sonra 10310. dakika sonrasında 0 değerine ulaşmıştır.

Çalışılan maya örneklerinde her maya farklı bir sonuç yani etanol üretimi sergilemiştir. Yapılan çalışmada kullanılan mayalar içinde en verimli ve en kısa sürede iş gören M 2 olarak isimlendirilen mayadır. M 1 mayası ise 10000 ppm değere ulaşamamıştır. Ticari maya ise çok uzun zaman diliminde 10000 ppm değerine ulaşmıştır. Dolayısıyla zaman ve verimlilik açısından en kullanışlı olan maya M 2 olarak isimlendirilen mayadır.

M 2 örneğinde alg numunesi ortamın içerisine eklendikten hemen sonra yapılan ölçümde 1973 ppm değerine ulaşmıştır. Sonrasında 1530. dakikaya kadar artan bir CO<sub>2</sub> verimi varken, bu dakikadan sonra hızlı bir artış göstererek 3390. dakika sonunda 10000 ppm değerinin üzerine çıkmıştır. M 2 ve ticari maya örneklerinde 10000 ppm değere ulaştıktan sonra ölçüm alınamamıştır. Bunun sebebi ölçüm yapılan cihazın maksimum ölçüm aralığının 10000 ppm olmasıdır.



Ticari maya örneğinde hemen yapılan ölçümde CO<sub>2</sub> değeri 998 ppm olarak ölçülmüştür. Yaklaşık 540. dakikaya kadar 1740 ppm değerine ulaşmıştır. Bu dakikadan sonra düzenli bir artış ile 2160. dakikada 5645 ppm değerine ulaşmış ve bu dakikadan sonra CO<sub>2</sub> seviyesinde 17280. dakikaya kadar keskin bir düşüş görülmüştür. Bu dakikadan sonrada ani bir yükseliş ile 10000 ppm değerine ulaşmıştır.

Yapılan benzer çalışmalarda iyi verim alınan bakterilerin yüksek sıcaklıklar da çalıştığı görülmektedir (Adams vd., 2011; Borines vd., 2013). Oysa bu çalışmada kullanılan M 2 mayası oda sıcaklığında maksimum performans göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda test edilen M 1, M 2 ve ticari maya suşları *C.barbata* taksonunu iyi bir karbonhidrat kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir. Üç maya için kullanma süresi ve miktarları değişiklik göstermiştir. Algi en kısa süre de parçalayıp, daha etkili kullanan maya ise M 2 olarak isimlendirilen maya olmuştur.

Alglerden biyoetanol eldesi küçük ölçeklerde başarılı olsa da ticarileşme için henüz hazır değildir. Bunun için en önemli basamağı doğru alg türlerinin belirlenmesidir. Alglerin büyük ölçeklerde yetiştirilmesi ve doğru hasat yönteminin belirlenmesi durumunda ticari anlamda yararlanma mümkün hale gelebilir. Oldukça geniş olan kıyılarımızda alg yetiştirilmeye uygun alanların belirlenmesi gerekmektedir. Bunun yanında potansiyel hammadde kaynağı olan alglerin ekosisteme zarar vermeden yararlanılması çalışmalarının da gerçekleştirilmesi gerekir. Ayrıca maddi olarak etkin stratejilerin belirlenmesi, biyomühendislik yöntemlerinin geliştirilmesi ile alglerden etkili bir şekilde yararlanmak olasıdır. Alglerden biyoyakıt elde edilmesi üzerindeki çalışmalar arttıkça, petrol kaynaklı yakıtların yerini alabilirler. Aynı zamanda alglerin karbondioksiti tüketmeleri ile doğaya zarar vermeden, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir biyolojik kaynak olarak enerji ihtiyacını karşılayabilirler. Türkiye kıyılarında bolca bulunan çok yıllık örneklerden *C. barbata* bu anlamda değerlendirilmesi mümkün olan örneklerdendir. Yetiştigi ortama göre en uygun zamanda hasat edilmesi ile potansiyel bir kaynak niteliğindedir.

**Teşekkür:** Bu çalışma yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tülay TURGUT GENÇ'e teşekkür ederim.

#### KAYNAKLAR

- Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50(7), 1834–1840.
- Adams, J.M., Gallagher, J.A., & Donnison, I.S. (2009). Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 569–574.
- Adams, J.M., Toop, T.A., Gallagher, J.M., & Donnison, I.S. (2011). Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresource Technology*, 102(21), 9976-9984.
- Adıgüzel, A.O., (2013). Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- Ahmed, A.S., Khan, S., Hamdan, S., Rahman, R., Kalam, A., Masjuki, H.H., & Mahlia, T.M.I. (2010). Biodiesel Production from Macro Algae as a Green Fuel for Diesel Engine. *Journal of Energy & Environment*, 1 (2), 1-5.
- Altunbay, S.G., Kangal, A., & Gürel, S. (2016). Şeker pancarından biyoetanol üretimi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel sayı-2),334-339.
- Başak, S., Özgün, D., & Çınar, Ö. (2014). Alglerle Biyoyakıt Üretiminde Atıksuyun Kullanımı. *Su Ürünleri Dergisi*, 29(1), 93-102.
- Borines, M.G., de Leon, R.L., & Cuello, J.L. (2013). Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource Technology*, 138, 22-29.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C., & Jensen, P.D. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology*, 102, 2595-2604.
- Canan, S., & Ceyhan, V., (2017). Türkiye’de biyokütle fiyatındaki değişimin biyoetanol maliyeti üzerine etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32,16-22.
- Chaudhary, L., Pradhan, P., Soni, N., Singh, P., & Tiwari, A. (2014). Algae as a feed stock for bioethanol production: new entrance in biofuel world. *International Journal of Chemtech Research*, 6(2), 1381–1389.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., & Navarro, J. (1988). Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y 7124: Sugar tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 155-161.
- Demain, A., Newcomb, M., & Wu, J.H.D. (2005). Cellulase, clostridia and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1), 124–154.
- Demirbaş, A. (2005). Bioethanole from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomas. *Energy Sources*, 27, 327-337.

- Demirbas, A. (2009). Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management*, 50(9), 2239–2249.
- Fu, C.C., Hung, T.C., Chen, J.Y., Su, C.H., & Wu, W.T. (2010). Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, 101(22), 8750–8754.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2017). Available at: <http://www.fao.org/bioenergy/aquaticbiofuels/en/>
- Gallagher, J.A., Adams, J.M.M., Toop, T.A., & Donnison, I.S. (2011). Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresource Technology*, 102(21), 9976–9984.
- Georgianna, D.R., & Mayfield, S.P. (2012). Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 488(7411), 329–335.
- Gouveia, L., & Oliveira A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 269-274.
- Hacisalihoglu, B., Kirtay, E., & Demirbas, A. (2009). Historical role of Turkey in petroleum between Caspian Sea Basin and the Middle East. *Society Political Economy Culturel Research*, 1, 1-25.
- Hill, J. Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Affiliations, A. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11206-11210.
- Hong, I.K., Jeon, H., & Lee, S.B. (2014). Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, 20(5), 2687–2691.
- Horn, S.J., Aasen, I.M., & Østgaard, K. (2000). Production of ethanol from mannitol by *Zymnobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24(1), 51–57.
- Jang, J.S., Cho, Y., Jeong, G.T., & Kim, S.K. (2012). Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 35(1-2), 11–18.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., & Pandey, A. (2011). Micro and macro algal biomass: a Renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1), 186–193.
- Jung, K.H., Ji-Hyeon, Y., Lee, S.E., Choi, W.Y., Kong, D.H., & Lee, H.Y. (2011). Repeated-Batch Operation of Surface-Aerated Fermentor for Bioethanol Production from the Hydrolysate of Seaweed *Sargassum sagamianum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 323–331.
- Kadam, K.L. (2002). Environmental implications of power generation via coal– microalgae cofiring. *Energy* 27(10), 905–922.
- Khambhaty, Y., Kaplana, M., Gandhi, M.R., Thampy, S., Maiti, P., Brahmabhatt, H., Eswaran, K., & Ghosh, P.K. (2012). *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresource Technology*, 103(1), 180–185.
- Khan, A.M., Obaid, M., & Sultana, R. (2015). Production of Biodiesel from Marine Algae to Mitigate Environmental Pollution. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37(03), 612-620.
- Kim, Y.J., Park, J.H., Hong, J.Y., Jang, H.C., Oh, S.G., Kim, S.H., & Yoon, J.J. (2012a). Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 108, 83-88.
- Kim, S.R., Ha, S.J., Wei, N., Oh, E.J., & Jin, Y.S. (2012b). Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 30(5), 274-282.
- Kim, S. K., Kim, H., & Ra, C.H. (2013). Ethanol Production from Seaweed (*Undaria pinnatifida*) Using Yeast Acclimated to Specific Sugars. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 533-537.
- Kim, S. K., Ra, C.H., Kim, Y.J., Lee, S.Y., & Jeong, G.T. (2015). Effects of galactose adaptation in yeast for ethanol fermentation from red seaweed, *Gracilaria verrucosa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(9), 1715–1722.
- Koçoğlu, Z.G., 2010. Çanakkale Boğazındaki bazı kahverengi alglerde alginat miktarlarının yıllık değişimi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale.
- Koçtürk, D., & Onurbas Avcioglu, A. (2012). Benzin motorlarında biyoetanol kullanımının çevresel etkilerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 4(2), 65-74.
- Leite, G.B., Abdelaziz, A.E.M., & Hallenbeck, P.C. (2013). Algal biofuels: Challenges and opportunities, *Bioresource Technology*, 145, 134–141.
- Larkum, A.W., Ross, I.L., Kruse, O., & Hankamer, B. (2011). Selection, breeding and engineering of microalgae for Bioenergy and biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 30(4), 198–205.
- Lee, J.H., & Lee, S.M. (2012). Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1), 16-18.
- López-Contreras, A.M., van der Wal, H., Sperber, B.L.H.M., Houweling-Tan, B., Barker, R.R.C., & Brandenburg, W. (2013). Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresource Technology*, 128, 431-437.
- Mata, T.M., Martins, A.A., & Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications:

- a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232.
- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource Technology*, 83, 47–54.
- Miao, X.L., & Wu, Q.Y. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of biotechnology*, 110(1), 85–93.
- Melis, A. (2002). Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1217–1228.
- Meinita, M.D.N., Hong, Y.K., & Jeong, G.T. (2012a). Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1), 93–98.
- Meinita, M.D.N., Kang, J.Y., Jeong, G. T., Koo, H.M., Park, S.M., & Hong, Y.K. (2012b). Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 857–862.
- Najafi, G., Ghobadian, B., Tavakoli, T., & Yusaf, T. (2009). Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1418-1427.
- Nguyen, T.H.M., & Vu, H.V. (2012). Bioethanol production from marine algae biomass: prospect and troubles. *Journal of Vietnamese Environment*, 3(1), 25–29.
- Özdemir, E. D., Härdtlein, M., & Eltrop, L. (2009). Land Substitution Effects of Biofuel Side Products and its effect on the Area Requirement for EU 2020 Biofuel Targets. *Energy Policy*, 37(8), 2986-2996
- Pitman, J.K., Dean, A.P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, 17–25.
- Rittmann, B.E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and bioengineering*, 100(2), 203–212.
- Saad, M.G., Dosoky, N.S., Zoromba, M.S., & Shafik, H.M. (2019). Algal biofuels: Current status and key challenges. *Energies*, 12, 1-22.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., & Yu, T. H. (2008). Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land –Use Change, *Science*, 319, 1238-1240.
- Sirajunnisa, A.R., & Surendhiran, D. (2016). Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 248–267.
- Singh, A., Nigam, P.S., & Murphy, J.D. (2011). Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102, 10–16.
- Trung, V.T., Ly, B.M., Hau, L.N., & Hnag, N.T. (2013). Research to Produce Ethanol from Seaweed Biomass *Cladophora* sp. *Journal of Materials Science and Engineering B* 3, 10, 670-676.
- Ulah, K., Ahmad, M., Sofia Sharma, V.K., Lu, P., Harvey, A., Zafar, M., & Sultana S. (2015). Assessing the Potential of algal Biomass opportunities for Bioenergy industry: a review. *Fuel*, 143, 414–423.
- Ünlü, D., & Durmaz Hilmioğlu, N. (2014). Yenilenebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyokütleden Biyoetanol Üretimini İncelenmesi. Uluslararası Enerji ve Güvenlik Kongresi, Kocaeli Üniversitesi 23 – 24 Eylül.
- Wi, S.G., Kim, H.J., Mahadevan, S.A., Yang, D.J., & Bae, H.J. (2009). The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. *Bioresource Technology*, 100, 6658–6660.
- Wu, F.C., Wu, J.Y., Liao, Y.J., Wang, M.Y., & Shih, I.L. (2014). Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from *Gracilaria* biomass. *Bioresource Technology*, 156, 123–31.
- Wang, G., Wang, X., & Liu, X. (2011). Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(3), 246–252.
- Yiğitoğlu, M., Ünal, M., & Gökgöz, M. (2012). Alternatif Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol. *Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1(1), 11-22.
- Yoza, B.A., & Masutani, E.M. (2013). The analysis of macroalgae biomass found around Hawaii for bioethanol production. *Environmental Technology*, 34(13-14), 1859-1867.