

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYAL YAKIT HÜCRESİ İÇİN MODİFİYE
KONDROİTİN SÜLFAT KATKILI MEMBRAN GELİŞTİRME
UYGULAMALARI**



FATMA BAHAR ÖZASLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

EYLÜL 2019

Tezin başlığı : “Mikrobiyal Yakıt Hücreleri Sistemi için Modifiye Kondroitin Sülfat Katkılı Membran Geliştirme Uygulamaları”

Tezi Hazırlayan : Fatma Bahar ÖZASLAN

Sınav Tarihi : 11.09.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi A. Şebnem ERENLER :.....

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Elif APOHAN :.....

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE :.....

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. KAZIM TÜRK

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Mikrobiyal Yakıt Hücresi İçin Modifiye Kondroitin Sülfat Membran Geliştirme Uygulamaları**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden olduğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fatma Bahar ÖZASLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL YAKIT HÜCRESİ İÇİN MODİFİYE KONDROİTİN SÜLFAT MEMBRAN GELİŞTİRME UYGULAMALARI

Fatma Bahar ÖZASLAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
67 + x sayfa

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER

Dünya nüfusunun artışı ve enerji bağımlı teknolojinin hızlı gelişimi ve yaygınlaşması, mevcut enerji kaynaklarının hızla tükenme periyoduna girmesine neden olmuştur. Alternatif enerji arayışı temel araştırma alanlarından biri haline gelmiştir.

Mikrobiyal Yakıt Hücreleri (MYH) de yenilenebilir enerji olarak önemli bir alternatiftir. MYH, organik atıklardaki kimyasal enerjiyi mikroorganizmalar yardımı ile direkt olarak elektrik enerjisine dönüştürebilen bir sistemdir. MYH' ler, elektrokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği bir anot ve bir katot bölmesiyle bir membrandan oluşmaktadır. Literatürde bu fikri destekleyecek yeterli miktarda bilgi mevcut değildir.

Tez çalışmamızda, çeşitli konsantrasyonlarda KS kullanarak hazırladığımız membranların, MYH performansı değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre, tasarladığımız KS katkılı membranların genel olarak proton iletimi, literatüre göre verimli bulunmuştur. Bu değerlendirme pH değişimi, voltaj, kuaternizasyon, iç direnç, coulomb verimi parametreleri analiz sonuçlarına göre yapılmıştır. Ayrıca tasarlanan membranın mekanik özellikleri test edilmiş, maliyet analizi de değerlendirilmiş ve etkili bir proton değiştirici membran potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir. İleri optimizasyon çalışmaları yapılması halinde, MYH performansını destekleyecek, verimli bir enerji süreci elemanı olabilecek, düşük maliyetli, alternatif bir membran geliştirilebilecektir. Bu membran MYH sistemlerinde yaygın kullanım potansiyeline sahip olacaktır.

ANAHTAR KELİMELELER: Alternatif Enerji, Mikrobiyal Yakıt Hücreleri, Proton değişim membranı, Kondroitin Sülfat.

ABSTRACT

Master Thesis

APPLICATIONS OF MODIFIED CHONDROITIN SULPHATE MEMBRANE DEVELOPMENT FOR MICROBIAL FUEL CELL

Fatma Bahar ÖZASLAN

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

67 + x pages

Supervisor: Faculty member, Ph. D. Ayşe Şebnem ERENLER

The uncontrolled growth of the world's population and the rapid development and diffusion of energy-dependent technology have led to the rapid depletion of existing energy resources. The search for alternative energy has become one of the main research areas.

Microbial Fuel Cells (MFC) are also an important alternative as renewable energy. MFC is a system that can convert chemical energy in organic wastes directly into electrical energy with the help of microorganisms. MFCs consist of an anode and a cathode chamber and a membrane in which electrochemical reactions take place. There is not enough information in the literature to support this idea.

In this study, the MFC performance of membranes prepared by using KS at various concentrations was evaluated. According to our results, the proton conduction of KS doped membranes we designed was found to be efficient according to the literature. This evaluation was made according to the analysis results of pH change, voltage, quaternization, internal resistance, coulomb yield parameters. Also, the mechanical properties of the designed membrane were tested, a cost analysis was evaluated and it was determined that it has an effective proton exchange membrane potential. In the case of further optimization studies, a low-cost alternative membrane that can be an efficient energy process element that will support the performance of MFC will be developed. This membrane will have the potential for widespread use in MFC systems.

KEYWORDS: Alternative Energy, Microbial Fuel Cells, Proton exchange membrane, Chondroitin Sulphate.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca çalışmalarına yön veren, kalbi iyilikle, merhametle, vicdanla çarpan, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve her türlü yardımını esirgmeden bir adım daha ilerlememe katkı sağlayan, hayata karşı duruşuna ve saçtığı o güzel ışığa hayran kaldığım Danışman Hocam Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER'e,

Tezimin deneysel aşamasında yardımlarının esirgemeyen İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye,

Çalışmalarım esnasında bilgi ve her türlü deneyimlerini paylaşan, kendimi şanslı hissetmemin yanında ayrıca özel hissettiren, her adımında birçok şey öğrendiğim, yolumun en güzel şekilde kesiştiği ve kalbi anlatılmayacak güzellikte olan çok sevdiğim, değerlim Arş. Grv. Dr. Tuba ÜNVER'e,

Laboratuvara ayak uydurmama sağlayan sevgili doktora öğrencisi Esra ÜLKE'ye,

Her zaman olduğu gibi tez çalışmam boyunca da sürekli yanımda olan ve desteklerini bir an olsun esirgemeyen arkadaşlarım İmren ÖZCAN, Samet UÇAR ve Eray TATLICI'ya,

FYL-2018-1275 nolu yüksek lisans tez araştırma projeme maddi olanak sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Son olarak hayatıma en güzel şekilde dokunan, beni her zaman iyiye yönelten, tezimin her aşamasında bana inanan, günüme her gün huzur taneciği gibi düşen, en yorgun olduğum şu dönemde sevgileri ile hayatımda eskimeyen ve hiçbir zaman eksilmeyecek olan sevgili annem, babam ve kardeşime yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Mikrobiyal Yakıt Hücreleri..... | 2 |
| 1.2. MYH' nin Çalışma Prensipleri..... | 3 |
| 1.3. MYH'nin Dizaynı ve İşletim Sistemi..... | 4 |
| 1.4. MYH'de Anot..... | 5 |
| 1.5. MYH'de Katot..... | 5 |
| 1.6. MYH Tasarımlarının Tarihçesi..... | 6 |
| 1.6.1. MYH'de kullanılan elektron vericiler..... | 8 |
| 1.6.2. MYH'ler de kullanılan elektron alıcılar..... | 8 |
| 1.7. MYH'de Kullanılan Mikroorganizmalar..... | 9 |
| 1.8. MYH Sistemlerinde Elektronların Bakteriden Elektrotta Taşınma Mekanizmaları..... | 10 |
| 1.8.1. Doğrudan elektron transferi..... | 10 |
| 1.8.2. Medyatorler kullanılarak yapılan elektron transferi..... | 11 |
| 1.8.3. Kimyasal medyatorler kullanılarak yapılan elektron transferi..... | 11 |
| 1.8.4. Biyolojik medyatorler kullanılarak yapılan elektron transferi..... | 12 |
| 1.9. MYH'de Kullanılan Substratlar..... | 12 |
| 1.10. MYH Sistemlerinde Elektrot Malzemesinin Seçimi..... | 12 |
| 1.11. MYH'de Kullanılan Membranlar..... | 12 |
| 1.11.1. Anyon değişim membranları..... | 13 |
| 1.11.2. Katyon değişim membranları..... | 13 |
| 1.11.3. İki kutuplu (bipolar) membranlar..... | 15 |
| 1.11.4. Zirfon membranlar..... | 16 |
| 1.11.5. Hyfon membranlar..... | 16 |
| 1.12. Diğer Membranlar ve Ayırıcılar..... | 16 |

| | |
|--|----|
| 1.12.1. Tubular membranlar..... | 17 |
| 1.12.2. Cam yün keçeleri..... | 17 |
| 1.12.3. J-Örtü malzemeler..... | 17 |
| 1.12.4. Seramik membranlar..... | 17 |
| 1.13. Kondroitin Sülfat Kaynaklı Membran Kullanımı..... | 19 |
| 1.13.1. GAG'ların biyosentezi..... | 20 |
| 1.14. Kondroitin Sülfat (KS)..... | 23 |
| 1.15. Kondroitin Sülfat Uygulamaları..... | 23 |
| 1.16. Ticari Kondroitin Sülfat..... | 24 |
| 1.17. KS'nin Biyosentezi..... | 24 |
| 1.17.1. KS üreten mikroorganizmalar..... | 25 |
| 1.17.2. KS'nin toksisitesi..... | 26 |
| 1.17.3. Mikrobiyal KS üretim yöntemleri..... | 26 |
| 1.17.4. Üretilen mikrobiyal KS'nin analiz edilmesi..... | 27 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 28 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 31 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar..... | 31 |
| 3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama Koşulları..... | 31 |
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri..... | 32 |
| 3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler..... | 32 |
| 3.5. Mikrobiyal Kondroitin Üretimi..... | 33 |
| 3.6. Kondroitinin HPLC-MS Analizi..... | 34 |
| 3.7. Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi..... | 35 |
| 3.8. Membran Aktivasyonu..... | 37 |
| 3.9. KS Katkılı Proton Değişim Membran Protokolü..... | 37 |
| 3.10. MYH Sisteminin Aktivasyonu..... | 39 |
| 3.11. MYH Sisteminin İşletimi..... | 39 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA..... | 40 |
| 4.1. Mikrobiyal Kondroitin Üretim Protokolümüz..... | 40 |
| 4.2. Mikrobiyal Kondroitinin HPLC-MS ve NMR Analizi..... | 41 |
| 4.3. Mikrobiyal KS Üretimi..... | 43 |
| 4.4. KS Katkılı Proton Değişim Membran Analizleri..... | 43 |
| 4.5. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Proton İletkenliği Ve Su Alım Miktarının Analizi..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 4.6. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kuarternizasyon Analizi..... | 46 |
| 4.7. Mikroorganizmaların Büyüme ve Çoğalma Karakteristiklerinin Membran Aktivitesi Üzerine Etkileri | 46 |
| 4.8. KS Katkılı Proton Değişim Membranın MYH Sistemindeki Performansı..... | 47 |
| 4.9. Elektrokimyasal Analizler..... | 48 |
| 4.10. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kullanıldığı MYH Sisteminde İç Direnç ve Güç Üretiminin Ölçümü | 49 |
| 4.11. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kullanıldığı MYH Sisteminde Oluşan Coulomb Verimi..... | 50 |
| 4.12. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kullanıldığı MYH Sisteminde pH Değişimi | 51 |
| 4.13. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kullanıldığı MYH Sisteminde Güç Yoğunluğu..... | 53 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 55 |
| 6. KAYNAKLAR | 57 |
| ÖZGEÇMİŞ | 67 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|----------------------|---|
| ADM | Anyon değişim membranı |
| µL | Mikrolitre |
| MYH | Mikrobiyal yakıt hücresi |
| KS | Kondroitin sülfat |
| Kb | Kilobyte |
| KDM | Katyon değişim membranı |
| Kj | Kilojoule |
| LB | Luria-Bertani |
| MEH | Mikrobiyal elektro-diyaliz hücresi |
| Mtr | Metal indirgeme solunumu |
| MW | Megawatt |
| mV | Milivolt |
| PDM | Proton değişim membranı |
| R | Direnç |
| Rpm | Dakikada dönme hızı |
| TB | Terrific Broth |
| Ω | Ohm direnç simgesi |
| ADV | Açık devre voltajı |
| CV | Coulomb verimi |
| Col- KS | Kollojen-kondroitin sülfat |
| GY | Güç yoğunluğu |
| KDM | Katyon değişim membranı |
| g L ⁻¹ | Litre başına gram |
| GAG | Glikozaminoglikan |
| HA | Hyalüronik asit |
| DS | Dermatan sülfat |
| GlcA | Glukronik asit |
| GalNAc | N-asetilgalaktozamin |
| GlcNAc | N-asetilglukozamin |
| GlcN | Glukozamin |
| <i>E.anterogenes</i> | <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>B.subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| NMR | Nükleer manyetik rezonans |
| HPLC | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| MS | Kütle spektrometresi |
| RVC | Ağ yapılı vitrifiye karbon |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotit |
| MB | Methylene red |
| NR | Neutral red |
| CH | Kitosan |
| PEC | Polielektrolit kompleksi |
| OA | Osteoartrit |
| ELISA | Enzim immün test |
| FACE | Fluorofor destekli karbonhidrat elektroforezi |
| KV | Kilovolt |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1. Fosil yakıtların yıllara göre üretim tahminleri..... | 2 |
| Şekil 1.2. A) Alternatif enerji kaynaklarında gözlenen ortalama güç çıkış aralığı B) Ortalama verimlilik aralığı..... | 3 |
| Şekil 1.3. Tipik bir MYH şeması..... | 4 |
| Şekil 1.4. MYH çalışma prensibi..... | 5 |
| Şekil 1.5. Glukozun substrat olarak kullanıldığı bir MYH sistemi..... | 6 |
| Şekil 1.6. MYH sistemin de, ekzoelektrojenler ile anot arasındaki elektron taşıma mekanizması..... | 10 |
| Şekil 1.7. Mtr Yolu | 11 |
| Şekil 1.8. Nafion Membran 117..... | 14 |
| Şekil 1.9. CMI 7000S Membran..... | 14 |
| Şekil 1.10. Selemion membran yapısı..... | 15 |
| Şekil 1.11. Cam yün keçeler | 17 |
| Şekil 1.12. Alümina membran | 18 |
| Şekil 1.13. AG öncüsü ve polisakkarit üretimi için biyosentetik yol. Enzimler italik yazı tipinde biçimlendirilmiştir; yuvarlatılmış dikdörtgenlerde ara metabolitler; Dikdörtgenlerde polisakkaritler; paralelkenarda GAG prekürsörleri (hyaluronan - mavi; heparosan - kırmızı; kondroitin - mor)..... | 21 |
| Şekil 1.14. AG öncüsü ve polisakkarit üretimi için biyosentetik yol | 22 |
| Şekil 1.15. KS'nin temel yapısı | 23 |
| Şekil 3.1. A: NaOH B:HCl uygulamaları | 36 |
| Şekil 3.2. MYH Sistemi | 39 |
| Şekil 4.1. Dondurulmuş Kondroitin örnekleri | 40 |
| Şekil 4.2. Çökeltiletilen Kondroitin numuneleri..... | 40 |
| Şekil 4.3. Liyafilizatör numuneleri | 41 |
| Şekil 4.4. E.coli pETM6-PACF ve pUC8:15 kaynaklı Mikrobiyal Kondroitin | 41 |
| Şekil 4.5. Mikrobiyal kondroitin HPLC-MS Analizi..... | 42 |
| Şekil 4.6. MKS HPLC-MS Analizi..... | 42 |
| Şekil 4.7. E.coli pETM6-PACF ve pUC8:15 kaynaklı KS..... | 43 |
| Şekil 4.8. Farklı SSA mol oranlarının kullanıldığı membranlar | 44 |
| Şekil 4.9. KS katkılı proton değiştirici membran | 44 |
| Şekil 4.10. KS katkılı proton değişim membranının su alımı ve proton iletkenliğinin membran tiplerine göre oranları..... | 45 |
| Şekil 4.11. Quat-188 çözeltisinde oluşan reaksiyon | 46 |
| Şekil 4.12. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde açık devre voltaj grafiği. | 48 |
| Şekil 4.13. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde akım yoğunluğunun voltaja bağlı değişimi | 50 |
| Şekil 4.14. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde akım yoğunluğunun coulomb verimine bağlı değişimi | 51 |
| Şekil 4.15. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde anot pH değişimi | 52 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.16. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde katot pH değişimi | 53 |
| Şekil 4.17. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde güç yoğunluğunun zamana bağlı değişimi..... | 54 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1. MYH' ler de kullanılan mikroorganizmalar | 9 |
| Çizelge 1.2. GAG'ların yapıları..... | 19 |
| Çizelge 1.3. KS üreten bakteriler | 25 |
| Çizelge 3.1. LB besiyeri (g L ⁻¹) | 32 |
| Çizelge 3.2. Kondroitin üretiminde kullanılan parçalama tamponu | 32 |
| Çizelge 3.3. HPLC-MS analizinde kullanılan parçalama tamponu | 33 |
| Çizelge 3.4. Tris- NaCl-İmidazol çözeltisi | 33 |
| Çizelge 3.5. 0.2 M Fosfat Tamponun Hazırlanışı | 39 |
| Çizelge 3.6. Metilen Mavisinin Hazırlanışı | 39 |
| Çizelge 3.7. 0.02 M Potasyum Ferrisiyanid Çözeltisinin Hazırlanışı..... | 39 |



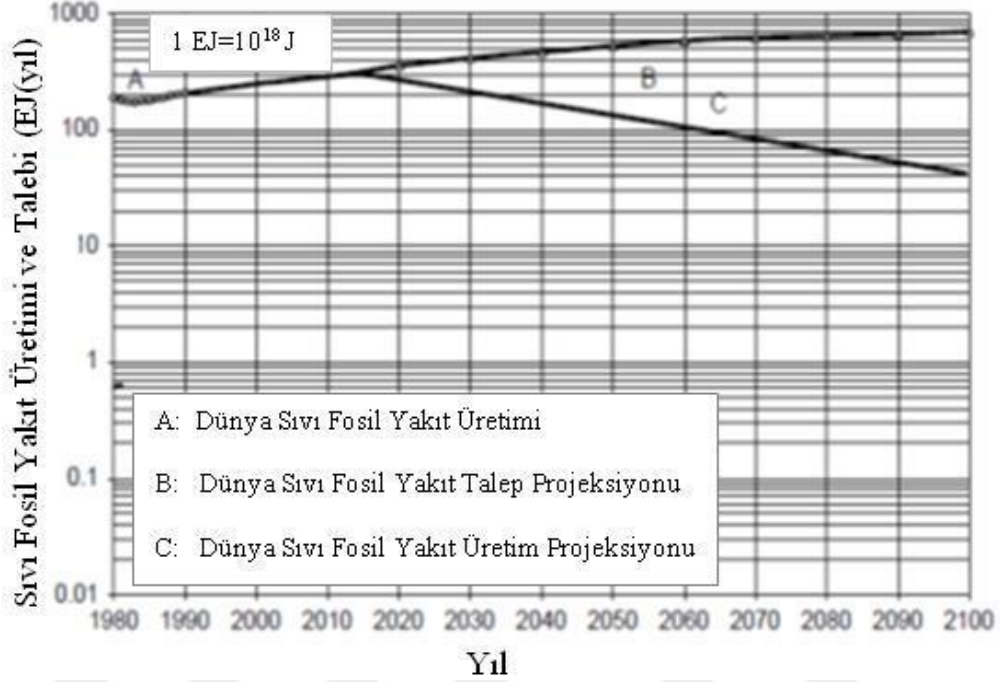
1. GİRİŞ

Günümüzde, teknolojik gelişmelere paralel olarak artan enerji ihtiyacının fosil yakıtlardan karşılanması mümkün görünmemektedir. Bu durum birçok araştırmacının yenilenebilir enerji kaynakları araştırmalarına yönelmesine neden olmuştur [1]. Yenilenebilir enerji kaynaklarından biri de Mikrobiyal Yakıt hücreleri (MYH)'dir. MYH; mikroorganizmaların katalitik aktiviteleri sonucu organik substrattaki kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüştürüldüğü bir biyoelektrokimyasal sistem olarak tanımlanmaktadır. MYH sistemleri; anot ve katot olmak üzere iki bölümden meydana gelen bir sistemdir. Bu bölmeler, bir membran ile birbirinden ayrılmaktadırlar. Anotta yer alan mikroorganizmalar buradaki organik maddeyi oksitleyerek elektron ve proton üretmektedirler [1]. Elektronlar harici bir devreden geçerek katot bölümüne ulaşırken, protonlar ise proton değiştirici membrandan geçerek katota ulaşmaktadırlar. Protonlar katot bölümünde suyu oluşturmak üzere oksijen ile birleşmektedirler. Bakteriyel oksidasyon ile son elektron alıcısı olan oksijen arasındaki potansiyel bir voltaj meydana getirmektedir [2].

MYH'de çeşitli substratlar kullanılabilir. MYH'lerde substrat olarak atık su kullanımı da mümkündür. Böylelikle hem atık arıtımı yapılır hem de elektrik üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Hemen hemen tüm atık sular MYH'lerde enerji kaynağı olarak kullanılabilmektedir [1,2]. MYH'lerin performansı üzerinde birçok faktör etkili olabilmektedir. Bunlardan biri de proton değişim membranlarıdır. MYH'lerde protonları anot bölümünden katot bölümüne taşımak için proton değiştirici membranın taşıma yeteneğinin etkin şekilde sağlanması gerekmektedir [1]. Mevcut proton değiştirici membranlardan en bilineni Nafion membran olup seçiciliği oldukça yüksek bir membrandır. Ancak Nafion membranlar oldukça pahalı MYH bileşenleridir. Hyfon ve Zirfon membranlar da kullanılmaktadır. Fakat bunlarda da iç direnç yüksekliği ve yüksek oksijen geçirgenliği gibi dezavantajlar olabilmektedir. Ultrex CMI 7000 membran ise düşük maliyetli olmasına rağmen ohm direnci yüksektir. Bu nedenle düşük maliyetli ve etkin nitelikli alternatif membran araştırmaları önemli bulunmaktadır.

1.1. Mikrobiyal Yakıt Hücreleri

Dünya üzerinde fosil yakıtların azalan rezervleri küresel enerji krizini belirgin hale gelmiştir. 2020-2025 yılları arasında, fosil yakıtta olan ihtiyacın karşılanamayacak bir düzeye ulaşacağı tahmin edilmektedir [3].



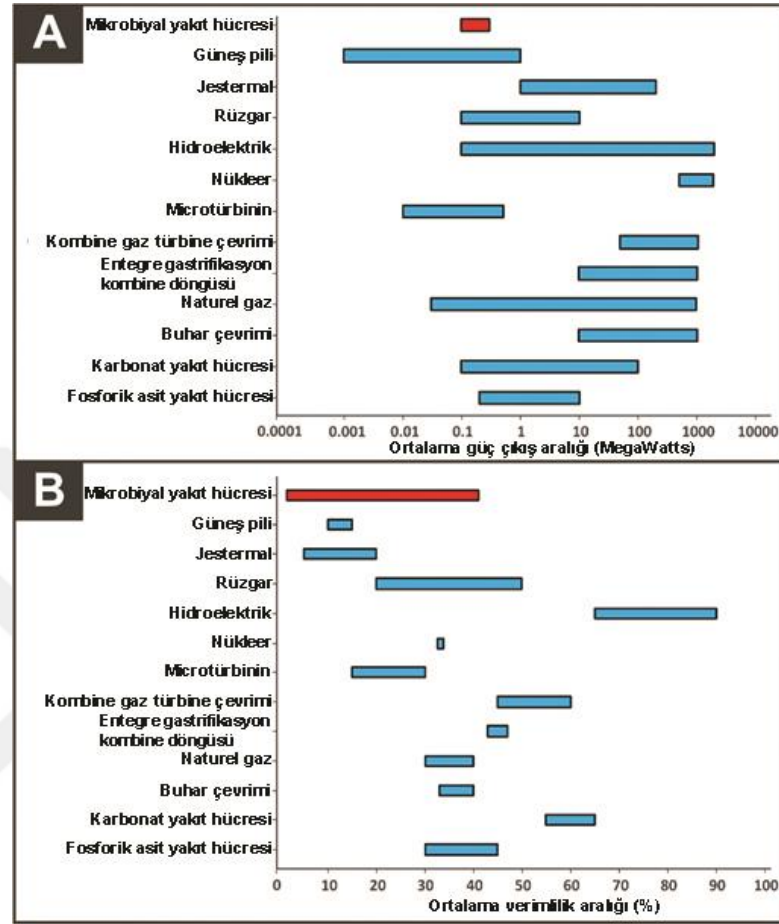
Şekil 1.1. Fosil yakıtların yıllara göre üretim tahminleri [3].

Petrol ve türevi yakıtların yanmasıyla yüksek miktarda CO₂ oluşmaktadır. Sera etkisi ve küresel enerji krizinin neden olduğu sorunları ortadan kaldırmak amacıyla bu yakıtlara ek olarak karbon içermeyen enerjilere ihtiyaç duyulmaktadır [4].

Günümüzde yenilenebilir enerji kaynaklarında özellikle biyokütle kullanımı önemsenmektedir. Biyokütle hem yenilenebilir bir kaynaktır, hemde karbon nötr özellik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı yeşil enerji araştırmalarında büyük ilgi görmektedir [5].

MYH sistemleri ise çevre dostu özelliği ile petrol ve türevleri için alternatif bir kaynak olarak görülmektedir [1]. Bu sistemler substrat içerisinde bulunan kimyasal enerjiyi mikroorganizmaları kullanarak elektrik enerjisine dönüştürmektedirler [6-10]. MYH sistemleri pratik ve geliştirilebilir teknolojiyi kapsamaktadır [10-11]. Ancak bu teknoloji için enerji kayıpları, işletme maliyetleri ve yüksek iç direnç gibi aşılması gereken önemli sorunlar vardır [12]. MYH, canlı mikroorganizmaların biyo-katalitik özelliklerini kullanmaktadır [13]. Pratik olarak, metallerin kullanımı yerine

elektrik akımı oluşturmak için kimyasal bağlarda depolanan enerjiyi dönüştürerek bir dizi organik yakıt kaynağını kullanabilmektedir [14].

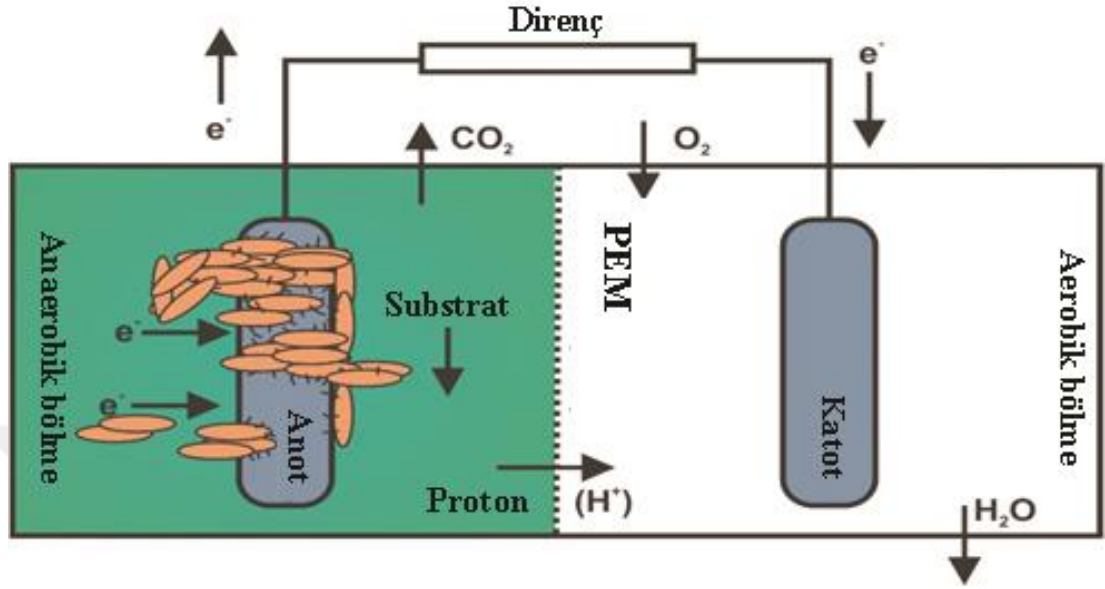


Şekil 1.2. A) Alternatif enerji kaynaklarında gözlenen ortalama güç çıkış aralığı B) Ortalama verimlilik aralığı [1].

1.2. MYH' nin Çalışma Prensipleri

MYH sistemlerinde; çözülmüş organik maddeler, biyo-elektrokimyasal yollarla elektrik enerjisine dönüştürülmektedir [15]. Bu sistemlerde, mikroorganizmaların katalitik reaksiyonu ile kimyasal enerji elektrik enerjisine dönüştürülmektedir [13]. MYH sistemleri, anot ve katot bölmelerinden oluşan, ayrı bir membran kullanılarak oluşturulan sistemlerdir (Şekil 1) [5]. Anotta, organik maddeler mikroorganizmalarca okside edilerek elektron ve hidrojen iletmektedir. Daha sonra bunlar, karbon elektrot veya grafit elektrot kullanılarak anot bölmesinin yüzeyine iletilmektedir. Uygulanan direnç yardımı ile elektronlar katot bölmesine doğru iletilirken oluşan hidrojen ise membran aracılığı ile katot bölmesine ulaşmaktadır [12]. Katot bölmesinde bulunan oksijen ise elektron tutucu olarak görev yapmaktadır. Dış devre üzerinden iletilen elektronlar membran yardımıyla anot

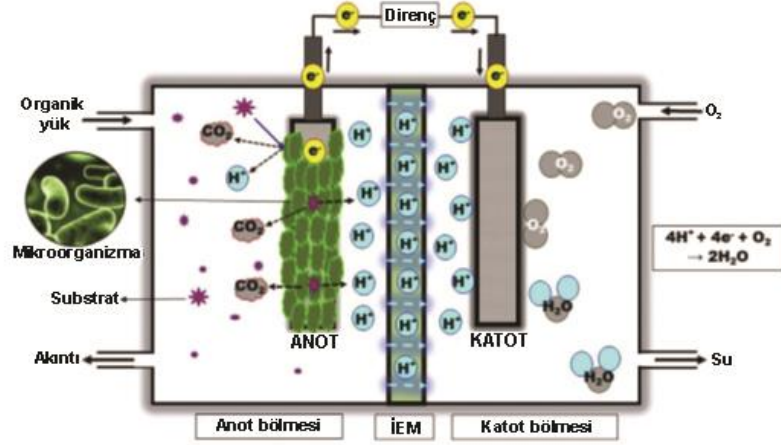
bölmesinde oluşan protonları yakalayıp suyun oluşmasını sağlamaktadır [12]. Bu aktarım esnasında, hat üzerinde bir gerilim oluşmaktadır. MYH sistemlerinde yer alan anot bölgesi tamamen anaerobik olması gerekmektedir [5].



Şekil 1.3. Tipik bir MYH şeması [5].

1.3. MYH'nin Dizaynı ve İşletim Sistemi

MYH sistemlerinde yer alan anot ve katot bölmeleri bir membran ile ayrılmaktadır. Anot bölgesinde çoğalan mikroorganizmalar ortamdaki organik maddeleri kullanarak elektron ve proton üretmektedirler. Anottaki elektronlar dış bir devre aracılığı ile katoda iletilmektedir [16]. Oluşan hidrojen MYH sisteminde kullanılan membran aracılığıyla katot bölgesine ulaşmaktadır. Elektron alıcısı olarak görev yapan oksijen tarafından hidrojenler bu bölmede su moleküllerine dönüşmektedir. Bu sayede anotta üretilen elektronlar katot bölgesine iletilerek, elektrik akımının oluşmasını sağlamaktadır [17].



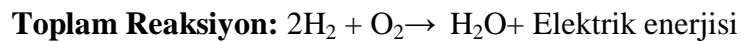
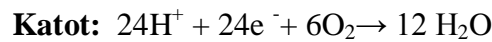
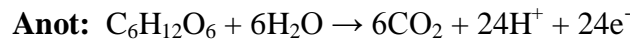
Şekil 1.4. MYH çalışma prensibi [19].

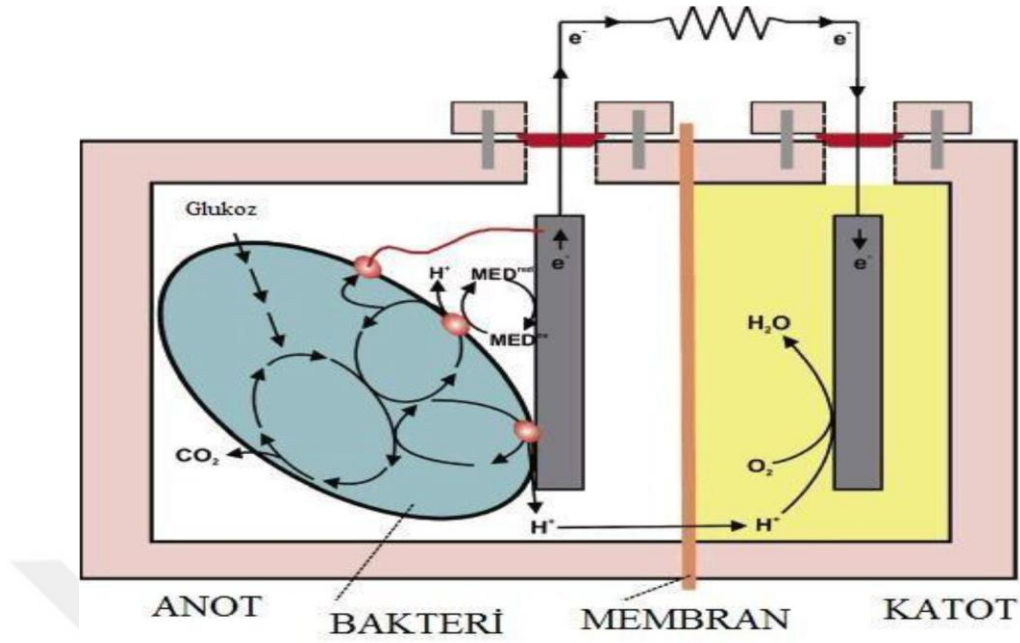
1.4. MYH’de Anot

MYH sistemlerinde anot bölgesi enerji veriminin oluşması için önemli bir kısımdır. Anot bölgesi doğrudan elektron transferini etkilemektedir [19]. Seçilen anot materyallerinin yüksek elektrik iletkenlik, düşük direnç, biyo-uyumlu ve uygun mekanik mukavemete sahip olması beklenmektedir [20-21]. MYH sistemlerinde anot bölgesi elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır [20]. Bakteriler aracılığı ile anot bölgesinde yükseltgenme tepkimeleri oluşurken katotta ise indirgenme tepkimeleri meydana gelmektedir [22]. MYH sistemlerinin ilk aşamasında anot bölgesinde oksijen yer almamaktadır. Anot bölgesinde kullanılan mikroorganizmalar doğal bir elektron alıcısına dönüşmektedirler [23].

1.5. MYH’de Katot

MYH sisteminde, katod bölgesinde anotta üretilen protonlar ile birlikte elektronlar da bulunmaktadır. Katotta elektron alıcısı görevi ferrisiyanid bileşenleri aracılığıyla yapılmaktadır [24]. Katot bölgesinde yer alan elektronlar ve protonlar tek bir katalizör sisteminde yer aldığından, meydana gelen kimyasal reaksiyonlar oldukça sınırlayıcı olmaktadır [3]. Katot bölgesinde meydana gelen reaksiyon birçok özelliğe bağlı olarak değişiklik göstermektedir [24, 25]. Şekil 1,5’de substrat olarak kullanılan glukozun MYH sistemindeki reaksiyonu gösterilmektedir [26].





Şekil 1.5. Glukozun substrat olarak kullanıldığı bir MYH sistemi [27].

1.6. MYH Tasarımlarının Tarihçesi

MYH sistemlerinin tasarımları performansı etkilediği gibi kullanılan reaktörlerin geliştirilmesi de oldukça önemlidir. Günümüzde birçok MYH tasarımı geliştirilmiştir [28]. Geliştirilen bu sistemler arasında tek bölmeli [6, 21], yığın [32], tubuler ve sediment sistemler [33,34,35], yukarı akışlı [31] ve H-tipi [29,30] sistemler de yer almaktadır.

▪ İki Bölmeli MYH Reaktör Sistemleri

Bu sistemler düşük maliyet nedeniyle tercih edilmektedir. İki bölmeli MYH sistemlerinde anot ve katodu birbirinden ayıran bir membran da kullanılmaktadır [13]. Genellikle bu sistemler H-tipi olarak tasarlanıp iki ayrı şişeyi membran aracılığı ile ayıran bir reaktör sistemi olarak kabul edilmektedir [25].

▪ H-tipi reaktör sistemleri

H-tipi sistemlerde oluşan güç yoğunluğu ve buna bağlı olarak oluşan iç direnç bu sistemlerin kullanılmasını sınırlandırmaktadır [13].

▪ **Tabaka ve Dikdörtgen MYH reaktör sistemleri**

Bu sistemler özellikle anot ve katot bölmesi arasındaki mesafeyi azaltmak ve yüzey alanını genişletmek için geliştirilmiş sistemler olarak kabul edilmektedirler [36,37]. Bu sistemde kullanılan membranların büyük alana sahip olması gerektiğinden tasarım ve üretim maliyeti yüksek olmaktadır [25].

▪ **Minyatür MYH reaktör sistemleri**

Mikroorganizmalar ile yürütülen çalışmalarda kullanıldığı gibi ayrıca minyatür elektronik malzemeler içinde tercih edilen pratik bir güç kaynağı sunmaktadır. Ancak hem yüksek maliyet hem de düşük verim nedeniyle kullanım alanı sınırlı kalmaktadır [38].

▪ **Yukarı akışa sahip olan MYH reaktör sistemleri**

Genellikle bu sistemler atık su arıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Adından da anlaşılacağı gibi substrat olarak kullanılan malzeme anota sistemin tabanından girerken, çıkacak olan malzeme ise katottan geçerek sistemin üst kısmından çıkmaktadır. Bu sistemlerde ayırıcı kullanılmamaktadır. Maliyeti üretilen enerjiden fazla olduğundan tercih edilmemektedir [25].

▪ **Sediment MYH reaktör sistemleri**

Bu sistemlerde genellikle substrat olarak deniz suyu kullanılmaktadır. Kullanılan elektrot deniz suyunun içerisine yerleştirilerek belirli bir seviyede güç yoğunluğu üretilmektedir [39]. Sediment MYH'lerde, anot ve katodu ayıran bir membran bulunmamaktadır. Çalışmalarda düşük güç üretimi ve verimin az olmasından dolayı birçok kısıtlamalarla karşılaşmaktadır [35, 40].

▪ **Tek Bölmeli MYH Reaktör Sistemleri**

Bu sistemler, basit tasarımlı bir MYH sistemleri olup anot bölmesi yer almamaktadır [7]. Bu tasarımda, anot ve katot tek bir tüpe yerleştirilerek hazırlanmaktadır [21]. Tek bölmeli MYH sistemlerinde, membran kullanılıyor ise hedeflenen amaç katot bölmesine su sızıntısının engellenmesidir. Ayrıca kullanılan membran anot bölmesine oksijen geçişini de azaltmaktadır [11]. Tek bölmeli MYH sistemlerinde membran kullanılmadığında üretilen güç yoğunluğunun, membran kullanılarak üretilen güç yoğunluğundan iki kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak coulomb veriminin membran kullanılmayan sistemlerde oldukça düşük olduğu da

rapor edilmiştir [21,41]. MYH kullanımında tek bölmeli sistemin, iki bölmeli sisteme göre avantajları bulunmaktadır. Bunlar:

- ◆ Tasarımları oldukça basittir.
- ◆ Katoda olan kütle transferi hızlıdır.
- ◆ Ortamda bulunan suyun havalandırılmasına ihtiyaç duyulmadığından işletme maliyetini azaltmaktadır.
- ◆ Diğer sistemlere göre reaktör hacminde genel bir azalma mevcut olduğundan tercih edilmektedir.

▪ Çok Bölmeli/Yığın MYH Sistemleri

Yığın sistemli olarak kullanılan bu tip MYH sistemlerinde genel sistem potansiyelini ve akımının artırılması hedeflenmektedir. Böyle sistemler paralel ve seri olarak bağlanabildiği gibi uygulanan voltaj akımı arttırarak istenilen miktarda güç üretilmesini sağlamaktadır [32].

1.6.1. MYH’de kullanılan elektron vericiler

MYH sistemlerinde kullanılan substrat en önemli biyolojik faktörlerden biridir. Birçok MYH çalışmasında; asetat [32], sakroz [31], glikoz [43], aminoasit (sistein) elektron verici olarak görev yapmaktadır [44]. Ayrıca evsel atık su [45], hayvansal atıklar [46], okyanus sedimanı [34] içeriği zengin hale getirilmiş karışık kültürler ile de elektrik üretimi gerçekleştirilmektedir [47]. MYH sistemlerinde yer alan substratlara göre üretilen güç yoğunlukları farklı olabilmektedir. Özellikle gerçek atık su ile yapılan testlere oranla, saf bileşikler kullanılarak yapılan çalışmalar da güç yoğunluğu çıkışının daha yüksek olduğu saptanmıştır [44].

1.6.2. MYH’ler de kullanılan elektron alıcılar

MYH sistemlerinde, atıksu içindeki kimyasal oksijenin elektrik enerjisine dönüştürülmesini sağlamak için bakteriler kullanılmaktadır [28]. Bakterilerin açığa çıkardığı elektronlar ekzoelektrojenler aracılığı ile katot bölmesine aktarılmaktadır. Son olarak burada elektron alıcısı tarafından indirgenmektedirler.

Katot bölmesinde kullanılan elektron alıcılar genel olarak;

- ◆ Oksijen [8],
- ◆ Ferrisiyanür [24],
- ◆ Ferrik demir [48],

- ◆ Mangan [49],
- ◆ Permanganat [50],
- ◆ Nitrat gibi elektron alıcıları anottan gelen elektronları kullanarak indirgenirken bu sayede de elektrik akımının oluşmasını sağlamaktadırlar [38, 52].

MYH sistemlerinde kullanılan oksijen hem elektron vericisi hem de elektron alıcısı görevi görmektedir [3,92]. Aynı zamanda oksijen, maliyetli olmaması ve toksik etki göstermemesi nedeniyle MYH sistemlerinde elektron alıcısı olarak tercih edilmektedir [25,53].

1.7. MYH’de Kullanılan Mikroorganizmalar

MYH sistemlerinde bakteriler ya da mayalar kullanılabilir. Tablo 1’de; MYH sisteminde kullanılan mikroorganizmalar görülmektedir [54-56]. Bugüne kadar, çoğunlukla *Enterobacter* [57], *Geobacter* [58], *Shewanella* [59] ve *Bacillus* [60] türü bakterilerin MYH sistemlerinde; kullanılması tercih edilmiştir. MYH’ ler de saf kültürlerle nazaran daha çok karışık kültürlerle çalışılmaktadır. Karışık kültürler daha dayanıklı ve kararlı bir yapıya sahiptirler [61]. *Shewanella* (MR-1)’in üzerinde yapılan bir çalışmada Kiely ve ark., karışık kültürlerin daha fazla güç yoğunluğu ürettiğini rapor etmiştir [62,63].

Çizelge 1.1. MYH’ ler de kullanılan mikroorganizmalar [63].

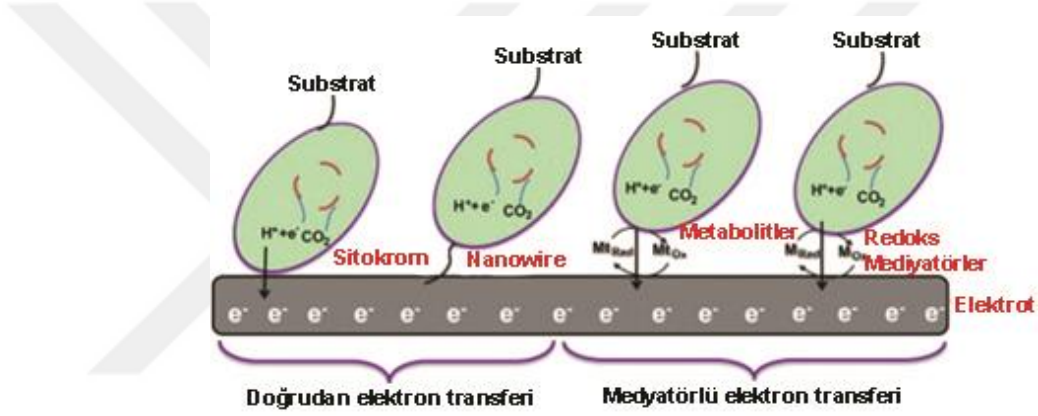
| Substrat | Mikroorganizmalar | Uygulanan Bileşenler |
|-----------------|------------------------------------|--|
| Glikoz | <i>Actinobacillus succinogenes</i> | Elektron medyatörü olarak tiyonin Ya da nötral kırmızısı [64]. |
| Asetat | <i>Aeromonas hydrophila</i> | Medyatörsüz MYH [65]. |
| Sükroz | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | Medyatör olarak sülfat/sülfid [66]. |
| Nişasta, Glikoz | <i>Clostridium butyricum</i> | Fermentatif bakteriyum laktat, melas [67]. |

| | | |
|----------------|-------------------------|----------------------|
| Glikoz, sükröz | <i>Escherichia coli</i> | Metilen mavisi [66]. |
|----------------|-------------------------|----------------------|

1.8. MYH Sistemlerinde Elektronların Bakteriden Elektrota Taşınma Mekanizmaları

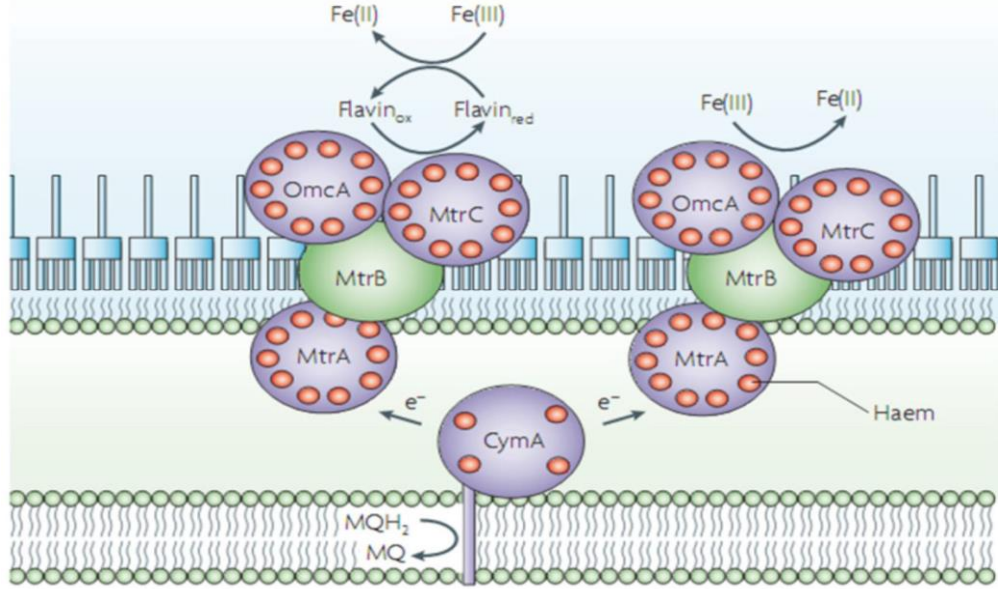
1.8.1. Doğrudan elektron transferi

Bu sistem, mikroorganizmaların hücre membranlarının anotta yapmış oldukları elektron taşınımını kapsamaktadır. Sitokrom-c proteinleri taşınımı gerçekleştirirken nano parçacıklar ise pil aracılığı ile taşınımı gerçekleştirirler. Nano parçacıklar, elektrokimyasal olarak aktif olup, bakteriler tarafından oluşturulan pil olarak tanımlanmaktadır [68].



Şekil 1.6. MYH sistemin de, ekzoelektrojenler ile anot arasındaki elektron taşıma mekanizması [68].

Elektron transferinin yapılabilmesi için, elektron taşıma proteinlerine gereksinim vardır. Taşıma proteinleri, elektronların aktarılmasını sağlamaktadır. Hücre membranına bağlı olarak yapılan bu taşınım birçok organizmada Mtr solunum yolu olarak tanımlanmaktadır. (Şekil 1.6.)



Şekil 1.7. Mtr Yolu [69]

1.8.2. Medyatörler kullanılarak yapılan elektron transferi

Elektron transferinde medyatörlere ihtiyaç duyulmasının nedeni, anotta bulunan bakteriler tarafından üretilen elektronların direkt olarak aktarılamamasından kaynaklanmaktadır. Bu problemi çözebilmek için farklı özelliklere sahip medyatörler kullanılmıştır [72]. Medyatörler elektronları anot elektrotta vererek yükseltgenmektedir. Bu aşamaların herhangi birinde mikroorganizmalar veya elektrot olumsuz etkilenmemektedir [66]. *Bacillus*, *Proteus*, *E.coli* ve *Pseudomonas* bakterilerinin kullanıldığı MYH sistemlerinde bazı durumlarda medyatörlere ihtiyaç duyulmaktadır [73]. Bazı türler ise medyatöre ihtiyaç duymadan kendi medyatörlerini sentezleyebilirken, kimyasal medyatörleri de kullanabilmektedir [74].

1.8.3. Kimyasal medyatörler kullanılarak yapılan elektron transferi

MYH sistemlerinde kimyasal medyatörlerin kullanımı sonucunda verimin ve performansın arttığı rapor edilmektedir. Aynı zamanda elektron transfer hızını da arttırmaktadır.

Kimyasal medyatörler olarak; neutral red (NR), metilen mavisi (MB), tionin, disulfonate (AQDS), Fe⁺³ EDTA gibi metallorganikler ve boyalar kullanılmaktadır [68]. Kullanılan bu medyatörler, ortamda kolay yayılmaları nedeni ile tercih edilmektedirler.

1.8.4. Biyolojik medyatörler kullanılarak yapılan elektron transferi

MYH sistemlerinde kullanılan biyolojik medyatörler toksik olmamakta ve nispeten düşük maliyetli olmaktadır [66].

- ◆ *S.algae* BrY suşunun ürettiği melanin [75],
- ◆ *G.fermentans*'ın tarafından üretilen quinon [76],
- ◆ *Shewanella*'ya ait olan flavin, riboflavin gibi bileşenler [77],
- ◆ *Shewanella oneidensis* MR1 tarafından üretilen menaquinon bileşikleri biyolojik medyatörlerlere örnek verilebilir [78].

1.9. MYH'de Kullanılan Substratlar

Yağ, protein ve karbonhidrat bakımından zengin olan, mikroorganizmaların üremesi için yeterli içeriğe sahip herhangi bir organik bileşik; MYH sistemlerinde substrat olarak kullanılabilir [79].

1.10. MYH Sistemlerinde Elektrot Malzemesinin Seçimi

MYH sistemlerinde kullanılacak elektrot malzemelerinin yüksek iletkenlik içermesi, üretiminin ölçeklendirilebilir olması, düşük maliyet göstermesi gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [80]. Aynı zamanda yüksek elektriksel kuvvet oluşturabilmek için bakterilerin, elektrotların yüzeyinde tutunabilmeleri gerekmektedir. MYH'de kullanılan karbon elektrotlar bakterilerin çoğalıp büyümesi içinde gerekli koşulları sağlamaktadır. Düşük maliyetli olmalarının yanı sıra, yüksek iletken özellikte olmaları onları ideal kılmaktadır. Belirtilen nedenlerle MYH'ler de çoğunlukla karbon elektrot kullanıldığı bildirilmiştir [81,82,83].

1.11. MYH'de Kullanılan Membranlar

MYH sistemlerinde kullanımı gerçekleştirilecek olan membranlar öncelikle, anot ve katot bölmelerinin birbirinden ayırmak ve bu bölmeler içerisindeki çözeltilerin birbirine karışmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır [3,12]. Bu membranlar seçici geçirgen özellikte olup iyonların iletilmesini sağlamaktadır [3]. Membran kullanılan MYH sistemlerinde, anottan katota aktarılan protonlar sistemin performansını belirlemektedir. MYH sistemlerinde protonların aktarılması hız sınırlayıcı bir aşamadır ve iç direncin oluşmasına neden olmaktadır [7]. Membranların yüksek maliyetli olması önemli bir dezavantaj olarak kabul edilmektedir. Çoğunlukla kullanılan ve verimli bir membran olarak bilinen Nafion membranının yüksek maliyeti önemli bir sorundur. Anot ve katot bölmelerini ayırmak

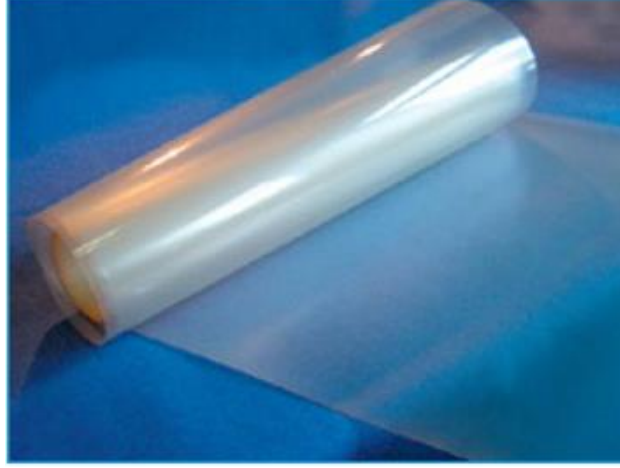
için anyon değişim membranı (ADM) kullanılmaktadır. Aynı zamanda mikrofiltasyon membranı, çift kutuplu (bipolar) membran, ultrafiltasyon membranı, J-örtü ve gözenekli kumaşlar gibi maliyeti düşük bazı membranlar MYH sisteminde ayırıcı olarak kullanılabilirler [84, 85]. Araştırmacılar düşük maliyete sahip cam elyafın kullanılabilmesi [86] ya da membransız sistemlerin oluşturulması üzerine çalışmalar yapılmaktadır [28,31]. Membran kullanılmayan sistemlerde ise anotta oluşan O₂ artacağından coulomb veriminin düşmesine neden olacaktır [3]. Bu nedenle membransız MYH'ler yerine, maliyeti düşük membranların kullanılmasını hedeflemektedirler [87]. Buna bağlı olarak coulomb verimindeki iyileştirmelerle beraber daha küçük ölçeklere sahip MYH tasarımları üzerine çalışılmaktadır [68].

1.11.1. Anyon değişim membranları

MYH sisteminde; bazı durumlarda H⁺ iyonları iletilmediğinden pH dengesi bozulmaktadır. Bunun için protonların fosfat anyonları kullanılarak daha etkin bir şekilde protonları iletileceği düşünölen H-tipi bir MYH sisteminin kurulup ayırıcı olarak da ADM kullanmıştır [84]. Yapılan çalışmada, MI-7001 ticari membran kullanıldığında, CMI-7000 ve Nafion göre daha yüksek akımın üretildiği bildirilmiştir. Anyon değişim membranının kullanımı katot pH'sını arttırdığından MYH performansını düşürmektedir. Bu nedenle membran kalitesinin iyileştirilmesi gerekmektedir [84].

1.11.2. Katyon değişim membranları

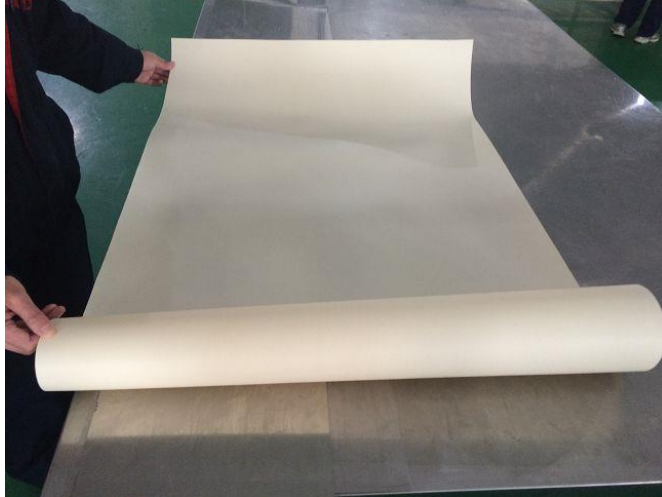
Katyon değişim membranları, 1960 yılında Gemini uzay çalışmaları kapsamında ilk kez hidrojen yakıt hücrelerinde kullanılmıştır. MYH araştırmalarında, öncelikli olarak kullanılan membranların maliyetinin azaltılması hedeflenmektedir [88]. Nafion-117 membran, MYH sistemlerinde sıklıkla kullanılan bir membran olup aynı zamanda sistemde yer alan su ile etkileşime girerek pH değişikliğine neden olmaktadır. Biyolojik yakıt hücrelerinde Nafion membran, düşük oksijen geçirgenliğinden dolayı uygun bir ayırıcı olarak görölmektedir [88].



Şekil 1.8. Nafion Membran 117

Oksijen geçirgenliğinin düşük olması nafion membranı MYH sistemleri için kullanıma uygun hale getirmektedir [88]. Ancak nafion membran protonlar kadar diğer katyonların da transfer edilmesine izin vermektedir. MYH sistemlerinde üretilen protonlar kadar ortamda var olan katyonların iletilmesi akım ve üretilen güç yoğunluğunu önemli ölçüde etkilemektedir. pH değişimlerinin yaşanması proton transferini güçleştirerek yük aktarım dengesinin bozulmasına neden olmaktadır [89].

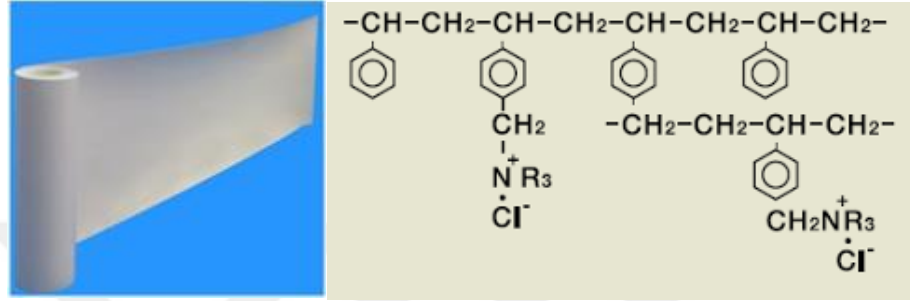
CMI-7000S membranı, MYH sistemlerinde kullanılan bir katyon değişim membranıdır. Nafion membrana göre bu membran daha kalın (0,046 cm) ve daha sert yapıdadır.



Şekil 1.9. CMI 7000S Membran

Yapılan çalışmalarda Nafionun, protonlar kadar diğer katyonların da geçişine izin verdiği, CMI 7000S'de de benzer sonuçlar alındığı belirtilmektedir [90]. MYH sistemlerinde membran kullanımı bazı işletim sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Uzun işletim süreleri MYH sistemlerinin performansını

düşürmektedir. Kısa süreli çözümlerde ise tampon çözeltiler kullanılmakta ancak bu durum da maliyeti arttırmaktadır. Geliştirilen çözümler MYH sistemlerinde tam olarak beklentiyi karşılayamadığından, membran geliştirilmesi önemlidir [90]. Selemion (Asahi Glass, Japonya) membranlar gibi ticari formda üretilen membranlar da, MYH sistemlerinde kullanılabilir [90,91]. Bu membranların temel özellikleri düşük direnç göstermeleri [91], seçicilikleri ve yüksek iletkenliğe sahip olmalarıdır [92].



Şekil 1.10. Selemion membran yapısı

CMF ve Nafion membranlar yüksek proton iletkenliği de göstermektedirler [93]. MYH sisteminde Selemion membran kullanımı, anot bölgesindeki protonların katot bölgesine doğru tek yönde aktarılmasını sağlamaktadır [94]. Yapılan çalışmalarda MYH’de Selemion HSF tipi bir membran kullanımının anot bölgesinde meydana gelen pH düzensizliklerinden etkilenmediği belirtilmektedir. Vafiadis ve Skylsd-Kazacas [91], tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise Selemion HSF kullanılarak oluşturulan bir MYH sisteminde, farklı anyon değişim membranlarının (HZ anyon) etkin coulomb verimine (%84, %83 ve %90) sahip oldukları rapor edilmiştir. Ancak bu membranların MYH sistemlerinde kullanım ömürlerinin kısa olduğunun farkına varılmış ve kullanılan Selemion HSF membranının 141 döngüden sonra kabarcık oluşturmaya başladığı ve bunun sonucunda da renk ve yapısının değiştiği belirtilmiştir.

Farklı proton değişim membranları ile yürütülen başka bir çalışmada ise Nafion membrana kıyasla Selemion HSF tipi membranın iletkenliğinin yüksek olduğu ve pH değişikliklerinden etkilenmediği görülmektedir [95]. Selemion membranının bir diğer avantajı ise maliyet açısından daha uygun olmasıdır [94].

1.11.3. İki kutuplu (bipolar) membranlar

Bipolar membranlar elektrodializ aracılığı ile ortamda bulunan suyun iyonlarına ayrılmasını kapsamaktadır. Suyun iyonlarına ayrılması ile oluşan

reaksiyon iki kutuplu membranda güç verimini olumsuz yönde etkilemektedir [88]. Katot bölmesinde oluşan pH değişiklikleri, kullanılan membranların yapısına zarar vermekle birlikte demir çökmesine de neden olmaktadır. Demir çökmesini engellemek için düşük pH' ya sahip MYH tasarlanmıştır. Bu şekilde, amaç dışarıdan bir asit ilavesi olmadan ferrik demiri çözünmüş formda tutmak hedeflenmiştir [88].

1.11.4. Zirfon membranlar

Zirfon ultrafiltrasyon kompozit membranlar (ZrO), inorganik dolgu maddesi parçacıkları içeren asimetrik bir polisülfon (PSF) membran yapısından oluşmaktadır. Zirfon ayırıcıların kimyasal kararlılıkları yüksek olmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda konsantre olabilme özelliği de bulunmaktadır. Aynı zamanda avantajlı mekanik özelliklere sahip olup ıslanabilir özellik göstermektedir. Gözenekli yapıya sahip olduğundan dolayı film yapım tekniklerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [5]. Zirfon membran kullanımı ilk olarak alkali su elektrolizi için geliştirilmiştir. Ayrıca Hermes Yakıt Hücresi için aday ayırıcı olarak kabul edilmektedir. Daha yakın bir zamanda ise, CNES sözleşmeleri kapsamında geliştirilen yeni tip Ni-H₂ batarya için aday bir malzeme haline gelmektedir. Zirfon membranlar hidrofobik özellik sergileyip, düşük su geçirgenliği ve kirlenmeye karşı hassas olduklarından dolayı bu membranların geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir [5,6].

1.11.5. Hyfon membranlar

Nafion membranlara göre yüksek proton iletkenliğine sahip olup aynı zamanda daha iyi düzeyde kimyasal stabilite sergilemektedir. Bu membranların iç direnci yüksek olduğu için MYH sistemlerinde çok tercih edilmemektedirler. Çünkü katot bölmesinde ani pH yükselişleri, uzun süreli MYH sistemlerinin işletim hızını olumsuz yönde etkilemektedir [7].

1.12. Diğer Membranlar ve Ayırıcılar

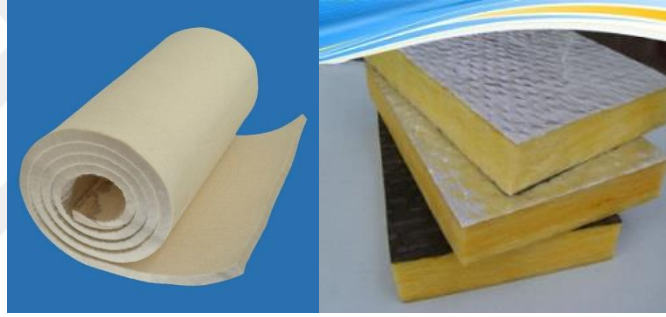
MYH sistemlerinde kullanılan membranların asıl amacı, anot ve katot bölmelerini ayırmak ve protonların iletilmesini sağlamaktır. Atıksu arıtım sistemlerinde geliştirilmiş ultrafiltrasyon (UF) membranların MYH de kullanımı, temel prensibi karşıladığından uygun bulunmaktadır [96,97].

1.12.1. Tubular membranlar

Atık su arıtım sistemlerinde kullanılan bu membran daha büyük yüzey alanları oluşturabilmek için tercih edilmektedir [62]. Tubular bir ultrafiltrasyon membran (UF) kullanılarak yapılan çalışmada 18 W/m^3 güç yoğunluğu elde edilirken oluşan coulomb verimi %70 olarak bildirilmiştir [72]. Tubular membranların maliyeti oldukça yüksektir. Diğer membranlara göre MYH çalışmaları için her zaman uygun olmayabilmektedirler. Bazen proton transferini engelleyerek yüksek iç direncin oluşmasına neden olmaktadır ve yapılan çalışmalarda düşük güç yoğunlukları elde edilmektedir. MYH sistemlerinde ayırıcı olarak j-örtü membranlar ve selüloz gibi ayırıcılar kullanılmaktadır [98].

1.12.2. Cam yün keçeleri

Biyolojik olarak indirgenmeyip kurşun asit pillerde ayırıcı olarak çok sık kullanılmaktadır.



Şekil 1.11. Cam yün keçeler

1.12.3. J-Örtü malzemeler

J-Örtü malzemeler biyolojik olarak indirgenebilir özelliktedirler. Bu nedenle de tek bölmeden oluşan, membran kullanılmayan bir MYH sistemi oluşturularak j- örtü malzemeler test edilebilmektedir. Üretilen güç yoğunluğunun kesikli besleme ile 627 W/m^3 olduğu tespit edilmiştir. J örtü malzemeler kullanılarak elde edilen güç yoğunluğu MYH tasarımlarında bu malzemelerin uygulanabilirliğini büyük ölçüde arttırmaktadır [97]. PDM'nin kullanılmadığı bir tek bölmeli MYH ise yüksek güç yoğunluğu, düşük maliyet ve basit işletim sistemlerinden dolayı etkin kabul edilmektedir [96].

1.12.4. Seramik membranlar

Alümina Membran (Al_2O_3); membran yapımında en yaygın kullanılan seramik malzemelerden biridir. Kolay işlenmesi ve yüksek mukavemetli ve ısıl kararlılığa sahip özgün özellikleri nedeniyle, alümina seramik membranda substrat, ara kat ve

aktif kat olarak işlev görebilmektedir [4]. Alümina membranlar kirli su temizliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır [12].



Şekil 1.12. Alümina membran

Zirkonyum Membranlar (ZrO_2); atık suların arıtılmasına yönelik kullanılan bir malzeme olup oda sıcaklığında zirkonya monoklinik bir kristal yapı halini almaktadır. Yüksek sıcaklıklarda, tetragonal ve kübik fazlara dönüşmektedir. Transformasyon sertleştirme mekanizması bir substrat olarak kullanılabilir ve stabilize edilmiş zirkonyadaki kırılma tokluğunu arttırmaktadır. Bu membranların , yüksek hidrofilitik özelliği su arıtımı sırasında yüksek akış ve düşük tıkanmaya neden olmaktadır [5]. Ayrıca yüksek tuzlu atık suların arıtılması içinde uygun görünmektedir. Bu tür suların geri kazanılması ve tuzdan arındırılması, çevre koruma için çok önemli olmaktadır [50].

Titanyum Membranlar; seramik malzemeler arasında en iyi kimyasal dirence sahip olup bu özelliğinden dolayı suyu arıtmak için kullanılabilir. Titanyum membranlar; filtrasyon ve fotokatalitik oksidasyon sağlayabildiğinden, UV ışınması altında organik bileşiklerin mineralize edilmesinde kullanılmaktadır [23]. Bu membran fotokatalitik özelliğinden dolayı çok fonksiyonlu su arıtımı sağlamakla birlikte anti-bakteriyel aktivite göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda elde edilebilecek nispeten düşük yüzey alanının ve yüksek sıcaklıklarda anataz yapısının kararsızlığının titanyum membranlar için zorluklar arasında sayılabileceği belirtilmektedir [55,56].

Silika membran (SiO_2); atık su arıtımı için geliştirilmiş bir membrandır. Bununla birlikte, silika membran kullanımı alümina, zirkonya ve titanya membranlara göre tercih edilen bir membran değildir. Bu membranlar da suyu tuzdan arındırma işlemlerinde kullanılmaktadır. Ancak yüksek afinite gösterdiğinden

dolayı tercih edilmemektedir. Su ile temas ettiğinde dengesiz bir yapı gösterdiğinden dolayı bu membranın kullanımında hidro-stabilitesinin artırılması gerekmektedir [4,59]. Organik maddelerden kaynaklanan zar tıkanmasının azaltılması, uygun zar performansının sağlanması oldukça önemlidir. Wang ve arkadaşları [60], zar tıkanmasını önlemek için alümina membranları modifiye ederek bir silika sol-jel işlemini benimsemişlerdir.

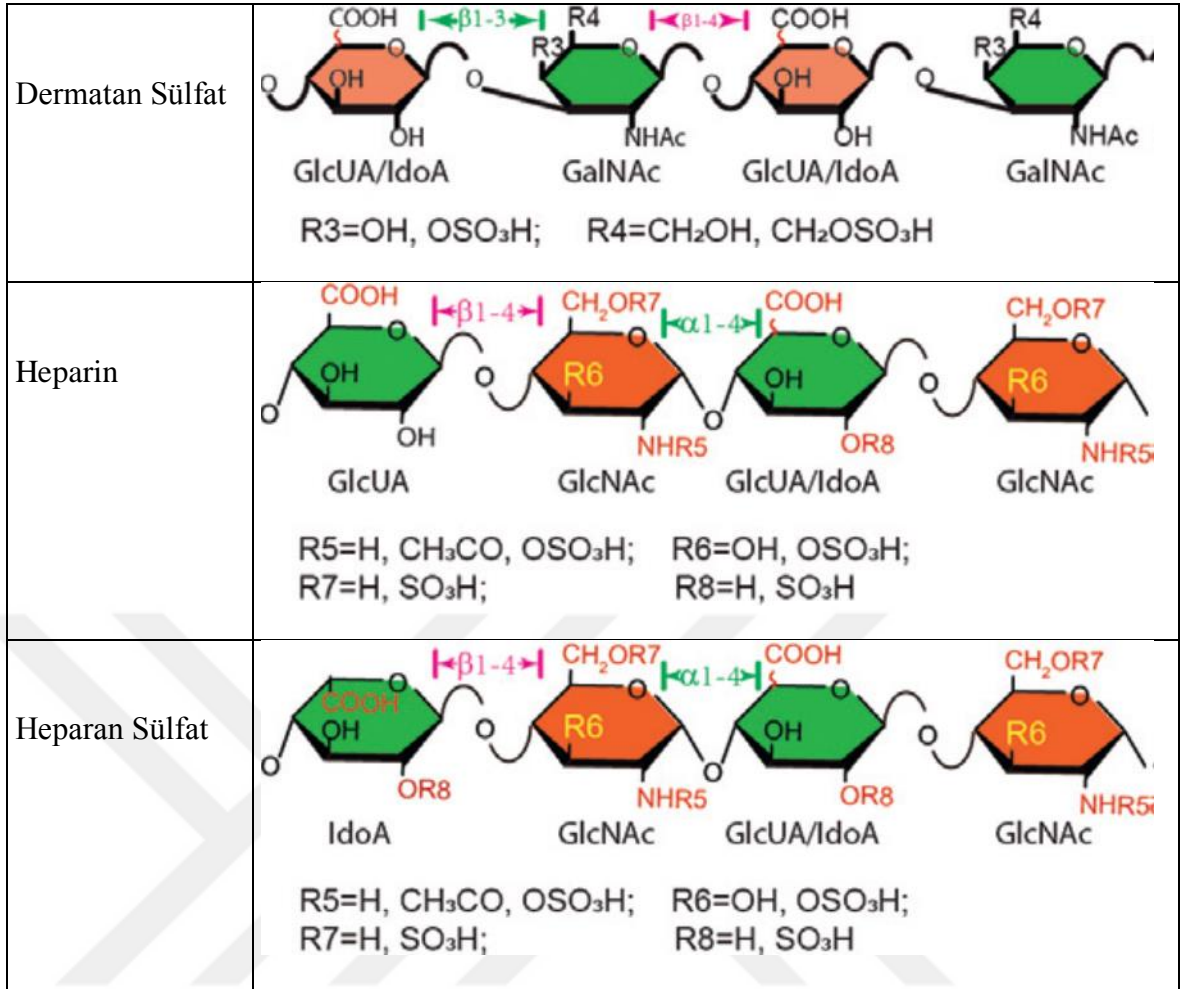
Zeolit membranlar; I. ve II. gruptaki katyonlarla kristalli ve hidratlanmış alüminosilikatlardır. Zeolit membran için, Si'nin Al'a oranı, ıslanabilirlik ve yüzey yükü gibi özelliklerin belirlenmesinde dikkate değer bir işleve sahiptir [4]. Zeolit membranlar benzersiz gözenek yapılarına sahiptir [32]. Zeolit membranlar, karmaşık karışımların tuzunun giderilmesinde büyük potansiyel göstermektedirler.

1.13. Kondroitin Sülfat Kaynaklı Membran Kullanımı

Glikoz Amino Glikanlar [GAG], dokuda kartilaj da yüksek konsantrasyonda bulunan ve aynı zamanda insan vücudunun konnektif dokularında yüksek aktivite gösteren yapılardır [99]. GA; hidroklorür, N-asetil GA ve sülfat gibi birçok formda bulunabilmektedir. Hangi formun en yüksek etkinliğe sahip olduğunun araştırılması halen devam etmektedir [100].

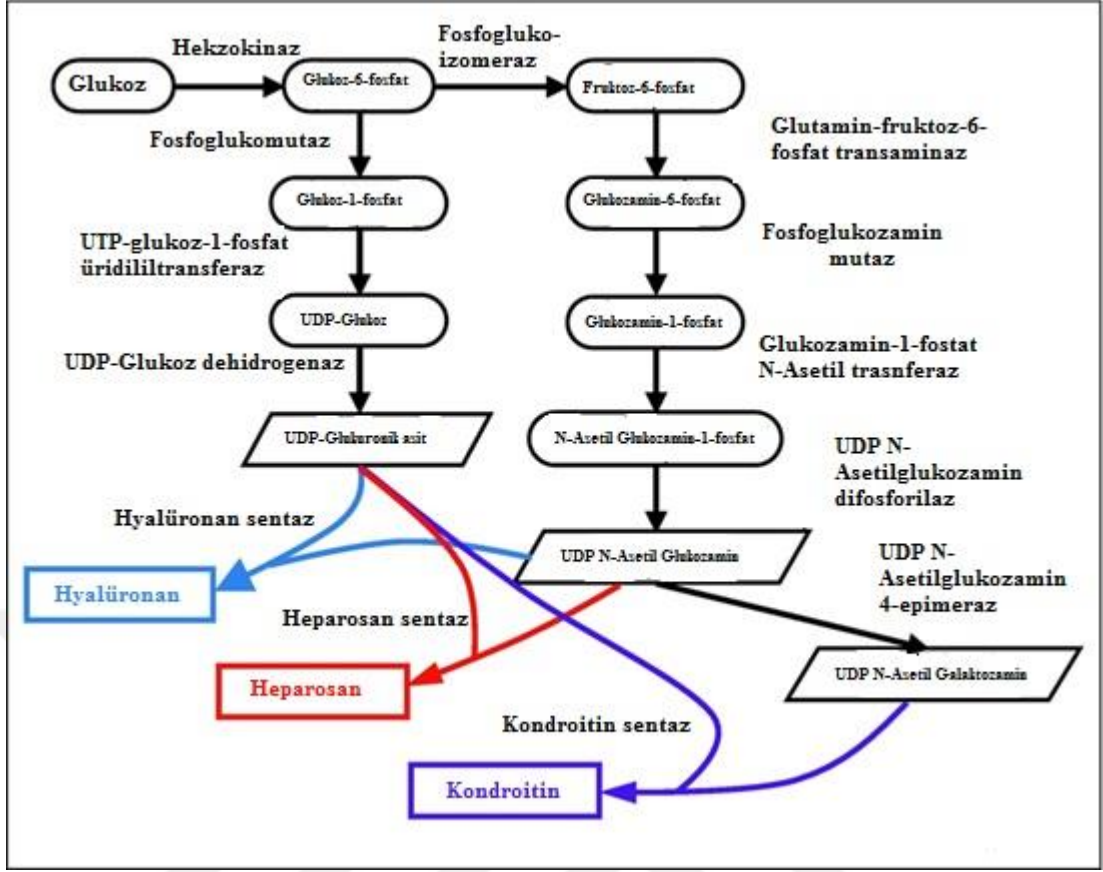
Çizelge 1.2. GAG'ların Yapıları [101]

| İsim | Tetrasakkarit Yapısı |
|-------------------|--|
| Hiyalüronan | <p>GlcUA GlcNAc GlcUA GlcNAc</p> |
| Kondroitin Sülfat | <p>GlcUA GalNAc GlcUA GalNAc</p> <p>R3=OH, OSO₃H; R4=CH₂OH, CH₂OSO₃H</p> |



1.13.1. GAG'ların biyosentezi

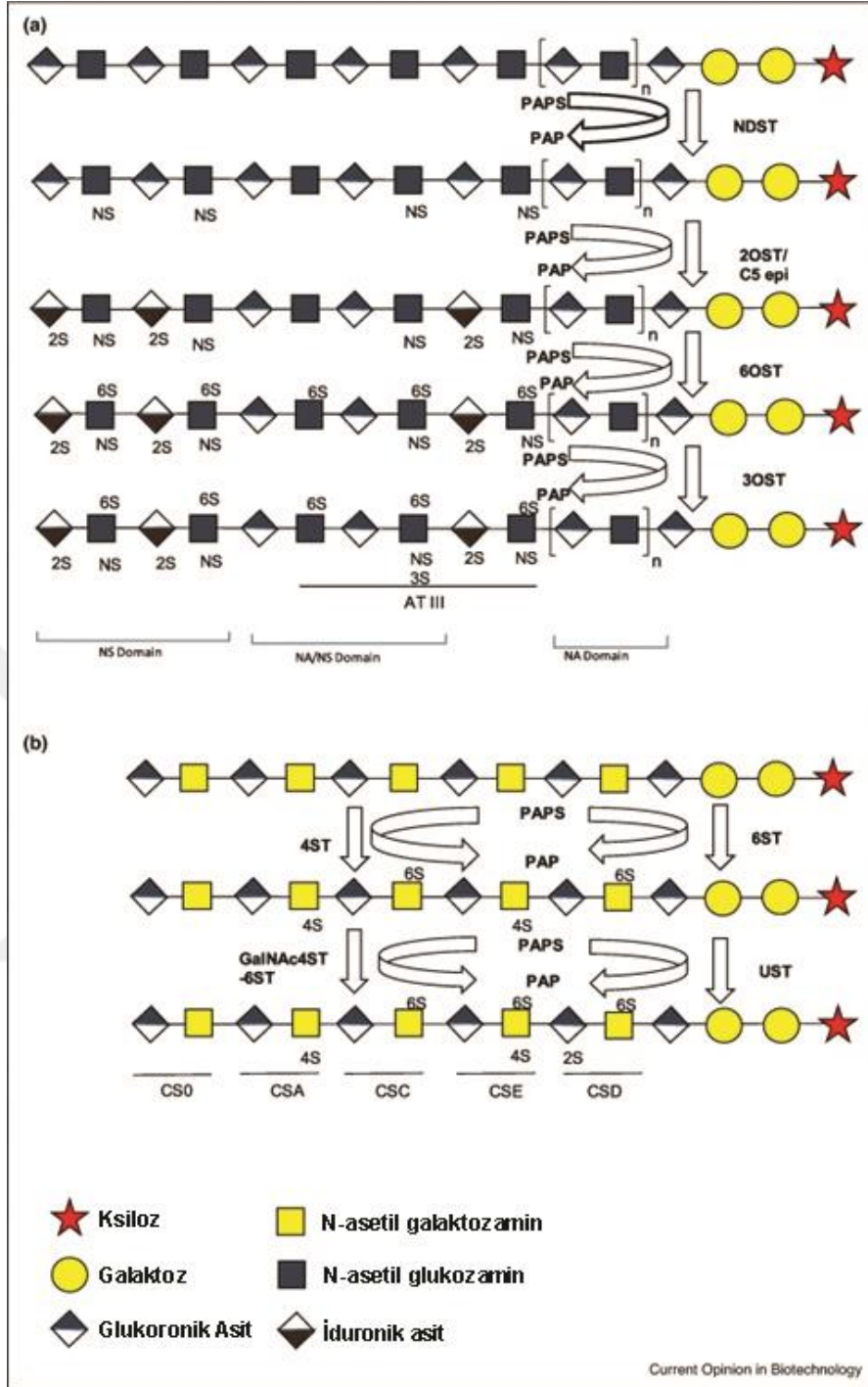
GAG'ların biyosentezi üç temel aşamadan oluşmaktadır. Sentez, polimerizasyon ve modifikasyondur. Her aşamada, bir dizi enzim katalizli basamak ile basit bir şekerden (tipik olarak glikoz) sentezlenmektedir. Sentezlenen ürünler, glikoziltransferazların katalitik etkisiyle GAG zincirine sırasıyla eklenmektedir [102].



Şekil 1.13. AG öncüsü ve polisakkarit üretimi için biyosentetik yol. Enzimler italik yazı tipinde biçimlendirilmiştir; yuvarlatılmış dikdörtgenlerde ara metabolitler; Dikdörtgenlerde polisakkaritler; paralelkenarda GAG prekürsörleri (hyaluronan - mavi; heparosan - kırmızı; kondroitin - mor)

◆ Alternatif Glikozaminoglikan Kaynakları

E.coli K4, *E.coli* K5, *Streptococci* A ve C grupları ve *Pastuerella multivisa* gibi bakteriler GAG kaynağı olarak görülmektedir. Bunlar arasında, *Streptococci* son yıllarda, Hialuronik asit elde etmek için ticari olarak kullanılmaktadır. HA, diğer GAG'lar gibi polimerizasyon sonrası değişikliklerden geçmediğinden, fermantasyon ürününü doğrudan izole edilip, saflaştırılarak satılmaktadır. Son çalışmalar, peynir altı suyu gibi atıkların kullanılması ile HA üretiminin ekonomik hale getirilmesini hedeflemektedir [103-105].



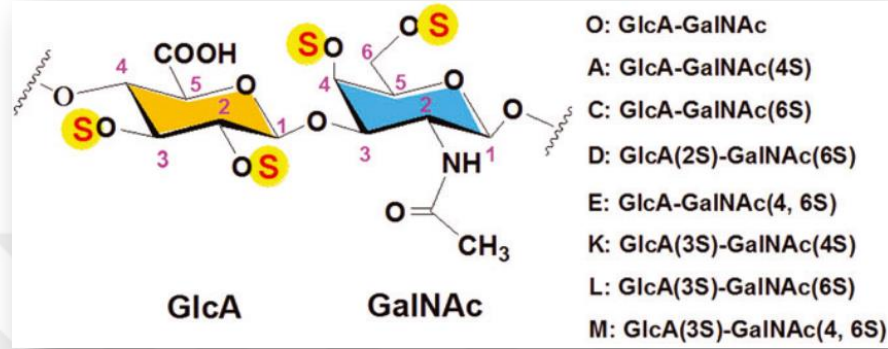
Şekil 1.14. AG öncüsü ve polisakkarit üretimi için biyosentetik yol

◆ GAG üretimi için alternatif yöntemler

GAG üretimi için hayvansal kaynaklar; kaynakların sınırlı olması, ölçek büyütme sorunları, olumsuz çevresel etki ve kalite kontrol sorunları nedeniyle sürdürülebilir bir seçenek olmamaktadır. Biyoteknolojik ve metabolik mühendislik uygulamalarının bu alternatif kaynak arayışları kapsamında kullanılması oldukça avantajlı ve gerekli görülmektedir.

1.14. Kondroitin Sülfat (KS)

KS, N-asetilgalaktozaminin sülfatlanmış birimlerini içeren aynı zamanda D-glukoronik asit yapılarından oluşan bir disakkarit birimidir. Oluşan disakkaritler polisakkarit yapısına katılmaktadır [106]. En yaygın tipleri, eklem dokusunda yer alan KS-A ve KS-C dir. KS'de yer alan polisakkarit zincirleri tekrarlayan üniteleri içermektedir [107].



Şekil 1.15. KS'nin temel yapısı [107].

Günümüzde ticari formda bulunan KS'ler ilk olarak sığır trakesinden elde edilmiştir [108].

1.15. Kondroitin Sülfat Uygulamaları

KS'nin temel uygulama alanlarından biri anti-inflamatuar etki göstererek tedavi amaçlı klinik kullanımınıdır [109]. Diğer taraftan, KS'nin antiviral ve anti-enfektif olarak kullanımı, doku rejenerasyonu ve doku mühendisliğindeki aktivitesi, kanserli hücrelerde ve dokularda biyobelirteç olarak kullanımı da rapor edilmiştir [109]. Yakın zamanda, KS'nin sülfasyon modeli ile ilgili olarak farklı potansiyel farmasötik uygulamalar da yayınlanmıştır [110]. Yapılan çalışmalarda, KS zincirlerinin, *Herpes simplex* virüsü enfeksiyonlarının güçlü inhibitörleri olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda sıtmaya karşı yeni aşuların geliştirilmesi için de kaynak gösterilmektedir. Bu sayede KS'nin antiviral ve anti-enfektif olarak potansiyel kullanıma uygun olduğu keşfedilmektedir [108].

KS in aynı zamanda doku rejenerasyonunda, hücre dışı matrikste sitokinler ve büyüme faktörleri ile işlev görerek yara iyileşmesini hızlandırdığı kanıtlanmıştır. Ayrıca KS'nin merkezi sinir sisteminin onarım mekanizmasında da rol oynadığı bildirilmektedir. Son çalışmalara göre, KS kanser tanı ve tedavi sürecinde de işlev

görmektedir. Yumurtalık kanserinde, KS'nin biyobelirteç olarak potansiyel bir rolü önerilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, yumurtalık epitel kanserinin erken tespitine yönelik serum kondroitin sülfat epitopu WF6'nın değerini vurgulamaktadır. Sonuçlar, KS (WF6) epitopunun bu tür tümörlerde yüksek oranda arttığını göstermektedir [108].

1.16. Ticari Kondroitin Sülfat

Ticari KS endüstrisi daha çok Çin'de gelişmiştir ve ürünlerin yaklaşık % 80'i Çin'den gelmektedir. Ayrıca, ticari olarak temin edilebilen glikozaminoglikanların birçoğu şu ana kadar hayvan kaynaklarından elde edilmektedir (örneğin domuz, koyun ve diğer memelilerin trakea ve nazal septası, tavuk omurgası, köpek balığı kıkırdağı ve diğer balıklar, bunların yanı sıra yumuşakçalardan). Ancak, sığır spongiform ensefalopatisi, H7N9 kuş gribi ve diğer gıda zinciri krizlerine bağlı endişelerin bir sonucu olarak, mikroorganizmanların ve deniz organizmalarının glikokonjugatların kaynağı olarak araştırılması giderek daha çok dikkat çekmektedir.

Son zamanlarda ise, birçok bilim adamı biyoteknolojik ve kimyasal sentez yöntemlerini kullanarak KS preparatları geliştirmektedir. Bununla birlikte, enzimatik yöntemlerle kondroitin üretilmesi durumunda, GlcUA ve GalNAc donörleri için alıcılar ve şeker nükleotidleri olarak oligosakkaritler gibi pahalı materyallerin hazırlanması gerekmektedir. Bu nedenle daha ucuz malzemeler kullanılarak kondroitin üretilmesi hedeflenmektedir [111]. Ticari ürünlerin ortalama moleküler ağırlığı yaklaşık 20,000 – 50,000 dalton arasındadır. Doğal ürünlerde, sülfat-4 grubuna sahip kondroitin sülfat, hiçbir zaman tek başına bulunmamaktadır. % 10 ila %73 arasında değişen oranlarda, sülfat-6 gruplu kondroitin sülfat zincirine katılmakta ve sonra bu zincirler güçlükle ayrılabilir. Genellikle ticari bir kondroitin sülfat; yaklaşık olarak % 40 Ch4S ve % 60 Ch6S içermektedir [112].

1.17. KS'nin Biyosentezi

KS endüstrisini geliştirmek için harcanan çabalara rağmen; karmaşık ve pahalı saflaştırma protokollerinin, kontaminasyon risklerinin, ürün veriminin düşük olması ile birlikte aynı zamanda ürün kalitesindeki değişiklikler ve ürünlerin sterilizasyon aşamasındaki sorunların çözülmesi gerekmektedir. Organik kimyasallar ve protein kirliliği gibi olumsuz özellikleri taşıyan pahalı ve karmaşık saflaştırma protokolleri dâhil çözülmesi gereken birçok sorun bulunmaktadır [108].

1.17.1. KS üreten mikroorganizmalar

Doğada bazı bakteriler ve mantarlar KS veya KS-benzeri bileşikler üretebilmektedirler. Mikrobiyal kapsüler polisakkaritlerin bu biyomoleküllere yapısal benzerliği, bu bakterileri glukozaminoglikan-türevlerinin hayvansal olmayan kaynağı olarak ideal adaylar haline getirmektedir. Bunlar, potansiyel endüstriyel üretim suşları olarak şu ön koşulları taşımak zorundadırlar:

- ◆ Güvenli olmalıdırlar;
- ◆ Yaygın ve ucuz kaynakları besiyeri olarak kullanabilmeliler,
- ◆ Tanımlanmış genetik altyapıya sahip olmalıdırlar,
- ◆ Çok sayıda KS veya bunun analoglarının verimli bir şekilde sentezini gerçekleştirebilmelidirler [107].

Hayvan kaynaklı KS bileşikleri tipik olarak 20,000 – 50,000 dalton arasında bir boyuta sahip iken mikrobiyal kaynaklı KS bileşikleri 300-20,000 dalton arasında bir boyuta sahiptirler [109]. KS veya KS benzeri bileşik üretimi için çeşitli mikroorganizmalar kültürlenebilmektedir. Bazı kültürlerde kullanılan mikroorganizmalar, genetik olarak tasarlanmamış olan doğal mikroorganizmalar iken bazılarında KS veya KS benzeri bileşik üretmek üzere rekombinant olarak dönüştürülmüş mikroorganizmalar kullanılmaktadır [110]. Örnek bakteriler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, *Actinobacteria* (örn: *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Monascus* ve *Streptomyces*), *Proteobacteria* (örn. *Escherichia*) ve Firmicutes (örn., *Bacillus* ve *Lactobacillus*) bulunmaktadır [111]. Araştırmalarda şu ana kadar çoğunlukla *Pasteurella multocida*, *E. coli* ve *B. subtilis* üzerine odaklanılmıştır [112]. Çizelge 1.3'te KS üretimi amacı ile kullanılan bakteriler verilmektedir [113].

Çizelge 1.3. KS üreten bakteriler

| Bakteriyel Türler | Kondroitin Sülfat (ng/ml) |
|---------------------------|---------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | 8.6 |
| <i>Bacillus circulans</i> | 11.7 |
| <i>Bacillus coagulans</i> | 8.5 |

| | |
|--------------------------------------|------|
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 9.0 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 8.8 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 8.9 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 8.9 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 8.8 |
| <i>Microbacterium arborescens</i> | 8.0 |
| <i>Micrococcus varians</i> | 8.7 |
| <i>Monascus purpureus</i> | 10.1 |
| <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | 8.3 |
| <i>Streptomyces rubiginosus</i> | 8.0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 8.8 |

Örnek mantarlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, filament Deuteromycota (örn., *Aspergillus*), Ascomycota (örneğin, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Hasegawaea*, *Penicilium*, *Pichia*, *Monascus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Eurotium*, *Galaktomyces*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Kluveromyces*), *Schizosaccharomyces*, *Talaromyces Torulopsis*, *Yamadazyma*, *Yarrowia* ve *Zygosaccharomyces*), Zygomycota (örneğin, *Mucor*, *Mortierella*, *Rhizomucor* ve *Rhizopus* türleri), Basidiomycota (örneğin, cins *Cryptococcus*, *Dipodascus* ve *Trichosporon*) olarak rapor edilmiştir [107].

1.17.2. KS'nin toksisitesi

KS' ler aşırı doz kullanıldığında çok hafif düzeyde yan etki göstermektedirler [108]. Yapılan çalışmalarda belirtilen tedavi aralığında kullanılan deneklerin %90'ında herhangi bir yan etki görülmeyip %3'lük bir kısmında ise yan etki olarak mide bulantısı tespit edilmiştir [108].

1.17.3. Mikrobiyal KS üretim yöntemleri

Mikrobiyal KS veya KS-benzeri bileşikler, bunları üreten herhangi bir mikroorganizmayı kültürlemek suretiyle elde edilebilmektedir. Bunlar arasında,

genetik olarak yapılandırılmamış, KS veya KS-benzeri bir bileşik üretmek üzere rekombinant olarak dönüştürülmüş mikroorganizmaların kültürü yapılmaktadır. Gece boyunca çoğalması sağlanan sıvı kültürlerdeki KS veya KS benzeri bileşikleri ayırmak için santrifüj işlemi yapılmaktadır. Fungal mikroorganizmalar da aynı şekilde, uygun bir besiyeri ortamı üzerinde fermantasyon gibi tank veya sıvı fermantasyon veya katı hal fermentasyonu dahil olmak üzere standart koşullar altında kültürlenebilmektedirler [107].

Kondroitin-KS üretimi için çeşitli ortamlar kullanılabilir. Yapılan detaylı bir araştırmada, besi ortamının glikoz, sakaroz, gentiobiose, çözünen nişasta, gliserol, dekstrin, melas ve organik asitler gibi karbon kaynaklarından içermesinin üretimi desteklediği belirtilmiştir. Ayrıca, amonyum sülfat, amonyum karbonat, amonyum fosfat, amonyum asetat, pepton, maya özütü, mısır maserasyon sıvısı, kazein hidrolizat, buğday kepeği ve et özü gibi nitrojen kaynakları ve potasyum tuzları, magnezyum tuzları, sodyum tuzları, fosfatlar, manganez tuzları, demir tuzları ve çinko tuzları gibi inorganik tuzlarında dahil olduğu zenginleştirici bileşenlerin ortamda bulunmasının üretimi indüklediği rapor edilmiştir [108].

1.17.4. Üretilen mikrobiyal KS'nin analiz edilmesi

KS içeriği ve bileşiminin incelenmesi ve karakterize edilmesi için çeşitli kromatografi teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), iyon değişim kromatografisi ve boyut eleme kromatografisi olarak ifade edilmiştir. Genel olarak, az konsantre ve ileri saflaştırma yapılmamış numuneleri karakterize etmek için ELISA yöntemi kullanılmaktadır. Fluorofor destekli karbonhidrat elektroforezi (FACE) gibi elektroforetik teknikler de, GAG zincirindeki sülfasyon derecesini ve yerini değerlendirmek için kullanılmaktadır [108]. Yine bir alternatif olarak, KS-asit ile hidrolize edilerek, ortaya çıkan şeker bileşenleri HPLC ile belirlenebilmektedir. Asit hidrolizinin sülfat gruplarını etkilemesi muhtemel olduğundan, çeşitli yöntemler kullanılarak KS'nin sülfür içeriğinin belirlenmesiyle analiz edilebilmektedir [108]. Çalışmamız KS katkılı proton değiştirici membran üretimini ve aynı zamanda üretilen membranın MYH sisteminde performansının değerlendirilmesini kapsamaktadır. Amacımız, düşük maliyetli bir MYH elemanı tasarlamak ve yeni ve orijinal bir biyo-malzeme üretimi gerçekleştirmektir. Ayrıca, bu çalışma ile ekibimizce üretilen MKS'nin kullanım alanlarının genişletilmesi de hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

KS, doğal olarak metabolizma tarafından üretilen bir GAG 'dır. Ancak önemli bir biyomedikal ürün olarak kullanım potansiyelinin anlaşılmasından bu yana pek çok üretim prosesinde yer almaktadır. Üretilen ürünler sadece sağlık alanında değil, biyomalzeme üretiminde de birçok çalışmaya kaynaklık etmektedir.

Akut kronik yaralar demografik gruplar arasında klinik bir problem olmaya devam etmektedir. Geleneksel ürünler, daha çok doku onarımını değil de yara bölgesindeki bakteriyel büyümenin inhibe edilmesi üzerine odaklanmaktadır. Bu sorunu gidermek için Sharma ve ark., yaptığı çalışmada kitosan (CH) ve kondroitin sülfat (KS) kullanarak bir polielektrolit kompleksi (PEC) oluşturmuşlardır. Hazırlanan PEC'in çok yüksek şişme ve gözeneklilik gösterdiğini belirtilmiştir. Ayrıca çalışmalar sonrasında hazırladıkları preparatın biyoyumluluğunun yüksek olduğu, yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve potansiyel olarak yara iyileşmesini teşvik ettiği belirtilmiştir [113].

Ajisaka ve ark., yaptıkları çalışmada köpekbalığı kıkırdağının; sığır trakea ve domuz bağırsağı mukozasındaki KS antioksidan etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda, somon kıkırdak ve sığır trakeası KS'leri, köpek balığı kıkırdak ve domuz bağırsak mukozasındaki KS'lere kıyasla daha yüksek bir antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir [114].

Wang ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, düşük moleküler ağırlıklı kondroitin sülfat elde edilmiştir. Daha sonra çeşitli teknikler kullanılarak saflaştırılmış ve yüksek performanslı jel filtrasyon kromatografisi ile 521, 1024 ve 1527 Da moleküler ağırlığı olan sırasıyla disakkarit, tetrasakkarit ve heksasakkarit olan üç oligosakkarit tespit edilmiştir. Bu üç oligosakkaritin *in vitro* çalışmada konsantrasyonlarının arttırılmasıyla antioksidan aktivite ve süperoksit anyon radikallerinin süpürme kabiliyetlerinin arttığı gösterilmiştir [115].

Biyoyumluluğa sahip kollajen filmin, korneal körlüğü olan hastalarda görsel rehabilitasyonu sağlayabilmek için klinik tedavilerin planlandığı bir çalışmada, KS ile güçlendirilmiş, yüksek nem kapasitesine sahip yeni bir kollajen bazlı film çalışılmıştır. Kollajen-KS filmi, X-ışını fotoelektron spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Analiz sonrasında hidrofilik özelliği, nem tutma, optik özellik ve mekanik performansları test edilerek nem tutma kapasitesinin, KS eklenmesiyle iyileştirildiği bulunmuştur. Kol-KS membranı, kollojen filminden daha iyi mekanik özellikler

sergilemektedir. Ayrıca modifiye edilmiş film, insan korneal epitel hücrelerinin *in vitro* çoğalması için biyouyumluluk da göstermektedir. İyi nemlendirme özelliklerine sahip olan bu Kol-KS filmi, xerophtalmi riskini azaltarak, kornea defekti olan klinik hastalarda implant başarı oranını da arttırmaktadır [116].

Matriks dejenerasyonları ile ilerleyen osteoartrit (OA) hastalığının tedavisi için matriks rejeneratif ajan KS ile birlikte test edilmiştir. Bu çalışmada Doksisisiklin (D) ve doksisisiklin-CS yüklü poli-kaprolaktan (PCL) mikrosferleri (MS) intraartiküler uygulama sistemleri olarak hazırlanmıştır. Geliştirilen mikrosferlerin biyoetkinliği ilk önce üç boyutlu *in vitro* OA modeli ile değerlendirilmiştir. Burada her iki MS'de 15 ve 24 gündeki tedavi edilmemiş OA-kondrositlerine kıyasla MMP-13 seviyelerinde önemli bir azalma göstermiştir. Hem D hem de D-MS ile tedavi edilen gruplar için GAG salınımında 15-24 gün boyunca önemli bir düşüş gözlenmiş, ikinci olarak mikro kürelere tedavinin etkinliğini değerlendirmek için hyaluronik asit (HA) tavşan dizine enjekte edilmiştir. D-MS ve D-CSMS gruplarında OA grubuna göre yüksek oranda iyileşme göstermiştir. Aynı zamanda D-MS histoloji sonuçlarının da OA'nın umut verici bir gelişme gösterdiği kaydedilmiştir [117].

KS, anti-enflamatuar özelliklere sahip olmasının yanı sıra yaralanan kemikteki hücrelerin yenilenme kabiliyetini arttırmaktadır. Bu nedenle yapılan bir çalışmada, KS'nin insan mezenkimal kök hücreleri (hMSC'ler) üzerindeki hücresel etkiler değerlendirilmektedir. Hücre kültürü deneylerinde hMSC'ler, KS içeren ve içermeyen kalsiyum fosfat kemik simanları üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra bir proliferasyonu ve bir osteogenetik farklılaşma ortamı içerisinde kültürlenmiştir. Proliferasyonu oranları ile ilgili olarak, önemli bir fark tespit edilememiştir. Ancak ortama KS eklenmesi, hMSC'lerin osteogenetik farklılaşmasında önemli bir artışa yol açmıştır. On iki erişkin Wistar sıçanında KS'nin osteokondüktif potansiyelinin etkisini değerlendirmek için süngerimsi kemiğin tip 1 kollajen (CDHA/Coll) içeren ve KS (CDHA/Coll/CS) içermeyen ve nanokristal bir hidroksiapatit siman ile arayüz reaksiyonu değerlendirilmiştir. Silindirik implantlar, tibial kafanın bir bozukluğuna bastırılarak yerleştirilmiştir. Operasyondan 28 gün sonra direkt kemik teması ve yeni oluşan kemik yüzdesi, CDHA/CS- implantlarında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışmada KS ilavesinin, kemik iyileşmesinin erken aşamalarında CDHA/Coll kompozitler üzerinde yeni kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [120].

MYH sistemlerinde, atıksu ve kompleks karışimli organik substratlar denenmesi ile atıksu arıtımında MYH sistemlerinin kullanılması yeni bir alanın oluşmasına neden olmuştur. MYH ile atık su arıtımının yapılması, ilk olarak Avustralya'nın Brisbane eyaletinde bira fabrikasında kurulan sistemde denenmiştir. Aynı zamanda bu fabrikada enerji üretimi de gerçekleştirilmiştir [121].

Biyoenerji üretimi konusunda bakterilerin tercih edilmesi yenilenebilir enerji kaynakları için oldukça elverişli olmaktadır. Bakteriyel reaksiyonlar; hem oda sıcaklığında (15-35 °C), hem yüksek sıcaklıklarında (50-60 °C), olduğu gibi düşük sıcaklıklarda da (≤ 15 °C) olabilmektedir. MYH'de birçok biyolojik organik madde kullanılmaktadır. İlk olarak Potter tarafından yapılan bir çalışmada; *Saccaromyces cerevisia* mayasının ve *E.coli* gibi bakterilerin elektrik üretebildikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda mayaların ortamdaki medyatör yokluğunda elektrik üretmediği de gözlenmiştir. Sonuç olarak dirence karşı voltajın düştüğü belirlenmiştir [122].

Yapılan bir diğer çalışmada, üniversitenin atık suyu substrat olarak kullanılarak elektrik üretimi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak atık su ve *Pseudomonas sp* kullanılmıştır. Tek bölmeli MYH tasarlanarak hazırlanan bu sistemde metilen mavisi ve nötral kırmızısının medyatör olarak etkinlikleri araştırılmıştır. Ölçüm sonuçlarında metilen mavisi kullanılan MYH sisteminde açık devre potansiyelinin, nötral kırmızı kullanıldığında üretilen potansiyelin iki katı olduğu kaydedilmiştir [123].

Yapılan bir diğer çalışmada sitokrom ya da ubikinon aracılığıyla elektron transferi yapabilen mikroorganizmalar içinde en etkili olduğu saptanmış ve *Ecloacae* SU-1' araştırılarak elektron transfer yapabilen bu taşıyıcıların; biyolojik olarak indirgenmemiş ve toksik olmayan redoks çiftleri olduğu gösterilmiştir. Bu bakterilerde elektron transfer zinciri ile elektronların oluştuğu daha sonrasında trikarboksilik asit döngüsü aracılığıyla da üretilen protonların elektrik üretimini gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [124].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmamızda besiyeri hazırlanması ve bakteri stoklarının korunması için; pepton, NaCl, maya özütü (yeast ekstratı), agar, amfisilin ve gliserol kullanılmıştır. Mikrobiyal kondroitin üretim aşamasında; saf etil alkol, DNase, Protease K, Tris, MgCl₂, CaCl₂ kimyasalları kullanılmıştır. (HPLC-MS) analizinde kullanılan kimyasallar: amonyum asetat, kalsiyum asetat, NaCl, imidazol tampon, Kondroitinaz ABC, AMAC (2-aminoakridon), NaBH₃CN, DMSO'dur. HPLC-MS analizinde; piridin sülfotrioksit, aseton, NaOH, HCl, Diyaliz tüpü selüloz membran ve dimetil formamid kimyasalları kullanılmıştır. Selüloz membranı aktive etmek için; sodyum sülfür ve sülfürik asit kullanılmıştır. Kompetan hücre oluşturulması için CaCl₂, Agaroz jel elektroforezi için ise; TBE tamponu (Tris baz, borik asit, EDTA), agaroz ve etidyum bromid kullanılmıştır.

Kullanılan cihazlar

1. Etüv ES 252
2. Otoklav OT 90 L NÜVE
3. Hassas Terazi RADVAG AS220 R2
4. pH metre OHAUS ST 3100
5. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı Biosan Htelli-Stirrer MSH-300İ
6. Vorteks HEİDOLPH REAX TOP
7. Santrifüj cihazı UNİVERSAL 320 R Hettich ZENTRİFUGEN
8. Liyafilizatör
9. Multimetre PİCOTEST M35000A 6 ½ Digit

3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama Koşulları

Çalışmamızda, Kondroitin ve MKS eldesi için ekibimizce önceki çalışmalarımızda oluşturulan pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidinin ikisinin de transforme edilmesiyle oluşturulan ve kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* genlerinin *Vitreoscilla* hemoglobin geni ile ortak ifade edildiği rekombinant bir sistem olan *E.coli* [pUC8.15+pETM6-PACF] suşu kullanılmıştır. Bakterilerin 30 günde bir LB amp plaklarına ekimi yapılarak, 4°C'de taze pasaj olarak muhafazası sağlanmıştır. Membran analizlerinde ise etkin hidrojen kaynağı olarak *Enterobacter*

aerogenes CCM2531 suşu kullanılmıştır. LB ortamında büyüme ve çoğalması sağlanmıştır. Stok kültürler de yine LB ortamında muhafaza edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Araştırmamızda; bakterilerin büyümesi için zengin içerikli LB-amp ve LB sıvı besiyeri kullanılmıştır. Besiyerleri 2' şer litrelik erlende hazırlanıp 25 dakika boyunca 120 °C'de ve 1 atm basınçta otoklav edilmiştir. LB ve LB amp besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. LB besiyeri (g L⁻¹)

| | |
|-----------------------------|-------|
| Pepton | 10 gr |
| NaCl | 10 gr |
| Maya özütü (Yeast ekstratı) | 5 gr |
| pH | 7.5 |

* Katı LB besiyeri için; ortama % 1,5 agar ilavesi yapılır. LB amp için ise, 2'şer litrelik hazırlanan besiyerlerine 2 mikrolitre ampisilin eklenmiştir.

3.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Kondroitin elde etmek için kullanılan parçalama tamponu Çizelge 3.2 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kondroitin eldesi için kullanılan parçalama tamponu

| | |
|-------------------|-------|
| Tris | 10 gr |
| MgCl ₂ | 10 gr |
| CaCl ₂ | 5 gr |
| pH | 7.5 |

HPLC-MS analizi için kullanılan parçalama tamponu ve Tris- NaCl-İmidazol çözeltisi sırasıyla Çizelge 3.3 ve 3.4 'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. HPLC-MS analizinde kullanılan parçalama tamponu

| | |
|-----------------|-------|
| Amonyum asetat | 50 Mm |
| Kalsiyum asetat | 2 Mm |
| pH | 7.5 |

Çizelge 3.4. Tris- NaCl-İmidazol çözeltisi

| | |
|-----------------|--------|
| Tris | 25 Mm |
| NaCl | 500 Mm |
| İmidazol Tampon | 300 Mm |
| pH | 7.5 |

* Yukarıda verilen kimyasallardan belirtilen miktarlarda kullanılarak istenilen hacimde bir stok çözelti hazırlanmış ve deneyler süresince bu stok çözelti kullanılmıştır.

3.5. Mikrobiyal Kondroitin Üretimi

1. Kullanılan bakteri suşundan LB-amp sıvı besiyerine ekim yapılarak gece kültürü yapılmıştır. Ertesi gün bu gece kültüründen yeni besiyerlerine ekim yapılarak inkübasyona bırakılmıştır.
2. Daha sonra rekombinant bakteri kültürü 9000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
3. Peletler biriktirilerek yeniden distile suda süspanse edilip (yaklaşık 20-30 ml) tek bir santrifüj tüpünde biriktirilmiştir.
4. Daha sonra bu tüp 15 dakika sıvı döngüde otoklav edilmiştir.
5. Otoklavdan çıktıktan sonra soğuması beklenmiştir. Gerekli ısıya ulaştığında ise 9000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant başka bir falkon tüpüne aktarılarak alkol hacmi %80 olacak şekilde soğuk alkol eklenmiştir.
7. Alkol ilavesinin ardından örnekler -20 °C'lik dondurucuda bekletilerek çökeltme işlemi sürdürülmüştür.
8. Gece boyu bekleyen numune 9000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

9. Santrifüj sonrası, elde edilen peletler toplanmış ve parçalama tamponunda yeniden süspanse edilmiştir. Tüp içinde kalan pelet üzerine parçalama tamponu eklenerek vortexlenip karıştırılmıştır.

Parçalama tamponu: 500 ml için, Tris 6.05 gr
MgCl₂ 2.38 gr
CaCl₂ 0.55 gr

10. Numunelerin üzerine DNase eklenmiş (1 mg/l) ve örnek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

11. Örneklerin üzerine Protease K eklenmiş (2,5 mg/ml) ve 56°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

12. Toplam hacim 45 ml olacak şekilde örneğin üzerine soğuk (+4 °C) alkol eklenmiştir. Örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant atılmıştır.

13. Kalan pelet santrifüj tüpünün içerisinde 15 mL distile su ile tamamlanacak şekilde vortexle çözünmesi sağlanmıştır.

14. 15 ml olan son hacmin hepsi tek bir spin kolon plastik kabı içerisine dökülmüştür. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp delikler açılarak spin kolonda -20°C'de dondurularak filtreleme için hazır hale getirilmiştir.

15. Filtrelemeden sonra geriye kalan kısım NMR analizi için vakumla liyofilize edilmiştir.

Yukarıdaki işlemlerle elde edilen kondroitinin doğrulanması için (HPLC-MS) ve Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analizleri yapılmıştır.

3.6. Kondroitinin HPLC-MS Analizi

Üretilen GAG'ların miktarının belirlenmesi için karbazol gibi kolorimetrik deneylerin kullanımı, ortam ve hücrel artıkların karışması nedeniyle sınırlıdır. HPLC-MS kullanılarak yapılan disakkarit analizi ise, kondroitin miktar tayini için yapısal olarak spesifik bir analiz sunmaktadır [18]. Bir önceki aşamada elde edilen kondroitin için HPLC analizi, İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Üretilen kondroitin numuneleri, analize gönderilmeden önce, referans makaleden alınan HPLC protokolü uygulanmıştır [18].

HPLC-MS Analizi

1. Analize gönderilecek kondroitin 100 µl parçalama tamponunun içerisinde çözülmüştür.
2. Tris- NaCl- İmidazol çözeltisinden 5 µl alınıp içerisine 20 mU Kondroitinaz ABC eklenmiş. Oluşan yeni solüsyon 1. Adımda parçalama tamponunda çözülmüş numuneye eklenir ve 35 °C'de 10 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra numune liyofilize edilmiş, liyofilize edilen numune; asetik asit/ dimetil sülfoksit karışımındaki (3,17 v/v) 0.1 M'lık AMAC (2-aminoakridon) solüsyonunun 10 µl'si içerisine ilave edilmiş ve 5 dakika vortekslenerek karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımına 1 M NaBH₃CN'den 10 µl eklenmiş ve 45 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Son olarak; AMAC-etiketli numune % 50 (v/v) sulu DMSO kullanılarak 0,5-50 ng aralığında farklı konsantrasyonlara seyreltilerek analize gönderilmiştir.

Sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS) analizleri, bir 6300 iyon tutucu ve ikili pompa ile donatılmış bir Agilent 1200 LC / MSD cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sütun, 55 ° C'de bir Poroshell 120C18 sütunudur (3.0 x 30 mm², 2.7 µm, Agilent). Eluent A: 80 mM amonyum asetat çözeltisidir, eluent B ise: metanoldür. Solüsyon A ve % 20 solüsyon B, kolondan 4 dakika boyunca akıtılmıştır (200 µl / dak), ardından % 40 solüsyon B 4 ila 60 dakika arasında akıtılmıştır. MS tarafından sürekli bir tespitin sağlanabilmesi için sütun atık suyu, elektrosprey iyonizasyon-MS kaynağına girmiştir. Elektrosprey ara yüzü, tam bir tarama spektrumunda (300–1200 Da) maksimum bollukta iyon elde etmek için -40.0 V keçe potansiyeline, -40.0 V kılcal çıkışa ve 350 ° C kaynak sıcaklığına sahip negatif iyonizasyon moduna ayarlanmıştır. Kurutma ve nebulize edici bir gaz olarak azot (8 l / dak, 40 psi) kullanılmıştır.

3.7. Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Üretimi

Önceki aşamada elde edilen mikrobiyal kondroitinin analizi yapıldıktan sonra sülfasyon yöntemi ile kondroitine sülfatlama işlemi yapılmıştır. Doğal KS'lerde, GalNAc tortularının neredeyse tamamı 4 ya da 6 konumunda sülfatlandığı ve 6-pozisyonunda sülfat oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız işlem ile tüm GalNAc tortularının 6. pozisyonundaki hidroksil gruplarının sülfatlanıp, uygun bir şekilde 4. pozisyonundaki hidroksil tortularını koruyan bir polimer elde

edilmesi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, literatürdeki çalışmamıza en uygun yöntem tercih edilmiştir [18]. Uygulanan sülfatlama işlemi aşağıdaki gibidir:

1. Mevcut mikrobiyal kondroitinin 4-6 gramı 80-120 ml sulu DMF (Dimetil formamid) içinde çözülmüş ve solüsyon 0-5 °C'ye kadar soğutulmuştur.
2. Daha sonra soğutulmuş solüsyona 12 gr Sülfür trioxide-pyridine kompleks eklenmiştir.
3. Solüsyonun oda sıcaklığına ulaşması beklenmiş ve 400 ml NaCl'e doymuş aseton ilave ederek çöktürme işlemi yapılmıştır.
4. Çökeltinin üzerinde kalan doymuş aseton pipetle çekilerek geri kalan çökelti spin kolonlara boşaltılmıştır. Daha sonra liyofilizatörde kurutulması sağlanmıştır.
5. Kurutma işleminin ardından toplamda elde edilen katı miktar 200 ml'de iyonize suda çözülüp elde edilen çözelti 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir.
6. Nötralizasyon sağlandıktan sonra çözelti 40 °C'ye kadar ısıtılmış 0,2-0,3 N 60 ml NaOH ile çözülmesi sağlanmıştır. Bu sıcaklıkta 2 saat tutulmuş ve daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve HCl asit damlatılarak nötralize edilmiştir.



Şekil 3.1. A: NaOH B:HCl uygulamaları

7. Çözelti 10 µs'den küçük geçirgenlik iletkenliğe sahip zar (membran) aracılığıyla filtrelenmiştir. Öncelikli olarak membran aşağıdaki protokolle aktive edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
8. Son olarak çözelti spin kolonlara 15'er ml'ye bölünüp liyofilize edilerek kurutulmuştur.

Elde edilen KS numunelerine kondroitin de olduğu gibi HPLC-MS ile doğrulama analizleri yapılmıştır. HPLC-MS protokolü kısım 3.6 da belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

3.8. Membran Aktivasyonu

1. Nemlendirici olarak kullanılan gliserolün fazlasının giderilmesi için membran, akan suyun altında yıkanıp distile su içinde 1 gece bekletilerek ertesi gün tekrar yıkanıp bir kaç kez suyu değiştirilmiştir.
2. Kükürt bileşiklerinin uzaklaşması için membran 1 dakika boyunca 80 °C de % 0,3 (w/v) sodyum sülfür solüsyonuyla muamele edilmiştir.
3. Membran, 60 °C de distile suda 2 dakika boyunca yıkanmış, bunu takiben % 0,2'lik (v/v) sülfürik asit ile muamele edilmiştir.
4. Daha sonra asiti uzaklaştırmak için membran sıcak su içerisinde durulanmıştır.

3.9. KS Katkılı Proton Değişim Membran Protokolü

Çalışmamızda özgün bir membran elde etmek için, laboratuvarımızda üretimi yapılan Mikrobiyal KS kullanılmıştır. Membran uygulaması içinde, çalışmamıza özel olarak tasarlanan iki bölmeli cam MYH kullanılmıştır.

Membran Bileşenleri

1. Sülfosüksinik asit (ağırlıkça %70 sulu çözelti)
2. Gluteraldehid (%25'lik çözelti)
3. 3-kloro-2-hidroksiproril trimetilamonyum klorür (%60'lık çözelti)
4. Asetik asit
5. Hidroklorik asit (%37'lik çözelti)
6. İyot
7. Pepton
8. Maya özütü (yeast ekstratı)
9. Sodyum klorür
10. Agar
11. Metilen mavisi
12. Ferri siyanür
13. Sodyum hidroksit
14. Grafit keçe (karbon \geq %99)

KS Katkılı Proton Değiştirici Membran Sentezi

Membran, ağırlıkça % 2'lik oranında sulu çözeltilisi, 2 gr MKS, minimal miktarda HCl içeren %2'lik (V/V) 100 ml asetik asit çözeltilisi içerisinde çözümlenmesiyle birlikte hazırlanmıştır.

1. Mikrobiyal KS, tamamen eridikten sonra, çeşitli miktarlarda sülfosüksinik asit (0,2, 0,4, 0,6 ve 0,8 mol oranı) ilave edilmiştir. 24 saat manyetik karıştırıcıda bekletildikten sonra, çözelti bir 24 saat daha %2'lik glutraldehid ile muamele edilmiştir. Son homojen karışım petri kapları üzerine dökülerek 40 °C'de pastör fırınında kurutulması sağlanmıştır.
2. Susuz membranlar 1 M NaOH ile nötralize edilip nötr olana kadar su ile yoğun bir şekilde yıkanmıştır.
3. Son olarak, yaklaşık 120-140 nm'lik bir kalınlığa sahip olan membranlar kullanılmadan önce de iyonize suda bekletilmiştir.

Kuaternizasyon aşaması için:

1. Quat-188 çözeltisi %15 (w/v)'lik NaOH çözeltisi kullanılarak pH 8'e ayarlanmıştır.
2. 20 ml Quat-188 başına 0,25 g iyot eklenmiştir.
3. Çapraz bağlı MKS membran, oda sıcaklığında 2, 4 ve 8 saat Quat-188 çözeltisine daldırılmıştır.
4. Son olarak, kuaternize kondroitin sülfat membranları nötralizasyon için kontrollü bir şekilde su ile yıkanmıştır.

Daha sonra ise hazırladığımız bu MKS katkılı membranın MYH'de uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonunda fiziksel ve kimyasal özellikleri en optimum olan membran içeriği MYH aktivasyonu-işletimi için denenmiştir. Çalışmamızda KS miktarı 1 gr olarak kullanıldığında kuruma süresi daha kısa olmuştur. 2 gr KS kullanılarak hazırlanan membranlar da ise kuruma olmayıp jelleşme gözlenmiştir. Bu nedenle 1 gr KS kullanılarak hazırlanan membran ile çalışmaya devam edilmiştir. Diğer membranlar fiziksel ve kimyasal özelliklerinin istenen düzeyde olmaması nedeni ile elenmiştir.

3.10. MYH Sisteminin Aktivasyonu

Bu çalışmada; rekombinant *Enterobacter aerogenes* CCM2531 suşu kullanarak belli bir düzeyde elektrik üretimi hedeflenmiştir *Enterobacter aerogenes* CCM2531 suşu hidrojen üreticisi ve enerji üretiminde etkin bir suştur.

3.11. MYH Sisteminin İşletimi

Anot Bölümü;

- Potasyum fosfat tamponu (yaklaşık 50 mL)
- Metilen mavisi (yaklaşık 50 mL)
- Bakteri (sıvı besiyeri ortamından yaklaşık 150 mL)

Çizelge 3.5. 0.2 M Fosfat Tamponun Hazırlanışı

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 3.561 g/100mL |
| NaH ₂ PO ₄ | 3.121g/100mL |

Çizelge 3.6. Metilen Mavisinin Hazırlanışı

| | |
|----------------|----------------|
| Metilen Mavisi | 0.375 g/100 mL |
|----------------|----------------|

Katot Bölümü;

Toplam hacim yaklaşık 125 mL olacak şekilde ilave edilen Potasyum ferrisiyanid çözeltisi katot bölümünü oluşturmaktadır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.7. 0.02 M Potasyum Ferrisiyanid Çözeltisinin Hazırlanışı

| | |
|---------------------------------|----------------|
| Potasyum Ferrisiyanid Çözeltisi | 0.65 g/ 100 mL |
|---------------------------------|----------------|

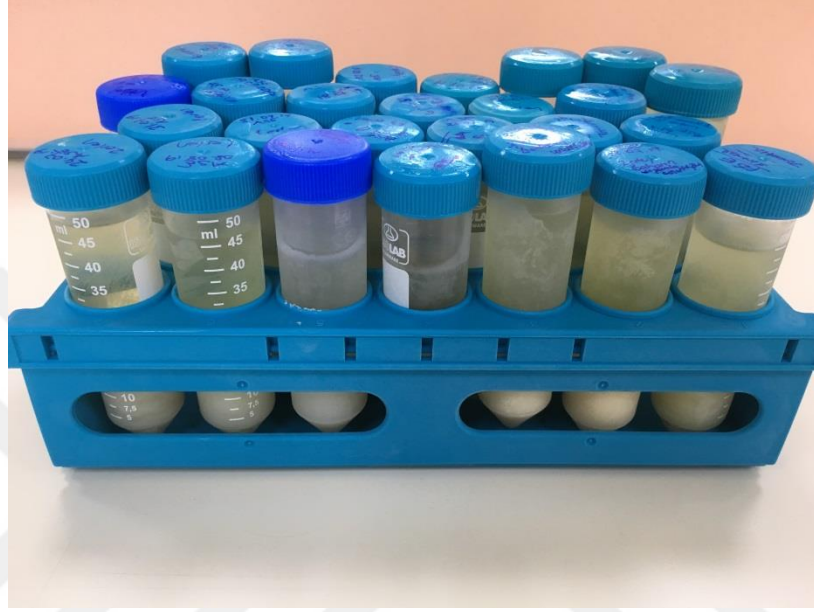


Şekil 3.2. MYH Sistemi

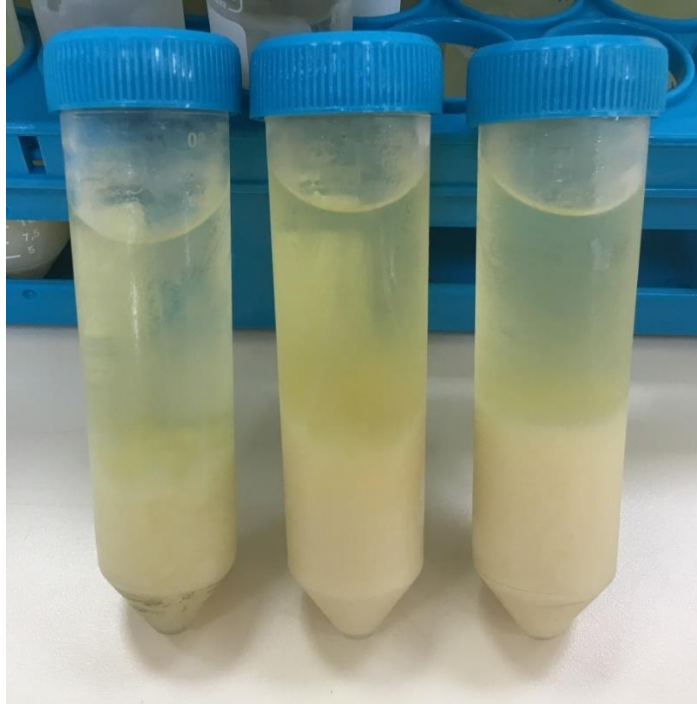
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Mikrobiyal Kondroitin Üretim Protokolü

Gece kültürü yapılan *E.coli* [pETM6-PACF+pUC8:15] suşunun biyokütlesinde uygulanan, santrifüj ve otoklav işlemi sonrasında eklenen alkol ile çökelti oluşması sağlanmıştır (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Dondurulmuş Kondroitin örnekleri



Şekil 4.2. Çökeltiletilen Kondroitin numuneleri

Alkol eklemesi yapıldıktan sonra dondurucuya kaldırılan numuneler, yaklaşık olarak 15 mL halinde kaplara transfer edilmiş ve bu işlemten sonra üzerleri alüminyum folyo ile sarılmıştır. Folyoların üzerleri kürdan yardımıyla delinerek liyafilizatör için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan numuneler Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



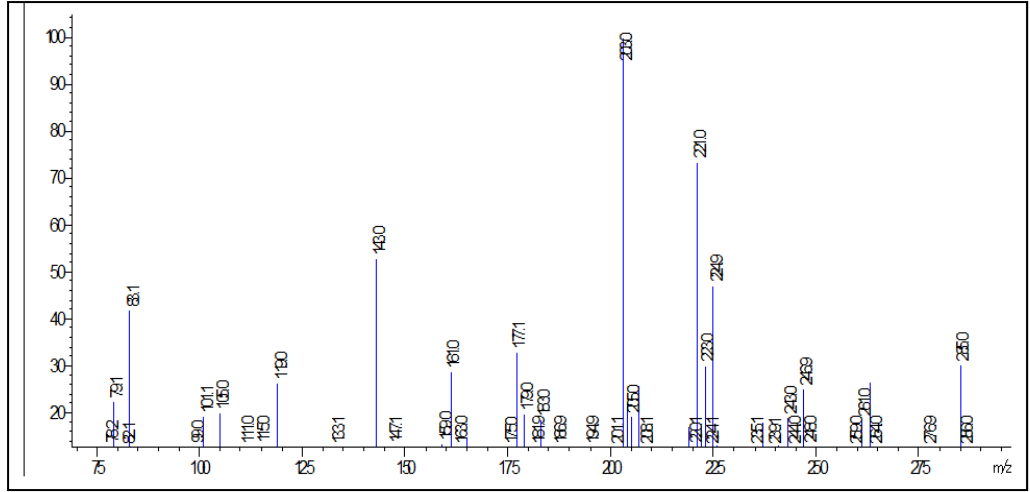
Şekil 4.3. Liyafilizatör numuneleri

Liyafilizatör işleminden sonra toz haline gelen örneklerimiz HPLC ve NMR analizine gönderilmek üzere hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.4)

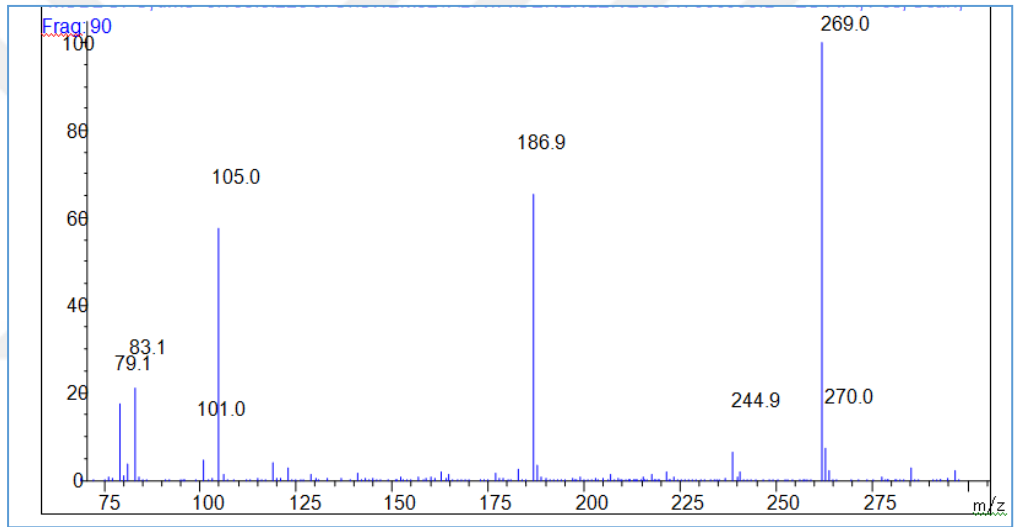


Şekil 4.4. *E.coli* pETM6-PACF ve pUC8:15 kaynaklı Mikrobiyal Kondroitin

HPLC-MS ve NMR analizleri; İBTAM (İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) bünyesinde yapılmıştır. Analiz sonrasında elde edilen sonuçlar HPLC spektrum ve kromatogram sonuçları sırası ile verilmiştir.



Şekil 4.5. Mikrobiyal kondroitin HPLC-MS Analizi.



Şekil 4.6. MKS HPLC-MS Analizi

Elde ettiğimiz mikrobiyal kondroitine, 6-konumda sülfatlama işlemi yapılmıştır. Kondroitin 6-sülfatın HPLC analizi için Kondroitinaz abc enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Böylece disakkarit birimlerinin serbest kalarak sülfatlanmış birimlerin analiz edilmesi amaçlanmıştır. HPLC analiz sonucumuza göre; 269 dalton molekül ağırlığında pik gözlenmesi mevcut literatürdeki çalışmalara göre daha düşük molekül ağırlıklı mikrobiyal kondroitin sülfat ürettiğimizi göstermektedir.

4.3. Mikrobiyal KS Üretimi

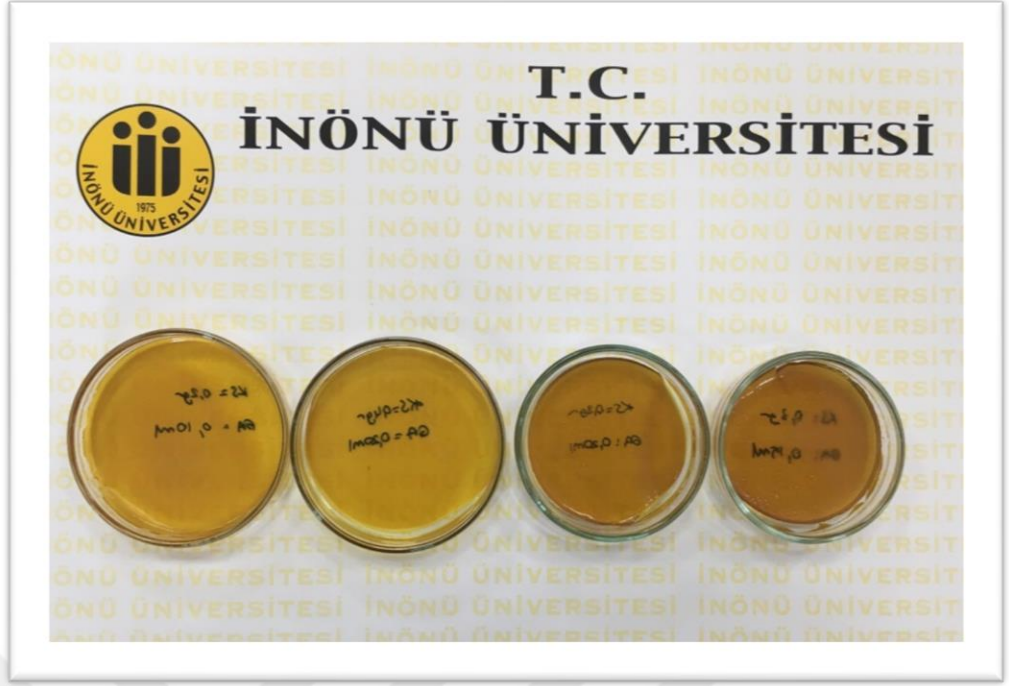
Elde edilen mikrobiyal kondroitine, referans alınan sülfatlama protokolü uygulanmış ve kondroitin-6-sülfat (Şekil 4.5) üretilmiştir [41]. HPLC-MS analizleri ile KS nin yapısal karakterizasyonu ortaya konulmuştur.



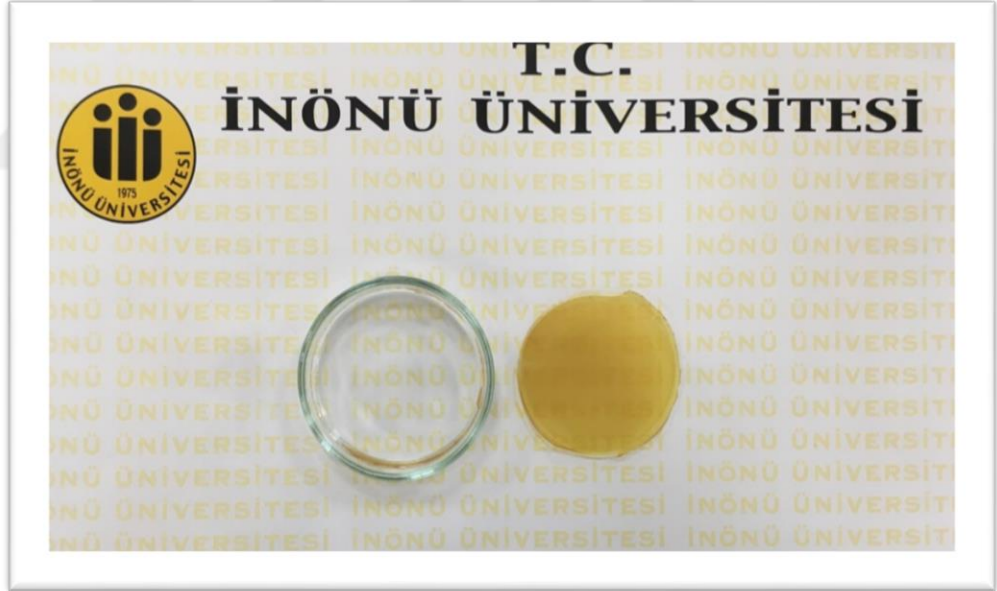
Şekil 4.7. *E.coli* pETM6-PACF ve pUC8:15 kaynaklı KS

4.4. KS Katkılı Proton Değişim Membran Analizleri

Laboratuvarda üretimi yapılan membranın kullanıma hazır hale gelebilmesi için birçok protokol uygulanmış ve aktive edilen KS katkılı proton değişim membranı MYH sisteminde test edilmiştir. Membran için tasarlanan içeriğe, farklı konsantrasyonlarda KS katılarak yüksek voltaj verimi ve uzun aktivite zamanı hedeflenmiştir. Geliştirilen membranın karşılaştırması nafion membran kullanılarak yapılmıştır. Asetik asit çözeltisinde çözdürülen KS çeşitli konsantrasyonlarda uygulanarak çapraz bağ oluşumu sağlanmış ve daha sonra Quat-188 (zeta potansiyelini belirlemek için kullanılan çözelti) ile kuaternize edilmiştir.



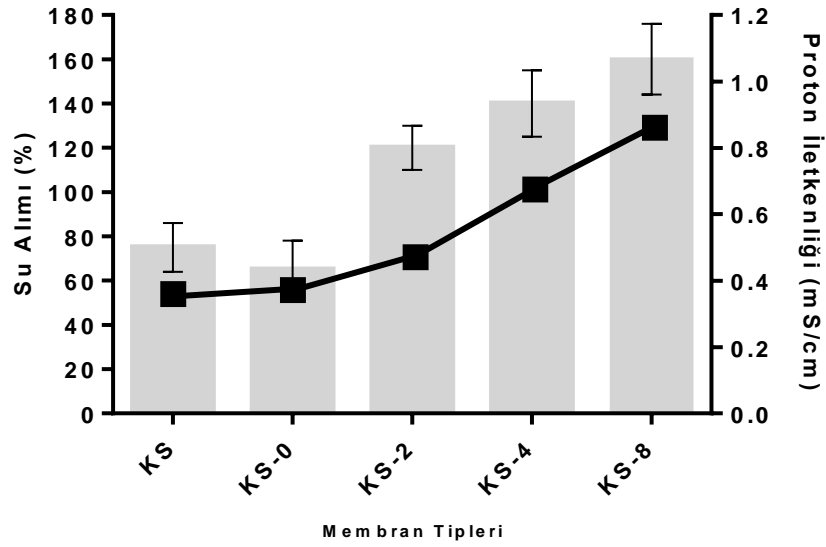
Şekil 4.8. Farklı SSA mol oranlarının kullanıldığı membranlar



Şekil 4.9. KS katkılı proton değiştirici membran

4.5. KS Katkılı Proton Değişim Membranının Proton İletkenliği Ve Su Alım Miktarının Analizi

Membranların proton iletkenliği MYH’de önemli rol oynamaktadır [105]. Membranlar, sistemin performansını belirlediği gibi akım ve güç yoğunluğu üzerinde de etkisi bulunmaktadır.



Şekil 4.10. KS katkılı proton değişim membranının su alımı ve proton iletkenliğinin membran tiplerine göre oranları

Protonların hareketliliği ortamdaki suya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda KS-8 membran tipinde %160'a yakın su alımı tespit edilmiştir. Kısa süreli MYH işletim sisteminde bu su alım miktarının, yapılan diğer çalışmalara kıyasla nispeten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [108]. MYH işletim sistemlerinde proton iletkenliğini artırıcı bir diğer özellik ise Quat-188 çözeltilisinin kuaterner amonyum gruplarının proton taşıyıcı özelliğini artırmasıdır.

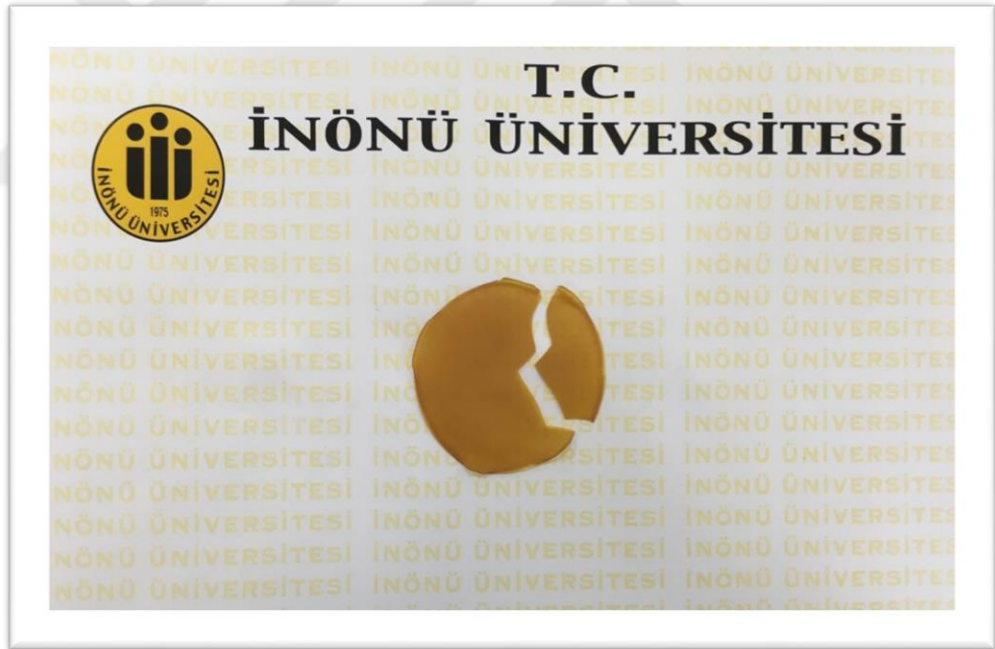
Yapılan çalışmalarda Quat-188 çözeltilisinde, kuaterner amonyum gruplarına proton taşıyıcı olma özelliği kazandırıldığı bildirilmiştir. Kuaternizasyon süresinin uzun olmasının proton iletkenliğinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir [108]. Çalışmamızda 8 saat boyunca kuaternize edilen membranın yüksek proton iletkenliği (0,7919 mS/cm) gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8). Proton iletkenliği ile ilgili yapılan bir çalışmada kitin içeren membran kullanımının proton iletkenliğini arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada proton iletkenliği 0,9919 mS/cm olarak tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada kısa sürede, proton iletkenliği açısından bu değere yaklaşılması membran verimi açısından ümit verici bulunmuştur [105].

KS katkılı proton değişim membranının proton iletim hızını arttırmak, kuaternizasyon süresini uzun tutmaktan geçmektedir. Nafion membran ile yapılan bir çalışmayla karşılaştırıldığında proton iletim hızının tasarladığımız membranda, daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [88].

4.6. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kuaternizasyon Analizi

Yüksek su alımı membranın mekanik özelliğini önemli ölçüde etkilemektedir [89]. Çalışmamızda 8 saatlik kuaternizasyon sonrasında 0.2-0.4 M SSA içeren membranlarda kırılmalar olurken 0.6-0.8 M SSA içeren membranda ise şekil bozuklukları meydana gelmiştir. Ek olarak da su alım hızı membranın mekanik özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle kuaternize edilen membranın bekletilme süresinin iyi ayarlanması gerekmektedir. Çalışmamızda bu süre kısa tutulmuş ve kuaternize edilen membranın MYH sisteminde kullanımında elde edilen akımın nispeten düşük olduğu tespit edilmiştir [108].

Üretilen KS katkılı proton değişim membranının MYH sistemindeki performansı test edildiğinde özellikle 10. saatten sonra membranda şişmeler ve kabarcıkların olduğu gözlenmiştir. Bu da proton iletkenliğinin ve buna bağlı olarak güç veriminin nispeten daha düşük olmasına neden olmuştur. Şekil 4.9'da membrandaki kırılma gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Quat-188 çözeltisinde oluşan reaksiyon

Ortalama gerilme mukavemeti 4. saatten sonrasında gözlenmiştir. 4 saatlik süre sonunda 2.42 MPa güç üretimi tespit edilmiştir. Kitin içeren membran kullanılarak yapılan bir çalışmada ortalama gerilme mukavemeti 6. saatlik sürenin sonunda 2,62 MPa olarak tespit edilmiştir. [108]. 8 saat sonra kullanılan asitlerin konsantrasyonlarının azalması; membranın zayıflamasına ve kırılma olmasına neden olmaktadır. Bu durumda MYH'nin performansını önemli ölçüde düşürmektedir [96].

4.7. Mikroorganizmaların Büyüme ve Çoğalma Karakteristiklerinin Membran Aktivitesi Üzerine Etkileri

MYH'de biyo-kirlenme, sistemin gelişiminde karşılaşılan sorunlardan biridir. Genel olarak bu kirlenme, bakteri kültürünü içeren anot bölmesinde olmaktadır [3]. Dinamik, iletken ve nüfuz edilebilir bir biyofilm geliştirilmesi elektrot mikrobiyolojisi manipülasyonu için ana etken olmaktadır. Genetik manipülasyon ve sentetik biyoloji kullanılarak elektrojenitenin iyileştirilmesi daha yüksek bir güç üretiminin oluşmasını sağlamaktadır. Bu nedenle MYH sistemleri için uygun mikroorganizma seçimi oldukça önemli olmaktadır [55].

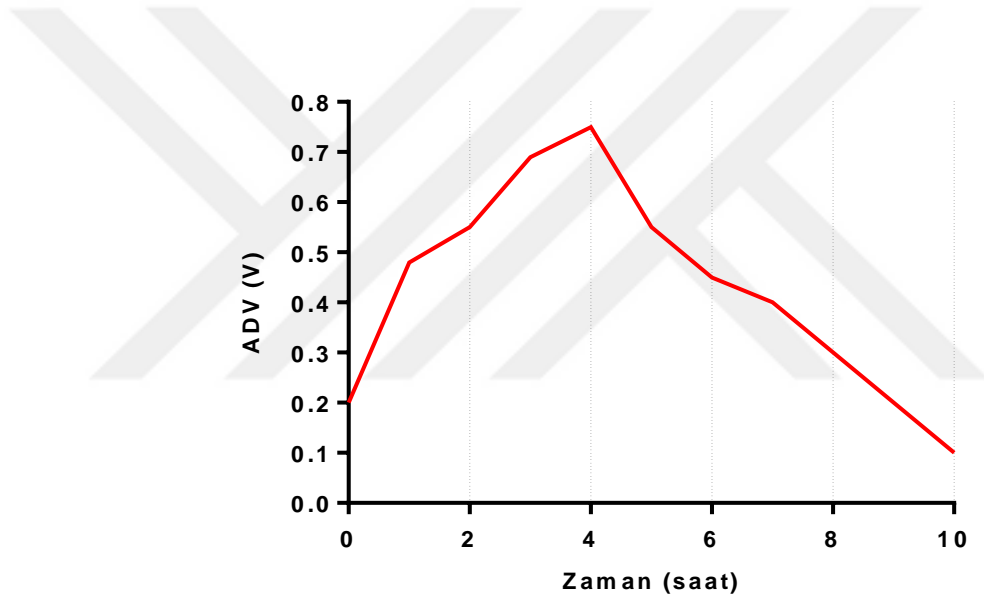
MYH'nin işletim süresinin ilk 3 saatinde mikroorganizma aktivitesinde bir artış gözlenmemektedir. Bu süre içerisinde mikroorganizmalar protonların üretimi için gerekli enzim veya yapıların üretimi sağlamaktadır. [54, 55]. Membran yüzeyinde belirli bir süre sonra mikroorganizmalar birikmekte ve oluşan organik substrattan dolayı biyo-film oluşmaktadır. Biyo-film oluşumu ise membran performansını, kullanma süresini ve dayanıklılığını azaltmaktadır. Bu durumu önlemek için çeşitli yöntemler uygulanabilmektedir. MYH sisteminde ilk 4 saat ortalama bir süre kabul edilerek mikroorganizma birikimi azaltılıp biyo-film oluşması engellenebilmektedir. Ayrıca membran yüzeyine mikroorganizmaların yapışmasını önlemek için çeşitli kimyasallar da kullanılabilir [87].

Bazı çalışmalarda; membran yüzeyine yapışmış bakterileri yok etmek için modifiye edilmiş zarlar bulunmaktadır. Bunun içinde antimikrobiyal aktivite avantajlı olabilmektedir. KS aynı zamanda pH 6,5 üzerinde bazik ortamda ve zayıf çözünürlükte antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. KS molekülleri pozitif yük ile etkileşime izin verirken, mikrobiyal hücre zarları hücre içi negatif yüklerin sızmasını engellemektedir. Genel olarak KS katkılı proton değiştirici membranların yüzeyinde 72 saat sonunda mikroorganizmalar morfolojik değişimlere uğradıklarından membranın iyon geçiş hızını düşürmektedirler [87, 88].

Oluşan membranın sert olması, mikroorganizmaların membranın üzerine yapışmasına neden olmaktadır. Ayrıca bakteriler pozitif yüklü yüzeylere daha hızlı yapışmaktadırlar [88]. *Enterobacter aerogenes* CCM2531 suşu MYH uygulamalarında avantajlı ve verimli bir suş olarak bilinmektedir. Çalışmamızda da suşun süreci destekleyici etkileri gözlemlenmiştir.

4.8. KS Katkılı Proton Değişim Membranının MYH Sistemindeki Performansı

Bütün çözeltiler eklendikten sonra hücrelerin çoğalması ile (üssel büyüme veya log fazı) oluşan elektron yoğunluğu büyük bir artış göstermiş ve buna bağlı olarak ADV'de (açık devre voltajı) kayıt altına alınmıştır. MYH sistemimiz için 750 mV civarında ADV kayıt edilmiştir (Şekil 4.12). Ölçülen ADV potansiyel kayıplar nedeniyle Nafion membrana göre nispeten düşük bir değer taşımaktadır [89]. MYH de kullanılan Nafion membran ve diğer membranların, protonlar kadar diğer katyonları da transfer etmesi nedeni ile voltaj veriminin etkilendiği bilinmektedir [112]. Tasarımımızda yer alan membran bileşenlerinin katyon geçirgenliğinin tespiti için ek analizlere ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.12. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde açık devre voltaj grafiği.

MYH'de güç çıkışı birçok parametreye bağlı olabilmektedir. Elektrot malzemesi, substrat, sıcaklık, pH gibi etkenler, MYH'de iç direnci ve performansı etkileyen faktörler olarak sıralanmaktadır [55].

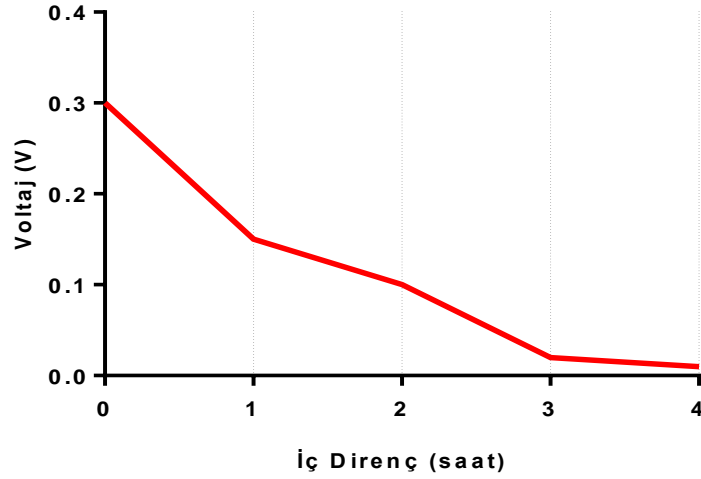
4.9. Elektrokimyasal Analizler

MYH'deki voltaj ölçümleri dijital multimetre (Picotest M3500A 61/2) ile ölçülmüştür. Multimetre cihazı dakikada bir ölçüm alacak şekilde ayarlanarak verilerin bilgisayar üzerinden sürekli kayıt edilmesi sağlanmıştır. Literatür taraması yapıldığında multimetre cihazına ek olarak kullanılan dış direncin voltajı düşürdüğü görülmektedir. Yaygın olarak MYH performansı, güç üretimi ve coulomb verimi ile

değerlendirilmektedir. Güç üretimi, sabit bir dış direnç ($R_{dış}$) üzerindeki gerilim (V) ölçülerek hesaplanabilir. Voltaj üretiminin kontrolü için kullanılan dış direnç MYH'de multimetre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Oluşan akım ise (I) Ohm kanunu ile ($I/R_{dış}$) hesaplanmıştır. Güç üretimi ise (P), elde edilen voltaj ve dış dirence bağlı olarak ölçülen akımdan $P = V^2/R_{dış}$ olarak hesaplanmıştır. Ölçülen güç değeri ve akım değerleri membran alanına aktarılmıştır. Daha sonra $R_{Mem} = V^2/R_{dış} A_{Mem}$ kullanılarak güç yoğunluğu hesaplanmıştır. Sistemin verimi ve güç değerinin kontrolü için belirli zamanlarda anot ve katot bölmelerinin pH değeri kontrol edilmiştir [40].

4.10. KS Katkılı Proton Değişim Membranın Kullanıldığı MYH Sisteminde İç Direnç ve Güç Üretiminin Ölçümü

MYH sistemlerinin tasarımları ve kullanılan membran yapısına bağlı olarak iç direnç farklılık göstermektedir. MYH sistemlerinin tasarımında anot ve katotlar arasındaki mesafenin fazla oluşu protonların iletimini güçleştirdiği için iç direncin artmasına neden olmaktadır. Araştırmamızda, oluşan voltaj multimetre cihazı aracılığıyla ölçülmüştür. İç direnç ölçümünde elde edilen değer $0,310 \Omega$ olarak kayıt edilmiştir. MYH sistemlerinde kullanılan CMI 7000 membranda ise iç direnç $0,558 \Omega$ olarak tespit edilmiştir. Membranlar arasındaki iç direnç farklılığının, membranların yapısından ve membranların sistemde yarattığı etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir [90]. İç direncin artmasına bağlı olarak voltajdaki değişim grafiği Şekil 4.11'te gösterilmiştir. Kayıt edilen bu voltaj değerleri Ohm Kanunu'na göre hesaplanıp polarizasyon eğrisinin eğimi kullanılarak iç direnç hesaplanmıştır [57]. Yapılan diğer ölçümlerde ise zamana bağlı olarak voltajdaki değişim Şekil 4.12'te gösterilmiştir.

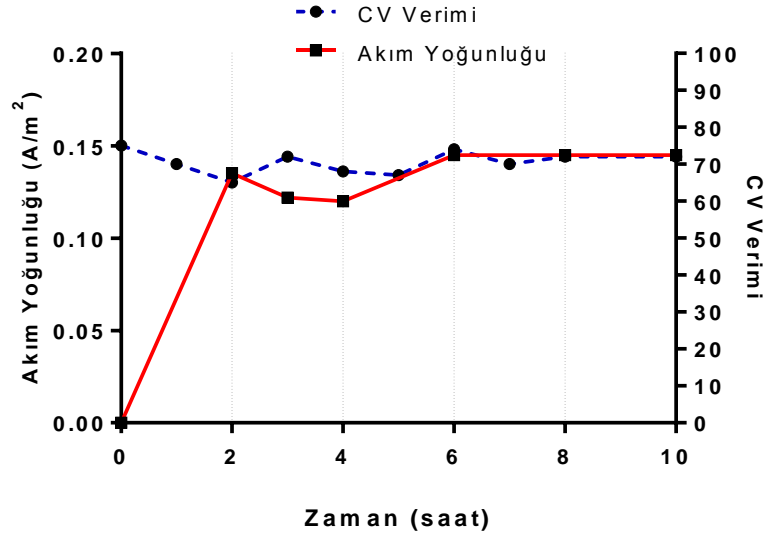


Şekil 4.13. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde akım yoğunluğunun voltaja bağlı değişimi

4.11. KS Katkılı Proton Değişim Membranının Kullanıldığı MYH Sisteminde Oluşan Coulomb Verimi

MYH sisteminin performansı coulomb verimi ve güç üretimine bağlı olarak değerlendirilebilmektedir. Coulomb verimi, substrattan anot bölgesine aktarılan toplam elektronların, akım üretilirken kullanılan substratın yok edilmesiyle birlikte ortaya çıkan maksimum coulomb oranı olarak tanımlanır. Coulomb verimi sürekli akışın sağlandığı MYH sistemleri için üretilen akıma bağlı olarak hesaplanmaktadır [57].

Yaptığımız çalışmada 2. saatten sonra akım yoğunluğu ve coulomb verimi değişiminin birbirine paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum şekil 4.13'te grafiksel olarak gösterilmiştir.



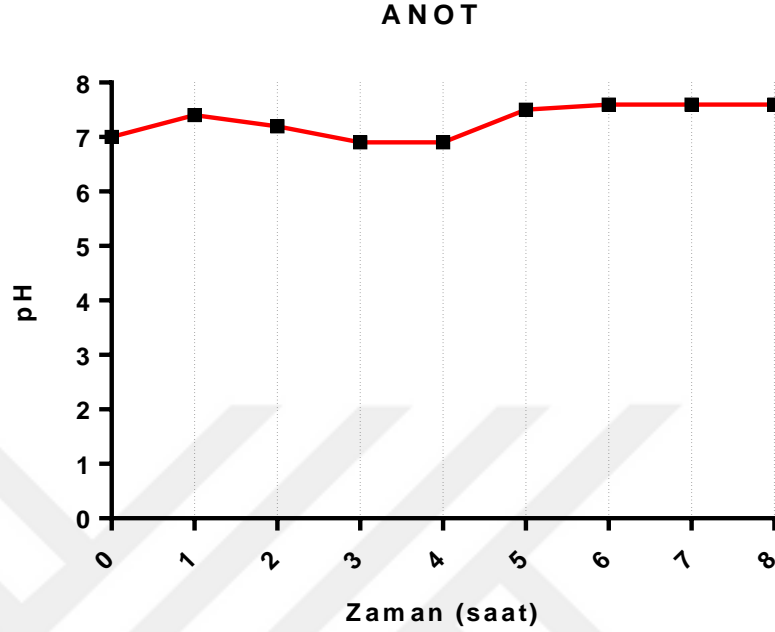
Şekil 4.14. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde akım yoğunluğunun coulomb verimine bağlı değişimi.

Çalışmamızda ölçülen maksimum CV verimi % 70 A/m² iken, CMI 7000 membran da ise CV verimi 80 A/m² olarak tespit edilmiştir. KS katkılı proton değişim membranının CV verimi diğer membranlara kıyasla nispeten daha düşük olduğu tespit edilmiştir. CV'lerin düşük oluşu tüm membranlarda elektronların büyük bir kısmının elektrik enerjisi olarak kazanılamadığını göstermiştir. Birçok faktör düşük coulomb verimine sebep olabilmektedir. Bunlardan her biri, sistem içindeki biyokütle birikimini, reaktördeki bakteriyel popülasyonu arttırabilecek ve aktif biyofilmdeki substrat konsantrasyonunu azaltabilecektir. Diğer bir neden ise, anot çözeltilisine katot bölmesinden gelen oksijen difüzyonu, çözelti içerisindeki bakteri ve serbest moleküler oksijen tarafından substratın direk oksidasyonuna neden olabilmektedir.

4.12. KS Katkılı Proton Değişim Membranının Kullanıldığı MYH Sisteminde pH Değişimi

Sistemin ilk oluşturulduğundaki anot pH 7-7,2 iken, 8 saat süre ile işletilen MYH anot bölmesinin pH'sının 7,9'a yükseldiği daha sonra stabil kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.14). CMI-7000 membran kullanılarak yapılan çalışmada ise başlangıçta nötr pH'ya sahip iken sentetik atık su kullanılan MYH anot bölmesinin pH'sı beslenmeye başladıktan 8 saat içerisinde 8'e yükseldiği ve daha sonra 7,6'ya düştüğü rapor edilmiştir [96]. Anot bölgesindeki pH'da meydana gelen bu değişikliklerin birçok nedeni olabilmektedir. Özellikle anotta üretilen protonların membran aracılığı ile hızlı bir şekilde katot bölgesine aktarılmaması, anotta anaerobik şartların bozulması ya da biyokütle birikiminin artması bu duruma neden

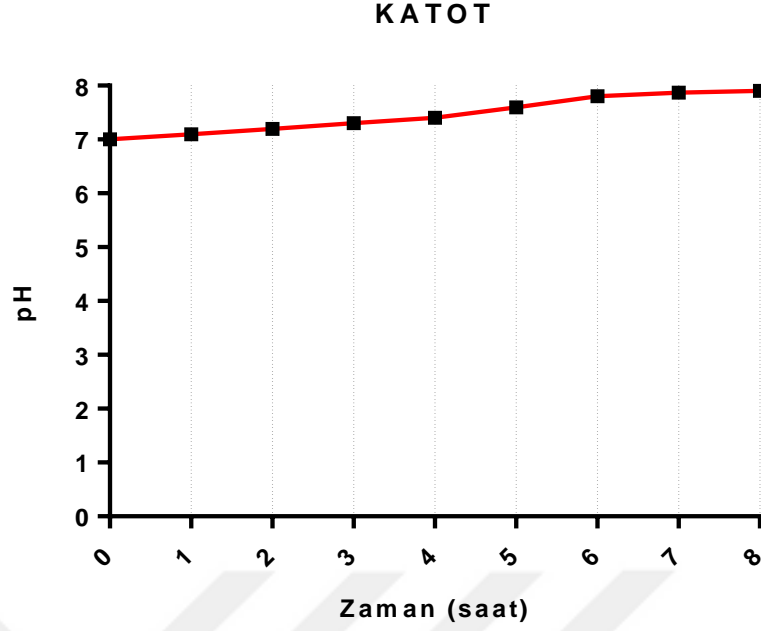
olarak gösterilebilir [96]. Sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğu, ileri optimizasyon çalışmaları sonrası pH değişiminin daha kontrollü olabileceği öngörülmektedir.



Şekil 4.15. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde anot pH değişimi

Yaptığımız çalışmada KS katkılı proton değişim membranının katot çözeltisindeki pH'ya bakıldığında düzenli bir artış görülmektedir. Bu artış en yüksek 7.46 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.15). Katot çözeltisindeki pH artışı proton konsantrasyonunun azalmasından kaynaklanmaktadır. CMI-7000 membran kullanılarak yapılan çalışmada ise katot pH'sının düzenli olarak 7,6'ya kadar yükseldiği rapor edilmiştir [96]. Katottaki pH'nın düzenli artışı MYH sisteminin performansını olumlu yönde etkilemiştir. Sonuçlarımızın literatür ile paralel olması membranımızı geliştirmemiz için önemli bir motivasyon oluşturmaktadır.

pH'nın katot bölgesindeki düzensiz olarak artışı güç üretimini de olumsuz yönde etkilemektedir. Katot bölgesindeki pH farklılıkları kıyaslandığında pH değişiminde membranlar arasında çok büyük farklılıklar oluşmamaktadır. Katotta en fazla pH yükselişi Nafion membranda gerçekleşmiştir. KS katkılı membranların bu konuda nafion membranlara göre daha avantajlı olabileceği tespit edilmiştir [112].



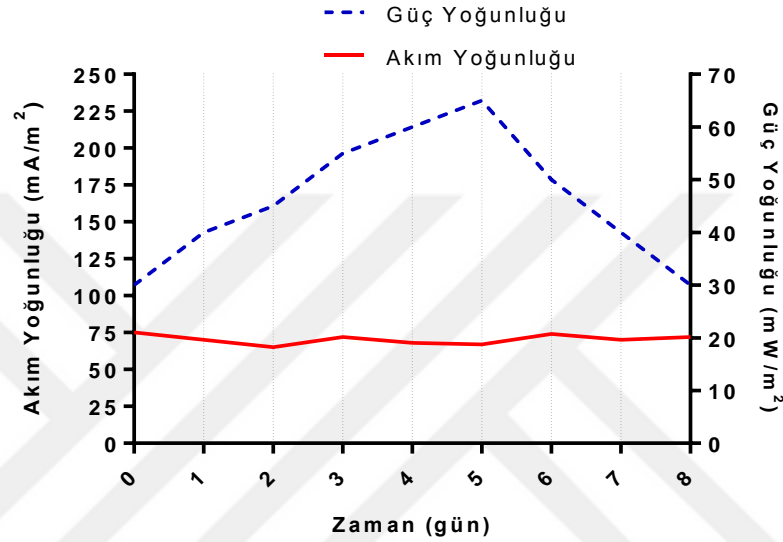
Şekil 4.16. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde katot pH değişimi

4.13. KS Katkılı Proton Değişim Membranının Kullanıldığı MYH Sisteminde Güç Yoğunluğu

Nafion membran ve tasarladığımız KS katkılı proton değişim membranının MYH’de voltaj düşüşlerine bağlı olarak çizilen polarizasyon eğrileri ile buna bağlı oluşturulan iç direnç grafiklerinin neredeyse lineer bir yapıda olduğu görülmüştür. Ancak düşük akım kayıpları yaşandığından çizilen eğrilerin aktivasyon bölgelerinde farklılıklar oluşmuştur. Bu da bize ohm kuvvetinin baskın olduğunu göstermiştir. Ohm’luk direncin yüksekliği voltajın düşüş hızı ile orantılı olarak hesaplanabilmektedir. Voltaja bağlı olarak hesaplanan iç direncin oluşması genel olarak sistemin tasarımsal özelliklerine, anot ve katot arasındaki mesafeye, kullanılan çözeltinin özelliklerine ve son olarak kullanılan membranların sistemde yarattığı etkilere bağlı olabilmektedir [105].

Bizim çalışmamızda kullandığımız iki bölmeli MYH sistemlerinde oluşan iç direnç daha büyüktür. Bunun da anot ve katot bölmeleri arasındaki mesafeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bölmeler arasındaki mesafelerin çok olması, protonların elektronlar aracılığıyla aktarılmasını güçleştirdiğinden büyük bir direncin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle MYH’de oluşan iç direnç farklılıkları hem kullanılan MYH tasarımlarına hem de membranın yapısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bütün bu özelliklere bağlı olarak KS katkılı proton değişim

membranlarının yüksek iç direnç gösterdiği ve bu da maksimum güç ve akım yoğunluklarının MYH sistemlerinde yaygın kullanılan nafion membranlara kıyasla nispeten düşük olduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmada KS katkılı proton değişim membranı kullanılarak oluşturulan MYH sistemlerinde güç yoğunluğu 30 mW/m^2 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16). Bu sonuç membranımızın iç direnç parametresi için avantajlı hale getirilmesi konusunda ileri bir değerlendirme ve tasarıma ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. KS katkılı proton değişim membranının kullanıldığı MYH sisteminde güç yoğunluğunun zamana bağlı değişimi

CMI-7000 membran kullanılarak Kim ve arkadaşları tarafında yapılan bir çalışmada şişe tipi MYH sisteminde üretilen maksimum güç yoğunluğunun 33 mW/m^2 olduğu bildirilmiştir. MYH sistemlerinde kullanılan CMI-7000 membran ile yapılan çalışmalarda KS katkılı proton değişim membranının benzer sonuçlar gösterdiği görülmektedir [105]. Bu sonuçlar, tasarladığımız KS katkılı proton değişim membranının kullanılabilirlik potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Belirlenen parametrelerde, sonraki çalışmalarda ileri optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

MYH teknolojisi, alternatif-yenilenebilir enerji üretimi için gelişmekte olan bir alandır ve çevresel biyolojik ıslah için ek fırsatlar sunmaktadır. Son bilimsel araştırmalarda, sistemde kullanılacak rekombinant organizmaların geliştirilmesine olduğu kadar, MYH reaktör tasarımına ve aynı zamanda enerji üretimini arttırmak için reaktör operasyonlarına odaklanıldığı görülmektedir. Alternatif MYH modellerinde kaydedilen ilerlemeler ve son yıllardaki performansları, bu teknolojiye daha geniş pratik uygulamalarda kullanım olanağını sağlamak hedefindedir. MYH lerde maliyetli bir kompartman olarak görülen membranların geliştirilmesi ve çeşitlendirilmesi önemlidir.

Çalışmamızda MYH teknolojisinin bu alanına odaklanılmıştır. Biyomalzeme ve biyomedikal alanda yaygın kullanımı olan KS'nin Mikrobiyal kaynaklardan üretimi molekülün fizikokimyasal ve biyolojik karakteristiklerini ve fonksiyonelliğini arttırmaktadır. Çalışmamızda üretimi ekibimiz tarafından gerçekleştirilen Mikrobiyal KS'nin MYH sisteminde proton değiştirici membran olarak kullanımı denenmiştir. Literatürde bizim kullandığımız yapı ve formülasyon daha önce kullanılmamıştır. İlk kez kullanılan formülasyondan elde edilen sonuçlar ümit verici bulunmuştur. İleri optimizasyon çalışmalarının mutlak gerekliliği ortaya çıksa da, elde edilen Voltaj verimi, tezimizin hipotezini doğrulamış, KS katkılı proton değişim membranının MYH sistemlerinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu kanıtlamıştır. Küresel enerji politikaları göz önüne alındığında, sürdürülebilir enerji grubunun kompakt tasarımları ile yaygın kullanım potansiyeline sahip alternatif olan MYH lerin avantajları ortadadır. Bu yapının tüm bileşenlerine yönelik yenilikçi tasarımlar oldukça önemlidir. Mevcut membran alternatiflerinin avantajları ve eksik yönleri tezimizin önceki kısımlarında detaylı olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler ışığında, alternatif olarak önerdiğimiz KS katkılı proton değişim membranının maliyeti düşük, MYH performansı da verimli bulunmuştur.

MYH' nin geliştirilmesinde, genel kullanım için ekonomik açıdan uygun hale getirilmesi için daha fazla ele alınması gereken birçok sınırlama ve zorluk bulunmaktadır. Bunlar arasında alternatif membran geliştirilmesi, yenilikçi yakıt hücresi tasarımı ve verimliliğinde devam eden iyileştirmelerin yanı sıra yerel ihtiyaçlara göre uyarlanmış ekonomik uygulamalarla ölçeklendirme de

bulunmaktadır. Ölçeklendirme, tasarım, modelleme, karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları MYH sistemlerinde temel çalışma başlıklarıdır. Ancak tabii ki, enerji odaklı bir çalışmada, elde edilen voltaj veriminin artırılması ve olabildiğince uzun zaman sistemin aktif kalabilmesi oldukça önemlidir. Çalışmanın sonraki aşamalarında daha dayanıklı ve uzun ömürlü, proton geçişi daha verimli, voltaj değerleri daha yüksek bir membran elde etmek odak noktamız olacaktır. MYH sisteminde, farklı hücre tasarımı ve beraberinde daha etkili membran alternatifleri için elde ettiğimiz sonuçlar yol gösterici olacaktır.



6. KAYNAKLAR

- [1] Lovley, D.R., Bug juice: *harvesting electricity with microorganisms*, **Nat. Rev. Microbiol.** 4 (7), 497–508, 2006.
- [2] Khan, A.M., *Electricity generation by Microbial fuel cells*, **Adv. Nat. Sci.** 3 (2), 279–286, 2009.
- [3] Logan, B.E., *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2008.
- [4] Sopian, K., Wan Daud, W.R., *Challenges and future developments in proton exchange membrane fuel cells*, **Renew.**, 31, 719–727, 2006.
- [5] Watanabe, K., *Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy*, **J. Biosci. Bioeng** 106 (6), 528–536, 2008.
- [6] Liu, H., Grot, S., Logan, B.E., *Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate*. **Environ. Sci. Technol.** 39 (11), 4317–4320, 2005.
- [7] Liu, H., Cheng, S., Logan, B.E., *Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration*, **Environ. Sci. Technol.** 39 (14), 5488–5493, 2005.
- [8] Cheng, S., Liu, H., Logan, B.E., *Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing*, **Environ. Sci. Technol.**, 40 (7), 2426–2432, 2006.
- [9] Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.S., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., *Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): the role of homo-acetogenic bacteria*, **Bioresour. Technol** 102 (1), 263–271, 2011.
- [10] Zhan, G., Zhang, L., Li, D., Su, W., Tao, Y., Qian, J., *Autotrophic nitrogen removal from ammonium at low applied voltage in a single-compartment microbial electrolysis cell*, **Bioresour. Technol** 116, 271–277, 2012.
- [11] Logan, B.E., Douglas, C., Shaoan, C., Hamelers, H.V.M., Sleutels, T.H.J.A., Jeremiasse, A.W., Rozendal, R.A., *Critical Review Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter*, **Energ Environ Sci** 42 (23), 8630-8640, 2008.
- [12] Ribot-Llobet, E., Nam, J.Y., Tokash, J.C., Guisasola, A., Logan, B.E., *Assessment of four different cathode materials at different initial pHs using unbuffered 157 catholytes in microbial electrolysis cells*, **Int. J. Hydrog. Energy** 38 (7), 2951–2956, 2013.
- [13] Du Z, Li H, Gu T., *A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy*. **Biotechnol Adv** 25: 464-482, 2007.

- [14] Rahimnejad M, Ghoreyshi AA, Najafpour G, Jafary T. Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial fuel cell operations. **Appl Energy** 2011;88:3999–4004.
- [15] Min B., Román O.B., Angelidaki I. *Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance*, **Biotechnol. Lett.** 30 2008; 1213–1218.
- [16] Kılıç Arzu, Uysal Yağmur, Çınar Özer. *Electricity Generation From Synthetic Wastewater in a Laboratory Scale Microbial Fuel Cell*. **Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi** Cilt 17, Sayı 1, 2011; Sayfa 43-49.
- [17] Sun M, Zhai L-F, Li W-W, Yu H-Q. *Harvest and utilization of chemical energy in wastes by microbial fuel cells*. **Chem Soc Rev** 2016;45:2847–70.
- [18] Q. Zhang, R. Yao, X. Chen, L. Liu, S. Xu, J. Chen, J. Wu, *Enhancing fructosylated chondroitin production in Escherichia coli K4 by balancing the UDP-precursors*, **Metab Eng**, 47 (2018) 314- 322.
- [19] Rinaldi, A., Mecheri, B., Garavaglia, V., Licocchia, S., Di Nardo, P., Traversa, E., *Engineering materials and biology to boost performance of microbial fuel cells: a critical review*, **Energ Environ Sci**, 1 (4), 417-429, 2008
- [20] Mohan Y., Kumar S. Manoj Muthu, Das D. *Electricity generation using microbial fuel cells*. **Int J Hydrogen Energy** 33, 2008; 423 – 426.
- [21] Liu, H.; Logan, B. E. *Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane*. **Environ. Sci. Technol.** 2004, 38, 4040-4046.
- [22] Liu, L., Li, F.B., Feng, C.H., Li, X.Z., 2009. *Microbial fuel cell with an azo-dyefeeding cathode*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85, 175–183.
- [23] Ateş Seçer Açelya. *Eppg ve nano-metal yüklü eppg elektrotların mikrobiyal elektrolizdeki etkinliklerinin araştırılması*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- [24] Oh S, Min B, Logan BE. *Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells*. **Environ Sci Technol** 2004;38:4900–4.
- [25] Logan, B. E.; Murano, C.; Scott, K.; Gray, N. D.; Head, I. M. *Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell*. **Water Res.** 2005, 39, 942-952.
- [26] Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J.M., Logan, B.E., *Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells*. **Water Res.** 39, 4961–8, 2005.
- [27] Logan Bruce E . et al. *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*. VOL. 40, NO. 17, 2006 / **Environ Sci Technol.**

- [28] Zhang, Y., *Energy recovery from waste streams with microbial fuel cell (MFC)-based Technologies*, PhD Thesis, Department of Environmental Engineering of Technical University of Denmark, Denmark, 2012.
- [29] Cheng, S., Liu, H., Logan, B.E., *Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure*, **Electrochem. Commun.** 8 (3), 489–494, 2006.
- [30] Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W., *A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency*, **Biotechnol. Lett.** 25 (18), 1531–5, 2003.
- [31] He, Z., Wagner, N., Minteer, S.D., Angenent, L.T., *An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: assessment of the internal resistance by impedance spectroscopy*, **Environ Sci Technol** 40 (17), 5212–7, 2006.
- [32] Aelterman, P., Rabaey, K., The Pham, H., Boon, N., Verstraete, W., *Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells*, **Environ Sci Technol** 40, 3388–3394, 2006.
- [33] Oh, S., Logan, B.E., *Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70, 162–169, 2006.
- [34] Lovley, D., Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher III, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A., Pilobello, K., Fertig, S.J., *Harnessing Microbially Generated Power on the Seafloor*, **Nat. Biotechnol.** 20, 821–825, 2002.
- [35] Lowy, D.A., Tender, L.M., Zeikus, J.G., Park, D.H., Lovley, D.R., *Harvesting energy from the marine sediment-water interface II. Kinetic activity of anode materials*, **Biosens. Bioelectron** 21(11), 2058–63, 2006.
- [36] Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W., *A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency*, **Biotechnol. Lett.** 25 (18), 1531–5, 2003.
- [37] Min, B., Logan, B.E., *Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell*, **Environ Sci Technol** 38 (21), 5809–14, 2004.
- [38] Qian, F., He, Z., Thelen, M.P., Li, Y.A., *Microfluidic microbial fuel cell fabricated by soft lithography*, **Bioresour. Technol** 102 (10), 5836–40, 2011.
- [39] Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., *Electrode reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*, **Science** 2002, 295, 483–485, 2002.
- [40] Hong, S.W., Chang, I.S., Choi, Y.S., Chung, T.H., *Experimental evaluation of influential factors for electricity harvesting from sediment using microbial fuel cell*, **Bioresour. Technol** 100 (12), 3029–3035, 2009.

- [41] Malik, Darshan & Thakur, Jayita & Singh, Sunita & Singh, R K & Kapur, Anita & Kaur, Amarjeet & Nijhawan, Shashi & Kumar, Anil. *Nanocomposite Electrode Microbial Fuel Cell: A Promising Technology for Enhanced Power Generation from Yamuna Water*. **Int. J. Recent Sci. Res (IJSR)**. 3. 641-646, 2004
- [42] Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., *A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production*, **Bioresour. Technol** 101 (6), 1533–1543, 2010.
- [43] Heilmann, J., Logan, B.E., *Production of Electricity from Proteins Using a Microbial Fuel Cell*, **Water Environ Res** 78 (5), 531–537, 2006.
- [44] Feng, Y., Wang, X., Logan, B.E., Lee, H., *Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 78 (5), 873–800, 2008.
- [45] Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., *Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell*, **Environ Sci Technol** 38 (7), 2281–2285, 2004.
- [46] Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J.M., Logan, B.E., *Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells*. **Water Res.** 39, 4961–8, 2005.
- [47] Kim, J. R., Min, B., Logan, B.E., *Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 68 (1), 23–30, 2005.
- [48] Ter Heijne, A., Hamelers, H.V.M., De Wilde, V., Rozendal, R.A., Buisman, C.J.N., *A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells*, **Environ Sci Technol** 40 (17), 5200–5205, 2006.
- [49] Rhoads A., Beyenal H., Lewandowski Z., *Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant*, **Environ Sci Technol**, 39(12), 4666-4671, 2005.
- [50] You, S., Zhao, Q., Zhang, J., Jiang, J., Zhao, S., *A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor*, **J. Power Sources** 162 (2), 1409-1415, 2006.
- [51] Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., *Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation*, **Environ Sci Technol** 41(8), 2915–292, 2007.
- [52] Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schampelaire, L., Pham, T.H., Boeckx, P., Boon, N., Verstraete, W., *Biological denitrification in microbial fuel cells*, **Environ Sci Technol** 41 (9), 3354–60, 2007.
- [53] Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., *Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation*, **Environ Sci Technol** 41(8), 2915–292, 2007.

- [54] Delaney, G.M., Bennetto, H.P., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L., Thurston, C.F. *Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. Performance of fuel-cells containing selected microorganism–mediator–substrate combinations.* **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 34, 13–27, 2008.
- [55] Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W. *A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency.* **Biotechnol. Lett.** 25, 1531–1535, 2003.
- [56] Solanki Komal, Subramanian Sindhu, Basu Suddhasatwa. *Microbial fuel cells for azo dye treatment with electricity generation: A review.* **Bioresour. Technol** 131, 564–571, 2013.
- [57] Rezaei, F., Xing, D., Wagner, R., Regan, J.M., Richard, T.L., Logan, B.E. *Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell.* **Appl. Environ. Microbiol.** 75, 3673–3678, 2009.
- [58] Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R. *Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes.* **Langmuir** 24, 4376–4379, 2008.
- [59] Watson, V.J., Logan, B.E. *Power production in mfcs inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures.* **Biotechnol. Bioeng.** 105, 489–498, 2010.
- [60] Nimje, V.R., Chen, C.Y., Chen, C.C., Jean, J.S., Reddy, A.S., Fan, C.W., Pan, K.Y., Liu, H.T., Chen, J.L. *Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell.* **J. Power Sources** 190, 258–263, 2009.
- [61] Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E. *Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 88, 371–380, 2010.
- [62] Lanthier, M., Gregory, K.B., Lovley, D.R. *Growth with high planktonic biomass in *Shewanella oneidensis* fuel cells.* **FEMS Microbiol. Lett.** 278, 29–35, 2008.
- [63] Solanki Komal, Subramanian Sindhu, Basu Suddhasatwa. *Microbial fuel cells for azo dye treatment with electricity generation: A review.* **Bioresour. Technol** 131, 564–571, 2013.
- [64] Park, D.H., Laivenieks, M., Guettler, M.V., Jain, M.K., Zeikus, J.G. *Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production.* **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 2912–2917, 1999.
- [65] Pham, C.A., Jung, S.J., Phung, N.T., Lee, J., Chang, I.S., Kim, B.H. *A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically*

related to Aeromonas hydrophila, isolated from a microbial fuel cell. FEMS Microbiol. Lett. 223, 129–134, 2003.

- [66] Ieropoulos, I. A., Greenman, J., Melhuish, C. and Hart, J. *Comparative study of three types of microbial fuel cell. Enzyme Microb Technol* 37, 238-245, 2005.
- [67] Niessen, J., Schroder, U., Scholz, F., *Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation—a bacterial fuel cell operating on starch. Electrochem. Commun.* 6, 955–958, 2004.
- [68] Gezginçi Mehmet, Uysal Yağmur, Kılıç Arzu, Çınar Özer. *Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Ekstraselüler Elektron Transferleri. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4 (2): 81-85, 2011.
- [69] Fredrickson, J. K., Romine, M. F., Beliaev, A. S., Auchtung, J. M., Driscoll, M. E., Gardner, T. S., Nealon, K. H., Osterman, A. L., Pinchuk, G., Reed, J. L., Rodionov, D. A., Rodrigues, J. L. M., Saffarini, D. A., Serres, M. H., Spormann, A. M., Zhulin, I. B. And Tiedje, J. M. *Towards environmental systems biology of Shewanella. Nat Rev Micro*, 6, 592-603, 2008.
- [70] Lengeler, J.W., et al., Eds., Stuttgart: Georg Thieme, *Biology of the Prokaryotes, 1999 [Russ. Transl. Sovremennaya mikrobiologiya, Moscow: Mir, vol.*
- [71] Debabov V. G.. *Electricity from Microorganisms. Microbiology*, 2007, Vol. 77, No. 2, pp. 123–131.1], 2005.
- [72] Liang S., Thomas C. S., John M. Z., James K. F., *Respiration of metal (hydr)oxides by Shewanella and Geobacter: a key role for multiheme c-type cytochromes. Mol. Microbiol.* 65(1), 12-20, 2007.
- [73] Lovley Derek R. *The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. Curr Opin Biotechnol* Volume 19, Issue 6, December , Pages 564–571, 2008.
- [74] Nathan Wrana, Richard Sparling, Nazim Cicek, David B. Levin. *Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrohydrogenesis. J. Clean. Prod.* 18, S105-S111, 2010.
- [75] Turick C. E., Tisa L. S., Caccavo F., Jr., *Melanin Production and Use as a Soluble Electron Shuttle for Fe(III) Oxide Reduction and as a Terminal Electron Acceptor by Shewanella algae BrY. Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2436-2444, 2002.
- [76] K. P. Nevin, Lovley D. R., *Mechanisms for Accessing Insoluble Fe(III) Oxide during Dissimilatory Fe(III) Reduction by Geothrix fermentans. Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2294-2299, 2002.
- [77] Velasquez-Orta S., Head I., Curtis T., Scott K., Lloyd J., von Canstein H., *The effect of flavin electron shuttles in microbial fuel cells current production. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(5), 1373-1381, 2009.

- [78] Newman D. K., Kolter R., *A role for excreted quinones in extracellular electron transfer*. **Nature**, 405(6782), 94-97, 2000.
- [79] Li, C. and Fang, H.H.P. *Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures*, Critical Reviews in **Environ Sci Technol** (37), 1-39, 2007.
- [80] Logan, B.E., *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons, Inc., **New Jersey**, 2008.
- [81] Liu, H., Grot, S., S.A., Logan, B.E., *Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate*. **Environ Sci Technol** 2005.
- [82] Cheng S., Logan B.E., *Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells*, **Electrochem. Commun.** 9, 492–496, 2007.
- [83] Hu, Liu, H., H., Fan, Y., *Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells*. **Water Res.** 42 (15), 4172-4178, 2008.
- [84] Kim, J.R., Cheng, S., Oh, S.E., Logan, B.E., *Power generation using different cation, anion, and ultrafiltration membranes in microbial fuel cells*, **Environ Sci Technol** 41 (3), 1004–1009, 2007.
- [85] Li, W.-W., Sheng, G.-P., Liu, X.-W., Yu, H.-Q., *Recent advances in the separators for microbial fuel cells*, *Bioresource Technology*, 102 (1), 244–52, 2011.
- [86] Zhang, X., Cheng, S., Huang, X., Logan, B.E., *The use of nylon and glass fiber filter separators with different pore sizes in air-cathode single-chamber microbial fuel cells*, **Energ Environ Sci** 3 (5), 659-664, 2010.
- [87] Fangzhou, D., Beizhen, D.X., Wenbo, D., Boyang, J., Kun, D., Hong, L., *Continuous flowing membraneless microbial fuel cells with separated electrode chambers*, **Bioresour. Technol** 102, 8914–8920, 2011.
- [88] Biffinger, J.C., Ray, R., Little, B., Ringeisen, B.R., *Diversifying biological fuel cell designs by use of nanoporous filters*, **Environ Sci Technol** 41 (4), 1444–1449, 2007.
- [89] Sopian, K., Wan Daud, W.R., *Challenges and future developments in proton exchange membrane fuel cells*, **Renew Energ** 31 (5), 719–727, 2006.
- [90] Mohan, S.V., Velvizhi, G., Modestra, J.A., Srikanth, S., 2014. *Microbial fuel cell: critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements*. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 40, 779e797. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.109>.
- [91] Vafiadis, H., Skyllas-Kazacos, M., *Evaluation of membranes for the novel vanadium bromine redox flow cell*, **J Membrane Sci** 279 (1–2), 394–402, 2006.

- [92] Leung, P., *Development Of Zinc-Cerium Redox Flow Battery*, PhD Thesis University of Southampton, 2011.
- [93] Takata, H., Mizuno, N., Nishikawa, M., Fukada, S., Yoshitake, M., *Adsorption properties of water vapor on sulfonated perfluoropolymer membranes*, **Int. J. Hydrog. Energy** 32 (3), 371–379, 2007.
- [94] Lefebvre, O. , Shen, Y., Tan, Z., Uzabiaga, A., Chang, I. S., Ng, H.Y., *Full-loop operation and cathodic acidification of a microbial fuel cell operated on domestic wastewater*, **Bioresour. Technol** 102 (10), 5841–8, 2011.
- [95] Pupkevich, V. Glibin, V., Karamanev, V., *The effect of ferric ions on the conductivity of various types of polymer cation exchange membranes*, **J Solid State Electr.** 11 (10), 1429–1434, 2007.
- [96] Fan, Y., Hu, H., Liu, H., *Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration*, **J. Power Sources** 171 (2), 348–354, 2007.
- [97] Zhang, X., Cheng, S., Wang, X., Huang, X., Logan, B.E., *Separator characteristics for increasing performance of microbial fuel cells*, **Environ Sci Technol** 43 (21), 8456–61, 2009.
- [98] Zhang, Y., Angelidaki, I., *A new method for in situ nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC)*, **Water Research**, 47 (5), 1827–36, 2013.
- [99] Towheed T, Maxwell L, Anastassiades TP, Shea B, Houpt JB, Welch V, Hochberg MC, Wells GA. *Glucosamine therapy for treating osteoarthritis*. **Cochrane Database Syst. Rev**, 2005.
- [100] Qiu H, et al. *Interdependent recruitment of SAGA and Srb mediator by transcriptional activator Gcn4p*. **Mol Cell Biol** 25(9):3461-74, 2005.
- [101] Z. Kang, Z. Zhou, Y. Wang, H. Huang, G. Du and J. Chen, *Bio-Based Strategies for Producing Glycosaminoglycans and Their Oligosaccharides*, **Trends Biotechnol**, 36:8 (2018) 806–818.
- [102] Cress BF, Englaender JA, He W, Kasper D, Linhardt RJ, Koffas MAG: *Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules*. **FEMS Microbiol Rev** 2014, 38:660-697.
- [103] Amado IR, Va' zquez JA, Pastrana L, Teixeira JA: *Cheese whey: a cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chem** 2016, 198:54-61.
- [104] Amado IR, Va' zquez JA, Pastrana L, Teixeira JA: *Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial byproducts: molasses and corn steep liquor*. **Biochem Eng J** 2017, 117:181-187.

- [105] Pan NC, Pereira HCB, da Silva M, de LC, Vasconcelos AFD, Celligoi MAPC: *Improvement production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus in sugarcane molasses*. **Appl Biochem Biotechnol** 2017, 182:276-293.
- [106] A. Badri, A. Williams, R. J. Linhardt and M. A. G. Koffas, *The road to animal-free glycosaminoglycan production: current efforts and bottlenecks*, **Curr Opin Biotechnol**, 53 (2018) 85–92.
- [107] Y Shi, Y. Meng, J. Li, J. Chen, Y. Liu, and X. Bai, *Chondroitin sulfate : extraction , purification , microbial and chemical synthesis*, **J Chem Technol Biotechnol**, 89 (2014) 1445–1465.
- [108] C. Schiraldi, D. Cimini and M. De Rosa, *Production of chondroitin sulfate and chondroitin*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 87 (2010) 1209–1220.
- [109] W. Zhu, Y. Ji, Y. Wang, D. He, Y. Yan, N. Su, C. Zhang, X.H. Xing, *Structural characterization and in vitro antioxidant activities of chondroitin sulfate purified from Andrias davidianus cartilage*, **Carbohydr Polym**, 196 (2018) 398–404.
- [110] K. Suzuki, K. Miyamoto, H. Kaseyama, *Chondroitin-producing bacterium and method of producing chondroitin*. US Patent 2010/0151532 A1, Jun. 17, 2010.
- [111] W. He, L. Fu, G. Li, J. A. Jones, R. J. Linhardt and M. Koffas, *Production of chondroitin in metabolically engineered E . coli*, **Metab Eng**, 27 (2015) 92–100.
- [112] A. Rani, S. Patel, A. Goyal, *Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics*, **Curr Protein Pept Sci**, 19:1 (2018) 22-33.
- [113] Q. Zhang, R. Yao, X. Chen, L. Liu, S. Xu, J. Chen, J. Wu, *Enhancing fructosylated chondroitin production in Escherichia coli K4 by balancing the UDP-precursors*, **Metab Eng**, 47 (2018) 314- 322.
- [114] Ajisaka, Katsumi & Oyanagi, Yutaka & Miyazaki, Tatsuo & Suzuki, Yasuhiro. (2016). Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 80. 1-7. 10.1080/09168451.2016.1141036.
- [115] Wang, Jinpeng & Zhang, Lian & Jin, Zhengyu. (2016). *Separation and purification of low-molecular-weight chondroitin sulfates and their anti-oxidant properties*. **Bangladesh J Pharmacol.** 11. 61. 10.3329/bjp.v11iS1.26414.
- [116] Liu, Yang & Lv, Huilin & Ren, Li & Xue, Guanhua & Wang, Yingjun. (2016). *Improving the moisturizing properties of collagen film by surface grafting of chondroitin sulfate for corneal tissue engineering*. **J Biomater Sci Polym Ed.** 27. 1-29. 10.1080/09205063.2016.1160561.

- [117] Aydın, Özlem & Korkusuz, Feza & Korkusuz, Petek & Tezcaner, Ayşen & B, Elif & YAPRAKCI, Mustafa Volkan & Sendil Keskin, Dilek. (2014). *In vitro and in vivo evaluation of doxycycline-chondroitin sulfate/PCLmicrospheres for intraarticular treatment of osteoarthritis*. **J Biomed Mater Res B**. 103. 10.1002/jbm.b.33303.
- [118] Bauerova, Katarina & Ponist, Silvester & Kuncirova, Viera & Drafi, Frantisek & Mihalova, Danica & Paulovicova, Ema & Volpi, Nicola. (2014). *Effect of Nonanimal High- and Low-Molecular-Mass Chondroitin Sulfates Produced by a Biotechnological Process in an Animal Model of Polyarthritis*. **Pharmacology**. 94. 109-114. 10.1159/000366285.
- [119] Pothacharoen, Peraphan & Najarus, Sumet & Settakorn, Jongkolnee & Mizumoto, Shuji & Sugahara, Kazuyuki & Kongtaweelert, Prachya. (2013). *Effects of sesamin on the biosynthesis of chondroitin sulfate proteoglycans in human articular chondrocytes in primary culture*. **Glycoconj.** 31. 10.1007/s10719-013-9514 6.
- [120] Schneiders, Wolfgang & Rentsch, Claudia & Rehberg, S & Rein, Susanne & Zwipp, Hans & Rammelt, Stefan. (2012). *Effect of chondroitin sulfate on osteogenetic differentiation of human mesenchymal stem cells*. **Mater. Sci. Eng. C**: 32. 1926–1930. 10.1016/j.msec.2012.05.036.
- [121] Guerrero A. Larrosa, Scott K., Head I.M., Mateo F., Ginesta A., Godinez C. *Effect of temperature on the performance of microbial fuel cells*. **Fuel** 89 (2010) 3985–3994.
- [122] Sharma Vinay, Kundu P.P. *Biocatalysts in microbial fuel cells*. **Enzyme Microb Technol.** 47 (2010) 179–18
- [123] Daniel David K., Mankidy Bijith Das, Ambarish K., Manogari R. *Construction and operation of a microbial fuel cell for electricity generation from wastewater*. **Int J Hydrogen Energy** 34 (2009) 7555 – 7560.
- [124] Samrot Antony V., Senthilkumar P., Pavankumar K., Akilandeswari G.C., Rajalakshmi N., Dhathathreyan K.S. *Electricity generation by Enterobacter cloacae SU-1 in mediator less microbial fuel cell*. **Int J Hydrogen Energy** 35 (2010) 7723 – 7729.

Benim makale: 102 NOLU REFERANSA YERLEŞTİR.

Capsular Polysaccharide Biosynthesis from Recombinant E. coli and Chondroitin Sulfate Production , Ayse Sebnem Erenler, 2019, Cellular and Molecular Biology. Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2019.65.6.4>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma Bahar ÖZASLAN

Doğum yeri ve tarihi: Malatya- 31.03.1992

Adres: Yakınca Mahallesi Aslan uşağı Sokağı Kanal üstü Caddesi No:6 Kat:2
Malatya / Yeşilyurt

E-posta: fatmabaharozaslan@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2011-2015)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Anabilim Dalı (2016-2019)

Pedagojik Formasyon: İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi (2015)

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

Mikrobiyal Yakıt Hücreleri ve Güncel Biyoteknolojik Uygulamaları (Seminer, 2018)

Mikrobiyal Kondroitin Sülfatın *Staphylococcus aureus* üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması (3. Uluslararası Gevher Nesibe Sağlık Bilimleri Kongresi, 2019)

Tuba Unver¹; Ayse Sebnem Erenler²; Rauf Melekoglu³; Nusret Akpolat⁴; Turgay Seckin⁵; Raul Azimov³; Bahar Ozaslan² *Antifungal activity of microbial chondroitin sulphate against Candida albicans* This study was supported by TUBITAK 1001 (215s-861), 2019