

**BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ AMFİFİLİK KOPOLİMERLER VE MODİFİYE İLETKEN POLİMERLER
KULLANILARAK ENZİMATİK YAKIT HÜCRELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ
Muhammet Samet KILIÇ**

DANIŞMAN : Prof. Dr. Baki HAZER

İKİNCİ DANIŞMAN : Doç. Dr. Şeyda KORKUT

**ZONGULDAK
Ocak 2016**

KABUL:

Muhammet Samet KILIÇ tarafından hazırlanan “Yeni Amfifilik Kopolimerler ve Modifiye İletken Polimerler Kullanılarak Enzimatik Yakıt Hücrelerinin Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir.

14/01/2016

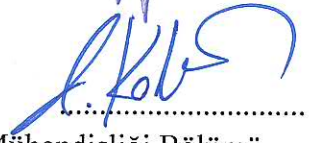
Danışman: Prof. Dr. Baki HAZER

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



İkinci Danışman: Doç. Dr. Şeyda KORKUT

Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü



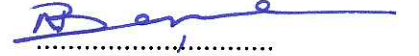
Üye: Prof. Dr. Şadi ŞEN

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



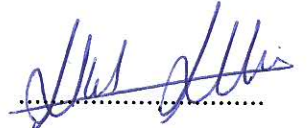
Üye: Yrd. Doç. Dr. Necati BAŞMAN

Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü



Üye: Yrd. Doç. Dr. Abdülkadir ALLI

Düzce Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü



ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../20....

Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Muhammet Samet Kılıç

ÖZET

Doktora Tezi

YENİ AMFİFİLİK KOPOLİMERLER VE MODİFİYE İLETKEN POLİMERLER KULLANILARAK ENZİMATİK YAKIT HÜCRELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Muhammet Samet KILIÇ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Baki HAZER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şeyda KORKUT

Ocak 2016, 135 sayfa

Bu tez, teknik açıdan arada membran olmaksızın tek bir kompartıman içinde çalışan, bu sayede hem atıksuda bulunan glikozu hem de *Carpobrotus Acinaciformis* bitkisinin ürettiği glikozu yenilenebilir yakıt olarak kullanarak elektrik enerjisine çevirebilen yüksek performanslı enzimatik yakıt hücrelerinin (EFC) geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Tezde anot biyokatalizörü olarak *glikoz oksidaz*, katot biyokatalizörü olarak *lakkaz* veya *bilirubin oksidaz* enzimi kullanılmıştır. Sistemde anot ve katot tek bir kompartımana daldırılarak çalıştırıldığından anot ve katot enzimlerinin birarada çalışabildiği optimum ortam şartları belirlenmiştir. Elektrot konfigürasyonlarına bağlı tüm parametreler maksimum güç üretimi elde edilecek şekilde optimize edilmiştir. Tez kapsamında elektrotlar için kullanılan amfifilik blok/graft kopolimerler ve homopolimerler (polipropilen, ve polistiren-poliizopren esaslı kopolimerler) amaca yönelik sentezlenmiş, bu polimerlerin yapısına enzim immobilizasyonu için farklı fonksiyonel gruplar (-COOH, -NH₂ ve polietilenglikol) takılmış, elektrot yüzeyinde hızlı elektron transferinin sağlanması amacıyla da çeşitli nanoparçacıklar (altın, kobalt oksit,

ÖZET (devam ediyor)

ferrosen, *p*-benzokinon, grafen) polimerlere emdirilmiştir. Ayrıca polipirol ve politiyofen esaslı farklı iletken kopolimerler de elektrokimyasal yoldan sentezlenerek ve medyatörlerle modifiye edilerek EFC sistemlerinde kullanılmıştır. Geliştirilen her EFC, standart glikoz çözeltilerinde test edildikten sonra *Carpobrotus Acinaciformis* bitkisinde ve evsel atıksuda işletilmiştir. Yüksek performansa sahip EFC'lerin akım yoğunlukları ve elektriksel güç çıktıları hesaplanmıştır. En yüksek güç yoğunluğu, 20 mM'lık standart glikoz için 23.5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, bitki için 1.3 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ve evsel atıksu için 16 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren Polipropilen-g-Polietilenglikol esaslı EFC sisteminden 560 mV'luk hücre potansiyelinde elde edilmiştir. Günümüze kadar yapılan EFC çalışmalarında çok çeşitli polimer malzeme kullanımına ve yapılan sistem optimizasyona dayalı bu kadar geniş ölçekte bir değerlendirme yer almamıştır. Deneysel sonuçlar ışığında bu tez ile EFC'lerin yenilenebilir yakıt kaynaklarıyla etkin kullanımına ilişkin önemli bir aşama kaydedildiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Enzimatik yakıt hücresi, yenilenebilir enerji, elektrik enerjisi üretimi, amfifilik polimer, iletken polimer, organik/inorganik nanokompozit.

Bilim Kodu: 405.04.02

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DEVELOPMENT OF ENZYMATIC FUEL CELLS BY USING NOVEL AMPHIPHILIC COPOLYMERS AND MODIFIED CONDUCTING POLYMERS

Muhammet Samet KILIÇ

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Thesis Advisor: Prof. Dr. Baki HAZER

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Şeyda KORKUT

January 2016, 135 pages

This thesis is based on the idea of development of high performance enzymatic fuel cells (EFCs) which use glucose both found in wastewater and *Carpobrotus Acinaciformis* plant generates as a renewable fuel and converts it to electric power without using a membrane in a single compartment technically. In the thesis, enzyme *glucose oxidase* has been used as anodic biocatalyst, enzyme *laccase* or *bilirubin oxidase* has been used as cathodic biocatalyst. Optimum working conditions where anodic and cathodic enzymes work together have been determined since anode and cathode have been immersed in the same single compartment. All of the parameters associated with the electrode configuration have been optimized to acquire maximum power. Amphiphilic block/graft copolymers and homopolymers (polypropylene and polystyrene-polyisoprene based copolymers) have been purposively synthesized, various functional groups (-COOH, -NH₂ and polyethyleneglycol) have been placed to the polymers for enzyme immobilization and various nanoparticles (gold, cobalt oxide, ferrocene, *p*-

ABSTRACT (continued)

benzoquinone, graphene) have been soaked in the side groups of the polymers in order to get fast electron transfer on surface of the electrodes within the thesis. In addition, various polypyrrole and polythiophene based conductive copolymers have been electropolymerized and used in EFC systems by modifying them with mediators. Each of the developed EFC has been operated in *Carpobrotus Acinaciformis* plant and municipal wastewater after it has been tested for standard glucose solutions. The current densities and electrical power output of the high performance EFCs have been calculated. The maximum power density has been obtained for gold and cobalt nanoparticle including Polypropylene-g-Polyethyleneglycol based EFC as $23.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ for 20 mM of standard glucose, $1.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ for plant operation and $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ for municipal wastewater at a cell potential of 560 mV. There has not been a large-scale assessment on EFC subject area yet. It can be said that, an important progress has been made with regard to effective usage of EFCs with renewable fuel sources with this thesis under the light of experimental results.

Keywords: Enzymatic fuel cell, renewable energy, electric power generation, amphiphilic polymer, conductive polymer, organic/inorganic nanocomposite.

Science Code: 405.04.02

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarıyla hep yanımda olan ve bana yol gösteren danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Baki HAZER'e ve sayın Doç.Dr. Şeyda KORKUT'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez süresince çalışmalarımı izleyerek fikir ve tecrübeleri ile beni yönlendiren tez izleme komisyonu hocalarım sayın Prof. Dr. Şadi ŞEN ve sayın Yrd. Doç. Dr. Necati BAŞMAN'a, doktora eğitimim süresince desteğini hissettiğim sayın Yrd. Doç Dr. Hasan ÇABUK'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca birlikte vakit geçirdiğim değerli arkadaşım Ortaç ÇETİNTAŞ'a ve güzel dostluklarından dolayı BEÜ Fen Edebiyat Fakültesindeki arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da beni sabırla destekleyen aileme minnet duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmamı “Yenilenebilir Enerji Kaynaklarından Elektrik Enerjisi Üretimi İçin Enzimatik Yakıt Hücrelerinin Geliştirilmesi” başlıklı, 112Y100 numaralı proje kapsamında finanse eden TÜBİTAK'a ve 2014-72118496-01 numaralı BEÜ Araştırma Fonuna teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
1.1 YAKIT HÜCRELERİ	1
1.1.1 Konvensiyonel Yakıt Hücreleri	2
1.1.2 Biyolojik Yakıt Hücreleri	5
1.1.2.1 Mikrobiyal Yakıt Hücreleri.....	5
1.1.2.2 Enzimatik Yakıt Hücreleri.....	6
1.2 ENZİM KATALİZLİ REAKSİYONLARDA ELEKTRON TRANSFER MEKANİZMASI.....	8
1.3 POLİMERLER	10
1.3.1 İletken Polimerler.....	11
1.3.2 Sentetik Polimerler.....	12
1.4 POLİMERLERİN MODİFİKASYONLARI.....	18
1.5 LİTERATÜR ÖZETİ	19
BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	25
2.1 KULLANILAN KİMYASALLAR VE EKİPMANLAR.....	25

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.2 ELEKTROTLAR VE ÖN HAZIRLIK.....	26
2.3 POLİMERLERİN SENTEZİ	26
2.3.1 PP-g-PEG Polimerinin Sentezi	27
2.3.2 Altın ve Kobalt Oksit Nanopartikül İçeren PP-g-PEG Polimerinin Sentezi.....	27
2.3.3 Altın Nanopartikül İçeren PP-g-Im Polimerinin Sentezi	28
2.3.4 Grafen ile Modifiye Edilmiş PSIS-COOH Polimerinin Sentezi.....	29
2.4 KİMYASAL OLARAK YENİ SENTEZLENMİŞ POLİMERLERLE ÇALIŞMA ELEKTROTLARININ HAZIRLANMASI	29
2.5 TİCARİ POLİMERLERLE ÇALIŞMA ELEKTROTLARININ HAZIRLANMASI ...	30
2.5.1 Poli(TAA-co-MT) Elektropolimerizasyonu	31
2.5.2 Poli(Py-COOH-co-TAA) Elektropolimerizasyonu	31
2.5.3 Poli(Py-COOH) Elektropolimerizasyonu	31
2.6 FABRİKASYON AŞAMALARININ OPTİMİZASYONU	31
2.7 EFC SİSTEMİNİN İŞLETİLMESİ	33
2.8 İŞLETME KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU.....	34
2.9. BİTKİ UYGULAMASI.....	35
2.10 ATIKSU UYGULAMASI.....	36
BÖLÜM 3 SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
3.1 PP-g-PEG TABANLI EFC SİSTEMİ	37
3.1.1 Karakterizasyon Çalışmaları	37
3.1.2 PP-g-PEG Tabanlı EFC Sisteminin İşletilmesi.....	39
3.2 PP-g-PEG/FERROSEN FİLM TABANLI EFC SİSTEMİ	41
3.3 ALTIN VE KOBALT OKSİT NANOPARTİKÜL İÇEREN PP-g-PEG TABANLI EFC SİSTEMİ.....	47
3.3.1 Karakterizasyon Çalışmaları	47
3.3.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	49
3.3.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu	59
3.3.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi	62
3.3.5 EFC Sisteminde Eysel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi	62

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

3.3.6 EFC Sistemi Kullanılarak <i>Carpobrotus Acinaciformis</i> Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi	64
3.4 PP-g-Im TABANLI EFC SİSTEMİ	66
3.4.1 Karakterizasyon Çalışmaları	66
3.4.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	69
3.4.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu	74
3.4.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi	76
3.4.5 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi	77
3.5 POLİ(TAA-co-MT) TABANLI EFC SİSTEMİ.....	78
3.5.1 Farklı Medyatörlerin Denenmesi ve CV Çalışmaları	78
3.5.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	82
3.5.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu	87
3.5.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi	89
3.5.5 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi	90
3.6 POLİ(Py-COOH-co-TAA) TABANLI EFC SİSTEMİ.....	91
3.6.1 Karakterizasyon Çalışmaları	91
3.6.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	91
3.6.3. İşletme Koşullarının Optimizasyonu	94
3.6.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi	97
3.6.5 EFC Sistemi Kullanılarak <i>Carpobrotus Acinaciformis</i> Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi	98
3.6.6 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi	99
3.7 PSIS-COOH TABANLI EFC SİSTEMİ	100
3.7.1 Karakterizasyon Çalışmaları	100
3.7.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	102
3.7.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu	107
3.7.4 Grafenin Sistem Performansına Etkisi	108
3.7.5 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi	110
3.7.6 EFC Sistemi Kullanılarak <i>Carpobrotus Acinaciformis</i> Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi	110

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.8 POLİ(Py-COOH) TABANLI EFC SİSTEMİ	111
3.8.1 Karakterizasyon Çalışmaları ve Farklı Medyatörlerin Denenmesi.....	111
3.8.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu	115
3.8.3 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi	119
3.8.4 EFC Sisteminde Eysel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi	120
3.9. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ	121
KAYNAKLAR.....	127
ÖZGEÇMİŞ	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İki bölmeli mikrobiyal yakıt hücresi sisteminin şematik gösterimi.	6
1.2 Glikozun yakıt olarak kullanıldığı tek kompartımanlı bir EFC.	7
1.3 DET şematik gösterimi.....	8
1.4 MET şematik gösterimi.....	9
1.5 Enzim elektrotlarının şematik gösterimi.	10
1.6 Başlatıcı reaksiyonları.	13
1.7 Akrilonitrilin radikalik katılma polimerizasyon mekanizması.....	14
1.8 Graft kopolimer türleri.	15
1.9 Williamson eter sentezi ile PP-g-PEG eldesi.	16
1.10 Adsorpsiyon ve kimyasal yöntem ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu.	17
1.11 Medyatör kullanılan EFC'ler için potansiyel şeması.	22
2.1 PP-g-PEG kopolimerinin sentezi.	27
2.2 Altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimeri.....	28
2.3 Elektropolimerizasyonda kullanılan üçlü elektrot sistemi.	30
2.4 EFC sistemi: yeşil kısaç anot (GOx bağlı elektrot), sarı kısaç katot (LAC veya BOD bağlı elektrot), kırmızı kısaç karşıt elektrot, beyaz kısaç referans elektrot.	34
2.5 <i>Carpobrotus Acinaciformis</i> bitkisi genel görünümü.	36
3.1 PP-g-PEG kopolimerine ait H-NMR spektrumu.....	37
3.2 PP-g-PEG kopolimerinin ve PP-Cl polimerinin FT-IR spektrumu.....	38
3.3 Anot ve katoda ait dönüşümlü voltametri (CV) grafikleri	39
3.4 PP-g-PEG polimeri ile kaplanmış anoda (A) ve katoda (B) ait amperometrik akım-zaman grafikleri.	40
3.5 PP-g-PEG polimer film kaplı elektrotların dönüşümlü voltametri grafiği: Tarama hızı: 100 mV/s.....	42
3.6 PP-g-PEG/ferrosen/BOD elektrodunun farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 Ferrosen içermeyen (A) ve ferrosen ile modifiye edilen (B) EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine karşı üretilen katodik akım sinyalleri.	44
3.8 PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sisteminden elde edilen güç yoğunlukları (Hücre potansiyeli: 0.56 V).....	45
3.9 Ferrosen ile modifiye edilmiş ve ferrosen içermeyen EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine karşı üretilen anodik akım sinyalleri.	46
3.10 PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sisteminde gerçekleşen biyoelektrokimyasal reaksiyonların şematik gösterimi.	47
3.11 Sadece altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (A), GOx immobilize edilmiş PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (B) ve BOD immobilize edilmiş PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (C) ait SEM görüntüleri. .	48
3.12 Altın ve kobalt oksit nanopartiküllü/nanopartikülsüz PP-g-PEG polimer film kaplı elektrotlara ait dönüşümlü voltametri grafikleri.	49
3.13 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle hazırlanmış BOD katodu içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.	50
3.14 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle hazırlanmış LAC katodu içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.	51
3.15 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle kaplanmış altın çalışma elektrotları içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.....	53
3.16 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren farklı film yoğunluğunda PP-g-PEG polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarının glikoz eklemelerinden elde edilen akım değerleri.	55
3.17 Protein kalibrasyon eğrisi.	56
3.18 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren 20 µg PP-g-PEG polimer kaplı ve farklı miktarlarda immobilize enzim bağlı EFC sisteminden 10 mM glikoz eklemesine karşı elde edilen akım değerleri.	58
3.19 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG ile hazırlanmış EFC'den farklı hücre potansiyellerinde elde edilen güç yoğunlukları.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.20 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG ile hazırlanmış EFC'den farklı pH değerlerinde elde edilen güç yoğunlukları.	60
3.21 NaCl'nin sistem performansına etkisi.	61
3.22 0.56 V'luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen akım değerleri.	63
3.23 EFC sisteminin bitki bünyesinde işletilmesi.	64
3.24 Bitki yaprağında fotosentezle oluşan glikozdan 0.56 V'luk hücre potansiyelinde elde edilen anot (A) ve katot (B) akım değerleri.	65
3.25 Altın nanopartikül içeren PP-g-Im polimerinin TEM görüntüsü.	66
3.26 PP-g-Im polimerinin FT-IR spektrumu.	67
3.27 Saf PP-g-Im polimeri (A), GOx immobilize edilmiş PP-g-Im polimeri (B) ve BOD immobilize edilmiş PP-g-Im polimeri (C) ile kaplanmış elektrotların SEM görüntüleri.	68
3.28 PP-g-Im tabanlı EFC sisteminin katoduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.	69
3.29 Farklı katot enzimleriyle hazırlanmış altın içeren PP-g-Im tabanlı EFC sistemlerinden üretilen akım sinyalleri.	70
3.30 Camsı karbon elektrotlarla hazırlanmış PP-g-Im tabanlı EFC sisteminden üretilen akım sinyalleri.	71
3.31 Altın nanopartiküller içeren farklı film yoğunluklarında PP-g-Im polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarının glikoz eklemelerinden elde edilen akım yoğunlukları.	73
3.32 Altın nanopartikül içeren PP-g-Im polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarında farklı immobilize enzim miktarlarından glikoz eklemesine karşı elde edilen akım yoğunlukları.	74
3.33 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.	75
3.34 pH'ın sistem performansı üzerine etkisi.	76
3.35 0.56 V'luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'deki akım değişimi.	77
3.36 Ferrosene (A), <i>p</i> -benzokinona (B) ve nötral kırmızısına (C) ait dönüşümlü voltametri grafikleri.	79

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.37 Poli(TAA- <i>co</i> -MT)/ferrosen film ile kaplanmış (A), Poli(TAA- <i>co</i> -MT)/nötral kırmızısı film ile kaplanmış (B), Poli(TAA- <i>co</i> -MT) / <i>p</i> -benzokinon film ile kaplanmış (C) EFC sisteminin glikoz eklemelerine karşı verdiği akım sinyalleri.	81
3.38 Poli(TAA- <i>co</i> -MT)/ferrosen/BOD katodunun glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.....	83
3.39 Farklı elektrot materyaliyle hazırlanmış Poli(TAA- <i>co</i> -MT)/ferrosen/BOD katodunun glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.....	84
3.40 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları. ...	85
3.41 Farklı immobilizasyon sürelerinde hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.	87
3.42 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.....	88
3.43 pH'ın sistem performansına etkisi.....	89
3.44 0.56 V'luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen katodik akım.	90
3.45 Py-COOH ve TAA'e ait kopolimerizasyonun dönüşümlü voltametri grafiği.	91
3.46 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları. ...	93
3.47 Dizayn edilen 5 EFC sisteminin elektrot yüzeylerine bağlanan enzim miktarları ve bu EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.	94
3.48 Yakıt olarak glikoz ve medyatör/aracı olarak <i>p</i> -benzokinonun kullanıldığı GOx/LAC yakıt hücresinin çalışma prensibi.....	95
3.49 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.....	96
3.50 pH'ın sistem performansına etkisi.....	97
3.51 Bitki yaprağında fotosentezle oluşan glikozdan 0.94 V'luk hücre potansiyelinde EFC'den üretilen akım değerleri: Anodik akım (A), katodik akım (B).....	98
3.52 0.94 V'luk hücre potansiyelinde 500 µL'lik evsel atıksu eklemesi sonucu EFC anot (A) ve katotundan (B) üretilen akım değerleri.....	99
3.53 PSIS-COOH kopolimerine ait H-NMR spektrumu.....	100
3.54 PSIS-COOH triblok kopolimerinin FT-IR spektrumu.....	101
3.55 PSIS-COOH'ın (A), PSIS-COOH/grafen'in (B), GOx immobilize PSIS-COOH/grafen'in (C) ve BOD immobilize PSIS-COOH/grafen'in (D) SEM görüntüsü.	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
3.56 PSIS-COOH/grafen triblok kopolimeriyle hazırlanmış altın ve camı karbon çalışma elektrotlarını içeren 2 EFC sisteminden glikoz eklemelerine karşı alınan akım değerleri.	103
3.57 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış 5 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden ürettiği akım yoğunlukları.	104
3.58 Farklı enzim miktarı yüklemelerinde hazırlanmış 6 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden ürettiği akım yoğunlukları.	106
3.59 Farklı hücre potansiyellerinde EFC'den üretilen akım yoğunlukları.	107
3.60 0,72 V'luk hücre potansiyelinde saf ve grafen modifiye edilmiş PSIS-COOH ile hazırlanan EFC'lerden elde edilen anodik (A) ve katodik (B) akım değerleri.	109
3.61 0,72 V'luk hücre potansiyelinde fotosentez reaksiyonları sonucu EFC'de gözlenen akım.	111
3.62 Poli(Py-COOH)/ferrosen (A), Poli(Py-COOH)/ <i>p</i> -benzokinon (B), Poli(Py-COOH)/Nötral kırmızısı (C) elektropolimerizasyonuna ait CV grafikleri.	112
3.63 Poli(Py-COOH)/ferrosen (A), Poli(Py-COOH)/ <i>p</i> -benzokinon (B), Poli(Py-COOH)/Nötral kırmızısı (C) katoduna ait glikoz eklemelerinden elde edilen akım değerleri.	114
3.64 Poli(Py-COOH)/ferrosen polimeriyle hazırlanmış LAC katodunu (A) ve BOD katodunu (B) içeren 2 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden üretilen akım sinyalleri.	116
3.65 Poli(Py-COOH)/ferrosen polimeriyle hazırlanmış camı karbon elektrotları içeren EFC sisteminin akım sinyalleri.	117
3.66 Farklı film kalınlıklardaki Poli(Py-COOH)/ferrosen filmi ile hazırlanmış EFC sisteminin glikoz eklemelerinden elde edilen anodik (A) ve katodik (B) akım değerleri.	118
3.67 Farklı miktarlarda enzim yüklemesine sahip 6 EFC sisteminden glikoz eklemesine karşı elde edilen akım değerleri.	119
3.68 0.45 V'luk hücre potansiyelinde 500 µL'lik evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen akım değeri.	121



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanmış çalışma elektrotlarında immobilize olan enzim miktarları.....	57
3.2	Farklı hacimlerde enzim damlatılarak hazırlanmış çalışma elektrotlarında immobilize olan enzim miktarları.....	58
3.3	Farklı immobilizasyon sürelerine maruz bırakılmış EFC elektrotlarının yüzeyindeki immobilize enzim miktarları.....	86
3.4	Farklı miktarlarda enzim yüklemesiyle hazırlanmış 6 EFC sisteminin, yüzeylere immobilize olmuş enzim miktarları.....	106
3.5	pH'ın akım yoğunluğuna etkisi.....	108
3.6	Geliştirilen EFC sistemlerinin elektriksel güç değerleri.....	125



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

V	: Volt
A	: Amper
mV	: Milivolt
s	: Saniye
nW	: Nanovat
μ W	: Mikrovat
I	: Akım
E	: Hücre Potansiyeli
P	: Güç/Güç Yoğunluğu
J	: Akım Yoğunluğu

KISALTMALAR

AIBN	: Azobisizobütironitril
BFC	: Biyolojik Yakıt Hücresi
BOD	: <i>Bilirubin Oksidaz</i>
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DET	: Direkt Elektron Transferi
EFC	: Enzimatik Yakıt Hücresi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
GOx	: <i>Glikoz Oksidaz</i>
LAC	: <i>Lakkaz</i>
MET	: Medyatörlü Elektron Transferi
Poli(Py-COOH)	: Poli(pirol-2-karboksilik asit)
Poli(Py-COOH-co-TAA)	: Poli(pirol-2-karboksilik asit-co-3-tiyofen asetik asit)
Poli(TAA-co-MT)	: Poli(3-tiyofen asetik asit-co-3-metil tiyofen)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

PP-g-Im	: Polipropilen-g-İmidazol
PP-g-PEG	: Polipropilen-g-Polietilenglikol
PSIS-COOH	: Poli(stiren-b-izopren-b-stiren)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
UV	: Ultraviyole



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 YAKIT HÜCRELERİ

Enerji kullanımının büyük bölümünün giderek tükenmekte olan ve artan miktarda çevresel problemlere yol açan fosil yakıtlardan sağlanması yakın gelecekte oluşacak enerji problemini son yıllarda üzerinde tartışılan önemli bir sorun olarak ortaya koymaktadır (Büyüknöhtü 2009). İhtiyaç duyulan temiz enerji araştırmacıları, yakıt hücreleri ve güneş enerjisi gibi yenilenebilir, temiz ve yüksek verimli sistemlere yönlendirmektedir. Yakıt hücreleri, yakıtlardaki kimyasal enerjiyi doğrudan elektrik enerjisine çeviren elektrokimyasal cihazlardır. Bir yakıt hücresinde, anot olarak tanımlanan çalışma elektrotunda yükseltgenme (oksidasyon) tepkimesi ve eş zamanlı olarak katot olarak tanımlanan çalışma elektrotunda indirgenme (redüksiyon) tepkimesi gerçekleşir. Yakıt hücresinde yükseltgenme reaksiyonu sonucu açığa çıkan elektronların bir dış devre yardımıyla katoda doğru hareketiyle elektriksel akım yaratılırken, karşıt yüklerin ((+) pozitif yüklü iyonlar) elektrolite doğru hareketiyle devre tamamlanmış olur. Yakıt hücrelerinin en tipik örneklerinden biri hidrojenin yakıt olarak kullanıldığı hidrojen/oksijen yakıt hücresidir. Bu tip hücrelerde, hidrojen, oksijenle reaksiyona girer ve yan ürün olarak su ortaya çıkarken elektrik enerjisi elde edilir (Büyüknöhtü 2009).

Yakıt hücreleri genel olarak konvensiyonel ve biyolojik yakıt hücreleri olarak iki sınıfa ayrılabilir. Konvensiyonel yakıt hücrelerinin yüksek verimli güç üretmeleri ve çevresel zararlarının düşük olması avantajları olarak bilinse de, bu teknolojinin yüksek çalışma sıcaklığı (60-1100 °C) ve maliyet gerektirmesi, metal katalizörlerin performansının azalması gibi çeşitli dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar, araştırmaları maliyeti düşük ve çevre dostu olan biyolojik yakıt hücrelerine çevirmektedir. Biyolojik yakıt hücreleri ise kendi içinde mikrobiyal yakıt hücreleri ve enzimatik yakıt hücreleri olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.1.1 Konvansiyonel Yakıt Hücreleri

Konvansiyonel yakıt hücreleri çalışma sıcaklığı, elektrolit tipi ve yakıt tipine göre çeşitli isimler alır. Yakıt hücresinin çalışma sıcaklığı 150 °C 'den düşükse, "düşük sıcaklık yakıt hücresi", 500-1000 °C arasında ise "yüksek sıcaklık yakıt hücresi" olarak adlandırılmaktadır. Düşük sıcaklık yakıt hücrelerinin hidrojen gibi basit yakıt ve platin gibi iyi ve pahalı katalizör gerektirmelerine rağmen yüksek sıcaklık yakıt hücreleri hidrokarbon yakıt ve daha ucuz katalizör kullanabilme potansiyeline sahiptir. Konvansiyonel yakıt hücrelerinin her ne kadar çalışma prensipleri benzer olsa da, çalışma koşulları ve uygulama alanları farklılık gösterir (Yıldızbilir 2006). Konvansiyonel yakıt hücreleri bünyelerinde kullanılan elektrolit çeşidine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır.

- Alkali yakıt hücreleri
- Proton değişim zarlı yakıt hücreleri
- Doğrudan metanol kullanan yakıt hücreleri
- Fosforik asitli yakıt hücreleri
- Erimiş karbonat yakıt hücreleri
- Katı oksit yakıt hücreleri

Alkali yakıt hücreleri geliştirilen ilk yakıt hücresi sistemidir. Alkali yakıt hücrelerinde platin, nikel ve gümüş gibi metal katalizörler ve elektrolit olarak potasyum hidroksit kullanılır. Kullanılan potasyum hidroksitin derişimine bağlı olarak çalışma sıcaklığı 120 °C'den az ya da 250 °C'nin üzerinde olabilmektedir. Yakıt olarak gönderilen hidrojen molekülleri anotta elektron vererek, hidrojen iyonlarına dönüşür. Bu iyonlar potasyum hidroksit elektrolitten yoluna devam ederken, elektronlar ise bir dış devre üzerinden katoda ulaşır. Burada hidrojen iyonları, katoda gönderilen oksijen ve dış devreden gelen elektronlar ile reaksiyona girerek devre tamamlanır.

Proton değişim zarlı yakıt hücrelerinde elektrolit olarak ince, geçirgen polimerler kullanılmaktadır. Yakıt olarak hidrojen, oksitleyici olarak da havanın oksijeni kullanılır. Hidrojen atomları hücrenin anot tarafına verilir ve burada iyonize olur. Pozitif yüklü protonlar geçirgen zardan geçerek katoda yönelirler. Elektronlar, anottan katoda harici bir yoldan ilerleyerek elektrik enerjisinin ortaya çıkmasını sağlar. Katotta elektronlar, hidrojen protonları

ve havadan alınan oksijen ile birleşerek suyu meydana getirir. Proton değişim zarlı yakıt hücrelerinde verim %40-50 civarındadır.

Doğrudan metanol kullanan yakıt hücreleri, özellikleri ve çalışma prensipleri itibariyle proton değişim zarlı yakıt hücrelerine benzemektedir. Sistemdeki tek farklılık, doğrudan metanol kullanılan bu tip hücrelerde hidrojenin sıvı metanolden elde edilmesidir. Yakıt hücresinde teorik olarak, katot üzerinde oluşan su ile sisteme doğrudan beslenen metanol-su karışımı anot üzerinde elektrokimyasal bir reaksiyon meydana getirir. Metanolün parçalanması sonucu protonlar, elektronlar ve karbondioksit meydana gelmektedir. Oluşan protonlar diğer ürünlerden ayrılarak seçiciliğe sahip polimer elektrolit zarından geçerek katoda hareket etmektedir ve katot üzerinde beslenen havadan sağlanan oksijen ile reaksiyona girerek suyu oluşturmaktadır.

Fosforik asitli yakıt hücreleri, adından da anlaşıldığı gibi elektrolit olarak fosforik asiti kullanmaktadır. Hücrede elektrolit olarak kullanılan fosforik asit kararlı bir asittir ve temel metallerle çok çabuk reaksiyona girer. Bunun sonucu olarak, sadece platin ve platin alaşımları katalizör olarak kullanılabilir. Anot elektrotuna verilen yakıt, proton ve elektronlarına ayrılır. Pozitif yüklü hidrojen iyonları elektrolitten geçerek anottan katoda ilerler. Anotta üretilen elektronlar ise harici bir yoldan devrelerini tamamlayarak elektrik enerjisi üretir ve katoda döner. Burada elektronlar, hidrojen iyonları ve oksijen reaksiyona girerek suyu oluşturur.

Erimiş karbonat yakıt hücreleri diğer yakıt hücrelerinden çok farklı bir işletim sistemine sahiptir. Elektrolit olarak, poroz lityum-alüminyum matris içinde tutulan erimiş alkali potasyum lityum karbonat kullanılmaktadır. Bu elektrolit 650°C çalışma sıcaklığına sahiptir ve karbonat iyonları iletimi sağlamaktadır. Erimiş karbonat yakıt hücreleri katot tarafından oksijen ve karbondioksit gazı ile beslenir. Bu şekilde karbonat oluşumunu sağlar ki iyonların iletimini sağlayan bu karbonat iyonudur. Karbonat iyonları elektrolit içinden anoda geçer ve burada hidrojenle reaksiyona girerek su, karbondioksit ve elektronları açığa çıkarır. Elektronlar harici bir devreyi izleyerek elektrik enerjisini meydana getirir.

Katı oksit yakıt hücreleri tamamen katı yapıda olup, elektrolit olarak yüksek sıcaklıkta oksijen iyonlarını (O^{2-}) katottan anoda aktaran katı zirkonyum materyaller kullanılır. Bu tip yakıt hücresi yapısında sadece iki faz (gaz ve katı) söz konusudur. Hem elektrotlar hem de elektrolit

seramik malzemedendir. Çalışma sıcaklıkları 1000 °C ve verimleri %60-%70 civarındadır. Katı oksit yakıt hücrelerinde yakıt anot tarafına verildiğinde katot tarafında bulunan oksijen iyonları elektrolit içinden geçerek anotta hidrojenle reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda elektronlar ayrılır ve anot katot arasına bağlı dış devre iletkeninden geçerek elektrik enerjisini oluşturup katoda geri döner. Reaksiyona giren hidrojen, oksijen ve karbonmonoksit çıkış ürünü olarak su ve karbondioksiti üretir (Yıldızbilir 2006).

Hidrojen yakıt hücreleri, hidrojende bulunan kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çeviren cihazlardır. İşlem sonunda atık olarak saf su buharı ve ısı oluşturmaktadır. Basit bir batarya gibi düşünülebilir. Batarya ile yakıt hücresi arasındaki fark ise, bataryayı devamlı şarj etmek zorunludur ancak yakıt hücrelerinde şarj etme durumu yoktur. Yakıt hücresinde meydana gelen kimyasal reaksiyon, elektroliz olayının tersi bir durumdur. Bilindiği gibi elektroliz olayında, saf suya iki adet elektrot daldırılıp ve bu elektrotlara düşük potansiyelde (12 V) elektrik akımı verildiğinde su kendisini oluşturan hidrojen ve oksijen iyonlarına ayrılmaktadır. Yakıt hücresi biri negatif (anot) ve diğeri pozitif (katot) olmak üzere iki elektrottan oluşmaktadır. Elektrotlar genellikle katı metallerdir. Hidrojen yakıt hücresinin anot kısmına oksijen ise katot kısmına giriş yapmaktadır. Katalizörün etkisiyle hidrojen atomları proton ve elektronlarına ayrılmaktadır.



Ayrılan elektronlar bir elektrik devresinin içerisinde geçerek elektrik akımı oluşturmaktadır. Protonlar ise, elektrolit arasından katoda doğru hareket etmektedirler. Devresini tamamlayan elektronlar tekrar hidrojenin protonuna bağlanır ve oksijenle birleşerek saf su buharı ve ısı meydana getirirler.



Elektrotlar genellikle geçirgen karbon karışımı olan malzemedен yapılmaktadır. Katalizör reaksiyonunun iyi olması için katalizör parçalarının hem proton hem de elektron iletkenliği arasında iyi ilişki kurması gerekmektedir (Alkaya vd. 2008). Yakıt hücrelerindeki yakıtın yenilenebilir olması bu sistemi “temiz enerji” üretim prosesi yapar. Ayrıca hidrojen yakıt hücrelerinde anotta hidrojenin protona yükseltgenmesi için soy metal katalizörlerine ihtiyaç duyulması, karmaşık çevre koşulları, hidrojenin güvenli depolanamaması (hidrojen gazı depoda bir yolunu bulup kaçabiliyor) gibi bazı engeller yakıt hücrelerinin ticarileşmesinin

yaygınlaşmasını engellemektedir. Bu engeller, sürdürülebilir enerji kaynaklarından temiz enerji üretiminin gerçekleştirildiği biyolojik yakıt hücrelerine yönelimi sağlamıştır.

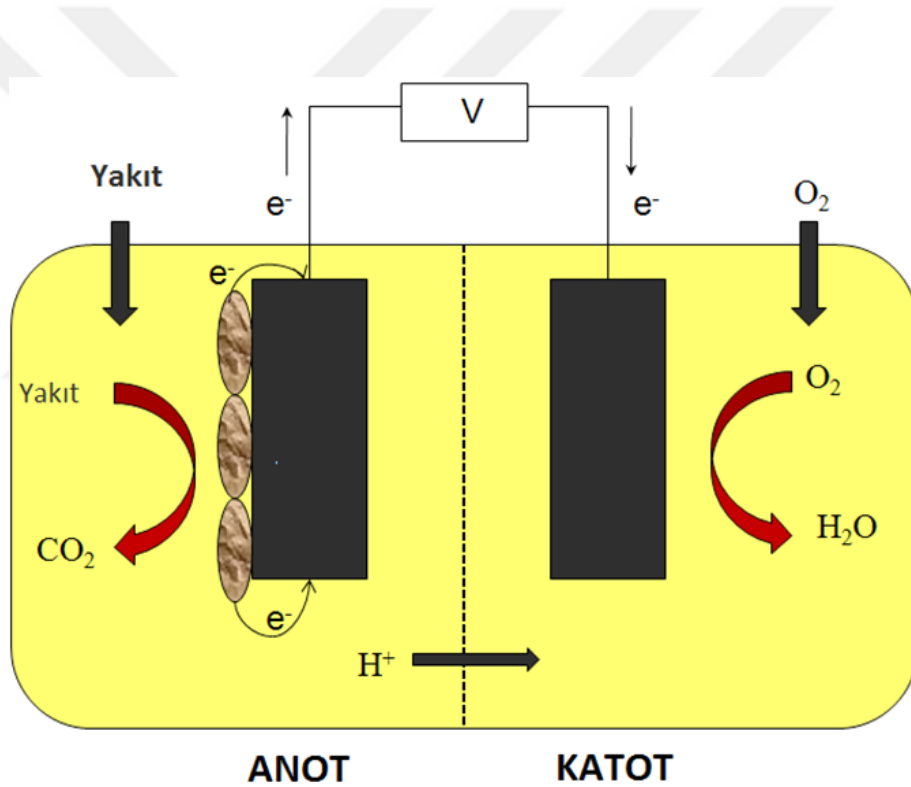
1.1.2 Biyolojik Yakıt Hücreleri

Biyolojik yakıt hücrelerinde (Biofuel cell, BFC) en yaygın kullanılan biyolojik katalizörler mikroorganizmalar ve enzimlerdir. BFC'ler, biyokimyasal metabolik yolları içeren elektrokimyasal reaksiyonlar üzerinden kimyasal maddeleri direkt olarak elektrik enerjisine çeviren cihazlardır. Polimer-elektrolit, direkt metanol ve katı-oksit gibi konvensiyonel inorganik yakıt hücreleri, pahalı, özel metal katalizörleri içerir ve/veya kalitesi yükseltilmiş fosil yakıtları kullanarak işletilir (Larminie ve Dicks 2003, Osman vd. 2011). Son yıllarda fosil yakıtların yerine kullanılabilen ve sera gazı salınımını azaltarak küresel ısınmayı önleyen yenilenebilir enerji kaynaklarının, bir başka ifadeyle çevre dostu yakıtların kullanılmasının özendirilmesi dünya gündemine gelmiştir (Hatunoğlu 2010). Fakat 2010 yılı verilerine göre, halen dünyada kullanılan toplam enerjinin yalnızca yaklaşık olarak %19'u yenilenebilir kökenlidir. Bu nedenle, yenilenebilir enerjinin yaygınlaştırılması ve enerji kazancı miktarının artırılması talep edilmekte ve bu yönde kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, enerji ve çevre gibi farklı disiplinlere ait problemlerin çözümünde biyoyakıt hücreleri ciddi bir seçenek olarak görülmektedir (Douglas vd. 2010). Bunun yanında, enzimatik katalizörlerin daha pratik yakıt hücreleri dizaynında kullanımı, makul koşullarda (oda sıcaklığı, pH 7), yüksek seçicilik ve yüksek dönüştürme özellikleri sayesinde ilgi uyandırmıştır (Ivanov vd. 2008). BFC'lerin üretim/tüketim aşaması prensipte konvensiyonel yakıt hücrelerine göre daha sürdürülebilirdir. BFC'lerde biyokatalizörler, konvensiyonel yakıt hücrelerinde kullanılan pahalı özel metal katalizörlerin yerini aldıklarından sistem için oldukça önemli bir maliyet avantajı sağlamaktadır (Shukla vd. 2004, Bullen vd. 2006). BFC'lerde üretilen güç miktarı, düşük enerji ile çalışabilen mikro ve mini ölçekli elektronik sistemlerin (sensör-iletim sistemleri) işletilmesi için yeterlidir.

1.1.2.1 Mikrobiyal Yakıt Hücreleri

Mikrobiyal yakıt hücresi sistemleri, organik maddelerin sahip olduğu kimyasal enerjiyi, elektrik enerjisine dönüştürmeyi sağlayan reaktörlerdir. Bu dönüşümde bakteriler önemli bir role sahiptir. Verimli güç üretiminin sağlanabilmesi için mikrobiyal yakıt hücresi sistemlerinde günümüze kadar reaktör tasarımında çok sayıda yenilikler yapılmıştır. Bunlardan en yaygın olanları, iki bölmeli ve tek bölmeli mikrobiyal yakıt hücresi

sistemleridir. İki bölmeli mikrobiyal yakıt hücreleri reaktörleri, bir membranın ayırdığı anot ve katot bölümlerinden oluşmaktadır. Şekil 1.1’de iki bölmeli bir mikrobiyal yakıt hücresi sistemi şematik olarak gösterilmiştir. Anot bölümünde anaerobik olarak büyüyen mikroorganizmalar, kendilerine verilen organik besinleri kullanarak proton ve elektronlar açığa çıkarırlar. Açığa çıkan elektronlar bir devre ile katot elektroda transfer edilirken, protonların katot bölümüne geçişi bir membran aracılığı ile olmaktadır. Seçici geçirgen özelliğinden dolayı membran, sadece katyonların geçişine izin verirken, aynı zamanda katot bölümündeki oksijenin anaerobik bakterilerin bulunduğu anot bölümüne geçişini de engeller. Devre yardımıyla katot bölümüne aktarılan elektronlar ve membrandan geçen protonlar burada oksijenin indirgenmesine yol açarak su molekülü oluşturur. Tek bölmeli mikrobiyal yakıt hücresi sisteminin en önemli farkı, ayrı bir katot bölümü içermemesidir (Gezginci vd. 2011).

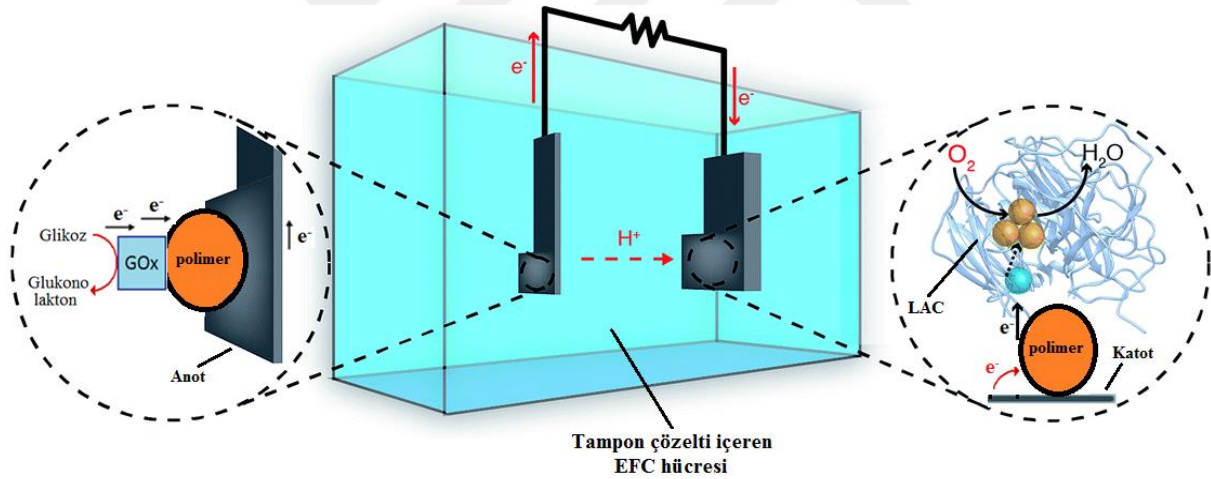


Şekil 1.1 İki bölmeli mikrobiyal yakıt hücresi sisteminin şematik gösterimi (Gezginci vd. 2011).

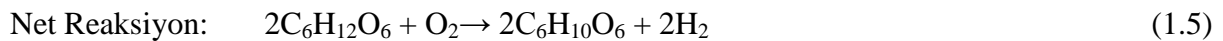
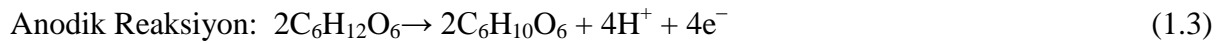
1.1.2.2 Enzimatik Yakıt Hücreleri

Enzimatik yakıt hücresi (Enzymatic fuel cell, EFC), biyokatalizör olarak mikroorganizma yerine enzimlerin kullanıldığı bir biyolojik yakıt hücresi çeşididir. Enzimle katalizlenen reaksiyonlar teorik redoks potansiyellerine yakın değerlerde gerçekleştiğinden enzim tabanlı

yakıt hücreleri, aynı gücü üreten mikrobiyal yakıt hücrelerine göre daha küçük ölçekte dizayn edilebilir (Gupta vd. 2011). Mikrobiyal yakıt hücrelerinin kullanım ömürleri uzun olmasına rağmen hücre membranlarında gerçekleşen yavaş kütle transferinden dolayı güç üretimleri düşük olmaktadır. Bunun tam aksine, EFC'lerin güç üretimleri, enzimlerin substratına spesifik olmasından ve mikroorganizmalara nazaran elektrot yüzeyinde hızlı reaksiyon vermesinden dolayı yüksektir. EFC'lerde, çoğunlukla glikozu yakıt olarak kullanan sistemler tercih edilmiştir (Liu vd. 2010). Glikozun yakıt olarak kullanıldığı EFC'lerde, glikoz anotta glikoz oksitleyici bir enzim tarafından glukonolaktone yükseltgenir ve elektronlar, bu enzim üzerinden enzimin bağlı bulunduğu polimere taşınır. Polimer aracılığıyla anoda iletilen elektronlar katoda ulaştırılır ve katot polimeri aracılığıyla katot enzimine (genellikle *lakkaz* ya da *bilirubin oksidaz*) aktarılır. Katot enzimi, üzerine aldığı elektronlar aracılığıyla ortamda bulunan oksijeni suya indirger. Bu reaksiyonlar gerçekleşirken, uygun bir hücre potansiyeli altında anottan katoda doğru sürekli bir elektron akışı sağlanır ve bu sayede devrede bir elektrik akımı üretilir. *Glikoz oksidaz* (GOx) biyoanodu ve *lakkaz* (LAC) biyokatodundan oluşan tipik bir EFC Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



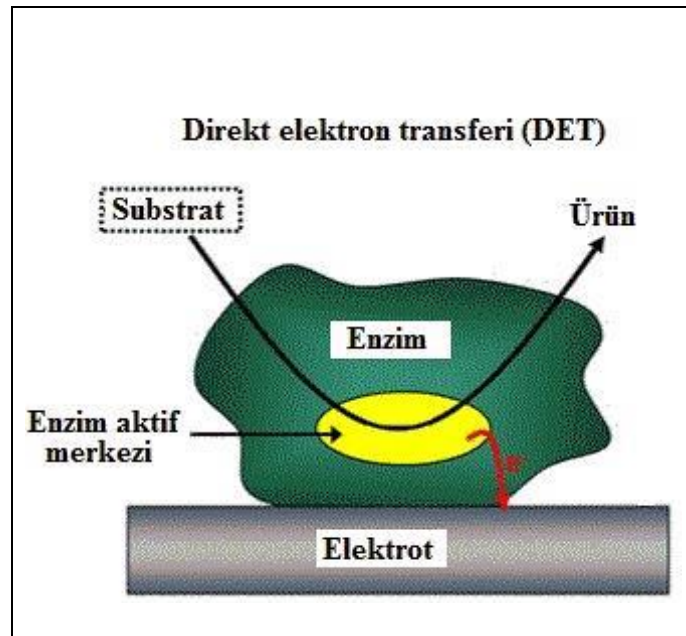
Şekil 1.2 Glikozun yakıt olarak kullanıldığı tek kompartımanlı bir EFC.



1.2 ENZİM KATALİZLİ REAKSİYONLARDA ELEKTRON TRANSFER MEKANİZMASI

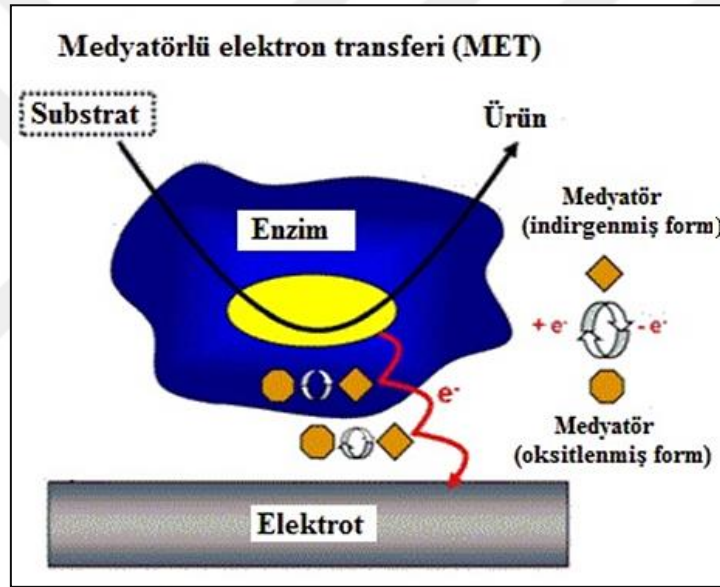
Enzimatik elektrotların dizaynındaki anahtar olay, enzim ve elektrot arasında gerçekleşen etkili elektriksel iletişimidir. EFC'lerde ortama substrat (yakıt) eklendiğinde oluşan biyokimyasal reaksiyonlar sonucu enzimin aktif merkezinden elektrot yüzeyine taşınan elektronlar ile akım üretilir. Elektronların taşınımında direkt elektron transferi (DET) ve medyatörlü elektron transferi (MET) olmak üzere iki farklı mekanizma bulunmaktadır.

Eğer bir enzim, elektrot ile kendisi arasında elektronları rahatça transfer edebilme yeteneğine sahipse bu süreç DET olarak adlandırılır. Şekil 1.3'de DET'in mekanizması şematize edilmektedir. DET gerçekleştiren birçok redoks enzimi bilinmektedir. Genel olarak, DET sergileme eğilimindeki enzimler, protein dış yüzeyine yakın olacak şekilde bulunan redoks aktif bölgelerine sahiptirler. Moleküler transformatör olarak davranan bu tip enzimler yakıtın redoks reaksiyonunu katalizler ve elektrot yüzeyine veya bir başka moleküle elektron transferini yapabilen redoks türleri sayesinde elektron transfer sürecini tamamlayarak elektrik sinyali oluştururlar (Xu 2014). DET yapabilen redoks enzimlerinin birçoğunun aktif merkezinde metal demir merkezi içeren en az bir heme grubu, demir sülfür kümeleri ve bakır gibi redoks aktif metal merkezler bulunmaktadır (Shao 2012, Xu 2014). Bu tarz enzim sistemleri medyatör kullanmadan elektron transferinin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır.



Şekil 1.3 DET şematik gösterimi.

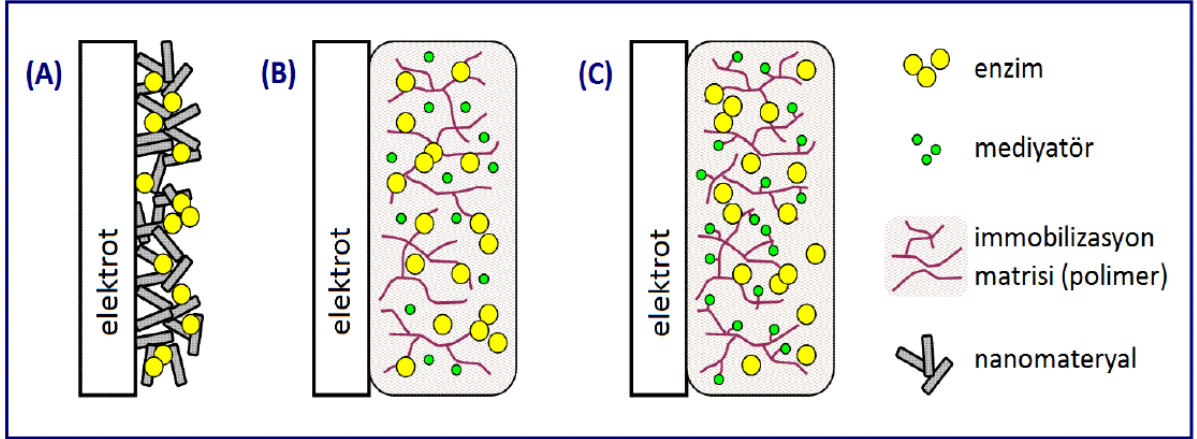
EFC'lerde çalışılan pek çok enzimde, redoks birimi protein yapısı içine derinden gömülmüş ve kalın bir karbonhidrat kabuk ile izole edilmiş bir vaziyettedir. Bu durumda, elektron transferi için kinetik bariyeri aşmak amacıyla biyoelektrokatalitik sisteme medyatör (aracı) denen redoks aktif bir tür uygulanması gerekir. Medyatörler elektronların enzim ve elektrot arasındaki elektron transferini rahatlatmak ve hızlandırmak için kullanılan maddelerdir. Bu sürece medyatörlü (aracılı) elektron transferi (MET) denir. Şekil 1.4'de MET'in mekanizması şematize edilmektedir. Uygun bir medyatör hızlı elektrokimyasal kinetik, enzimle girişim yapmayacak yükseltgenme seviyesi, kimyasal kararlılık ve tersinirlik gibi özellikler barındırmalıdır (Büyüknohutçu 2009). Bunun yanı sıra medyatörün indirgenme/yükseltgenme potansiyelinin tasarlanan EFC elektrotunun potansiyeline yakın olması üretilen güç yoğunluğuna pozitif etki edecektir.



Şekil 1.4 MET şematik gösterimi.

Medyatör kullanılan yakıt hücrelerinde verimli enerji eldesi için genellikle enzim ve medyatörün beraberce elektrot destek materyaline bağlı olması istenmektedir. Bu sayede kullanılan medyatörün çalışma ortamına kaçma riski ortadan kalkar, ayrıca medyatör yüzeyde bağlı bulunan enzime daha yakın yerleşerek enzim tarafından salınan elektronları kolaylıkla yakalar. Enzim ve medyatörler için; basit fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama (cross-linking) ve polimerik jeller içine hapsetme gibi çok çeşitli immobilizasyon (tutuklama/bağlama) stratejileri mevcuttur. Bu bağlamda, literatürde var olan enzimatik elektrotları 3 gruba ayırmak mümkündür:

- İmmobilizasyon matrisi nanoyapılı materyaller olan ve DET'e dayalı elektrotlar (Şekil 1.5A)
- İmmobilizasyon matrisi polimer olan ve medyatörü enzimle beraber sonradan immobilize edilen MET'e dayalı elektrotlar (Şekil 1.5B)
- Polimer yapısına polimerin sentez aşamasında bağlanana medyatöre sahip MET'e dayalı elektrotlar (Şekil 1.5C)



Şekil 1.5 Enzim elektrotlarının şematik gösterimi.

1.3 POLİMERLER

Gerek biyosensör sistemlerinde gerekse yakıt hücrelerinde sistem performansını etkileyen önemli konulardan birisi, kullanılacak enzimin elektrot yüzeyinde bir polimer aracılığıyla bağlanma kapasitesi ve bu polimer sayesinde yeterli iletkenliğin sağlanabilmesidir. Kullanılan polimerin fonksiyonelliği ve morfolojisi elektrik akımının üretimini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, elektrot ve enzim arasındaki elektron transferini sağlayabilecek, enzimi üzerine bağlayabilecek gruplar taşıyan orjinal polimer ve kopolimerlerin kullanılması tasarlanan EFC'lerin performansını olumlu yönde etkileyecektir.

Elektropolimerizasyon ya da kimyasal yolla sentezlenebilen iletken/yalıtkan polimerler EFC sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hali hazırda ticari olarak satılan monomerler elektrot yüzeyinde polimerleştirilerek iletken bir film oluşturabilmektedir. İletken polimerlerin yanısıra kimyasal olarak sentezlenen polimerlerin tasarlanma şekline göre enzimi adsorpsiyon yada kimyasal bağlama kabiliyeti, EFC dizaynı için geniş bir yelpaze sunmaktadır.

1.3.1 İletken Polimerler

İletken polimer kavramı, kendi örgüsü içerisindeki elektronlarla (elektronik) yeterli düzeyde elektriksel iletkenliği sağlayan polimerler için kullanılır. Bir polimerin kendisinin doğrudan elektriği elektronlar üzerinden iletebileceği, ilk kez, poliasetilen üzerine yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Poliasetilen, uzun yıllardır iletken olmadığı bilinen ve normalde siyah toz halinde bir polimerdir. H. Shirakawa, 1974'te, Ziegler-Natta katalizörü kullanarak metalik görüntüde ancak yeterince iletken olmaya gümüş renginde poliasetilen filmler hazırlamıştır. 1977 yılında H. Shirakawa, A.J. Hegger ve A.G. MacDiarmid sözü edilen poliasetilen filmlerin iyot, flor veya klor buharlarına tutularak yükseltendiğinde, iletkenliğin 10^9 kat artarak 10^5 S/m düzeyine çıktığını gözlemişlerdir. Bu değer yalıtkan karakterli teflonun iletkenliği olan 10^{-18} S/cm den çok yüksektir ve gümüş, bakır gibi metallerinin iletkenliği olan 10^6 S/m düzeyine yakındır. Shirakawa, Hegger ve MacDiarmid bu çalışmalarından dolayı 2000 yılında Kimya Nobel ödülünü kazanmışlardır (Saçak 2004).

Polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde konjüge çift bağlar bulunan polimerler sağlar. Konjügasyon yüksek düzeyde iletkenlik için tek başına yeterli değildir. Konjüge çift bağlı polimerlerin iletkenliği dop işlemiyle artırılır. Dop işlemiyle polimer yapısına iletkenliği sağlayacak olan elektronlar verilir veya elektronlar alınarak polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar oluşturulur. İletken polimerlerde iletkenliğin nasıl sağlandığı çok basit bir yaklaşımla bu boşluklar üzerinden açıklanabilir. Artı yüklü bir boşluğa başka bir yerden atlayan elektron, geldiği yerde de artı yüklü boşluk oluşturacaktır. Bu işlemler ard arda zincir boyunca veya zincirler arasında yinelenerek elektrik iletilir (Saçak 2004).

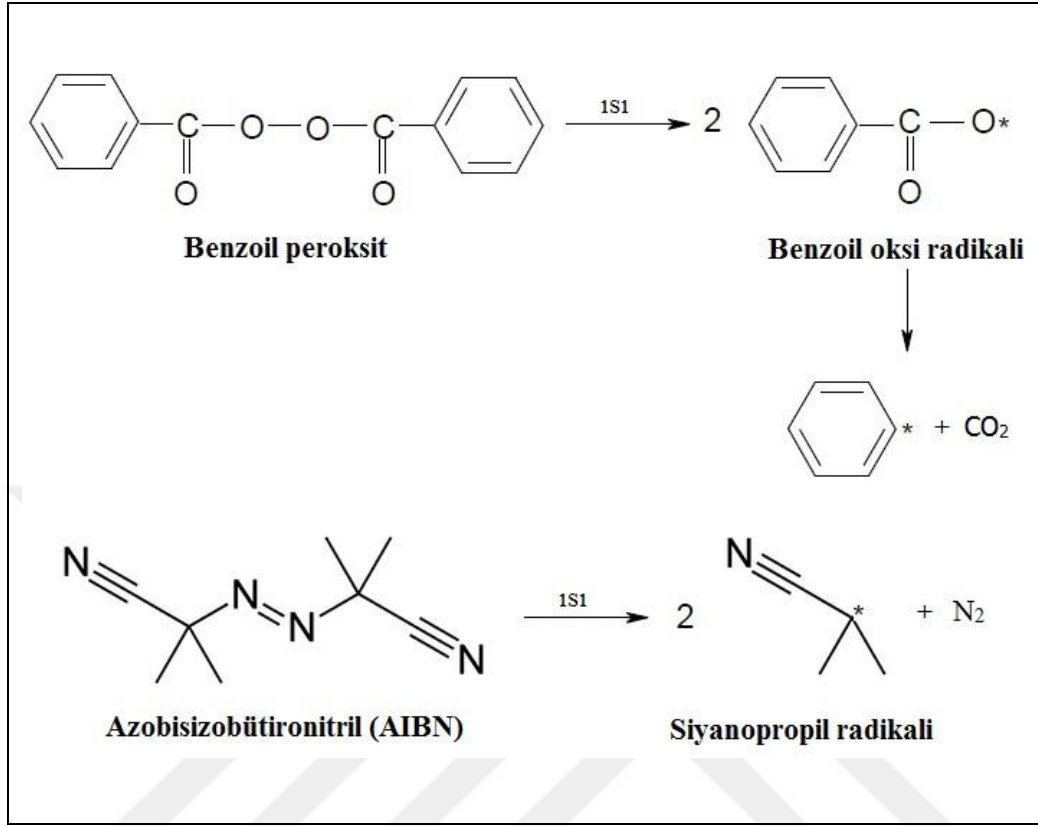
Günümüzde polipirol, polianilin, politiyofen, polifuran, poli(N-vinil karbazol) ve bu polimerlerin kimyasal türevleri gibi pek çok iletken polimer bulunmaktadır. Bazılarının film ve levha üretiminde ticari olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yakıt hücreleri ve biyosensör sistemleri için kolay elektropolimerize edilebilmeleri, film oluşturmaları, elektrot yüzeyi ve enzim arasında elektron taşınımına katkı sağladıklarından oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca elektrot yüzeyinde oluşturulan iletken filmin kalınlığı, elektropolimerizasyon süresinde değişiklikler yapılarak kontrol edilebilir.

1.3.2 Sentetik Polimerler

Polimerler istenilen kimyasal morfolojiye göre bir ya da daha fazla monomerdan sentezlenebilir ve monomer çeşidine göre homopolimerler ve kopolimerler olarak iki gruba ayrılırlar. Homopolimerler tek cins monomerin polimerleşmesiyle elde edilirler. Kopolimerler iki ya da daha fazla monomer biriminden oluşmuş polimerlerdir ve geniş bir çalışma yelpazesi sunduklarından BFC ve biyosensör çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Kopolimerler, katılma polimerizasyonu ve basamaklı polimerizasyon yöntemleriyle sentezlenebilir. Katılma polimerizasyonu özellikle radikalik kopolimerizasyon, kopolimerin sentezi için en uygun yöntemdir (Saçak 2004). Basamaklı polimerizasyon fonksiyonel gruplar taşıyan moleküller arasında adım adım ilerler. Önce iki monomer tepkimeye girerek bir dimer oluşturur. Dimer, diğer bir monomerle etkileşerek trimer veya kendisi gibi bir dimerle etkileşerek tetramere dönüşür ve benzer tepkimelerle zincirler büyümeyi sürdürür. Polimerizasyon ortamında bulunan her büyüklükteki molekül birbiriyle tepkimeye girebilir ve polimerin mol kütlesi yavaş yavaş, uzun bir zaman aralığında artar. Katılma polimerizasyonunda monomer molekülleri aktif merkezlere ard arda ve hızla katılarak zinciri büyütürler. Büyüme tepkimeleri her zaman aktif zincirlerle monomer molekülleri arasındadır. Polimerizasyonun ilk anlarında yüksek mol kütleli polimer oluşur, tepkime süresince de ortamda yalnız yüksek mol kütleli polimer ve monomer bulunur (Saçak 2004) Katılma polimerleri radikalik ya da iyonik mekanizma üzerinden sentezlenebilir. Ancak bu bölümde, yakıt hücresi ve sensör sistemlerde çok fazla ilgi gören kopolimerlerin sentezlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem olan radikalik katılma polimerizasyonu incelenecektir.

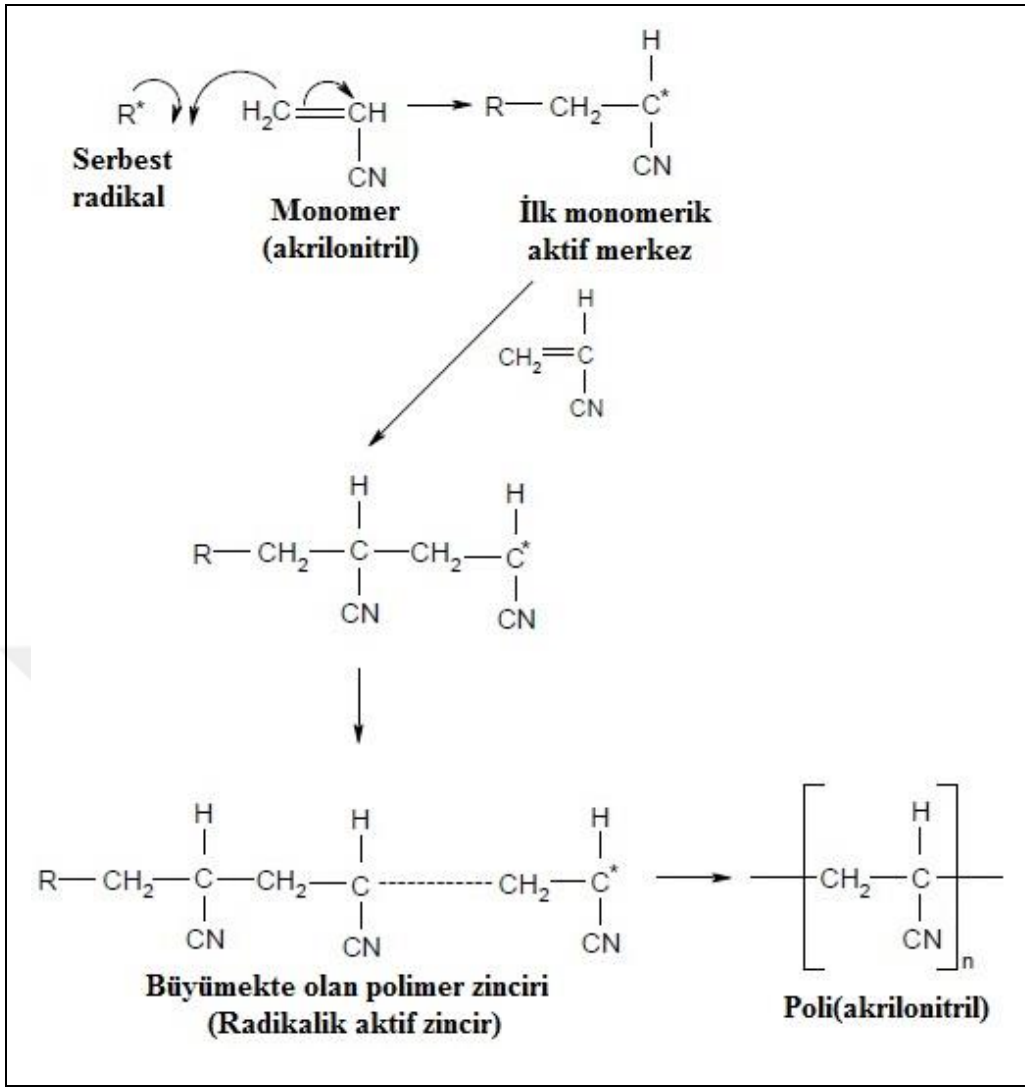
Radikalik polimerizasyona yatkın bir monomerin polimerizasyonu, bu monomerin varlığında polimerizasyon ortamında serbest radikaller oluşturularak başlatılır. Polimerizasyonu başlatacak serbest radikaller, kimyasal maddeler veya bazı fiziksel etkenlerden yararlanılarak üretilir. Organik peroksit veya hidroperoksitler, azo bileşikleri, redoks başlatıcılar ve organometalik bileşikler gibi kimyasal gruplar içeren maddeler, normal koşullarda kendiliğinden ya da ısı etkisiyle parçalanarak radikal oluşturan bileşiklerdir. Bu kimyasal gruplar arasında yaygın olarak kullanılan başlatıcılara örnek olarak azobisisobütironitril (AIBN) ve benzoil peroksit verilebilir. Şekil 1.6, AIBN ve benzoil peroksitin radikal oluşturma reaksiyonlarını göstermektedir. Isı, ışık ve yüksek enerjili ışınlar radikalik

polimerizasyonu başlatabilen fiziksel etkenlerdir. Bunların yanı sıra elektrokimyasal metotla radikal üretmek polimerizasyona olanak sağlayan bir başka yöntemdir.



Şekil 1.6 Başlatıcı reaksiyonları.

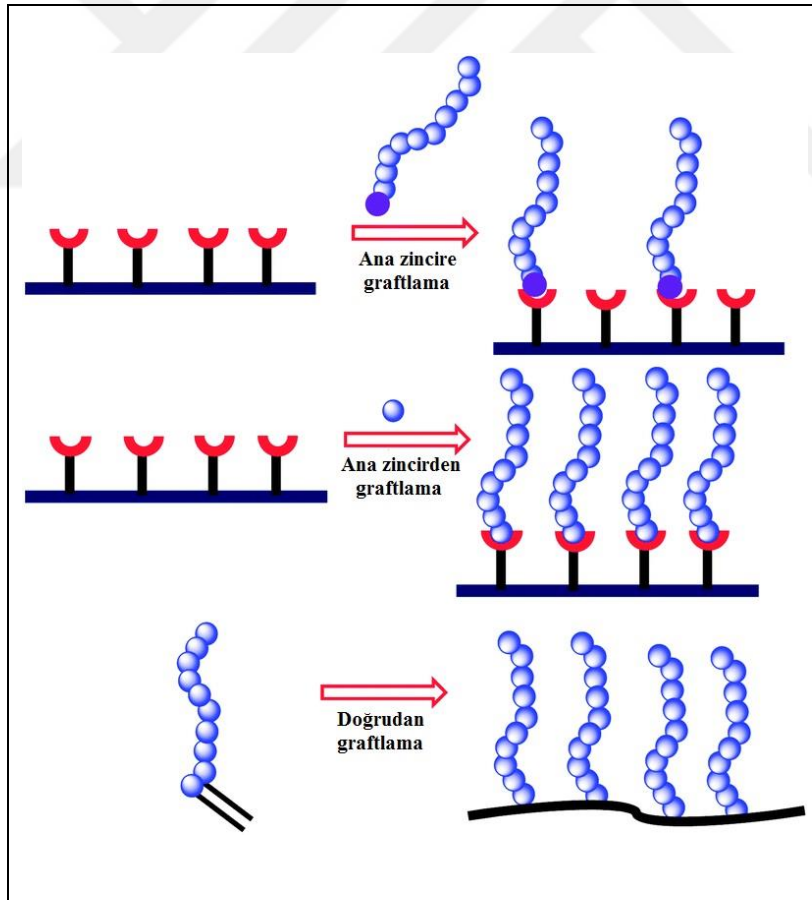
Katılma polimerizasyonuna zincir polimerizasyonu da denir. Başlama basamağını büyüme ve sonlanma adımları takip eder. Büyüme adımında, aktif radikalik merkezler hızla monomer moleküllerini katarak zinciri büyütürler. Aktif polimer zincirlerinin ortamda bulunan herhangi bir molekülle etkileşerek aktifliklerini yitirdikleri ve ölü polimer zincirlerine dönüştükleri kısım, sonlanma adımı olarak adlandırılır. Sonlanma iki aktif zincirin birleşerek sonlanması ya da ayrı ayrı sonlanması şeklinde olabilmektedir. Şekil 1.7’de radikalik katılma polimerizasyonuna örnek olarak akrilonitrilin polimerizasyonu detaylı bir şekilde gösterilmektedir.



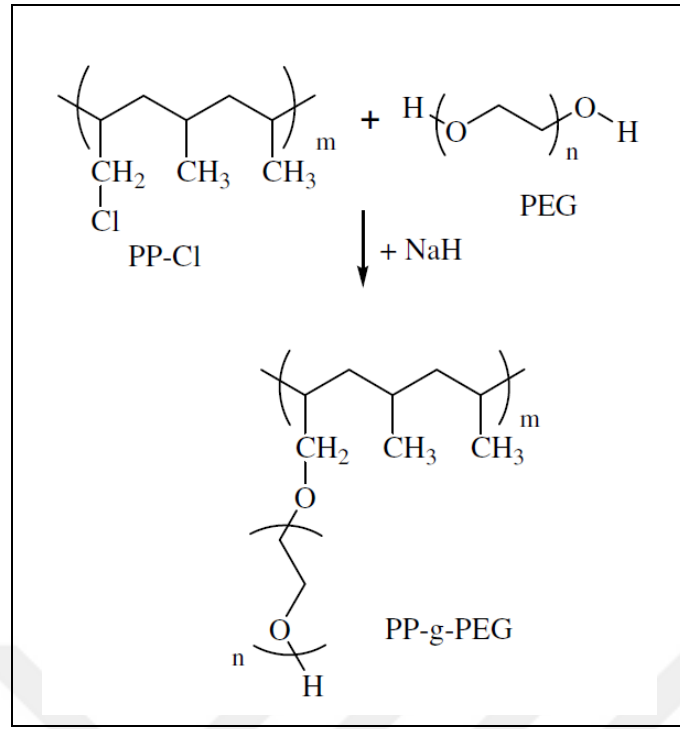
Şekil 1.7 Akrilonitrilin radikalik katılma polimerizasyonu mekanizması.

Radikalik kopolimerizasyonu ile istenilen morfolojide ve özellikle sentezlenebilen kopolimerler, zincir boyunca tekrarlayan birimlerinin dağılımına göre sınıflandırılırlar. Gelişigüzel, ard arda, blok ve grafit (aşı) kopolimerler olmak üzere dört kısma ayrılırlar. Bu alt birimler arasında grafit (aşı) kopolimerler biyolojik sistemlerde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Grafit kopolimerler, aynı tür monomer içeren polimer zincirinin bir veya daha fazla yerinden dallanma yaparak oluşurlar. Bu teknikle dallanma yapan monomerler farklı türden olmalıdır. Grafit kopolimer üç şekilde gerçekleşir: ana zincirden grafitlama (grafting from), ana zincire grafitlama (grafting onto) ve doğrudan grafitlama (grafting through) şeklinde tarak ya da fırça tipi grafit kopolimerlerdir (Hazer 1995, Hazer 2015, Şanal vd. 2015). Şekil 1.8’de grafit kopolimer türleri şematize edilmiştir (Banerjee vd. 2014). Ana zincirden grafitlanmada (grafting from) fırça tipi grafit kopolimer elde edilir ve genellikle grafitlanan yan zincirler çizgisel bir ana zincirden oluşur. Tarak tipi grafit kopolimerler ise ana

bir polimer zincirinden oluşur bir tane veya daha fazla zincir kovalent bağlarla birbirlerine bağlanır. Ana zincir uzunluğu, grafitin yoğunluğu ve yan zincirlerin uzunlukları toplam molekül ağırlığını belirler ve tarak türü grafit kopolimerin özelliklerini etkiler (Balcı vd. 2010, Ataman 2010). Grafit kopolimerlerin sentezi için bir başka yöntem Williamson eter sentezi olarak bilinen bir nükleofilik yer değiştirme tepimesidir. Bu sentez, bir sodyum alkoksitin, bir alkil halojenür, bir alkil sülfonat veya bir alkil sülfatla verdiği SN2 tepkimesini içerir (Solomons and Fryhle 2000). Williamson eter sentezi ile elde edilen Polipropilen-g-Polietilenglikol (PP-g-PEG), Şekil 1.9’da gösterilmektedir (Balcı 2010, Kalaycı 2010). Grafit kopolimerlerin amfifilik özellik kazandırılarak sentezlenmesi de polimerin morfolojisinde ve özelliklerinde önemli değişikliklere sebep olabilir (Allı ve Hazer 2008, Kılıçay vd. 2010). Amfifilik kopolimerler hidrofilik ve hidrofobik özelliklere sahip bloklar içeren polimerlerdir. Çeşitli tasarımlarda sentezlenebilen (graft, blok vb.) amfifilik kopolimerlerin hidrofilik ve hidrofobik birimlerinin polimer içerisindeki miktarları değiştirilerek polimere yeni özellikler kazandırılabilir.



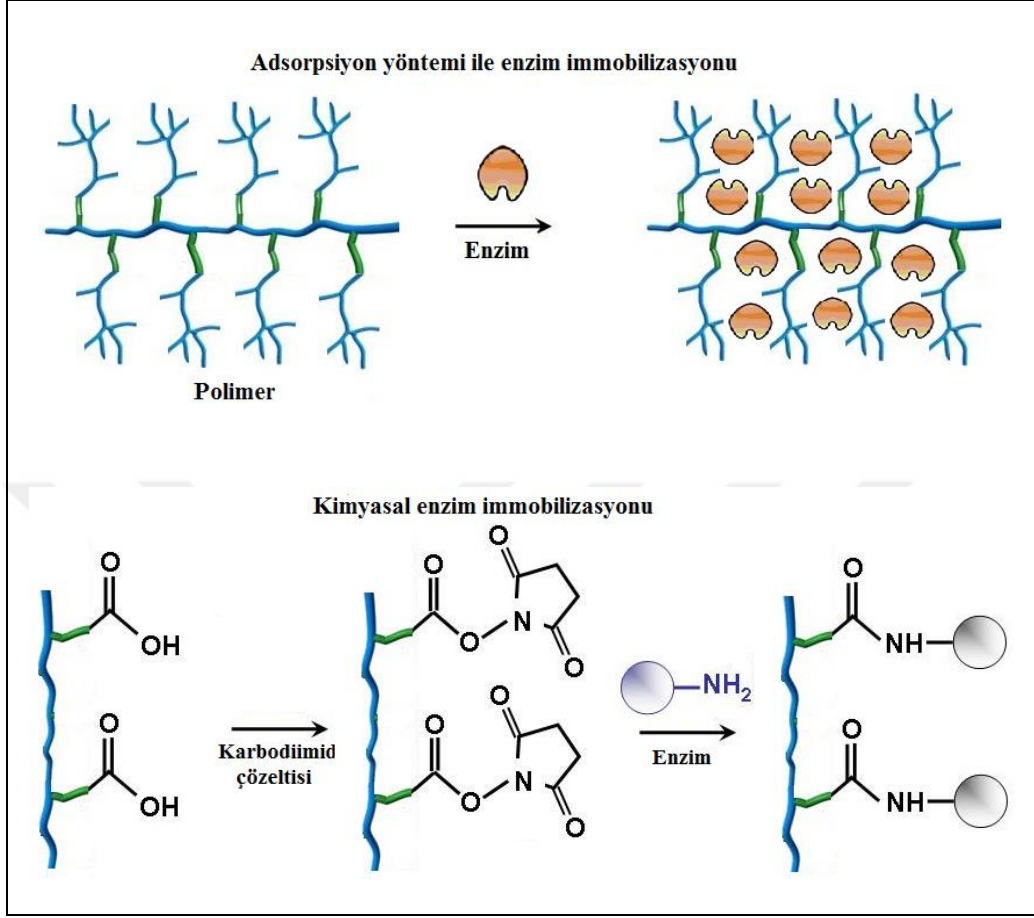
Şekil 1.8 Grafit kopolimer türleri.



Şekil 1.9 Williamson eter sentezi ile PP-g-PEG eldesi.

EFC çalışmaları için sentezlenen kopolimerlerin bilinen konsantrasyondaki çözeltileri altın, camlı karbon, platin gibi çalışma elektrotlarının yüzeyine damlatılarak kullanılır. Çözücüsü oda sıcaklığında uçurulmuş olan kopolimerin elektrot yüzeyinde polimerik bir film oluşturması beklenir. Oluşan kopolimerik film EFC sisteminde kullanılacak olan enzimlerle muamele edilerek çalışma elektrodu hazır hale getirilmektedir. Bu işlem kopolimer kaplı yüzeye enzim çözeltisi damlatma ya da kopolimer filmin enzim çözeltisinde belli bir süre bekletilmesiyle yapılmaktadır. Enzimler, kopolimere ya kimyasal olarak bağlanır ya da adsorpsiyon yoluyla tutuklanır. Enzim immobilizasyon metodu, sentezlenen kopolimerin kimyasal gruplarına göre belirlenmektedir. Karboksilik asit ve amin grupları gibi kimyasal yapıları bünyesinde bulunduran kopolimerler, enzimlerin kimyasal yoldan kopolimere bağlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu gruplar ile enzimler arasındaki kimyasal bağın oluşabilmesi için bağlanma ajanları kullanılmaktadır. Bağlanma ajanları karboksilik asit grupları için karbodiimid çözeltisi ve amin grupları için gluteraldehit çözeltisidir. Aktifleştirme işlemi kopolimer kaplı yüzeye bağlanma ajanı çözeltisi damlatma ya da kopolimer filmin bağlanma ajanı çözeltisinde belli bir süre bekletilmesiyle yapılmaktadır ve bu işlemden sonra enzimle muamele edilerek kimyasal bağlanma gerçekleştirilir. Adsorpsiyon yöntemi ise enzim moleküllerinin, fiziksel olarak destek materyali yüzeyine ve porlarına tutunmasıyla gerçekleştirilir. Şekil 1.10'da adsorpsiyon ve kimyasal yöntem ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonunun şematik hali gösterilmektedir. Kimyasal olarak

bağlanan enzim ve kopolimer arasında kovalent bağlar oluşurken, adsorpsiyon ile tutuklanan enzim ile kopolimer arasında fiziksel etkileşim oluşmaktadır.



Şekil 1.10 Adsorpsiyon ve kimyasal yöntem ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu.

BFC'lerde polimerler kompozitler şeklinde de kullanılmaktadır. İki veya daha fazla farklı maddenin veya malzemenin kullanım amacına yönelik karıştırılması veya belli bir düzende bir araya getirilmesiyle hazırlanan yeni malzemelere kompozit denir. Kompozitler çözünen veya çözen bileşenlerden oluşmadığı gibi bileşenleri arasında atom alışverişi gibi kimyasal etkileşimler bulunmaz. Kompozitlerin hazırlanmasındaki temel amaç, farklı maddelerin iyi özelliklerini bir malzeme altında toplayabilmektir. Kompozitlerle hazırlanan malzemelerde iyi film oluşturabilme, yüksek dayanım, kararlılık, sıcaklığa dayanıklılık, düşük ağırlık, ısı iletkenliği, elektriksel iletkenlik, elektriksel direnç ve benzeri özellikler gözlenir (Ataman 2010).

1.4 POLİMERLERİN MODİFİKASYONLARI

Kimyasal ya da adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilize edilebilen polimerik filmlerin modifiye edilmesi EFC performansını arttırabilmektedir. EFC'lerde kullanılan GOx gibi bazı enzimlerin aktif merkezleri protein yapının derinlerinde gömülü olduğu için enzim/substrat reaksiyonu sonucu ortaya çıkan elektronların transferi daha zor olmaktadır. Elektron transferini kolaylaştırma ya da hızlandırma amacıyla medyatör (karbon nanotüpler, ferrosen, *p*-benzokinon, nötral kırmızısı, nanopartiküller vb.) kullanmak, daha fazla enzim molekülü bağlayabilen ve elektron transferini hızlandıran elektroaktif fonksiyonel gruplarla polimerleri modifiye etmek EFC performansında önemli katkılar sağlamaktadır.

Nanomalzemelerin elektronik, magnetik, optik, fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyo uyumluluğu ile birleştiğinde EFC performansını olumlu yönde etkilemektedir (Kırkistolayte 2009). Ayrıca nanomalzemelerin maliyetinin ucuz olması avantaj yaratmaktadır. Nanopartiküller, ince filmler ve nanotüpler olarak üretilen malzemeler, çok küçük boyutları sebebiyle teknolojide önemli kullanım alanlarına sahiptirler. Nanoteknolojinin en önemli ve güncel konularından biri, çok önemli mekanik ve elektronik özelliklere sahip olan karbon nanotüplerdir. İdeal bir nanotüp, düzgün bir silindir oluşturmak için yuvarlatılmış karbon atomlarından oluşmuş hegzagonal ağ gibi düşünülebilir. Nanometrik boyutlu silindir, mikronun onda biri uzunluğunda olabilir. Karbon nanotüpler, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (CNT) olmak üzere iki grupta toplanırlar. Tek duvarlı karbon nanotüpler temel yapı gibi düşünülebilir ve bu da çok duvarlı nanotüplerin yapı taşı oluşturur (Dolaştır 2009). Nanometrik boyutta silindirik grafen tabakalarından oluşan karbon nanotüpler kendine özgü karakteristik özelliklere sahiptir. Yüzey alanı/kütle oranının büyük olması, yüksek elektrik iletkenliği ve mekanik dayanıklılığı bu özellikler arasında sıralanabilir (Merkoçi vd. 2005). Son yıllarda karbon nanotüp, iletkenliğinin çok yüksek olması nedeniyle hassas ölçümler yapılmasına imkan sağlayabildiği için bir çok amperometrik biyosensör ve biyolojik yakıt hücresi çalışmasında kullanılmıştır. Örneğin, karbon nanotüple modifiye edilmiş polipirol film ile hazırlanan amperometrik fenol biyosensörü çalışmasında karbon nanotüpsüz hazırlanan biyosensöre göre oldukça yüksek akımlar gözlenmiştir ve karbon nanotüple modifiye edilen elektrot ile daha düşük fenol konsantrasyonları ölçülebilmektedir (Korkut vd. 2008). Bir başka çalışmada, ticari olarak satılan kurşun kalem grafit elektrotlarına kimyasal olarak LAC enzimi immobilize edilerek iki farklı çalışma elektrodu hazırlanmıştır. Çalışma elektrotlarından birine elektropolimerizasyon

yöntemiyle polianilin film oluşturulduktan sonra kimyasal olarak MWCNT (E1 elektrodu) bağlanırken diğerine direkt olarak MWCNT (E2 elektrodu) bağlanmıştır. E1 çalışma elektroduna 0.58 V uygulayarak $295.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve E2 çalışma elektroduna 0.60 V uygulayarak $228.94 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ akım yoğunluğu elde edilmiştir (Kashyap vd. 2015).

Son 15 yıldır karbon nanotüplerin yanısıra, altın nanopartiküller de EFC çalışmalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Rasmussen vd. 2015). Yüksek akım yoğunluğu elde etmek için kullanılan altın nanopartiküller stabil, iletken ve biyouyumlu nanomalzemelerdir (Krikstolaityte 2009). Kimyasal yoldan ya da elektropolimerizasyon yoluyla sentezlenen polimerler altın nanopartiküllere modifiye edilerek kullanılabilir. Bir grup araştırmacı tarafından yapılan mikrobiyal yakıt hücresi çalışmasında, karbon kağıt çalışma elektrodu altın nanopartiküllerle modifiye edilerek kullanılmıştır. Siklik voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi sonuçları ile altın nanopartiküller içeren çalışma elektrodunun sadece karbon kağıt ile hazırlanan çalışma elektroduna göre daha iyi elektrokimyasal davranış gösterdiği tespit edilmiştir. Modifiye elektrotta daha yüksek elektroaktif yüzey ve artan elektron transfer hızı, sistemin performansını olumlu yönde etkilemiştir. Karbon kağıt ile hazırlanan çalışma elektrodundan $174 \text{ mW}/\text{m}^2$ 'lik, altın nanopartiküllerle modifiye çalışma elektrodundan $346 \text{ mW}/\text{m}^2$ 'lik güç yoğunluğu hesaplanmıştır (Guo vd. 2012). BFC ve biyosensör çalışmaları için altın nanopartiküllerin yanı sıra platin, kobalt, gümüş, nikel, bakır, indiyum, pladyum gibi nanopartiküller hazırlanarak biyolojik sistemlerde etkinliği araştırılmaktadır (Li vd. 2013, Ciszewski and Stepniak 2013, Kunga vd. 2014, Yuan vd. 2014, Dhara vd. 2014, Wang vd. 2014).

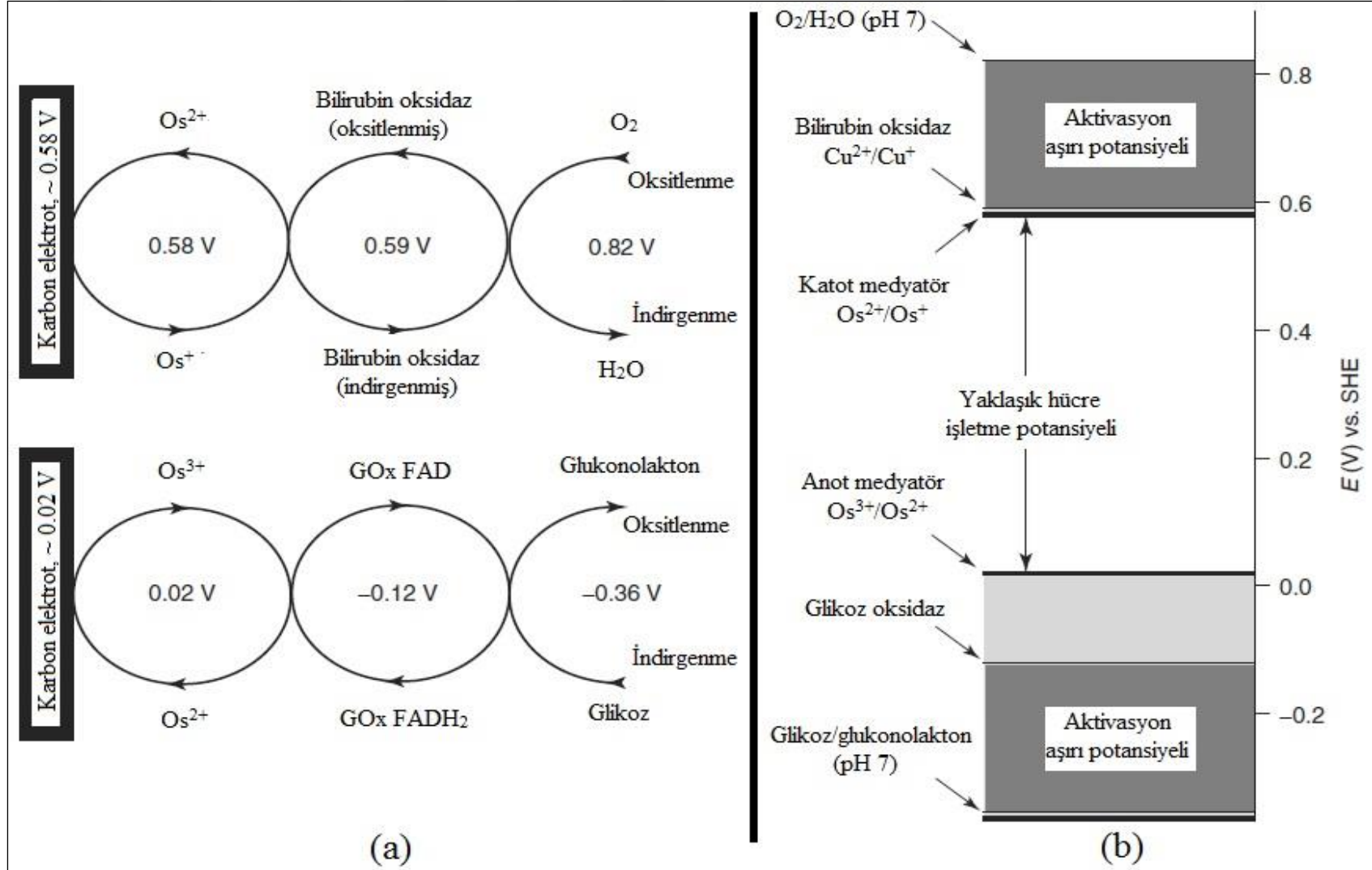
1.5 LİTERATÜR ÖZETİ

Enzimlerin substrat spesifikliğı sayesinde, mikrobiyal yakıt hücrelerinde anot ve katot arasına yerleştirilen seçici membrana gerek duyulmamaktadır (Brunel vd. 2007). Bu özellik EFC'lere çevresel ve *in vivo* ortamlarda kullanım kolaylığı sağlamanın yanında sistem minyatürizasyonuna da olanak sağlar ve aynı zamanda hazırlanan EFC sistemlerinin ticarileştirilmesi için gereklidir. Buna rağmen, literatürde arada membran olmadan, anot ve katodun tek bir kompartımanda kullanıldığı EFC uygulaması oldukça azdır (Osman vd. 2011). Üstelik bu az sayıda raporda elde edilen güç oldukça düşüktür. *Glikoz dehidrogenaz* enziminin karbon anot üzerinde tutturulup glikozun yakıt olarak kullanıldığı tek kompartmanlı EFC çalışmasında 0.06 V'luk hücre potansiyeli değerinde $50 \text{ nW}/\text{mm}^2$ 'lik bir güç üretimi sağlanabilmiştir (Katz vd. 1999a). Tsujimura ve grubu, 50 mM glikoz içeren oksijene doyurulmuş

membransız tampon ortamında glikozu yakıt olarak kullanmış ve 0.19 V'luk hücre potansiyelinde 580 nW/mm² lik bir güç üretmiştir (Tsujimura vd. 2002). Chen ve grubu, GOx ve LAC enzimlerini 2 cm uzunluğundaki karbon fiber elektrotlara bağlayarak tek kompartmanlı bir yakıt hücresi tasarlamış, hücreyi 37°C sıcaklıkta çalıştırarak, 0.38 V'luk hücre potansiyelinde 0.6 µW/mm² lik bir güç elde etmiştir (Chen vd. 2001). Söz konusu çalışmada pH değeri 7.2'dir ve bu değer sadece GOx için uygun bir değer olup, LAC enziminin düşük aktivite gösterdiği bir değerdir. Diğer bir EFC çalışmasında güç üretimi 0.78 V gibi yüksek bir hücre potansiyelinde 2.7 µW/mm² olup, üstelik bu çalışmada bir medyatör elektron transferini artırma amacıyla kullanılmıştır (Mano vd. 2003a). *Alcohol dehydrogenase* ve GOx enzimlerinin çubuk şeklindeki karbon elektrotlara tutturulmasıyla hazırlanan başka bir EFC çalışmasında 10 nW/cm² lik bir güç üretimi sağlanabilmiş ve hazırlanan yakıt hücresinin kullanım ömrü 2.5 gün olarak rapor edilmiştir (Ramanavicius vd. 2005). Glikozu yakıt olarak kullanan diğer tek kompartmanlı EFC çalışmalarında üretilebilen güç değerleri, Coman vd. 2008 tarafından 0.05 µW/mm² ve Wang vd. 2009 tarafından 0.0138 µW/mm² olarak rapor edilmiştir. Medyatör kullanılmadan yapılan EFC çalışmalarında şimdiye bulunan en yüksek güç üretimi 10 µW/mm² dir (Kamitaka vd. 2007, Katz vd. 1999b, Tsujimura vd. 2002, Chen vd. 2001, Mano vd. 2003b, Coman vd. 2008, Ramanavicius vd. 2005, Wang vd. 2009, Zayats vd. 2005). Söz konusu çalışmalarda elektrotların akım üretim kabiliyetlerinin geliştirilmesi için elektrot fabrikasyon basamağı üzerine detaylı çalışmalar yapılmamıştır. Tez kapsamında bu aşamada yoğun çalışmalar yürütülmüş, geliştirilen EFC'ler yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılan bitkiye ve şeker bazlı atıksuya daldırıldığından tek bir kompartmanda işletilmiştir. Bu bağlamda çalışma ortamı her iki enzimin yüksek aktivite göstereceği biçimde optimize edilmiştir.

EFC'lerde yüksek performans elde edebilmek için sistemde medyatör kullanılması, elektrot ve enzim arasında gerçekleşen elektron akışını hızlandıracağından uygun görülmüştür. Bunun yanı sıra, GOx yüksek aktivite gösteren bir enzim olmasına rağmen, aktif merkezi derinde bulunduğundan elektron transferi için bir medyatör kullanılması faydalı olmuştur. Şimdiye kadar yapılan EFC çalışmalarının çok azında medyatör kullanımına rastlanmıştır, medyatör kullanılmasına rağmen sistem performansının artırılmadığı elde edilen güç değerleri yönünden açıkça belli olmaktadır. Üstelik kullanılmış olan medyatörler genellikle elektrot yüzeyindeki polimere enzimle beraber immobilize edilerek sonradan tutturulmuştur. Medyatörlerin bu şekilde kullanımı işletim sırasında polimerik malzemeden medyatörün kaçmasına büyük ölçüde olanak sağlar. Örneğin; medyatörlü bir EFC çalışmasında elektroda tutturulmuş olan medyatörlerin üzeri kaçı engellemek için Nafyon ile kaplanmıştır. 0.63 V gibi yüksek bir hücre potansiyeli oluşarak

elde edilen güç değerinin $0.23 \mu\text{W}/\text{mm}^2$ olduğu belirtilmiştir (Cosnier vd. 2010). Böyle bir uygulamada medyatör üzerinin kaplanması, medyatör ile enzim arasında kütle transferini güçlendirebilmekte, ayrıca EFC'nin kullanım pratikliğini azaltabilmektedir. Bu nedenle kullanılacak olan medyatör, polimerin polimer sentez aşamasında ana veya yan gruplarına takılmalı, bu sayede medyatör kaybının önüne geçilmelidir. Buna ek olarak, medyatörün elektrot yüzeyinde bağlı bulunması elektrot ile yakın temasını sağlayacağından elektron transfer ihtimalinin oldukça yüksek olması beklenir (Barton 2009). Medyatörün polimerin kendi yapısında bulunması aynı zamanda işletim sırasında çalışma ortamına medyatör eklenmesini gerektirmez. Tez kapsamında kullanılan medyatörler (altın, kobalt vb.), polimerlerin sentez aşamasında ana yapıya takılmış olduğundan geliştirilen EFC'lerde yukarıda açıklanmaya çalışılan sıkıntılarının önüne geçilebilmiştir. Literatürde EFC'ler için kullanılmış medyatörler; ferrosen, tetratiyafülvalen, 8-hidroksikinolin-5-sülfonik asit ve osmium kompleksidir (Cosnier vd. 2010, Nazaruk vd. 2008, Merle vd. 2009, Mano vd. 2005). Bu çalışmalar arasında en yüksek performans osmium kompleksinin kullanıldığı çalışmadan elde edilmiştir ($13 \mu\text{A}/\text{mm}^2$). Fakat, osmiumun kuvvetli bir redoks açıcı madde olduğu bilinmesine rağmen, osmium ile bir çalışma elektrodu hazırlamak oldukça kompleks ve çok sayıda aşamayı içermektedir (Ivan vd. 2011). Ayrıca osmium oldukça pahalı bir maddedir ve yakıt hücrelerinde toksidite yarattığı rapor edilmiştir (Barton vd. 2004). Seçilen medyatörün, hazırlanacak sistemde elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyoelektrokimyasal olaylara uyumluluk göstermesi ve elektrot fabrikasyon ve işletim basamaklarında sorun yaratmaması şarttır. Zayat vd. 2005, GOx enzimini altın nanopartiküllerle modifiye ederek enzimin elektriksel iletim kapasitesini artırmıştır. Çalışmada altın nanopartiküllerin enzimle oldukça uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, tez kapsamında GOx enzimi anodik enzim olarak kullanılacağından, kullanılması planlanan medyatörler arasında altın nanopartiküller içeren polimerlere de yer verilmiştir. Şekil 1.11'de medyatörün kullanıldığı bir devre gösterilmektedir. Devrede elektron akışı artan potansiyel yönünde gerçekleşmektedir. Kullanılacak olan medyatörün elektrot potansiyel değeri enzimatik reaksiyonun gerçekleşebildiği potansiyel değeriyle uyum sağlamalıdır. Bu nedenle kurulacak sistem için uygun medyatörlerin seçilmesi önemlidir. Şekil 1.11b'de görüldüğü gibi medyatör kullanımı, hücre potansiyelini önemli oranda düşürmektedir. Bu sayede medyatörlü sistemlerde daha düşük hücre potansiyellerinde enerji elde edilebilmekte ve uygun medyatör kullanımı sistemin ekonomik olmasına olanak sağlamaktadır (Ivanov vd. 2011, Cosnier vd. 2010, Nazaruk vd. 2008, Merle vd. 2009, Mano vd. 2005, Barton vd. 2004).



Şekil 1.11 Medyatör kullanılan EFC'ler için potansiyel şeması.

Enzim immobilizasyon metodu, enzimatik aktiviteyi etkilemektedir. İmmobilize enzimlerin stabilitesi, polimerle yaptıkları bağ gücüne, buldukları mikroçevreye, aktivite gösterdikleri reaksiyon ortamının içeriğine ve immobilizasyon ortamına bağlıdır. Bu nedenle, gerek enzim denatürasyonunu önlemek gerekse aktivitesini kısıtlamamak için uygun immobilizasyon metodu seçilmelidir. Bu seçim yapılırken kullanılacak olan polimerin morfolojisi de göz önünde bulundurulmalıdır. EFC ve biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan immobilizasyon metodları; fiziksel yüzey adsorpsiyonu, iletken polimer ya da hidrojeller içine hapsedme ve fonksiyonel polimerlere kovalent bağlama şeklinde sıralanabilir (Osman vd. 2011). Enzim immobilizasyon için en kolay metot fiziksel adsorpsiyondur. Enzimler, karbon siyahı ve grafit tozu gibi iletken partiküller üzerine adsorbe edilebilir (Pizzariello vd. 2002). İşlem basit ve düşük maliyetlidir. Fakat enzim ve polimer arasındaki bağ gücü (genellikle elektrostatik) çok zayıfsa, enzimin polimerden koparak ortama difüze olma ihtimali söz konusu olup, bu durum aynı zamanda çalışma ortamında da kontaminasyona neden olacaktır. Polimer porlarına hapsedme metodunda, polimerik yapı, hapsolan enzimin hareket kabiliyetini kısıtlamamalıdır. Bu metotla immobilize edilen enzimlerde substrat temasının sağlanması, substratın porlar içine difüze olabilmesine bağlıdır. Hapsedme metodu kullanılarak hazırlanan bir etanol/O₂ biyoyakıt hücresinde yapılan dönüşümlü voltametri çalışması sonucunda, enzimatik reaksiyon için kütle transferinin sınırlayıcı basamak olduğu rapor edilmiştir (Minteer vd. 2004). Kovalent bağlanma metodu ile enzim ve polimer arasında güçlü bir kimyasal bağ kurulur. Bu metotta, polimerler üzerinde bulunan fonksiyonel enzim bağlayıcı gruplar kimyasal bağ kurulumuna olanak sağlar. Enzimler üzerinde taşıdıkları amin, hidroksil ve karboksil grupları üzerinden bağ yapar. Bu grupların enzim aktivitesini engellemeyen gruplar olmasına dikkat edilmelidir. Kovalent bağ, enzimi kuvvetlice bağladığından sistem kararlılığı bakımından EFC'lerde yaygın olarak kullanılmıştır (Willner vd. 1998, Katz vd. 1999a, Katz vd. 2001, Katz vd. 2003a, Katz and Willer 2003b, Katz and Willer 2003c). Bununla beraber polietilenglikol ve glutraldehit gibi çapraz bağ ajanları kullanılarak gerçekleştirilen kovalent bağlama metodlarının immobilize enzim stabilitesini artırdığı rapor edilmiştir (Soukharev vd. 2004, Katz vd. 1998, Bardea vd. 1997). Enzim immobilizasyon metodu, elektrot yüzeyinde bulunan polimerin yapısına uygun seçilmeli, enzim ve polimer arasında güçlü bir oryantasyon sağlanmalı ve seçilecek metodun enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine olumsuz etkisi olmamalıdır. Tez kapsamında incelenecek önemli parametreler arasında immobilizasyon metodu yer almaktadır. Literatürde EFC'lerde görülen bir diğer önemli sorun EFC kullanım ömrüdür (0,33-2 gün arasında) (Pas 2007, Willner vd. 1998, Katz vd. 1999a, Kang vd. 2004). Bu sorun ana olarak immobilize edilen enzimin stabil olmamasına bağlıdır. Elektrot

yüzeyindeki enzimin stabil olması büyük ölçüde immobilizasyon metoduna bağlıdır. Bu nedenle tez kapsamında kullanılacak polimerlere uygun farklı immobilizasyon metotları denenmiştir. Şimdiye kadar yapılan EFC çalışmalarında, performans üzerine aynı enzim için farklı immobilizasyon metotlarının etkisi incelenmemiştir.



BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 KULLANILAN KİMYASALLAR VE EKİPMANLAR

Potasyum fosfat, sodyum hidroksit, potasyum klorür, gümüş nitrat ($\geq 99.5\%$), lityum perklorat ($\geq 95\%$), D(+) glikoz monohidrat, metanol ($\geq 99.7\%$, GC grade), tetrahidrofuran (THF, $\geq 99.8\%$), kloroform (99-99.4%, GC grade), toluen (99.9%, HPLC grade), hidroklorik asit (36.5-38%), *glikoz oksidaz* (from *Aspergillus niger*, ≥ 100000 units/g solid (149800 units/g solid)), *lakkaz* (from *Trametes versicolor*, ≥ 10000 units/g solid (13600 units/g solid)), *bilirubin oksidaz* (from *Myrothecium verrucaria*, 15000-65000 units/g solid (29000 units/g solid)), N-hidroksisüksinimid, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid, sodyum dodesil sülfat ($\geq 98.5\%$, GC grade), 3-metil tiyofen (98%), 3-tiyofen asetik asit (98%), pirol-2-karboksilik asit (99%), *p*-benzokinon (98%), nötral kırmızısı (90%), albumin (from bovine serum, $\geq 98\%$), klorlanmış polipropilen ($M_w=150000$ Da), polietilen glikol ($M_n=8000$ Da), altın(III) klorür (HAuCl_4 , $\geq 49\%$ Au), kobalt(II) klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%), sodyum hidrür (NaH, 60% dispersion in mineral oil), sodyum borohidrür (NaBH_4), imidazol, poli(stiren-b-izopren-b-stiren) (14 wt% of styrene), merkaptopropiyonik asit ve benzofenon Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Dipotasyum hidrojen fosfat, sitrit asit monohidrat, trisodyum sitrat, ferrosen ($\geq 98\%$), sodyum klorür, asetonitril ($\geq 99.9\%$, HPLC grade), diklorometan, coomassie brilliant blue G250, tetrabütülamonyum tetrafloroborat (TBAFB), glutraldehit (25%) Merck firmasından ve grafen, Aegean Nanotech. firmasından temin edildi.

CHI1040C marka potansiyostat, altın çalışma elektrotları (çapı: 2 mm), camsı karbon çalışma elektrotları (çapı: 3 mm), Ag/AgCl referans elektrotları, Ag^0/Ag^+ susuz referans elektrotları, platin karşıt elektrotlar, elektrot temizleme kitleri, cam hücreler ve teflon kapakları CH Instruments firmasından alındı. Deneysel süreçte kullanılan SEM, FT-IR ve UV-VIS spektrofotometre sırasıyla Quanta FEG 450, Perkin Elmer Spectrum 100 ve Shimadzu UV

1800 marka ve modeldir. Küçük hacimlerde kullanmak üzere Eppendorf firmasından temin edilen otomatik mikropipetler kullanıldı. IKA C-MAG HS7 marka manyetik karıştırıcı, Osram Puritec HNS Germidical marka UV lamba, Nüve EV 018 marka vakum etüvü ve Nüve FN 500 marka normal etüv kullanıldı.

2.2 ELEKTROTLAR VE ÖN HAZIRLIK

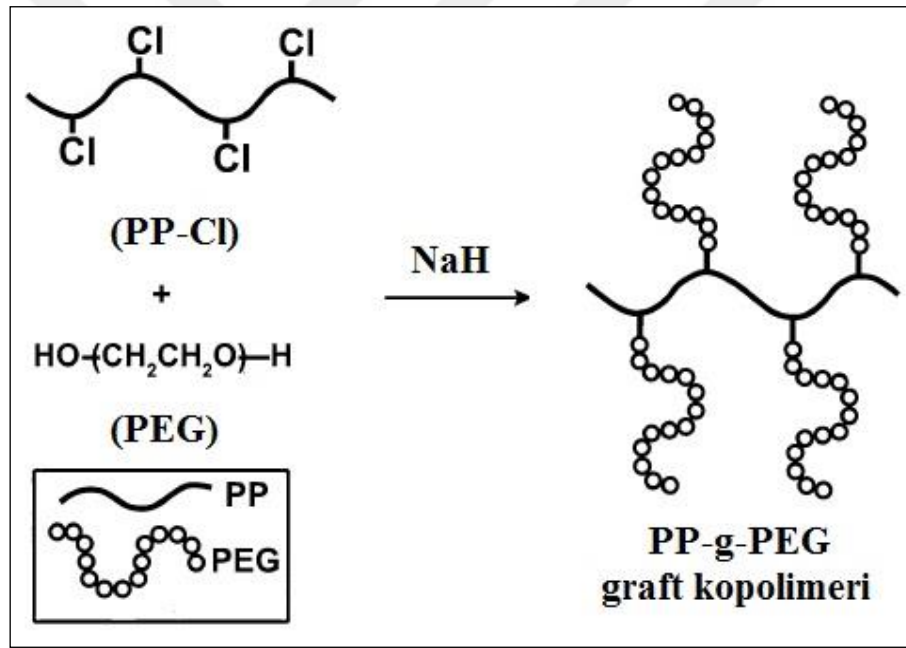
EFC elektrotlarının fabrikasyon deneylerinde kullanılan elektrokimyasal düzenek, üçlü elektrot sistemi, cam reaksiyon hücresi ve bir potansiyostattan (elektrokimyasal analizatör) oluşmaktadır. Üçlü elektrot sistemi, bir çalışma elektrodu, bir karşıt elektrot ve bir referans elektrottan oluşmaktadır (Bölüm 2.5-Şekil 2.3). Çalışma elektrodu cinsi ya altın ya da camsı karbondur. Karşıt elektrot platin çubuktur. Referans elektrot ise sulu ortamlar için Ag/AgCl, organik ortamlar için Ag^0/Ag^+ 'dir. Deneylerde kullanılan tüm çalışma elektrotları ve karşıt elektrotlarının yüzeyleri her kullanımdan önce elektrot temizleme kiti ile temizlendi. Elektrot temizleme kiti, farklı büyüklükteki zımparalardan ve 0.05, 0.3 ve 1 mikron boyutundaki γ -alüminyum tozlarından oluşmaktadır. Uygun zımpara üzerine sırasıyla farklı boyuttaki γ -alüminyum tozlarından bir miktar alınarak elektrot yüzeyi zımparalandı böylelikle hem elektrot yüzey temizliği hem de yüzey pürüzsüzlüğü sağlandı. Elektrotlar daha sonra ultra saf su ile yıkanarak ve kullanıma hazır hale getirildi.

2.3 POLİMERLERİN SENTEZİ

Çalışmada kullanılan polimerler, elektropolimerizasyonla veya kimyasal tekniklerle sentezlendi. Bu polimerler daha önce de açıklandığı gibi üzerlerine farklı tiplerde enzim bağlayıcı fonksiyonel grupları (-COOH, -NH₂, polietilenglikol vb) ve çalışmanın amacına uygun seçilen medyatörleri (altın, kobalt, ferrosen, *p*-benzokinon, grafen) içeren/ile modifiye edilen orijinal polimerlerdir. Söz konusu polimerler ya tek bir polimer ana zincirinden ya da iki farklı polimerden oluşan ana zincire sahiptir. Tez kapsamında amacına uygun olarak sentezlenmiş olan polimerler bu sayede çok çeşitli olmuştur. Çalışmada yeni sentezlenen polimerlerin karakterizasyonları da yapılarak yapıları aydınlatılmıştır.

2.3.1 PP-g-PEG Polimerinin Sentezi

Williamson eter sentezine göre tarak tipi PP-g-PEG, polietilen glikolün (PEG) sodyum tuzunun klorlanmış polipropilen (PP-Cl) ile reaksiyona girmesiyle sentezlenmektedir. Sentez işlemi için öncelikle 1.43 g PP-Cl ve 1.51 g PEG2000, 10 mL saflaştırılmış tetrahidrofuranda (THF) çözülmüştür. Bu çözeltiliye 5 mmol (0.12 g) NaH çözeltisinden 2 mL damla damla 20 dakika içinde eklendi. Hazırlanan çözelti, oda sıcaklığında argon gazı altında 3 gün karıştırıldıktan sonra içerisinde 1 mL derişik HCl içeren 200 mL'lik saf sudan çöktürülmüştür. Graft kopolimer süzölmüş, üç defa saf suyla yıkandı ve 50°C'de 1 gece vakumda kurutuldu. Saflaştırma işlemi için polimer kloroform çözeltisinde tekrar çözülmüş, 200 mL metanolde tekrar çöktürülmüştür ve sonra vakumda kurutulmuştur (Balcı 2010). PP-g-PEG kopolimerinin sentezi Şekil 2.1'de şematize edilmektedir.

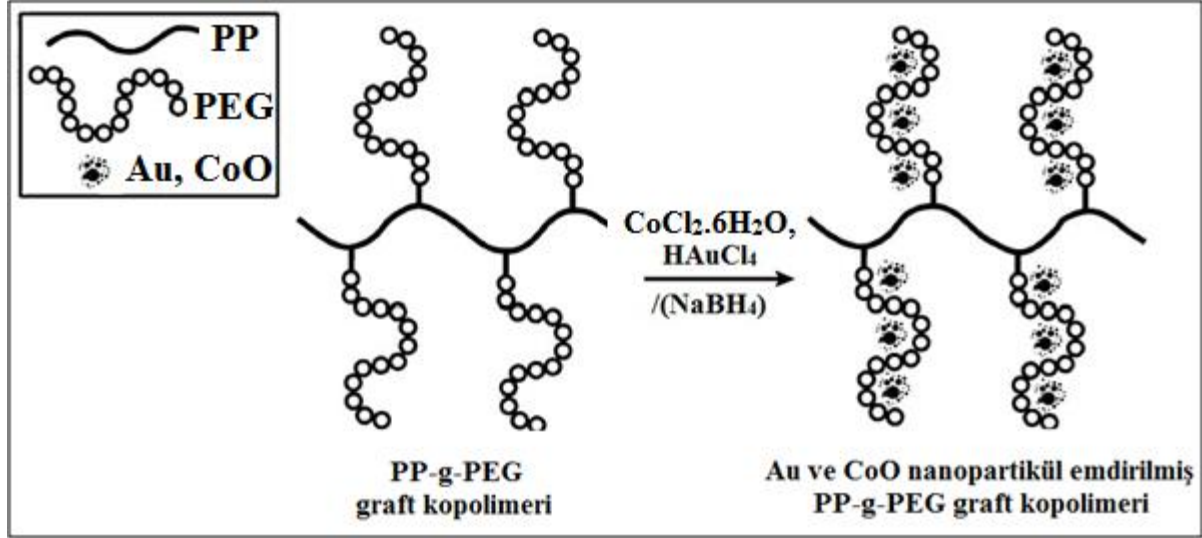


Şekil 2.1 PP-g-PEG kopolimerinin sentezi.

2.3.2 Altın ve Kobalt Oksit Nanopartikül İçeren PP-g-PEG Polimerinin Sentezi

Bölüm 2.3.1'de sentezlenen polimere eklenmek üzere iki standart çözelti hazırlandı: (1) 0.58 g HAuCl₄ 20 mL THF'de çözünerek altın tuzu çözeltisi, (2) 0.35 g CoCl₂.6H₂O 6.4 mL suda çözünerek kobalt tuzu çözeltisi hazırlandı. Sentezlenen polimerin 0.2 gramı 10 mL THF'de çözülmüştür. Bu çözeltiliye hazırlanmış olan nanopartikül çözeltilerinden 4'er damla eklendi ve karışım yaklaşık 1 saat karıştırıldı. Tuzların metal nanoparçacıklarına indirgenebilmesi için,

3.2 g suda çözülmüş 65 mg sodyum borohidür (NaBH_4) çözeltisinden karışıma 2 damla eklendi ve 2 saat daha karıştırıldı. Süre sonunda polimer karışımı 5 cm çapındaki petri kabına dökülerek “solvent casting” yoluyla film oluşumu sağlandı. Oluşan film metanolle yıkandıktan sonra, önce oda koşullarında ve daha sonra 40 °C sıcaklıkta vakumda 4 saat kurutuldu. Elde edilen nanopartiküllü polimerik film toluen içinde çözülerek kullanıma hazır hale getirildi. Nanopartikül içeren polimer Şekil 2.2’de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimeri.

2.3.3 Altın Nanopartikül İçeren PP-g-Im Polimerinin Sentezi

Klorlanmış polipropilen zincirine -NH grubu içeren imidazol takıldı ve enzimlerin, polimer porlarına fiziksel olarak tutuklanması hedeflendi. Bu amaçla, polimer sentez işlemi için, yağ içinde hazırlanan ağırlıkça %60’lık NaH çözeltisi 0.25 g imidazol içeren THF çözeltisine eklendi ve çözelti oda koşullarında ve argon atmosferi altında 3 saat karıştırıldı. Hazırlanan imidazol sodyum tuzu, THF’de hazırlanan (1.43 g/30 mL THF) klorlanmış polipropilen çözeltisine eklendi ve yarım saat karıştırıldı. Karışım 1 gün daha karıştırılarak polimer çökeleğin oluşabilmesi için 1 M’lık HCl’nin 500 mL’sine eklendi. Çökelen polimer filtrelendi, saf suyla yıkandı ve vakum altında 50°C ‘de kurutuldu. Saflaştırma işlemi için polimer tekrar kloroform çözeltisinde çözüldü, 200 mL metanolde tekrar çöktürüldü ve sonra 1 gece oda sıcaklığında vakumda kurutuldu. 100 mg PP-g-Im polimeri 10 mL THF’de çözüldü ve 0.2 M’lık HAuCl₄ çözeltisinin 0.05 mL’si polimer çözeltisine eklendi, yarım saat karıştırıldı. Altın nanopartikülden kaynaklanan renk oluşumu gözlemlendikten sonra çözelti yaklaşık 1 saat daha karıştırıldı ve çapı 7 cm olan petri kabına dökülerek “solvent casting”

yoluyla film oluşumu sağlandı.1 gün sonra oluşan film metanolle yıkandıktan sonra 1 gün vakum altında oda koşullarında kurutma işlemine tabi tutuldu. Elde edilen nanopartiküllü kompozit polimer 20 mL toluen içinde çözülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.3.4 Grafen ile Modifiye Edilmiş PSIS-COOH Polimerinin Sentezi

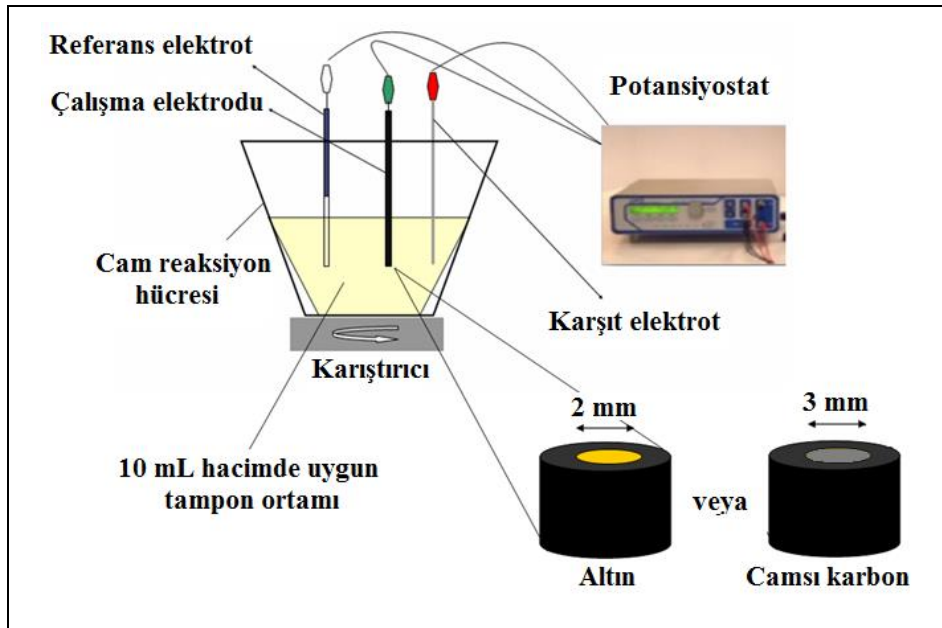
8.7 g Poli(stiren-b-izopren-b-stiren), 0.131 g benzofenon ve 10.7 g merkaptopropiyonik asit argon atmosferinde ve hafif karıştırma hızında 20 mL diklorometan kullanılarak çözüldü. Hazırlanan bu çözelti hafif karıştırılırken ultraviyole lamba ile 10 cm mesafeden 5 saat boyunca ışıklandırıldı. Daha sonra polimerin çözücüsü (diklorometan) uçurularak polimer katısı elde edildi. Kuru polimer sırasıyla saf su ve metanol ile yıkandı. Yıkanan polimer katısı vakum altında 50°C 'de ve 24 saat boyunca kurutuldu. 10 mg final polimer ve 0.1 mg grafen 1 mL kloroformda çözülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.4 KİMYASAL OLARAK YENİ SENTEZLENMİŞ POLİMERLERLE ÇALIŞMA ELEKTROTLARININ HAZIRLANMASI

Kimyasal olarak farklı çeşitlerde sentezlenmiş polimerlerin uygun çözücüler (literatürde çoğunlukla kullanılan çözücüler asetonitril, diklorometan, tetrahidrofuran, kloroform vb.) içinde çözülmek suretiyle çözeltileri hazırlandı. Polimer çözeltilerinden mikrolitre seviyesindeki hacimde elektrot yüzeyine damlatılıp, oda koşullarında çözücüsünün uçması beklendi. Karboksil fonksiyonel grup içeren polimerler için bu grup karbodiimid (2 saat boyunca 15 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid ve 300 mM N-hidroksisüksinamid çözeltilerinin karışımına daldırılarak), amin ve polietilenglikol grubu içeren polimerler için bu grup gluteraldehit (% 5'lik gluteraldehit çözeltisinden 1 µL damlatılarak) çapraz bağlama ajanlarıyla aktive edildikten sonra enzim immobilizasyon aşamasına geçildi. Fonksiyonel grup aktivasyonu, polimer kaplı elektrodu belli hacimdeki çapraz bağlama ajanı çözeltisine daldırmak ve bir süre beklemek suretiyle gerçekleştirildi. Buraya kadarki kısım hem anot hem de katot için aynen uygulandı. Aktive edilmiş polimer kaplı anot GOx çözeltisine, katot ise ya LAC ya da BOD çözeltisine daldırılarak yaklaşık 1 gece buzdolabında bekletilmek suretiyle kimyasal immobilizasyon işlemi tamamlandı. Bu işlemlerin sonunda elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.5 TİCARİ POLİMERLERLE ÇALIŞMA ELEKTROTLARININ HAZIRLANMASI

Çalışmada elektropolimerizasyon metoduyla elektrot yüzeyinde ticari monomerler kullanılarak polimerik filmler ve kopolimerleri oluşturuldu. Elektropolimerizasyon Şekil 2.3'de gösterilen üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirildi (Özöner 2010). Pirel tabanlı ticari monomerlerin polimerizasyonu 100 mM sodyum dodesil sülfat içeren pH 6.5 sitrat tamponunun 10 mL'sine monomerden mikrolitre seviyesindeki hacimde eklenip karıştırmak suretiyle, elektrot sistemine 0 ile 1 Volt aralığında potansiyel uygulamasıyla gerçekleştirildi. Tiyofen tabanlı ticari monomerlerin polimerizasyonu ise 100 mM tetrabutilamonyum tetrafloroborat içeren 10 mL asetonitril içerisine monomerden mikrolitre seviyesindeki hacimde eklenip karıştırmak suretiyle, elektrot sistemine 0 ile 2 Volt arasında potansiyel uygulanarak gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon işlemi, potansiyostat cihazının dönüşümlü voltametri (CV) programıyla gerçekleştirildi. Elde edilen CV görüntülerine bakılarak elektrot yüzeyinde kaplamanın gerçekleşip gerçekleşmediği anlaşıldı. Ticari polimerlere, enzim immobilizasyonu polimerin fonksiyonel grupları üzerinden enzimi kimyasal bağlayarak gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon işlemlerinde, monomer elektrot yüzeyinde okside olarak polimerleşirken (monomerin belli bir potansiyelde elektroda doğru yürümesiyle) aynı zamanda ortamda bulunan maddeler elektrot yüzeyinde oluşan polimerik yapıya doğru yönelerek hapsolür. Kullanılan ticari monomerler elektropolimerizasyon işlemi sırasında çeşitli medyatörlerin ortama ilavesiyle modifikasyona uğratıldı.



Şekil 2.3 Elektropolimerizasyonda kullanılan üçlü elektrot sistemi.

2.5.1 Poli(TAA-co-MT) Elektropolimerizasyonu

0.1422 g 3-Tiyofen Asetik Asit (TAA) (100 mM), 11 µL 3-metiltiyofen (MT) (10 mM) ve 0.3293 g tetrabütül amonyum tetrafloroborat (100 mM) (destek elektrolit olarak kullanıldı) 10 mL asetonitrilde çözüldü. EFC sisteminde akım değerlerini artırabilmek için polimerizasyon ortamına medyatörler eklendi ve film kaplaması sırasında ortama eklenen medyatörün film yapısına girmesi sağlandı. Çalışmada kullanılan medyatörler sırasıyla ferrosen, *p*-benzokinon ve nötral kırmızısı'dır. Medyatör, polimerizasyon ortamına konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde eklendi. Kaplamalarda altın elektrotlar kullanıldı. Elektropolimerizasyon şartları: tarama hızı 100 mV/s, döngü sayısı 15, uygulanan potansiyel aralığı: 0-2 V arasındır.

2.5.2 Poli(Py-COOH-co-TAA) Elektropolimerizasyonu

10 mM Piyrol-2-karboksilik Asit (Py-COOH), 5 mM 3-Tiyofen asetik asit (TAA), 10 mM *p*-benzokinon ve 20 mM tetrabütül amonyum tetrafloroborat (destek elektrolit olarak kullanıldı) 10 mL asetonitrilde çözüldü. Kaplamalarda altın elektrotlar kullanıldı. Elektropolimerizasyon şartları: tarama hızı 100 mV/s, döngü sayısı 40, uygulanan potansiyel aralığı: 0-2 V arasındır.

2.5.3 Poli(Py-COOH) Elektropolimerizasyonu

Piyrol-2-karboksilik asitin elektropolimerizasyonu için, 10 mL asetonitril içine konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde Piyrol-2-karboksilik asit, konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde tetrabütül amonyum tetrafloroborat destek elektroliti ve 10 mM medyatör (ferrosen, *p*-benzokinon veya nötral kırmızısı) eklenerek bir elektropolimerizasyon ortamı hazırlandı. Bu elektropolimerizasyon ortamı her bir medyatör için hazırlandı ve sonuçta 3 farklı medyatörle modifiye edilmiş Poli(Py-COOH)/ferrosen, Poli(Py-COOH)/*p*-benzokinon ve Poli(Py-COOH)/Nötral kırmızısı anot ve katotları elde edildi. Altın elektrotlar, bu çözeltiye daldırılarak dönüşümlü voltametri metodunda elektrot yüzeylerinde polimerizasyon sağlandı. Elektropolimerizasyon şartları: tarama hızı 50 mV/s, döngü sayısı 25, uygulanan potansiyel aralığı: 0-1.3 V arasındır.

2.6 FABRİKASYON AŞAMALARININ OPTİMİZASYONU

Elektrot fabrikasyon aşamasında değişik enzim bağlayıcı gruplara ve değişik tipte medyatörlere sahip çok çeşitli polimerlerle hazırlanan geniş bir elektrot yelpazesi elde edildi.

Böylelikle immobilize enzim aktivitesinin ve medyatör türünün EFC performansına etkisi detaylıca incelendi. Elektrot fabrikasyon aşamasında, dizayn edilen her EFC sisteminin performansını artırabilmek için aşağıdaki parametreler optimize edildi.

Film yoğunluğu deneyleri: İnce bir filmde elektron akışı kısıtlanmadığından az miktarda enzimle, kalın bir filmde ise kısıtlı elektron akışı koşullarında fazla bir enzimle akım artabilir. Fakat önemli olan her iki durumda en yüksek akım artışının hangi durumda gözlendiğinin yanıtını bulmaktır. Film yoğunluğu deneylerinde, elektriksel iletkenliğin artması durumunda mı yoksa enzim miktarının fazla olduğu durumda mı akım değerlerinin daha çok artacağı sorusuna yanıt arandı. Kimyasal olarak sentezlenen polimerlerle hazırlanan elektrotlarda, hazırlanan polimer çözeltilerinden artan hacimlerde elektrot yüzeyine damlatılmasıyla oluşturulan farklı yoğunluklardaki polimer filmleri içeren çalışma elektrotlarından oluşmuş EFC'lerden glikoz eklemesi sonucu elde edilen akım değerleri incelendi. Elektrokimyasal olarak belli bir potansiyel değerinde sentezlenen ticari polimerlerle hazırlanan çalışma elektrotlarında ise bu optimizasyon, aynı miktarda monomerleri içeren polimerizasyon ortamlarında elektropolimerizasyon süresi değiştirilerek gerçekleştirildi.

İmmobilize enzim miktarının belirlenmesi: Aynı polimerlerle, aynı film yoğunluklarında ve aynı enzim immobilizasyon metodu kullanılarak oluşturulan çalışma elektrotlarında kullanılan enzim miktarı değiştirilerek, yüzeyde tutulan enzim miktarı optimize edildi. Hazırlanan elektrotlarda Bradford protein analiz metodu uygulanarak bağlı bulunan enzim miktarı tespit edildi. Bu optimizasyon çalışmasında hazırlanmış olan elektrotlar, EFC sisteminin çalışma ortamına belirlenen konsantrasyonda glikoz eklenerek denendi ve üretilen akım değerleri tespit edildi. Aynı zamanda hazırlanan elektrotlarda işletme sırasında enzim kayıplarının olup olmadığı tespit edildi.

Bradford Protein Analizinde esas olarak Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılır. Bu boya ortamda bulunan proteinlerle kompleks oluşturarak ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk verir. Analize göre renk oluşumu yaklaşık 590 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede okunur. Bu analiz 0-50 ppm aralığında protein içeren çözeltilere uygulanabilmektedir. Analizde kullanılmak üzere 100 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 mL metanolde çözüldü, çözünen boya 100 mL % 85'lik fosforik asite ilave edilerek karıştırıldı ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 21 mL alınıp üzerine 27 mL saf su eklenerek stok boya çözeltisi hazır hale getirildi.

Uygun elektrot materyalinin seçimi: Farklı elektrot materyalleri farklı iletkenliklere sahip olduğundan ve yüzeyde oluşturulan polimerik filmin mekaniksel uyumu elektrot materyaline göre farklılık gösterdiğinden, her bir çalışma elektrodu hem altın hem de camsı karbon elektrot ile hazırlandı. Hazırlanan elektrotların EFC sistemindeki performansı incelendi.

Katot için farklı enzimlerin denenmesi: Optimizasyon aşamasında anot tarafında GOx enzimi kullanılırken, katot tarafının performansı hem BOD hem de LAC kullanılarak test edildi, bu şekilde farklı katot enzimleri içeren EFC sistemlerinden en yüksek akım değerini üreten katot enzimi tercih edildi.

2.7 EFC SİSTEMİNİN İŞLETİLMESİ

EFC sistemi dörtlü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Bu sistem, üçlü elektrot sistemine ek olarak ikinci bir çalışma elektrodu içermektedir. Dörtlü elektrot sistemi anot, katot, karşıt ve referans elektrottan oluşmaktadır. GOx anoda, LAC ya da BOD enzimi katoda immobilize edildi. Sistemin karşıt elektrodu platin çubuk, referans elektrodu ise Ag/AgCl olarak tercih edildi. Tez kapsamında bu sistemde anottan katoda doğru gerçekleşen elektron akışı elektrik akımı olarak potansiyostatta gözlemlendi. Çalışma elektrotları potansiyostata bağlandıktan sonra 10 mL hacminde cam reaksiyon hücresine daldırıldı (Şekil 2.4). Cam reaksiyon hücresi içerisindeki reaksiyon ortamı uygun pH değerindeki bir tampon çözelti olup, içerisine belli konsantrasyonda destek elektrolit eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda, anottaki enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan elektronların anot tarafından yakalanmasını sağlayacak uygun potansiyel, katoda ise katot enziminin reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için anottan gelecek elektronların yakalanmasını sağlayacak uygun potansiyel değeri verildi. Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı ve arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamına belli hacimlerde yakıt olarak glikoz eklemesi yapıldı. Hem anot hem de katot için elde edilen akım sinyalleri cihaz tarafından kaydedildi. Eşitlik 2.1'deki formül ile sistemin hücre potansiyeli ($E_{\text{hücre}}$), katot elektrot potansiyelinden (E_{katot}) anot elektrot potansiyeli (E_{anot}) çıkarılarak bulundu. Daha sonra devreden geçen akım miktarı kullanılarak aşağıdaki (Eşitlik 2.2) formülden (Joule Kanunu) güç üretimi hesaplandı.

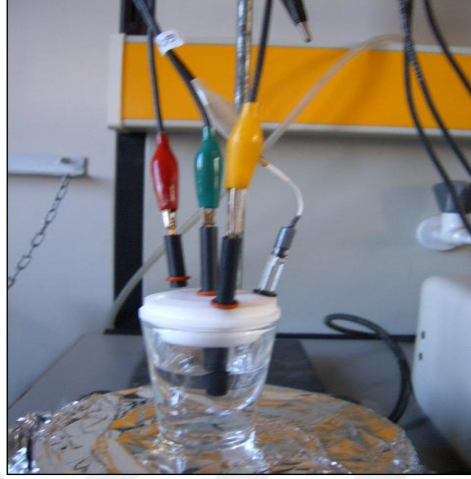
$$E_{\text{hücre}} = E_{\text{katot}} - E_{\text{anot}} \quad (2.1)$$

$$P = I \times E_{\text{hücre}} \quad (2.2)$$

P: Güç üretimi (Watt)

I: Devreden geçen elektrik akımı (Amper)

$E_{\text{hücre}}$: Hücre potansiyeli (Volt)



Şekil 2.4 EFC sistemi: yeşil kısıkaç anot (GOx bağlı elektrot), sarı kısıkaç katot (LAC veya BOD bağlı elektrot), kırmızı kısıkaç karşıt elektrot, beyaz kısıkaç referans elektrot.

2.8 İŞLETME KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Dizayn edilen EFC sistemlerinin performansını artırabilmek için işletme koşulları aşağıdaki şekilde optimize edildi.

pH deneyleri: Hazırlanan çalışma elektrotları, EFC sisteminde farklı pH değerlerinde hazırlanmış tampon ortamlarda test edildi. pH değerleri, hem anot hem de katot enziminin çalışabileceği uygun aralıkta tutuldu. Bu amaçla farklı pH'larda hazırlanmış 10 mL'lik tampon ortamlarında EFC sistemleri işletildi, farklı pH'lardaki bu ortamlara aynı konsantrasyonda glikoz eklenerek oluşan akım sinyalleri kaydedildi. Bu sayede enzimlerin en yüksek aktivite gösterdikleri pH değerleri tespit edildi.

Destek elektrolit konsantrasyonunun belirlenmesi: Dizayn edilen EFC sistemlerinin bazılarında destek elektrolit kullanıldı ve etkisi araştırıldı. Deneylerde aynı tampon çözeltisi içerisine farklı miktarlarda destek elektrolit (NaCl) eklenerek EFC sistemi çalıştırıldı ve glikoz ortama eklenerek akım değerleri kaydedildi.

Hücre potansiyelinin optimizasyonu: Çalışma kapsamında kullanılan her medyatöre uygun potansiyel aralıklarında anodik ve katodik potansiyel değerleri sisteme uygulandı ve kullanılan medyatörün etkin olduğu potansiyel değeri belirlendi. Bunun için, EFC sistemi, pH değeri optimize edilmiş tampon ortamına daldırılarak değişik anot ve katot potansiyel değerlerinde çalıştırıldı. Uygulanan her potansiyel değerinde sabit konsantrasyonda glikoz eklemesi yapılarak elde edilen akım değerleri yorumlandı ve hücre potansiyeli optimizasyonu gerçekleştirildi.

Yakıt miktarının performansa etkisi: Bitki ve atıksu uygulamalarına geçmeden önce geliştirilen EFC'lerden bazıları, optimize edilen potansiyel değerlerinde farklı konsantrasyondaki glikoz eklemelerine tabi tutularak işletildi. Her eklemeden gözlenen akım değerlerine karşı yakıt konsantrasyonu arasında bir ilişki kuruldu.

2.9. BİTKİ UYGULAMASI

Yenilenebilir yakıt kaynağı olarak *Carpobrotus Acinaciformis* bitkisi kullanıldı (Şekil 2.5). *Carpobrotus Acinaciformis*, halk arasında Kazayağı olarak bilinir. Boyu maksimum 30 cm'ye kadar ulaşan bu bitkinin yaprakları 8-10 cm boyunda, etli ve enine kesitte üçgen şeklindedir. Bu bitkinin tercih edilmesinin en önemli nedenleri, bitkinin iç pH'sının (pH 5.6) enzimatik reaksiyonlara uygunluğu, yüksek su içeriği ve bir EFC'nin çalışabilmesi için fotosentez reaksiyonları sonucu yeterli miktarda glikoz üretme kapasitesine sahip olmasıdır. Aynı zamanda söz konusu bitkinin ülkemizin hemen hemen her bölgesinde ve her mevsim bol bulunması seçilmesi için başka bir tercih nedeni olmuştur. Deneyleerde *Carpobrotus Acinaciformis*'in yaprağında küçük bir kesik oluşturuldu, geliştirilen EFC sistemi bu kesikten bitki yaprağına daldırıldı. EFC sistemi elektrot çapı 3 mm olduğundan bitki üzerinde hasar oluşturmadı. Önce, karanlık ortamda EFC sistemine uygun potansiyel uygulandı ve sistemin dengeye gelmesi beklendi. Arka akım sabitlendikten sonra ortam aydınlatıldı ve bitkinin fotosentez yapması sağlandı. Fotosentez reaksiyonları süresince bitki yapraklarında üretilen glikoz, EFC sisteminin yakıtı olarak kullanılabilirdi.



Şekil 2.5 *Carpobrotus Acinaciformis* bitkisi genel görünümü.

2.10 ATIKSU UYGULAMASI

Atıksular mikroorganizmalarla arıtılırken, içerdikleri karbonlu organik maddeler hidroliz basamağında glikoza dönüştürülür, dolayısıyla özellikle şeker bazlı atıksuların yoğun glikoza sahip olması beklenir. Bu düşünceden hareketle, tez kapsamında evsel atıksuyun glikoz içeriğinin yakıt olarak kullanılması planlandı. Bu amaçla Zonguldak ili evsel atıksu arıtma tesisi giriş atıksuyundan numune alındı. Atıksu arıtma tesisi plug-flow havalandırma reaktörünün giriş kısmından alınan evsel atıksu numunesi, uygulamaya geçmeden önce askıda katı madde sisteminde 0.45 µm'lik selüloz asetat Whatman membrandan süzüldü ve yoğun içeriğinden (süspanse katı, çözünemeyen organikler vb.) arındırıldı. Geliştirilen EFC'ler 10 mL tampon ortamına daldırılıp uygun potansiyelde çalıştırıldı, akım dengelendikten sonra belli hacimdeki atıksu numunesi bu tampon ortamına eklendi ve üretilen akımlar kaydedildi. Atıksu, EFC işletme ortamına eklenirken 20 kat kadar seyreltilmiş oldu.

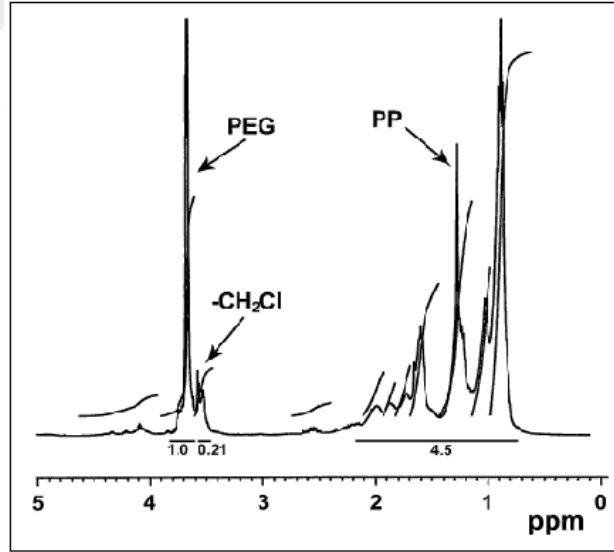
BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

3.1 PP-g-PEG TABANLI EFC SİSTEMİ

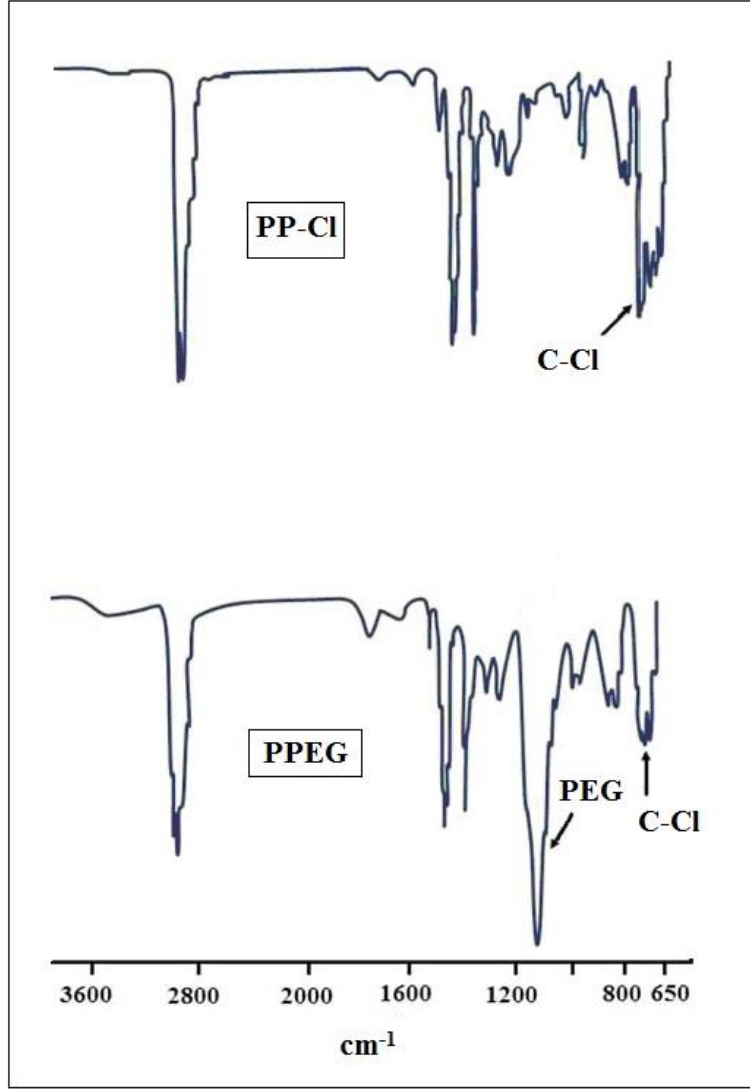
3.1.1 Karakterizasyon Çalışmaları

PP-g-PEG kopolimerine ait H-NMR spektrumu tetrametilsilan internal standartı ile CDCl_3 kullanarak çekilmiştir (Şekil 3.1). Spektrumda 3.5 ppm’de gözlenen pik PEG’i, 0.9 – 2.1 ppm aralığında gözlenen pik PP’i ve 3.5 – 4.0 ppm aralığında gözlenen pik ise klorlanmış polipropilen zincirine ait $-\text{CH}_2-\text{Cl}$ grubunu göstermektedir.



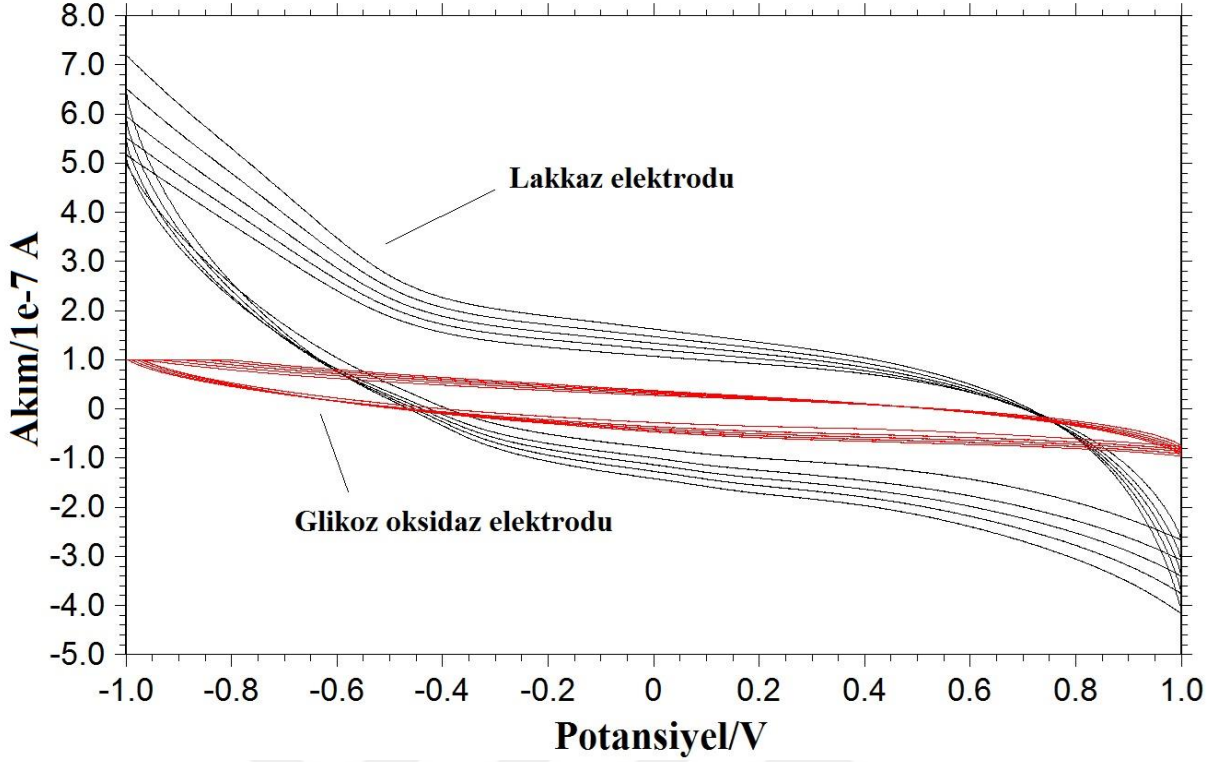
Şekil 3.1 PP-g-PEG kopolimerine ait H-NMR spektrumu.

PP-g-PEG graft kopolimerinin ve PP-Cl polimerinin FT-IR spektrumu Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Graft kopolimerin FT-IR spektrumunda PEG için karakteristik pik 1100 cm^{-1} ’de ve $(-\text{CH}_2-\text{Cl})$ grubuna ait pikler 657 , 725 , 757 cm^{-1} ’de tespit edildi.



Şekil 3.2 PP-g-PEG kopolimerinin ve PP-Cl polimerinin FT-IR spektrumu.

Hazırlanmış olan anot ve katodun 100 mM pH 5 sitrat tamponu içerisinde, -1 V ve +1 V aralığında, 100 mV/s tarama hızında çekilmiş dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 3.3'de verilmektedir. Elde edilen dönüşümlü voltametri grafikleri, her iki elektrot için de elektrotların yüzeyinde elektron akışını tamamen kapatacak herhangi bir sterik etki ya da direncin olmadığını gösterdi.

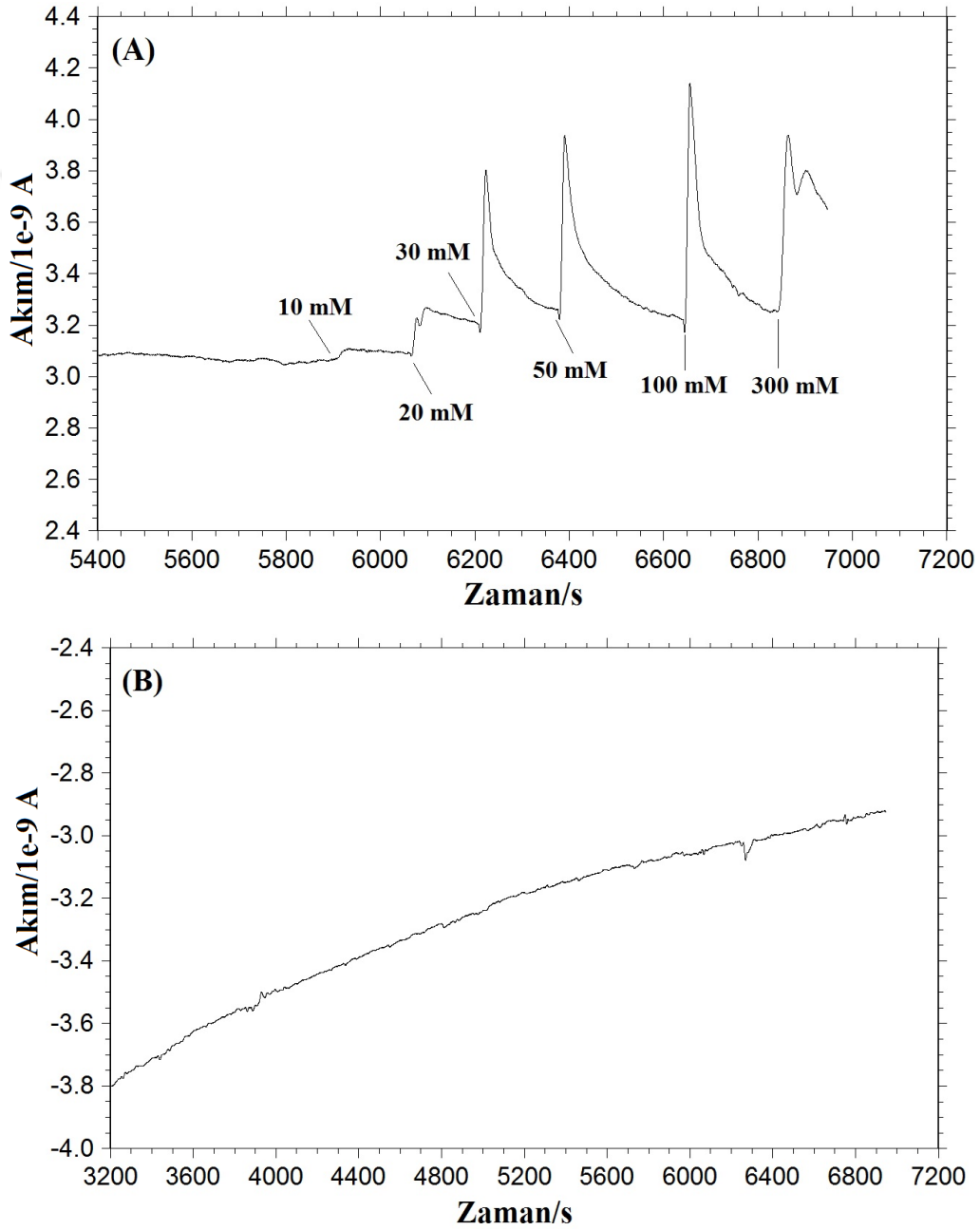


Şekil 3.3 Anot ve katoda ait dönüşümlü voltametri (CV) grafikleri.

3.1.2 PP-g-PEG Tabanlı EFC Sisteminin İşletilmesi

EFC sisteminde elektrot materyali olarak hem anot hem katot için 3 mm çapında camı karbon elektrot kullanıldı. Anot enzimi GOx, katot enzimi ise LAC'dır. 0.6 mg GOx enzimi 50 mM pH 7.4 potasyum fosfat tamponunun 1 mL'sinde, 0.6 mg LAC enzimi 50 mM pH 5.5 sitrat tamponunun 1 mL'sinde çözülerek hazırlandı. 2 M'lık glüköz çözeltisi, 50 mM pH 5 sitrat tamponunda, 1 mg PP-g-PEG polimeri ise 1 mL THF'de çözülerek hazırlandı. Sistemde karşıt elektrot olarak platin çubuk, referans elektrot olarak da Ag/AgCl kullanıldı. Elektrotlar ultra saf su ile yıkandı ve kullanıma hazır hale getirildi. Elektrotlar temizlendikten sonra yüzeylerine stok polimer çözeltisinden 10 µL damlatılıp oda koşullarında solventi uçurularak kurutuldu. Elektrotlar ultra saf suyla yıkandı daha sonra her iki elektrodun da yüzeyine %5'lik gluteraldehit çözeltisinden 1 µL damlatılıp, polimer üzerinde bulunan PEG gruplarıyla bağ yapması beklendi (Zeng vd. 2011). Süre sonunda bağlanmayan gluteraldehitin fazlası ultra saf su ile yüzeyden yıkandı. Polimerle kaplanan anot elektrot üzerine 30 µL stok GOx çözeltisinden, polimerle kaplanan katot üzerine 30 µL stok LAC çözeltisinden damlatıldı, oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak enzim immobilizasyonu sağlandı. Enzimler polimer üzerinde bulunan PEG yan gruplarına gluteraldehit bağlama ajanı aracılığıyla kimyasal olarak immobilize edildi. Elektrotlar

yıkandı, potansiyostata karşıt ve referans elektrotlarla beraber bağlandı. Dörtlü elektrot sistemi 10 mL'lik 100 mM pH 5 sitrat tamponuna daldırıldı. Polimerde herhangi bir nanopartikül olmadığından (elektron aracısı/medyatör) anot ve katoda sırasıyla anot ve katot enziminin çalışabildiği -0.36 V ve +0.59 V'luk standart potansiyel değerleri uygulandı. Sistem dengeye geldikten sonra reaksiyon ortamında sırasıyla 10, 20, 30, 50, 100 ve 300 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden eklemeler yapıldı. Hem anot hem de katot için elde edilen sinyaller cihaz tarafından kaydedildi (Şekil 3.4).

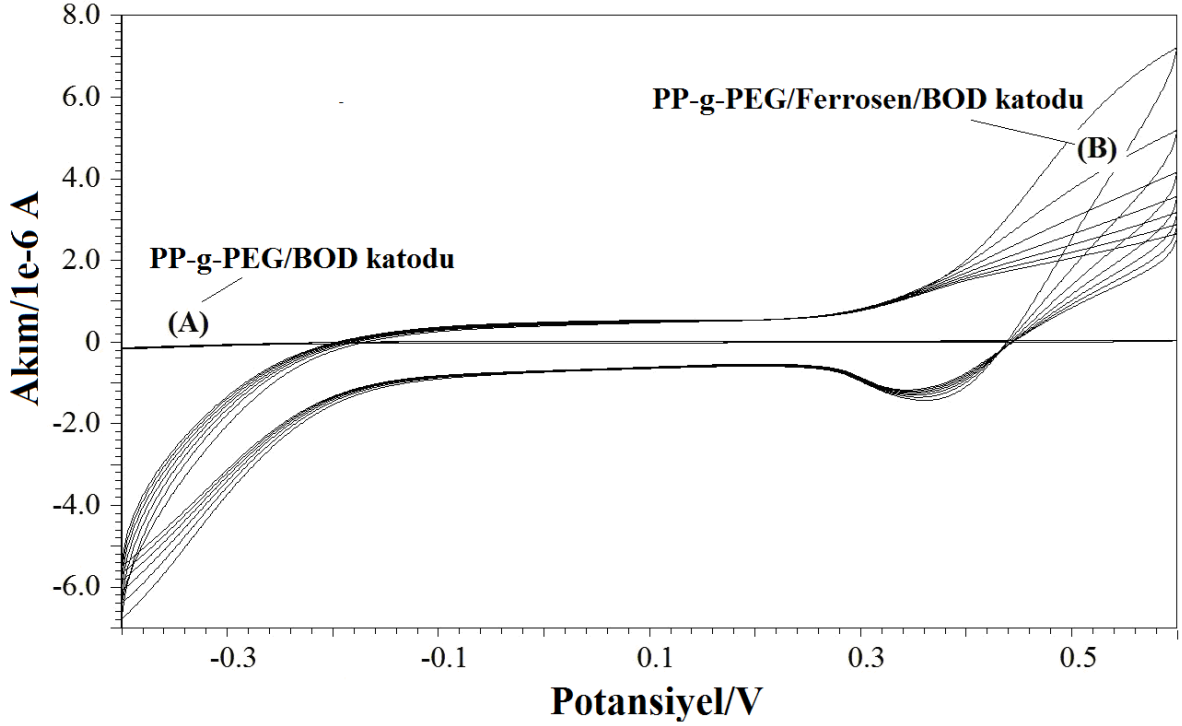


Şekil 3.4 PP-g-PEG polimeri ile kaplanmış anoda (A) ve katoda (B) ait amperometrik akım-zaman grafikleri.

Şekil 3.4'den görüldüğü gibi anotta, farklı konsantrasyonlardaki glikozun oksidasyon akımları gözlemlenirken katot tarafında oksijen indirgenmesi gerçekleşmemiştir. Kullanılan polimerde, enzimatik reaksiyonlar sonucu salınan elektronların transferini hızlandırıcı/kolaylaştırıcı herhangi bir elektron aracısı/medyator bulunmadığından EFC sisteminden cevap alınmaması beklenen bir durumdur. Çalışılan anodik potansiyel değerinde anot tarafında gözlenen sinyal değişimleri glikoz eklemesine bağlı olarak enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkmıştır, bu durum polimer üzerine enzimin bağlanmış olduğunu göstermektedir. Elektrot yüzeyine sadece enzimin bağlanması tek başına bir EFC sisteminin çalışması için yeterli olmamaktadır. EFC sistemlerinde kullanılan enzimlerin katalitik merkezleri oldukça dipte bulunmakta, bu durum enzim ve elektrot arasındaki elektron akışını zora sokmaktadır. Bu nedenle sinyal alınamayan EFC sistemlerinde akım artışlarını sağlayıcı bir medyatorün kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Bir sonraki aşamada PP-g-PEG polimeri medyator (elektron aracısı) olarak görev yapan ferrosen ile modifiye edilerek kullanıldı.

3.2 PP-g-PEG/FERROSEN FİLM TABANLI EFC SİSTEMİ

Kloroformda hazırlanan 10 mg/mL'lik PP-g-PEG çözeltisinin 1 mL'sine 1 mg ferrosen eklenerek karıştırıldı. Temizlenen camı karbon anot ve katot yüzeyine bu çözeltiden 2 µL damlatılarak oda koşullarında solventi uçuruldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anot yüzeyine 10 mg/mL'lik GOx enzim çözeltisinden 30 µL, katot yüzeyine 10 mg/mL'lik BOD enzim çözeltisinden 30 µL damlatılarak enzimlerin immobilize olması sağlandı. Enzimler polimerin PEG saçaklarına adsorbe olmak suretiyle fiziksel olarak tutuklandı. Süre sonunda elektrotlar 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuyla yıkanarak bağlanmayan enzim yüzeyden yıkandı. Hazırlanmış olan PP-g-PEG/ferrosen/BOD katodunun 100 mM pH 7.4 sitrat tamponu içerisinde, -0.4 V ve +0.6 V aralığında ve 100mV/s tarama hızında çekilmiş dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 3.5'de verildi. Şekil 3.5 aynı zamanda ferrosen içermeyen PP-g-PEG kaplı ve BOD enzimi immobilize edilmiş katodunun da aynı deney şartlarında çekilmiş dönüşümlü voltamogramını göstermektedir. Şekilden açıkça görüldüğü gibi ferrosen içeren polimerik film kaplı elektrodun yüzeyinden, ferrosen içermeyen elektrot yüzeyine kıyasla oldukça yüksek akım geçmektedir. Dönüşümlü voltamogram, aynı zamanda ferrosenin polimer yapısına girdiğinin göstergesidir (Şekil 3.5B).



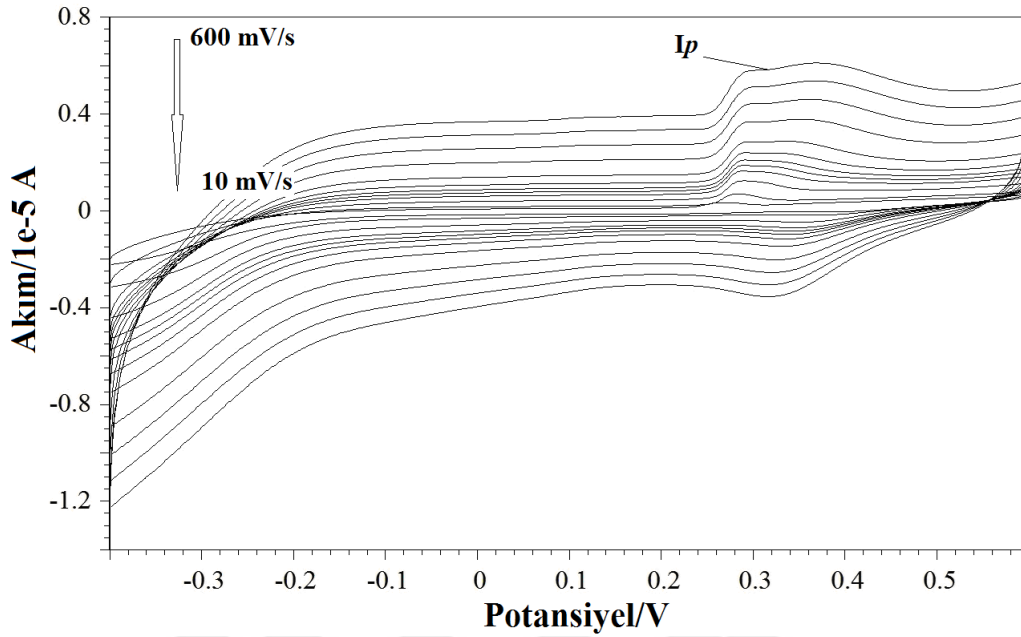
Şekil 3.5 PP-g-PEG polimer film kaplı elektrotların dönüşümlü voltametri grafiği: Tarama hızı: 100 mV/s.

Elektrot yüzeylerine bağlanan immobilize enzimin elektroaktivite gösteren miktarını tespit etmek için elektrokimyasal bir metot kullanıldı (Laviron 1979). Bu metoda göre, enzim kaplanan elektrotların 100 mM pH 7.4 fosfat tamponu içinde 10-600 mV/s aralığında değişen farklı tarama hızlarında -0.4 ve +0.6 V aralığında dönüşümlü voltamogramları çekildi (Şekil 3.6). Tarama hızı arttıkça akımların pik noktaları (I_p) lineer olarak artış göstermektedir. Grafiğe göre, Faraday kanunundan yararlanılarak;

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma \nu}{4RT} \quad (3.1)$$

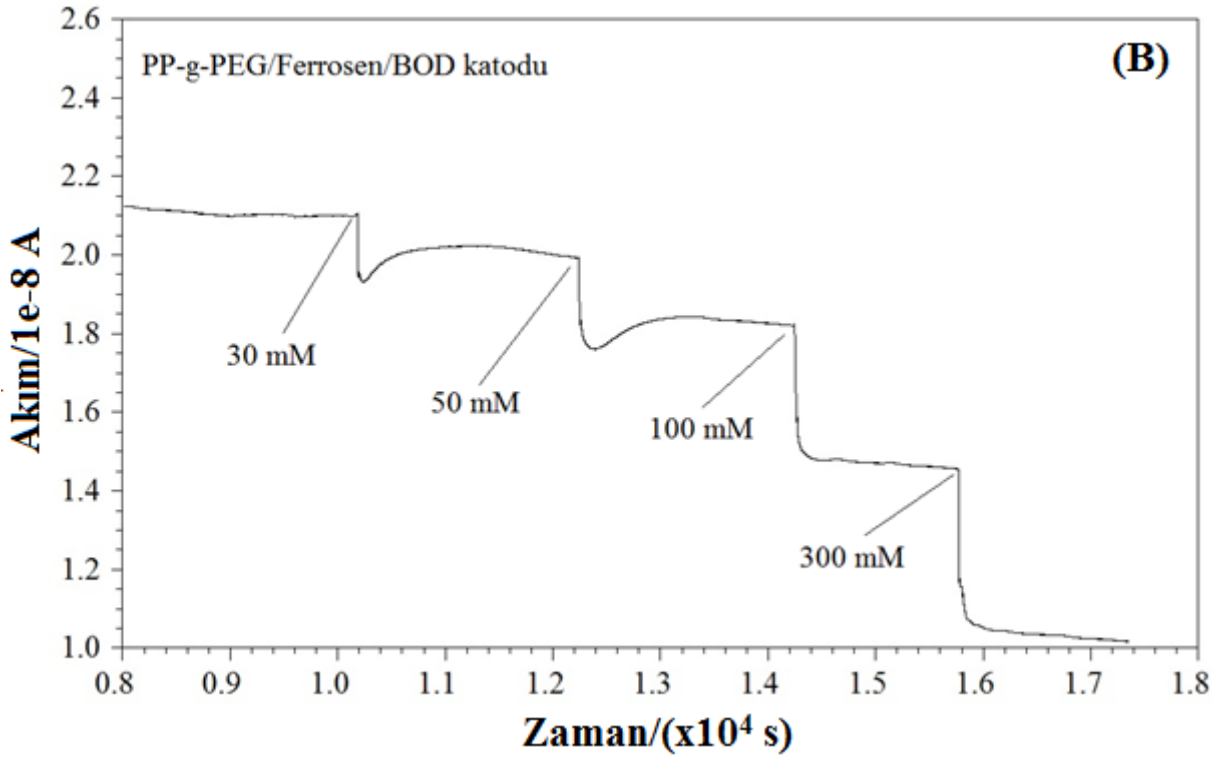
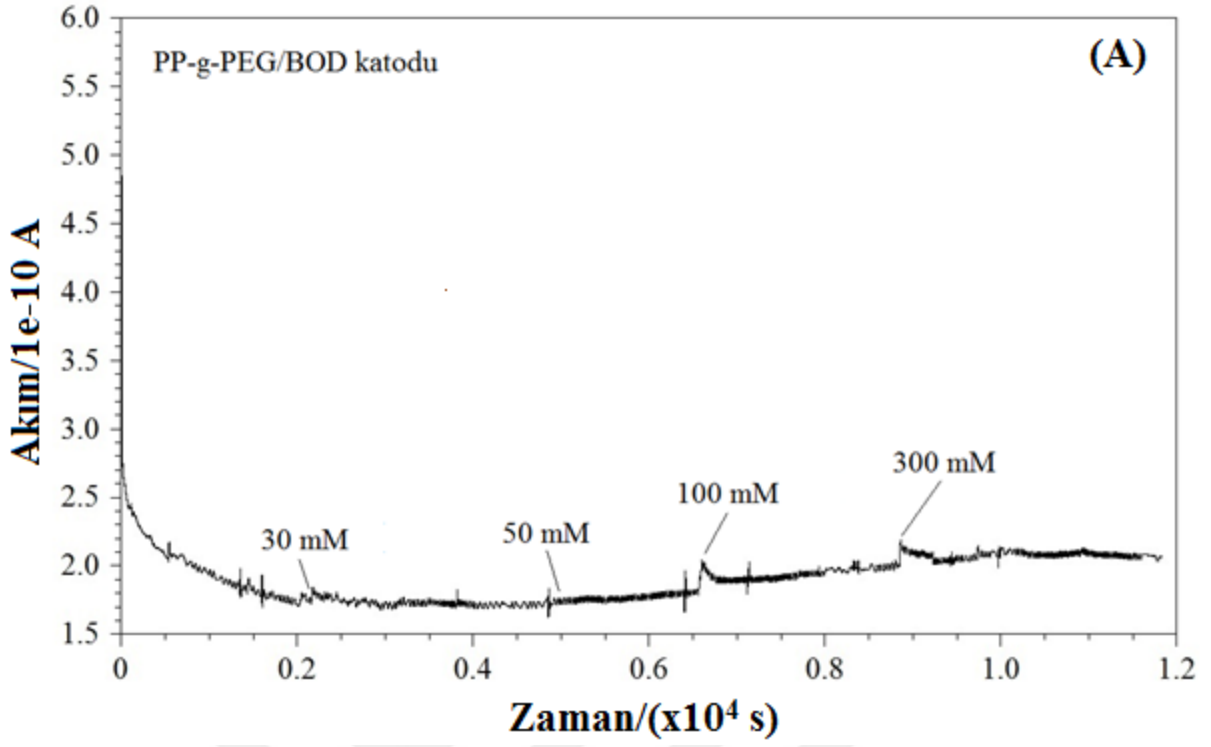
formülünden PP-g-PEG/ferrosen/BOD katodunun pik akımının (I_p) tarama hızlarına göre değişimini veren eşitlik (lineer doğru denklemleri) $I_{pc} = 8.10^{-9} \nu + 10^{-6}$ ($r^2 = 0.992$), PP-g-PEG/ferrosen/GOx anodununki ise $I_{pa} = 1.10^{-8} \nu + 2.10^{-7}$ ($r^2 = 0.998$) olarak bulundu. (7) eşitliğinde elektroaktif enzim miktarı (Γ) simgesiyle gösterilmektedir. Eşitlikte, A elektrot yüzey alanını, ν tarama hızını (mV/s), n elektron sayısını göstermektedir. $\nu=300$ mV/s, $n=1$, $A = 0.07068$ cm², $F = 96.485$ C/mol, $R = 8.314$ J/K.mol ve $T = 298$ K iken PP-g-PEG/ferrosen/GOx elektrodu için $I_p = 3.2 \times 10^{-6}$ A, PP-g-PEG/ferrosen/BOD elektrodu için ise

$I_p = 3.4 \times 10^{-6}$ A'dir. İlgili terimler yerine yazıldığında elektrot yüzeylerinde elektroaktivite gösteren GOx miktarı 280 ng, BOD miktarı ise 190 ng olarak hesaplandı.



Şekil 3.6 PP-g-PEG/ferrosen/BOD elektrodunun farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları.

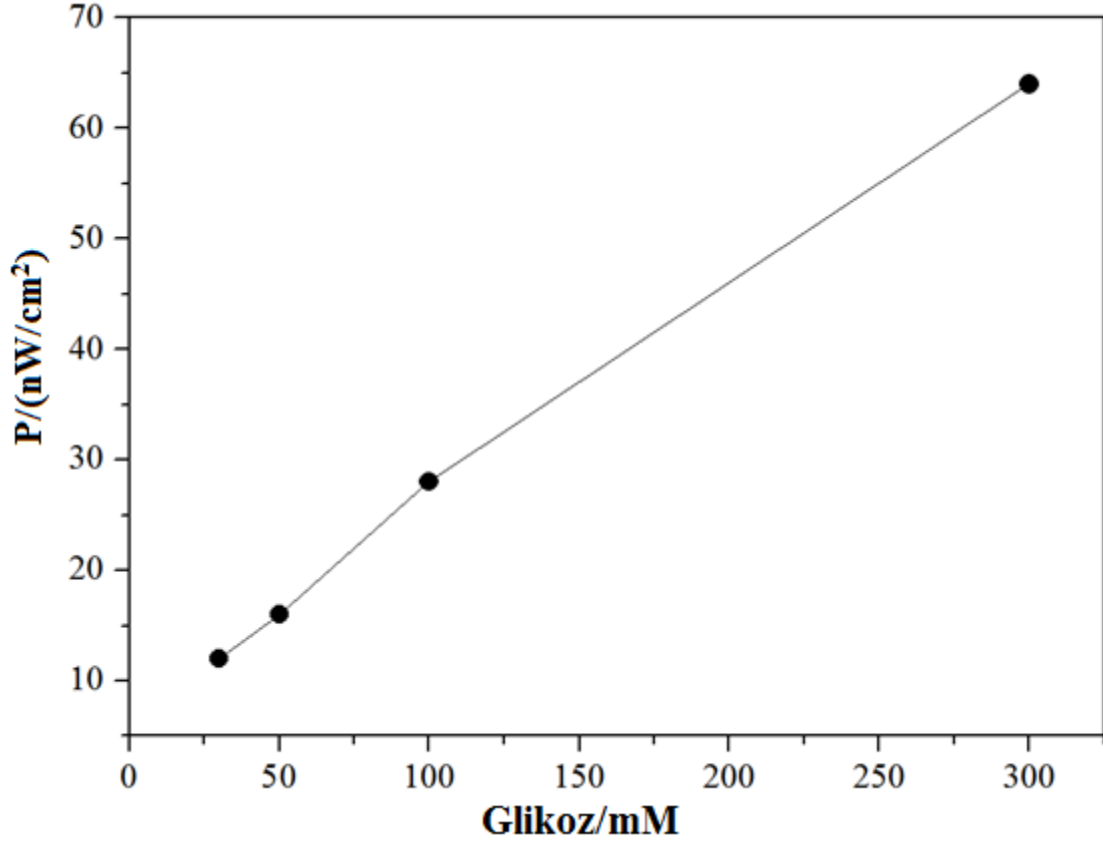
Bir tanesinde PP-g-PEG film, diğerinde PP-g-PEG/ferrosen film kaplı elektrotlardan oluşan iki EFC sisteminin elektrik akımı üretim kapasitelerini kıyaslayabilmek için, reaksiyon hücrelerine 10 mL 100 mM pH 7.4 fosfat tamponu eklenerek ortam karıştırıldı. PP-g-PEG film içeren EFC sisteminin anot tarafına -0.34 V, katot tarafına +0.36 V, PP-g-PEG/ferrosen film içeren EFC sisteminin anot tarafına -0.2 V, katot tarafına +0.36 V uygulanarak sistemler çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında sırasıyla 30-50-100 ve 300 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen katodik akım değerleri kaydedildi (Şekil 3.7). Ferrosen içermeyen EFC sisteminde kararsız, gürültülü arka akımlar oluştu, sistem glikoz eklemeleri sonucu enerji üretmedi. Tam aksine, ferrosen içeren EFC sistemi artan glikoz eklemelerine karşı anlamlı akım değerleri üretebildi. Sistemde ferrosenin bulunması, elektron akışını rahatlatarak devreden akım geçmesini sağladı. Üstelik ferrosen ile modifiye edilmeyen sistemde hücre potansiyeli (0.7 V), ferrosen ile modifiye edilen sisteme göre (0.56 V) yüksek olmasına rağmen, ferrosen içeren sistem ferrosensiz sisteme göre yaklaşık 100 kat daha fazla akım üretebildi.



Şekil 3.7 Ferrosen içermeyen (A) ve ferrosen ile modifiye edilen (B) EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine karşı üretilen katodik akım sinyalleri.

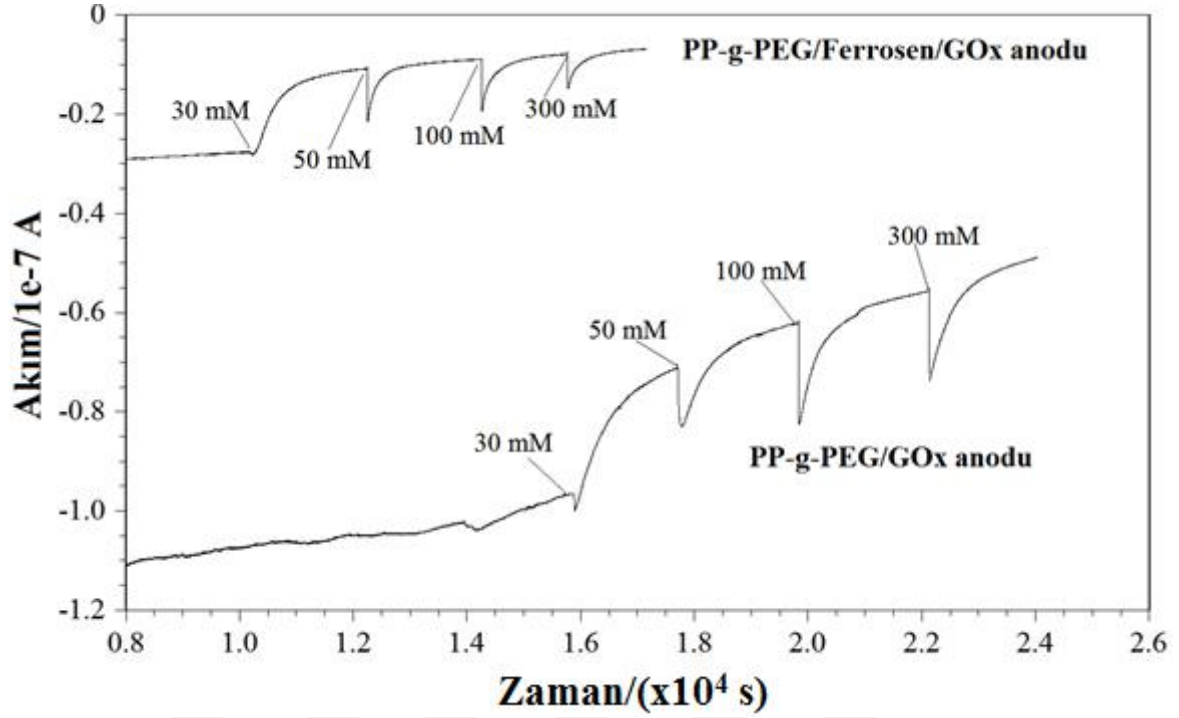
0.56 V hücre potansiyelinde çalıştırılan PP-g-PEG/ferrosen film kaplı anot ve katottan oluşan EFC sisteminin Şekil 3.7’de, üretilen akım değerlerinden hesaplanan elektriksel güç

yoğunluğu değerleri Şekil 3.8'de gösterilmektedir. PP-g-PEG/ferrosen film tabanlı EFC sisteminde hesaplanan immobilize enzim miktarı sadece nanogram mertebesinde olmasına rağmen sistemin ferrosenle modifikasyonu sonucu 300 mM'lık glikoz eklemesi sonucu 65 nW/cm²'lik güç üretildi.



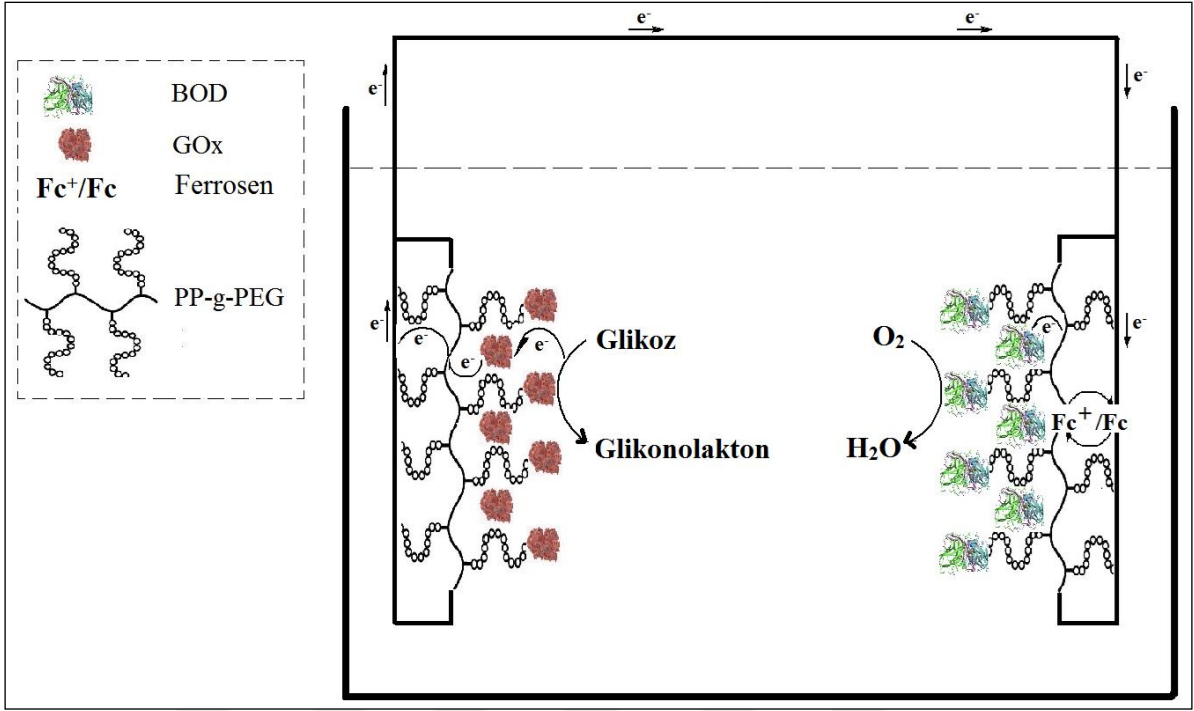
Şekil 3.8 PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sisteminden elde edilen güç yoğunlukları (Hücre potansiyeli: 0.56 V).

Ferrosen ile modifiye edilen ve modifiye edilmeyen EFC sistemlerinin anot tarafına bakılacak olursa (Şekil 3.9), ferrosen modifikasyonunun anot tarafına faydalı olmadığı anlaşılmaktadır. Yani, anotta bağlı bulunan GOx enzimi her iki sistemde de ortama eklenen glikozu aynı performansta oksitlemektedir. Sistemin ferrosenle modifikasyonu katottan enzime doğru akan elektron akışını hızlandırmış bu sayede katodik BOD enzimi birim zamanda daha fazla oksijen molekülünü suya indirgeyebilmiştir (Şekil 3.7B).



Şekil 3.9 Ferrosen ile modifiye edilmiş ve ferrosen içermeyen EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine karşı üretilen anodik akım sinyalleri.

Sistemde ferrosen olmadığı zaman, anot tarafından salınan elektronlar katot tarafına aktarılamadığından BOD tarafından oksijen redüksiyonu yeterince gerçekleşmemiş, bu durum da zaten Şekil 3.7A'dan açıkça gözlenmiştir. Ferrosenle modifiye edilen EFC sisteminde katoda akan elektronlar ferrosenyum/ferrosen (Fc^+/Fc) redoks çiftini oluşturmaktadır. Oluşan redoks çifti oldukça elektroaktif özellikte olduğundan üzerindeki elektronları kolaylıkla ve hızlı bir şekilde BOD enzimine transfer edebilmiştir. Ferrosen ile modifiye edilen EFC sisteminin elektrot yapıları ve yakıt ilavesiyle meydana gelen reaksiyonlar Şekil 3.10'da şematize edilmektedir.



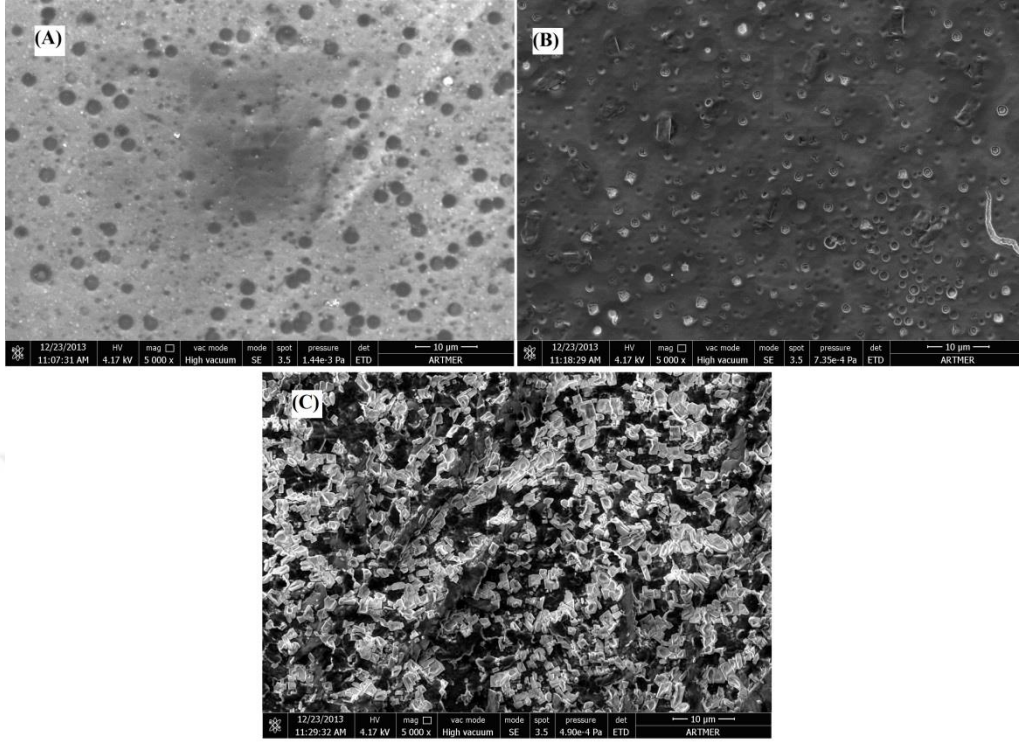
Şekil 3.10 PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sisteminde gerçekleşen biyoelektrokimyasal reaksiyonların şematik gösterimi.

3.3 ALTIN VE KOBALT OKSİT NANOPARTİKÜL İÇEREN PP-g-PEG TABANLI EFC SİSTEMİ

3.3.1 Karakterizasyon Çalışmaları

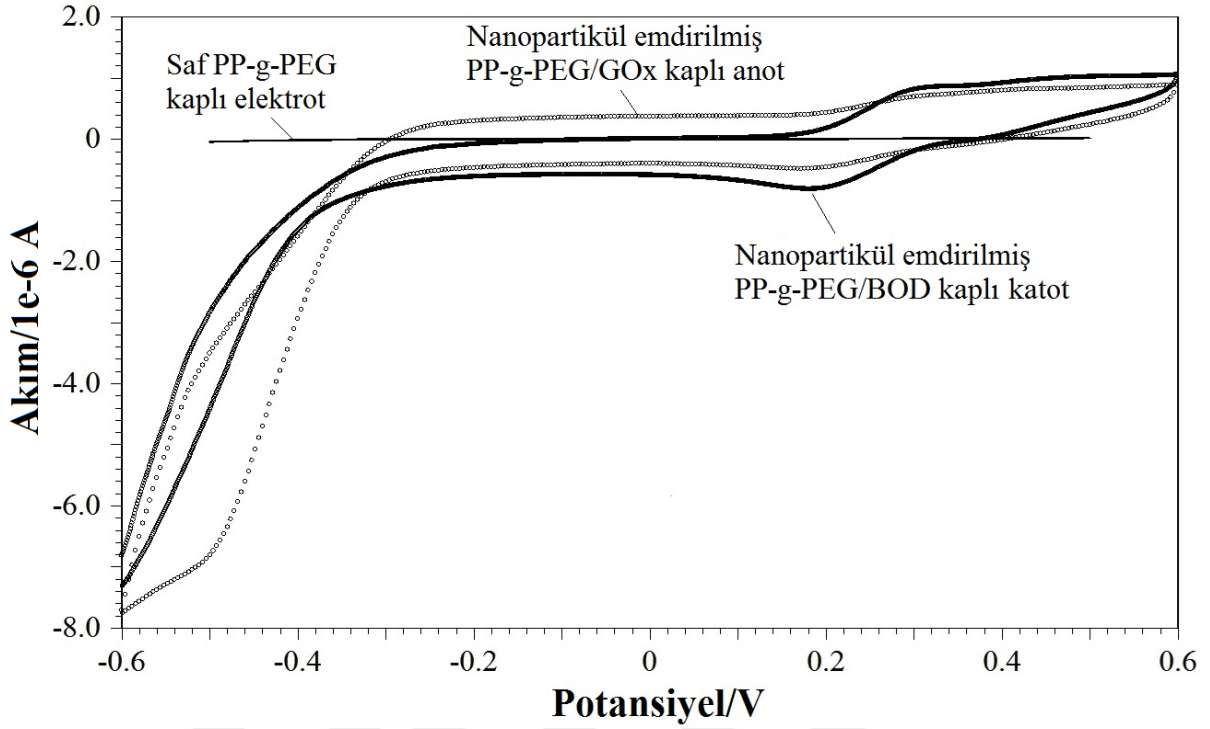
Toluende hazırlanan 10 mg/mL'lik altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimer çözeltisinden camı karbon anot ve katot üzerine 2'şer μL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 20 μg) damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 10 mg/mL GOx enziminden 20 μL , katoda 10 mg/mL BOD enziminden 20 μL damlatılıp kurutularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı. Elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan elektrotların SEM görüntüleri Quanta FEG 450 marka cihazla çekilmiştir. Sadece altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda ait SEM Şekil 3.11A'da, GOx immobilize edilen PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda ait SEM Şekil 3.11B'de ve BOD immobilize edilen PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda ait SEM Şekil 3.11C'de gösterilmektedir.. Aynı boyutta çekilmiş 3 SEM görüntüsüne sahip elektrotların hepsinin farklı yüzey morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi. Üzerinde bağlı enzim bulunmayan polimer filmin görüntüsünde birçok por açıkça gözlenirken

(Şekil 3.11A), enzimlerin bağlı bulunduğu polimer filmlerde porların kolaylıkla görülmediği/kapandığı ve yüzeylerin değiştiği gözlemlendi.



Şekil 3.11 Sadece altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (A), GOx immobilize edilmiş PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (B) ve BOD immobilize edilmiş PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda (C) ait SEM görüntüleri.

Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal karakteristiği dönüşümlü voltametri ile belirlendi. Elektrotlar 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı, 100 mV/s tarama hızında, -0.6 ve +0.6 V potansiyel aralığında dönüşümlü voltametri çekimleri gerçekleştirildi (Şekil 3.12). Altın ve kobalt oksit nanopartikül içeren PP-g-PEG polimer film kaplı anot ve katodun elektriksel iletkenliğinin, saf (nanopartikül içermeyen) PP-g-PEG polimer film kaplı elektroda kıyasla oldukça yüksek olduğu açıkça gözlemlendi. Bu sonuca göre polimer içerisine nanopartiküllerin emdirilmesinin EFC sisteminde elektrodun elektroaktivitesini artıracığı söylenebilir.

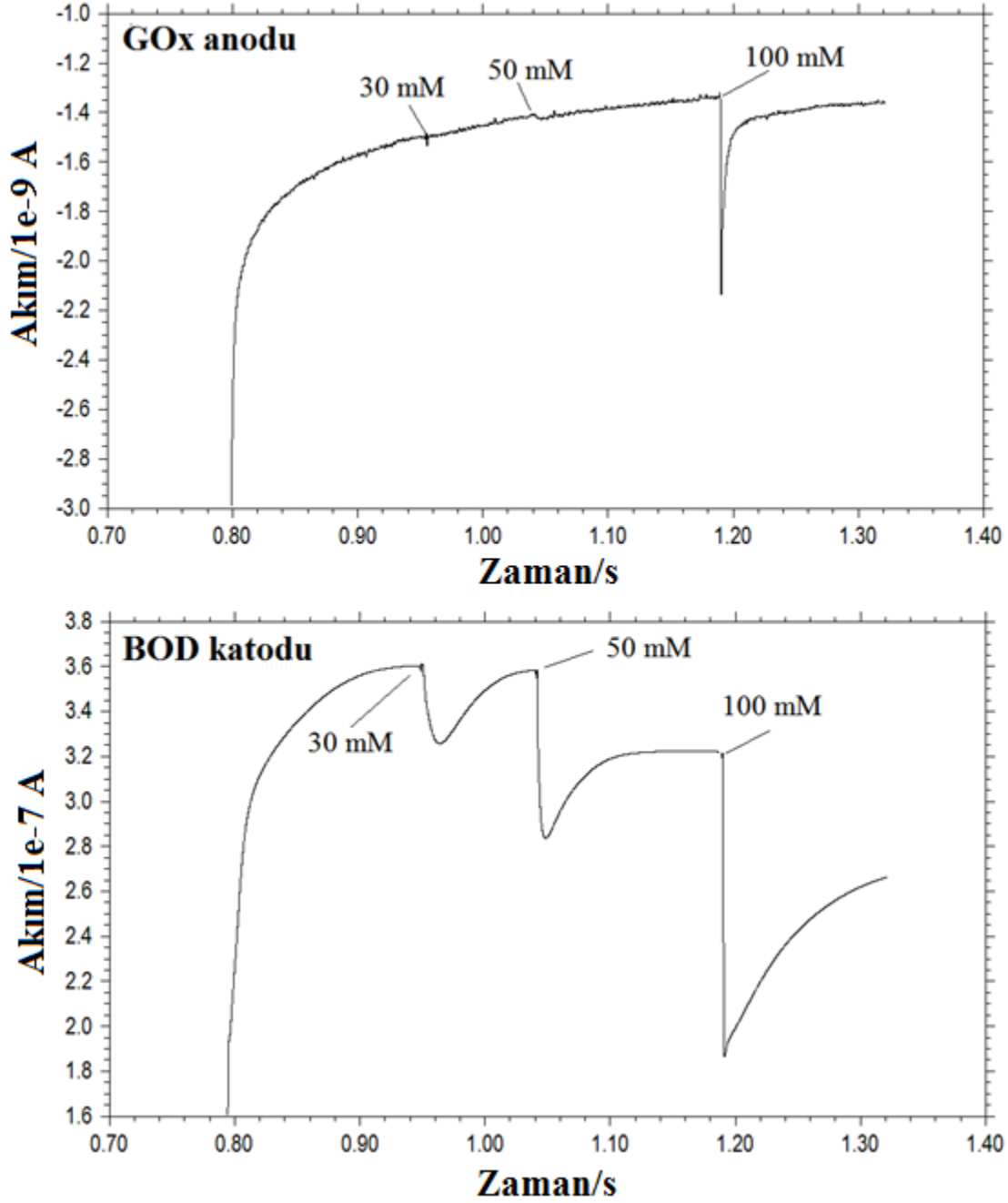


Şekil 3.12 Altın ve kobalt oksit nanopartiküllü/nanopartikülsüz PP-g-PEG polimer film kaplı elektrotlara ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

3.3.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Katot için farklı enzimlerin denenmesi (Enzim Seçimi):

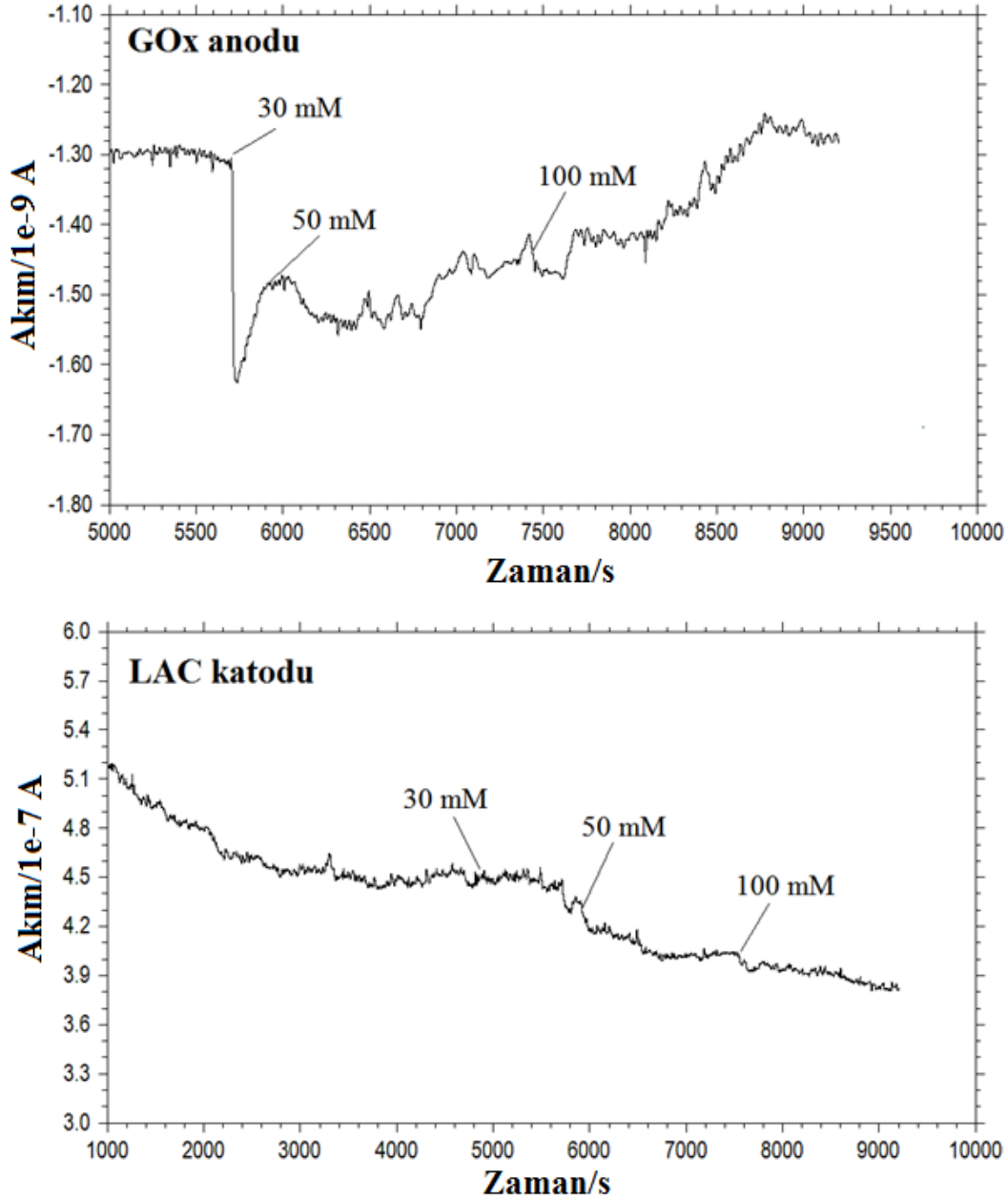
Çalışma elektrotlarının fabrikasyonlarının optimizasyon aşamasında katot elektrodu için BOD ve LAC kullanıldı, sistem performansı test edilerek, tek kompartımanlı EFC sisteminde katot için uygun olan enzim seçildi. Öncelikle, camı karbon anot ve katot üzerine 10 mg/mL'lik toluende hazırlanmış polimer çözeltisinden 2'şer μL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 20 μg) damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 10 mg/mL GOx enziminden 20 μL , katoda 10 mg/mL BOD enziminden 20 μL damlatılıp kurutulularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı. Elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Stok glikoz çözeltisi 2 M olacak şekilde reaksiyon hücresine eklenen tamponla hazırlandı. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.2 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı. Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı, öncelikle arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamında sırasıyla 30, 50 ve 100 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden eklemeler yapıldı. Hem anot hem de katot için elde edilen sinyaller cihaz tarafından kaydedildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle hazırlanmış BOD katodu içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.

LAC enziminin kullanıldığı EFC sistemi elektrotları da aynı şekilde hazırlandı, fark olarak katot elektroduna BOD yerine 10 mg/mL'lik LAC enziminden 20 μ L damlatılıp kurutulularak enzim tutuklandı. Bu sistemde LAC kullanıldığından reaksiyon ortamı LAC enzimine uygun çalışma ortamı olan 10 mL, 100 mM, pH 5 sitrat tamponudur. Reaksiyon ortamına yukarıda anlatıldığı şekilde yapılan glikoz eklemelerinden alınan sinyaller Şekil 3.14'da gösterilmektedir. Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'den alınan sonuçlara göre sentezlenmiş olan polimer için katot enziminin BOD

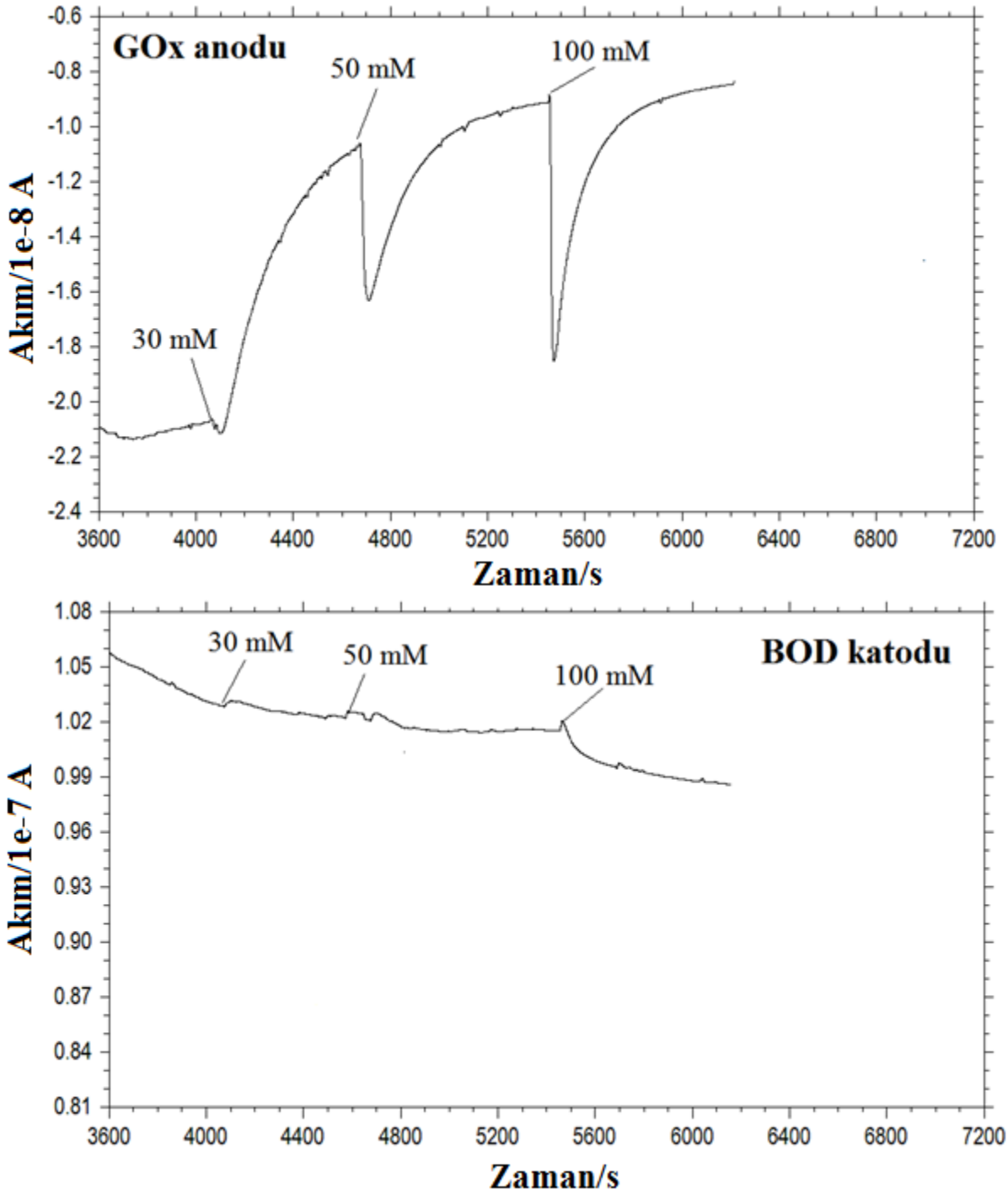
olması sistem performansı açısından uygun olduğu gözlemlendi. LAC katodundan alınan sinyaller gürültülü ve artan glikoz konsantrasyonlarına karşı duyarlı değildir (Şekil 3.14). Aynı şekilde LAC enziminin kullanıldığı EFC sisteminin anot tarafında da kararsız ve gürültülü sinyaller kaydedilmiştir. BOD enzimiyle hazırlanmış katodu içeren EFC sistemi artan konsantrasyonlardaki glikoz eklemeleriyle orantılı artan akım değerleri üretmiştir. Bu nedenle EFC sisteminin katot enzimi olarak BOD'nin kullanılması uygundur.



Şekil 3.14 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle hazırlanmış LAC katodu içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.

Elektrot materyali seçimi:

Her bir çalışma elektrodu hem altın hem de camısı karbon elektrot ile hazırlandı ve elektrotların EFC sistemindeki performansı incelendi. Katot için farklı enzimlerin denenmesi (Enzim Seçimi) başlığı altında anlatılan elektrot fabrikasyon yöntemi kullanılarak camısı karbon anot ve katot yerine altın anot ve katot kullanılarak çalışma elektrotları aynen hazırlandı. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Stok glikoz çözeltisi 2 M olacak şekilde reaksiyon hücresine eklenen tamponla hazırlandı. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.2 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı. Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı, öncelikle arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamında sırasıyla 30, 50 ve 100 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden eklemeler yapıldı. Hem anot hem de katot için elde edilen sinyaller cihaz tarafından kaydedildi (Şekil 3.15). Şekil 3.13'e kıyasla Şekil 3.15'den elde edilen akım değerlerinin yakıt miktarıyla orantısız olduğu ve altın elektrotlar kullanılarak hazırlanan EFC sisteminin kullanışsız olduğu gözlemlendi. Bu nedenle EFC sistemi için camısı karbon elektrodun uygun olduğu sonucuna varıldı.

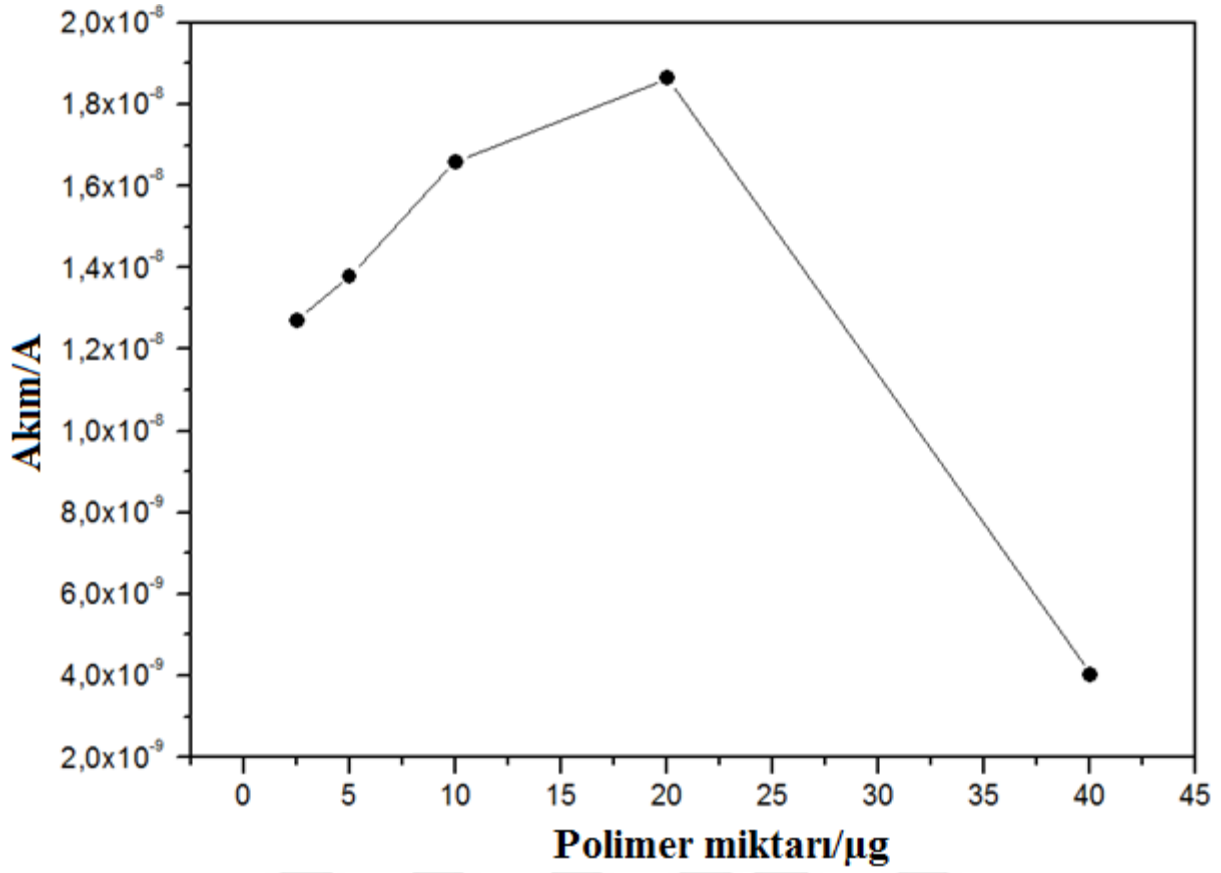


Şekil 3.15 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG kopolimeriyle kaplanmış altın çalışma elektrotları içeren EFC sisteminin artan konsantrasyonlarda glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.

Film yoğunluğu deneyleri:

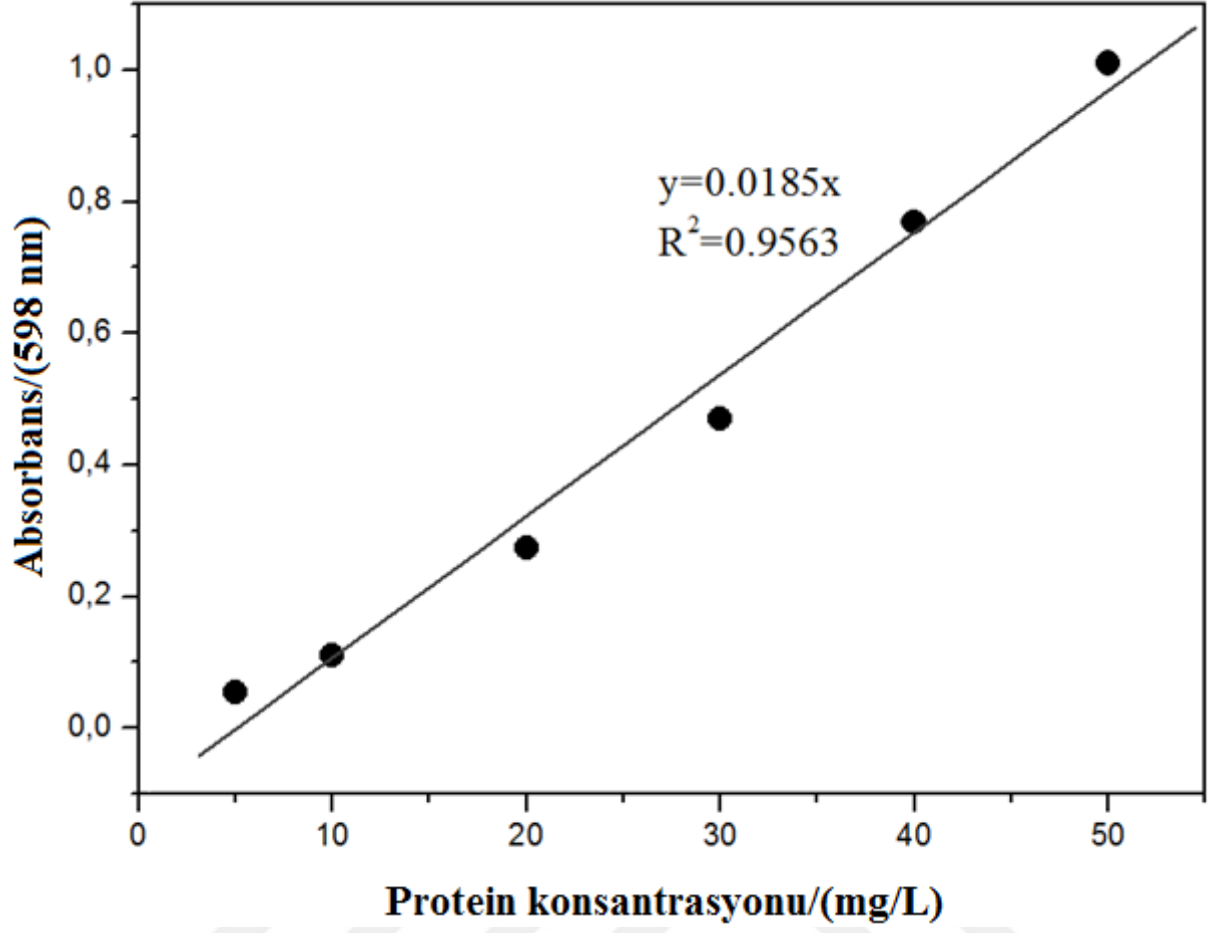
Film yoğunluğu parametresi elektrot performansı için önemlidir. Film yoğunluğunun aşırı olması elektrot ile enzim arasında bariyer oluşturabilir bu durumda enzim ile elektrot

arasındaki elektron transferi güçleşeceğinden sistemden elde edilen güç düşebilir. Bu nedenle polimerik filmin yoğunluğu sistemden en fazla güç alınabilecek şekilde optimize edilmelidir. Bu amaçla, film yoğunluğu deneyleri için elektrot yüzeyinde sırasıyla 2.5-5-10-20-40 µg altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG polimeri olacak şekilde çalışma elektrotları yüzeyleri polimerik filmle kaplandı. Polimer kaplama işlemi polimer çözeltisinden elektrot yüzeyine damlatılıp kurutmak suretiyle gerçekleştirildi. Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanmış elektrotların EFC sistemine takılarak glikoz eklemelerinden alınan akım değerleri karşılaştırıldı. Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanan anot üzerine 10 mg/mL GOx enziminden 20 µL, katoda 10 mg/mL BOD enziminden 20 µL damlatılıp kurutulularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı. Elektrotlar yıkanarak 10 mL'lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.2 V, katoda +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 10 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapılarak elde edilen akım değeri kaydedildi. Bu deney farklı film yoğunluğuyla hazırlanan her elektrot için tekrarlandı (Şekil 3.16). Şekil 3.16'dan görüldüğü üzere 20 µg polimer içeren çalışma elektrodundan aynı miktardaki glikoz eklemesi için diğer film yoğunluklarında hazırlanan çalışma elektrotlarından elde edilen akım değerlerine göre en yüksek akım elde edildi. 20 µg polimer miktarından büyük miktarlarda aynı glikoz eklemesine karşı elde edilen akım sinyalleri düşmeye başlamıştır. Film yoğunluğunun artmasının, elektrot ve enzim arasında gerçekleşen elektron transferi için bir bariyer oluşturduğu ve elektron transfer hızını düşürdüğünden düşük akımlar elde edildiği söylenebilir.



Şekil 3.16 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren farklı film yoğunluğunda PP-g-PEG polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarının glikoz eklemelerinden elde edilen akım değerleri.

Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış elektrot yüzeyinde tutuklanan enzim miktarlarına bakıldı. Bunun için Bradford Protein Analizi metodu uygulandı. Protein analizinde kullanılan Coomassie Brilliant Blue stok boya çözeltisinin hazırlanışı Bölüm 2.6'da verilmiştir. Protein analizi için 5-10-20-30-40 ve 50 mg/L'lik BSA standart protein çözeltileri kalibrasyon için hazırlandı. Standart protein çözeltisinin her biri ve boya çözeltisi eşit hacimde karıştırıldı ve UV-spektrofotometrede 598 nm dalga boyunda absorbans değeri okunarak protein konsantrasyonuna karşı grafiği çizildi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Protein kalibrasyon eğrisi.

Her bir polimer film yoğunluğuna karşı enzim immobilizasyon aşaması sonrası elektrot yıkama sularında enzim tayini yapıldı ve bu sayede enzim kaçakları kontrol edildi. Protein analizine göre 2.5-5-10-20-40 µg altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG polimeriyle hazırlanan elektrotlarda immobilize olan enzim miktarları Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. Polimer film yoğunluğu arttıkça tutuklanan GOx miktarı artmasına rağmen, BOD miktarı fazla değişim göstermemiştir, bu durumda film yoğunluğunun sadece elektrot ve enzim arasındaki elektron transfer hızını etkilediği söylenebilir. Eğer film yoğunluğuyla orantılı olarak katotta tutuklanan BOD enziminin miktarı artmış olsaydı enzimatik reaksiyon sonucu salınan elektronların sayısı da artacağından katotta oksijen redüksiyonu hızlanabilir ve devreden geçen akım değeri de artabilirdi.

Çizelge 3.1 Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanmış çalışma elektrotlarında immobilize olan enzim miktarları.

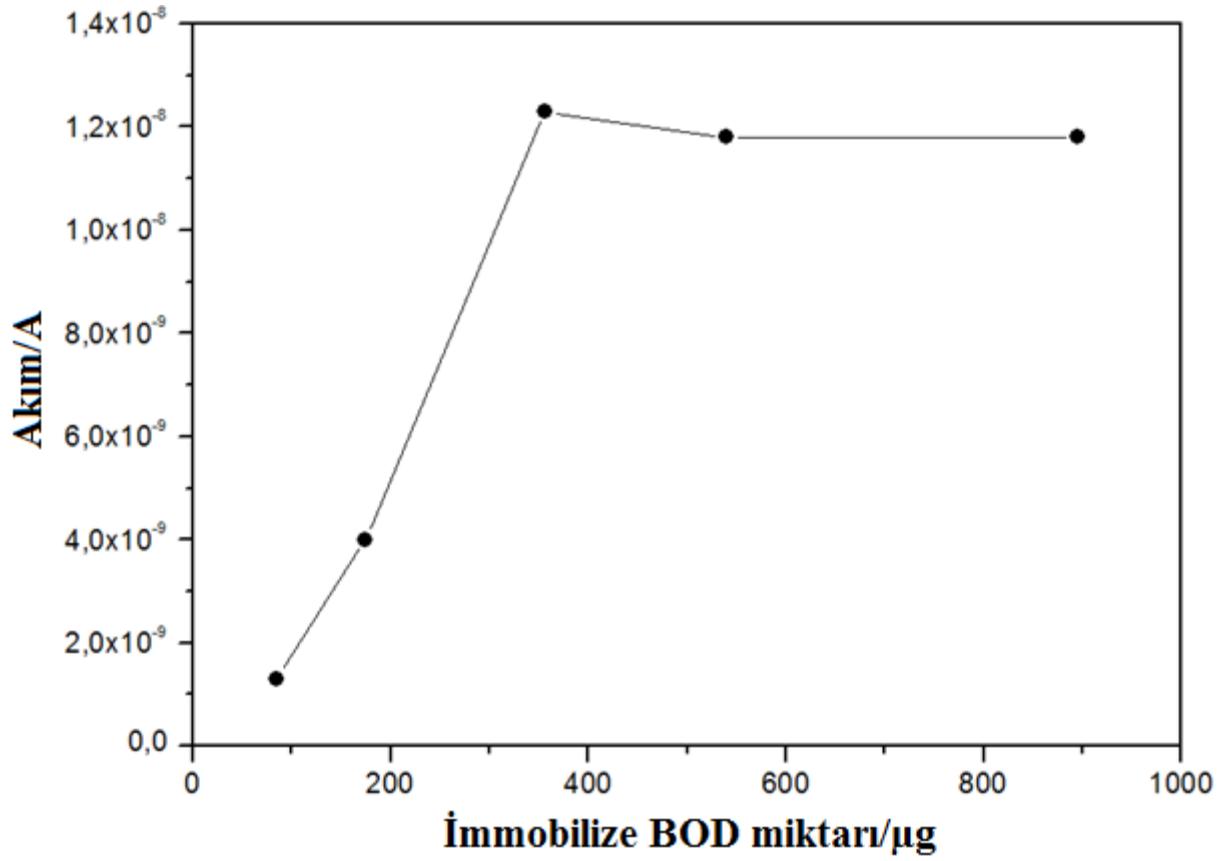
Film yoğunluğu (μg polimer)	İmmobilize edilen GOx miktarı (μg)	İmmobilize edilen BOD miktarı (μg)
2.5	17	24
5	40	27
10	48	26
20	60	26
40	72	28

İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Biyokimyasal reaksiyon hızının enzim miktarına bağlı olarak sınırlanması istenmediğinden aynı polimerlerle, aynı film yoğunluklarında ve aynı enzim immobilizasyon metodu kullanılarak oluşturulan çalışma elektrotlarında kullanılan enzim miktarı değiştirilerek, yüzeyde tutulan enzim miktarı optimize edildi. Hazırlanan elektrotlarda Bradford protein analizi metodu uygulanarak immobilize olmuş enzim miktarı belirlendi. Bu amaçla, anot ve katot kullanılarak, 20 μg 'lık polimer film kalınlığında GOx ve BOD enzimleriyle hazırlanan çalışma elektrotlarıyla kurulan EFC sistemlerinde 10 mM glikoz eklemelerine karşı elde edilen akımlar kaydedildi (Şekil 3.18). Elektrotlar hazırlanırken 20 mg/mL'lik GOx ve BOD enzim çözeltilerinden anot ve katot yüzeyine sırasıyla 5-10-20-30 ve 50 μL damlatılıp yüzey kurutuldu, enzim immobilizasyonu için yeterli süre beklendi. Farklı hacimlerde enzim damlatılarak hazırlanan elektrotlarda protein analizi yapılarak herbir elektrodun immobilize olan enzim miktarı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 3.2'de verildi. Belli bir enzim miktarından sonra, elektrot yüzeyinde bulunan aktif gruplar ve porlar substrata yeterince doymuş olduğundan beklendiği gibi, aynı miktardaki glikoz eklemesinden elde edilen akım değerleri değişmemiştir (Şekil 3.18). Bu durumda sistemde katot için 356 μg BOD enziminin immobilize olmasıyla çalıştığımız glikoz konsantrasyonu aralığı için maksimum akım elde edildi ve bu değer yeterli oldu.

Çizelge 3.2 Farklı hacimlerde enzim damlatılarak hazırlanmış çalışma elektrotlarında immobilize olan enzim miktarları.

Elektrot yüzeyine damlatılan enzim miktarı (μg)	İmmobilize edilen GOx miktarı (μg)	İmmobilize edilen BOD miktarı (μg)
100	49	85
200	110	174
400	185	356
600	314	539
1000	668	895

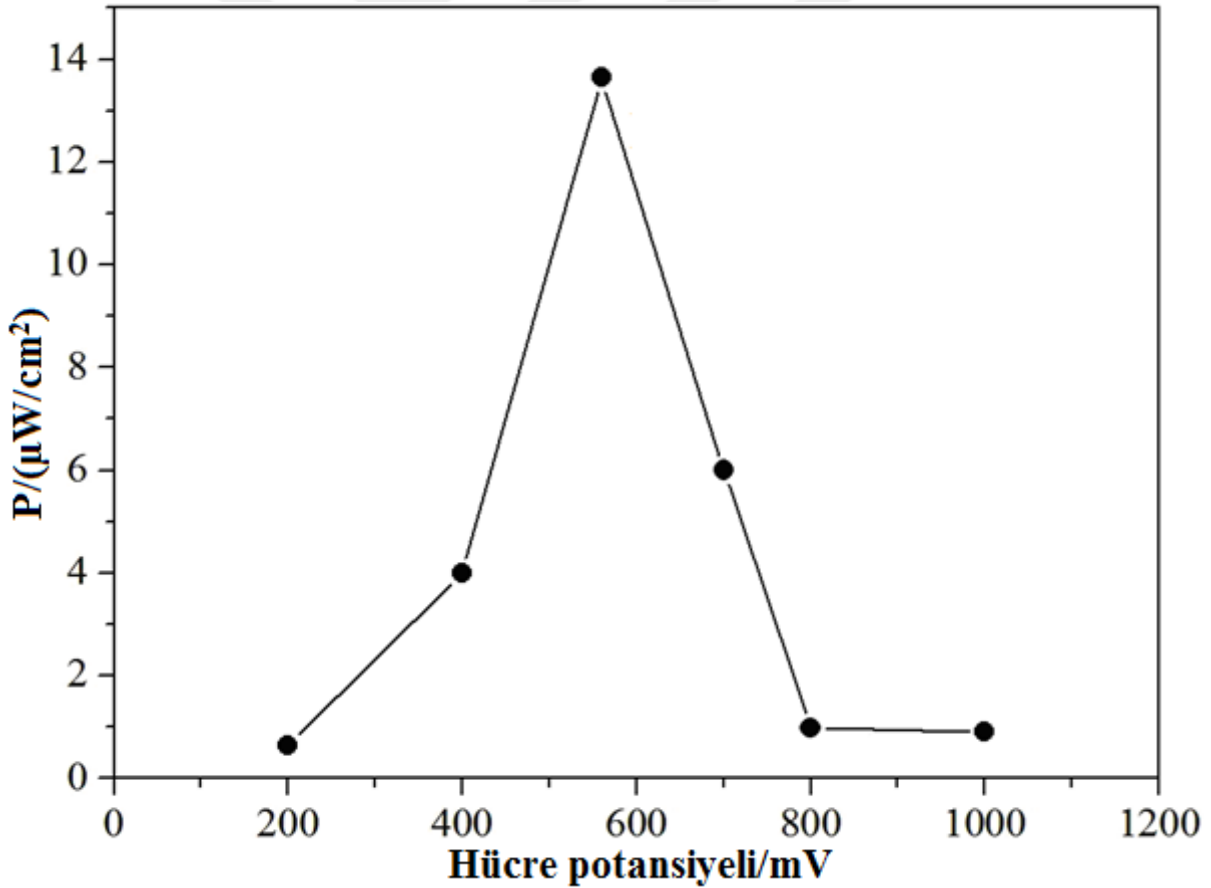


Şekil 3.18 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren 20 μg PP-g-PEG polimer kaplı ve farklı miktarlarda immobilize enzim bağlı EFC sisteminden 10 mM glikoz eklemesine karşı elde edilen akım değerleri.

3.3.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu

Hücre potansiyeli:

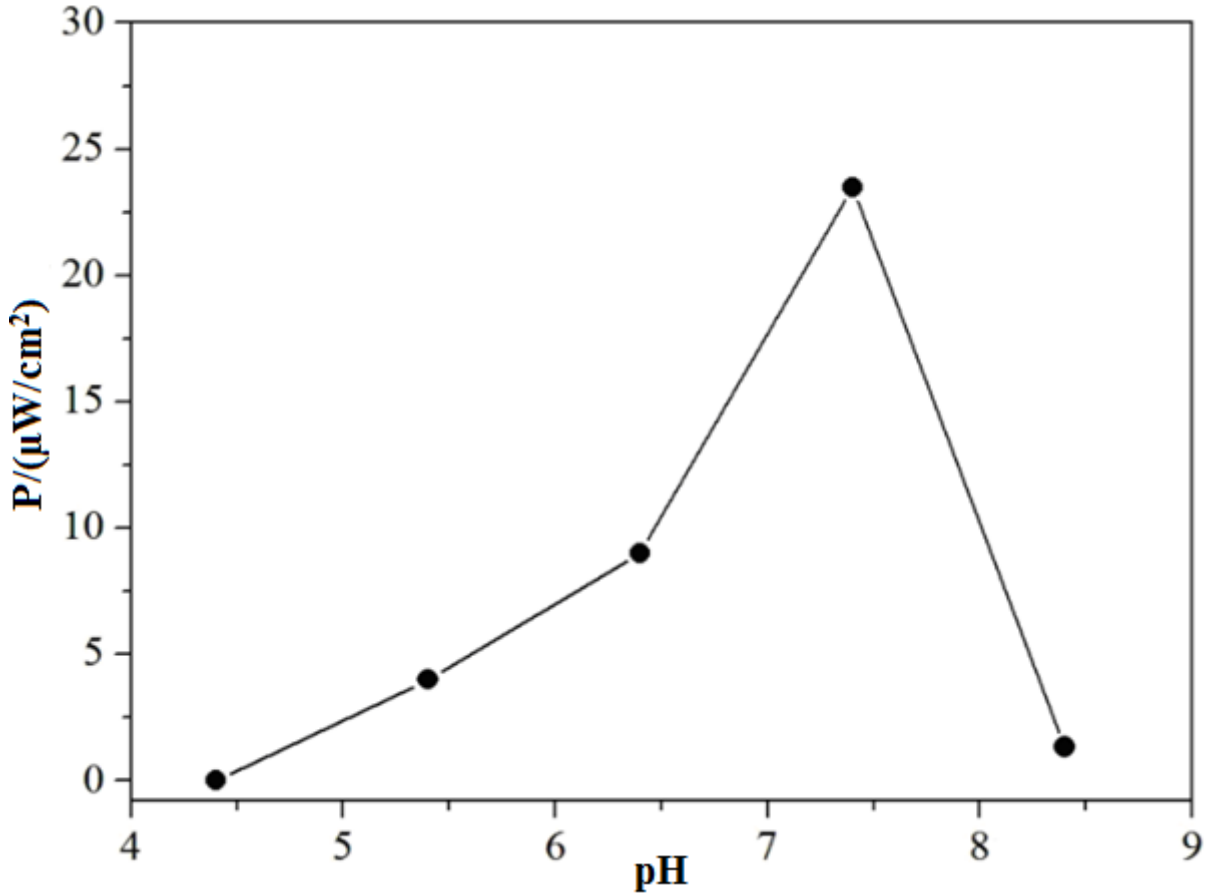
EFC sistemi için en uygun anodik ve katodik potansiyeli bulmak için farklı potansiyel değerleri sisteme sırasıyla uygulanarak (Anot potansiyel /Katot potansiyel: -100/+100, -200/+200, -200/+360, -300/+400, -400/+400, -500/+500 mV) hücre potansiyeli optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla hazırlanan elektrotlar için EFC sistemi kuruldu ve her hücre potansiyeli değeri için standart olarak sisteme 10 mM glikoz ilave edildi, herbir hücre potansiyelinde üretilen akım değerlerinden elde edilen güç yoğunlukları Şekil 3.19’da gösterildi. Güç yoğunluğu 560 mV’lık hücre potansiyeline kadar artarken bu değerden sonra düşmeye başladı. Maksimum güç yoğunluğu, anot için -200 mV ve katot için +360 mV olarak uygulanan potansiyel değerlerinden elde edildi ve hücre potansiyeli 560 mV olarak belirlendi.



Şekil 3.19 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG ile hazırlanmış EFC’den farklı hücre potansiyellerinde elde edilen güç yoğunlukları.

pH:

Enzimlerin optimum pH değerinde daha yüksek aktivite gösterdikleri bilinir bundan dolayı EFC sistemini etkileyen pH parametresi optimize edildi. Bu amaçla pH değerleri 4.4-5.4-6.4-7.4 ve 8.4 olan 100 mM fosfat ve sitrat tamponları hazırlandı ve 20 mM standart glikoz eklemesiyle sistem performansı ölçüldü. Şekil 3.20'den görüldüğü üzere en yüksek güç yoğunluğu pH 7.4 olan fosfat tamponundan elde edildi. Güç yoğunluğu pH 4.4'den pH 7.4'e kadar artarken 7.4'den sonra düşmüştür. Sonuç, GOx ve BOD enziminin tek bir hücre içinde birlikte çalışabildiği pH profilini göstermiş ve her iki enzim için de en aktif ve en uygun çalışma ortamının pH değerinin hazırlanan EFC sistemi için 7.4 olduğu gözlenmiştir.

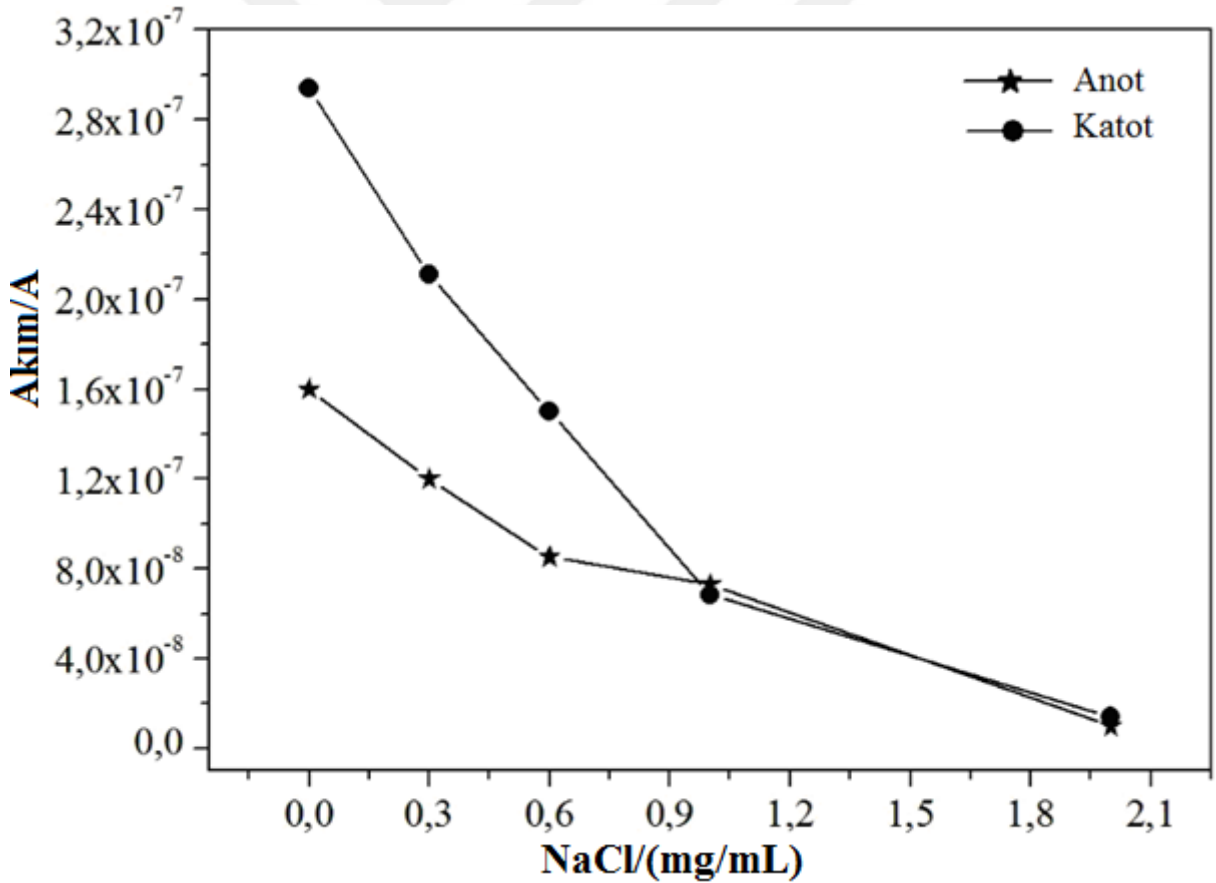


Şekil 3.20 Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG ile hazırlanmış EFC'den farklı pH değerlerinde elde edilen güç yoğunlukları.

Destek elektrolit (Tuz):

Destek elektrolit çalışma elektrotlarının elektrik akımı iletimi için önemli bir parametredir. Destek elektrolitin ortamda bulunmaması, redoks potansiyelini gözlemlemek için sisteme

daha fazla hücre potansiyeli uygulanmasını gerektirebilir. Dolayısıyla destek elektrolit olarak ortama tuz eklenmesi ile EFC performansı araştırıldı. Destek elektroliti olarak NaCl seçildi ve reaksiyon ortamındaki NaCl miktarı değiştirilerek EFC sisteminin performansı değerlendirildi. Bu amaçla reaksiyon ortamına 0.3-0.6-1-2 mg/mL NaCl ilave edilip 560 mV'luk hücre potansiyeli uygulandı ve 20 mM glikoz eklemesiyle her biri ayrı ayrı analiz edildi. Şekil 3.21'den görüldüğü gibi tuz miktarının artmasıyla hem anot hemde katot için akım değerleri düşmektedir. En yüksek akım değeri tuz kullanılmadan elde edilen akım değeridir. Bundan dolayı ortamda aşırı tuz konsantrasyonunun inhibisyon etkisi yarattığı tespit edilmiş ve çalışma tamponunun yeteri kadar tuz konsantrasyonuna sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Destek elektrolit deneyleri enzim aktivitesi ön çalışmalarında da yapılmış ve genel olarak fazla destek elektrolit miktarlarının reaksiyon ortamında olmasının enzim aktivitesini sınırlayıcı olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, bir sonraki EFC çalışmalarında destek elektrolit deneyleri tekrarlanmamıştır.



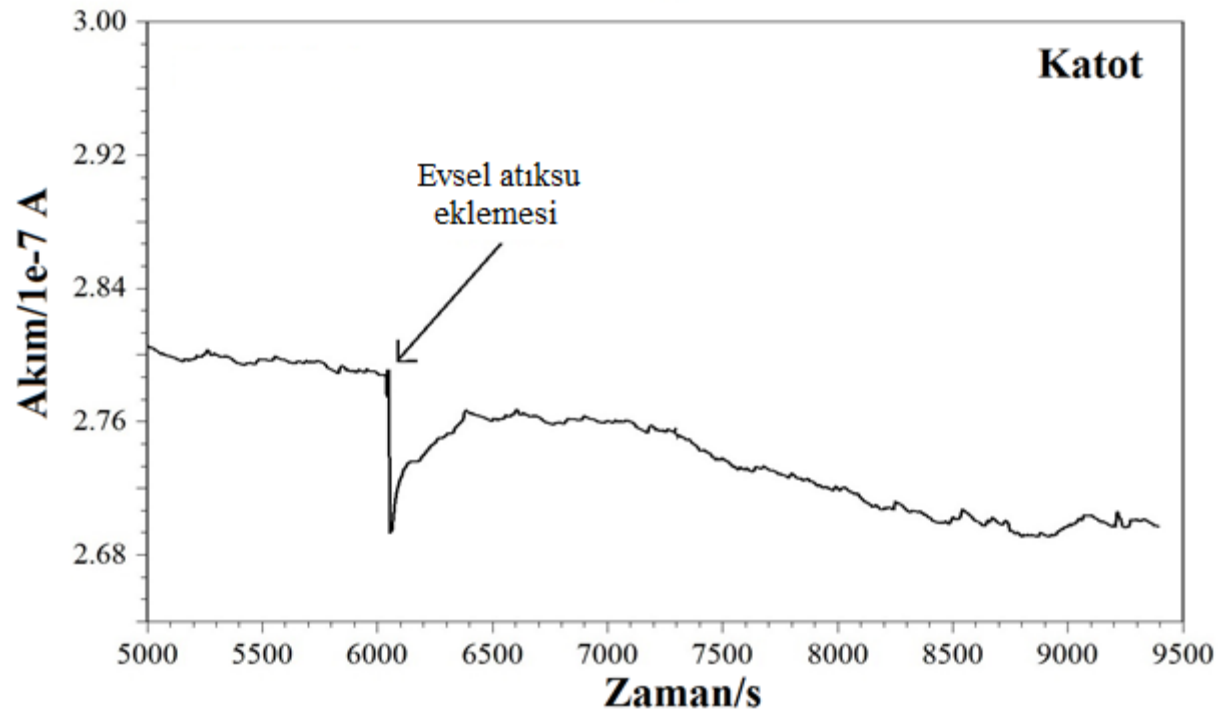
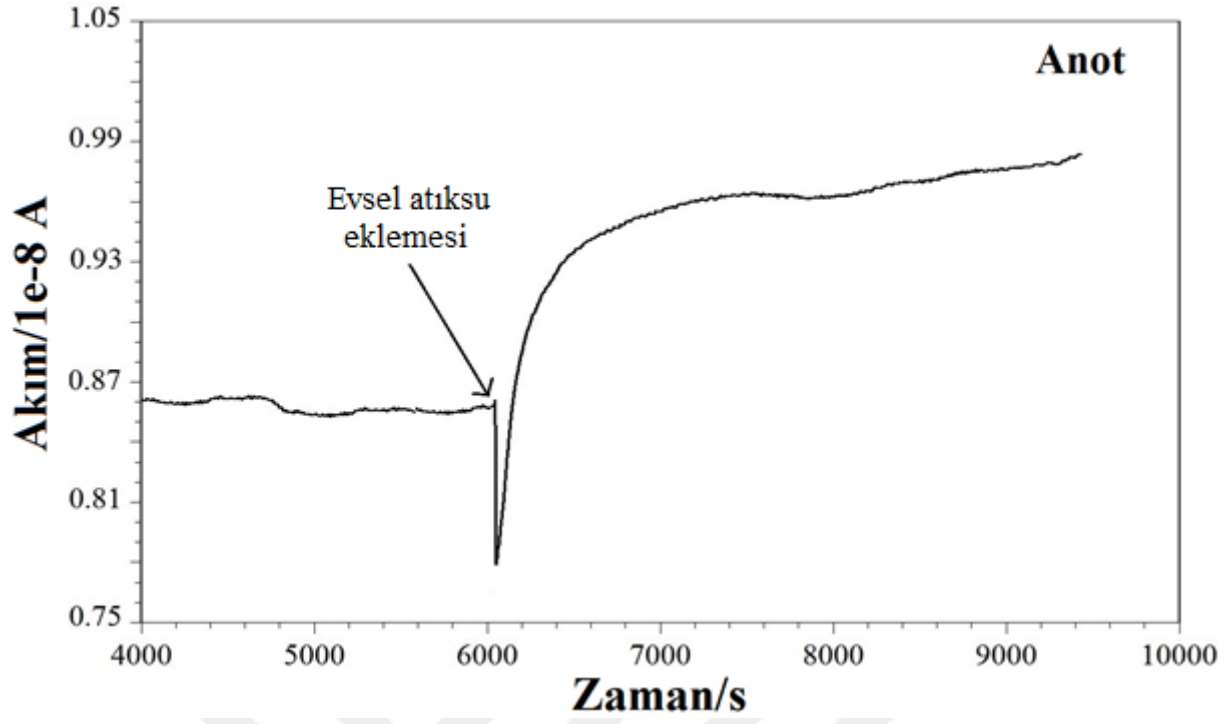
Şekil 3.21 NaCl'nin sistem performansına etkisi.

3.3.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi

Optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrot fabrikasyonu ve işletilmesi şu şekilde olmuştur: Camı karbon anot ve katot üzerine 10 mg/mL'lik toluende hazırlanan polimer çözeltisinden 2'şer μL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 20 μg) damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 10 mg/mL GOx enziminden 20 μL , katoda 10 mg/mL BOD enziminden 20 μL damlatılıp kurularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı (yüzeyde bağlı GOx 185 μg , BOD 356 μg olarak hesaplandı). Elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.2 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı (Hücre potansiyeli: 0.56 V). Sistem dengeye ulaştınca, reaksiyon ortamında 20 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ekleme yapıldığında elde edilen akım değerinden yararlanılarak elektriksel güç yoğunluğu hesaplandı ve $23.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak bulundu (2.1 numaralı eşitlik) .

3.3.5 EFC Sisteminde Eysel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi

Performansı geliştirilmiş altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG polimer tabanlı EFC sisteminin evsel atıksulardan elektrik enerjisi üretebilme potansiyeli araştırıldı. Bölüm 3.3.4'deki şekilde hazırlanan EFC sistemi, 10 mL pH 7.4 fosfat tamponuna daldırılıp, 0.56 V'luk hücre potansiyeli altında çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra, hücreye Zonguldak ili evsel atıksu arıtma tesisi biyolojik arıtım ünitesinin giriş kısımlarından alınan ve filtreden süzülerek yoğun içeriğinden arındırılan evsel atıksu numunesinden 500 μL eklendi (atıksu numunesi güç üretimi sırasında 20 kat seyrelmiştir). Ekleme sırasında cihazın kaydettiği akım değişimi Şekil 3.22'de gösterilmektedir. EFC sisteminden, seyrelmemiş evsel atıksu içeriğindeki glikozun yakıt olarak kullanılmasıyla elde edilen güç yoğunluğu $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı.



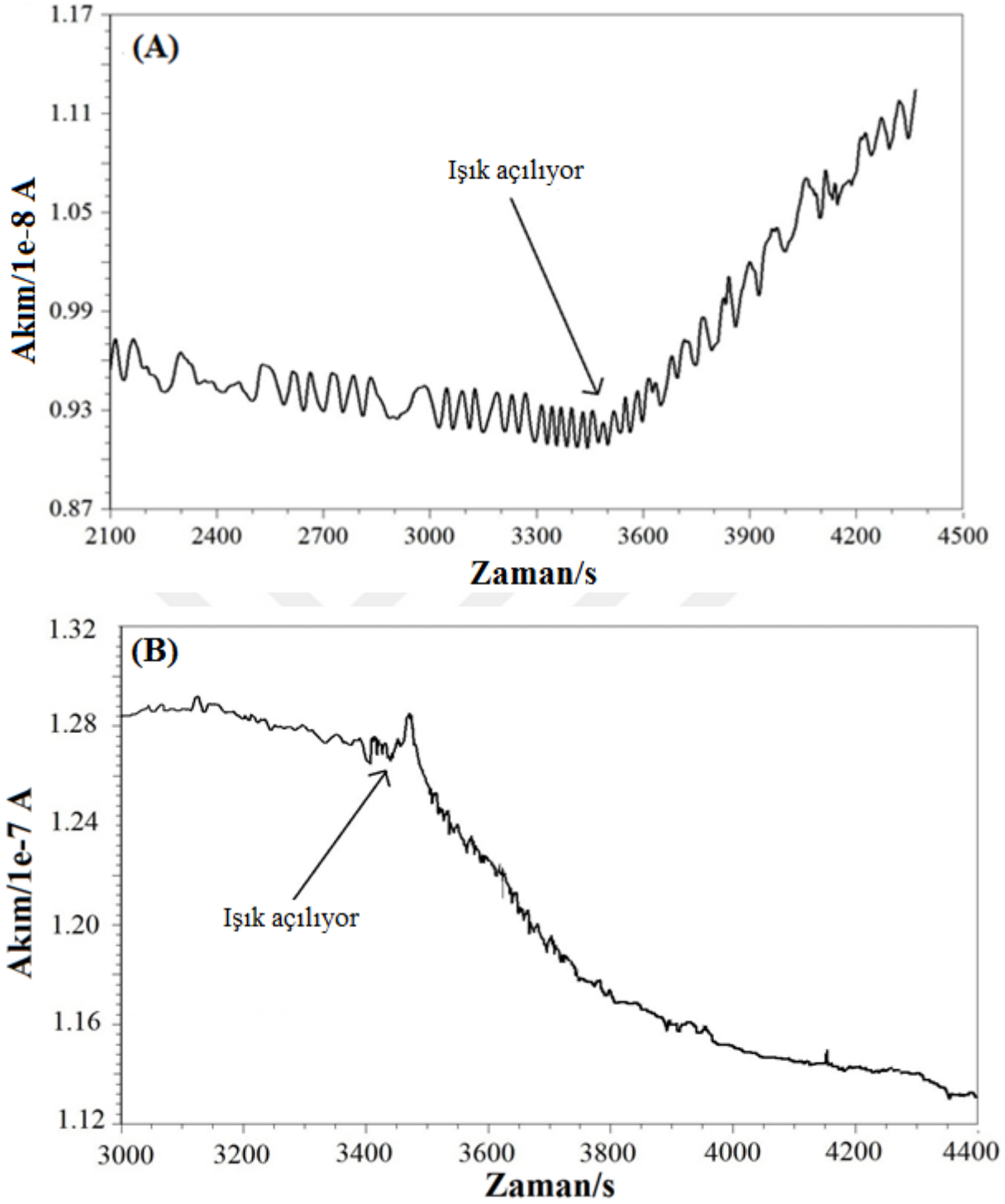
Şekil 3.22 0.56 V'luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen akım değerleri.

3.3.6 EFC Sistemi Kullanılarak *Carpobrotus Acinaciformis* Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi

Deneylerde, bitki yaprağında küçük bir kesik oluşturularak EFC sisteminin elektrotları bu kesikten yaprak içine batırıldı (Şekil 3.23). İşletme sırasında ve sonrasında bitki zarar görmemiş ve gelişimine devam etmiştir. Deneylere başlamadan önce bitki karanlık ortamda 24 saat bekletildi. Bölüm 3.3.4’de verildiği şekilde hazırlanan EFC sisteminin anot ve katot tarafı referans ve karşıt elektrot ile beraber karanlık odada bitkinin yaprağına batırıldı. Sistem 0.56 V’luk hücre potansiyeli altında çalıştırıldı ve dengeye geldikten sonra ışık kaynağı açıldı. Işık kaynağının açılmasıyla ortam aydınlatılarak bitkinin fotosentez yapması sağlandı. Bu sırada bitki bünyesinde üretilmeye başlayan glikozun EFC sisteminde yakıt olarak kullanılması sonucu anotta glikoz, GOx enzimi tarafından oksitlenmeye başlamış, glikoz üretimi fotosentezle devam ettikçe anotta oksidasyon akımının arttığı (Şekil 3.24A), buna bağlı olarak katoda akan elektronlar sayesinde katotta bulunan BOD enziminin oksijeni indirgediği gözlemlendi (Şekil 3.24B). Bitki uygulamasından üretilen güç yoğunluğu $1.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı.



Şekil 3.23 EFC sisteminin bitki bünyesinde işletilmesi.

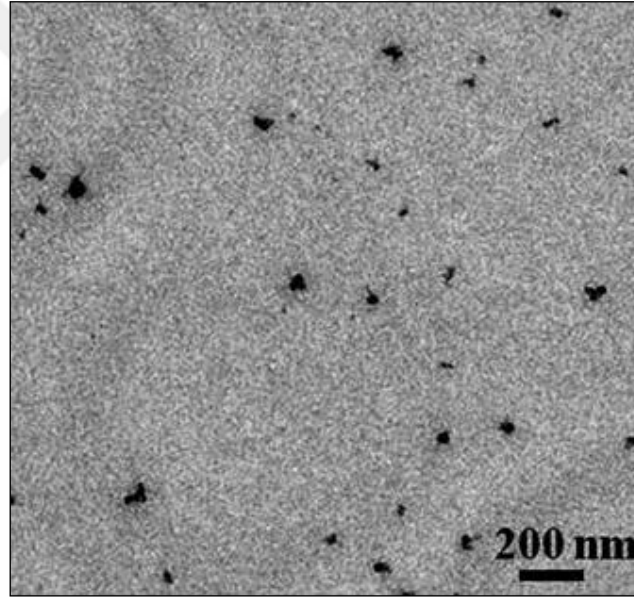


Şekil 3.24 Bitki yaprağında fotosentezle oluşan glikozdan 0.56 V'luk hücre potansiyelinde elde edilen anot (A) ve katot (B) akım değerleri.

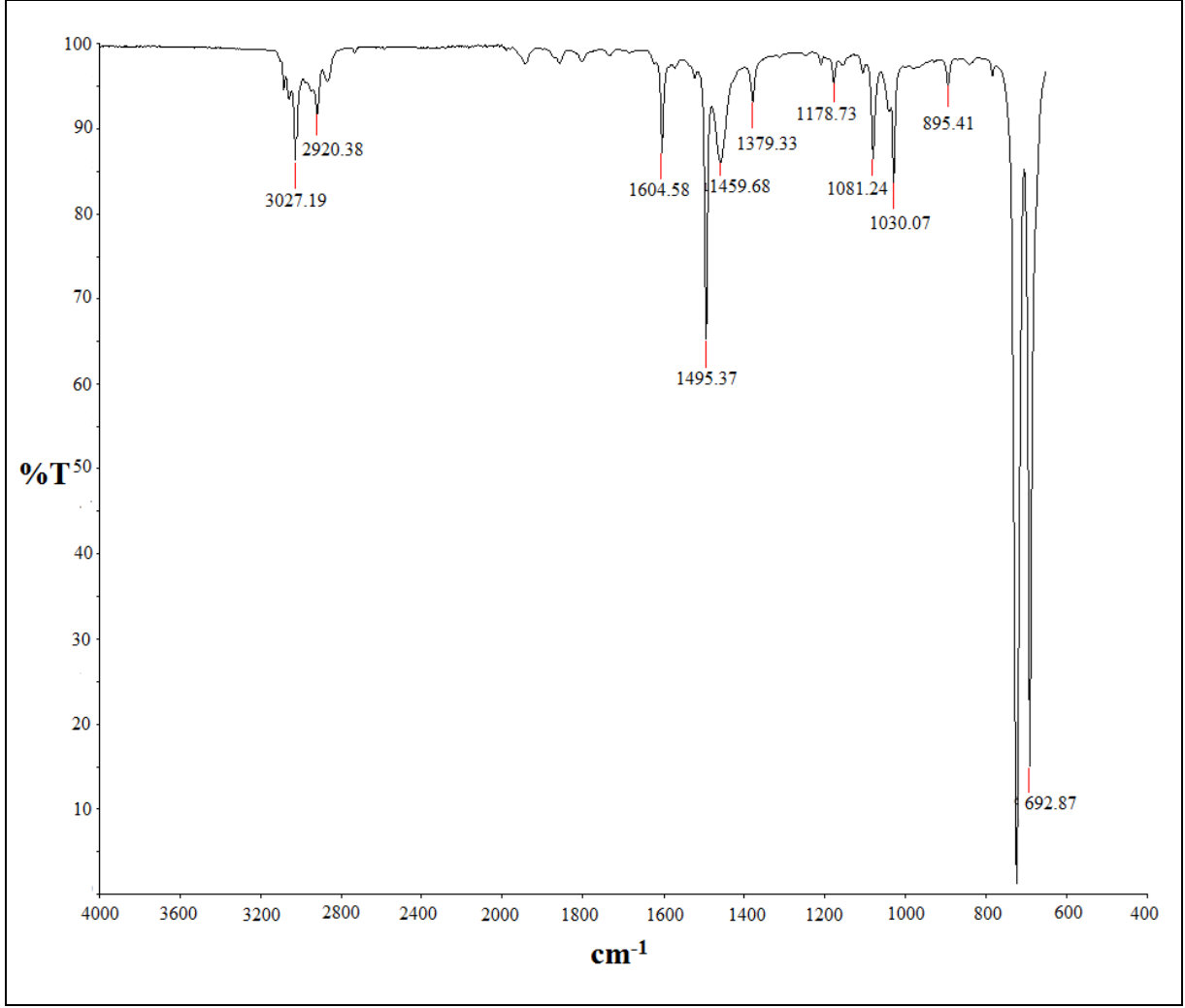
3.4 PP-g-Im TABANLI EFC SİSTEMİ

3.4.1 Karakterizasyon Çalışmaları

Bölüm 2.3.3’de sentezi açıklanan altın nanopartikül içeren PP-g-Im polimerinin 200 nm’de TEM görüntüsü çekildi (Şekil 3.25). TEM görüntüsünde polimer yapısında bulunan altın nanopartiküller gözlemlendi. Analiz sonucunda kümelenmiş partikül boyutu yaklaşık olarak 100 nm olarak tespit edildi. PP-g-Im polimeri FT-IR spektrum analizi Perkin Elmer Spectrum 100 spektrofotometre kullanılarak yapıldı. Şekil 3.26’da PP-g-Im polimerinin FT-IR spektrumu verilmektedir. 1081 cm^{-1} ’de görülen güçlü sinyal C-N bağı ve 1495 cm^{-1} ’deki sinyal ise C=N bağı göstermektedir. C=C ve C-H gerilimlerinin karakteristik pikleri sırasıyla 1604 cm^{-1} ve 2920-3027 cm^{-1} ’de gözlemlenmektedir. Spektrumda gözlemlenen bu pikler imidazol halkasının polimer yapısına kimyasal olarak bağlandığını göstermektedir.

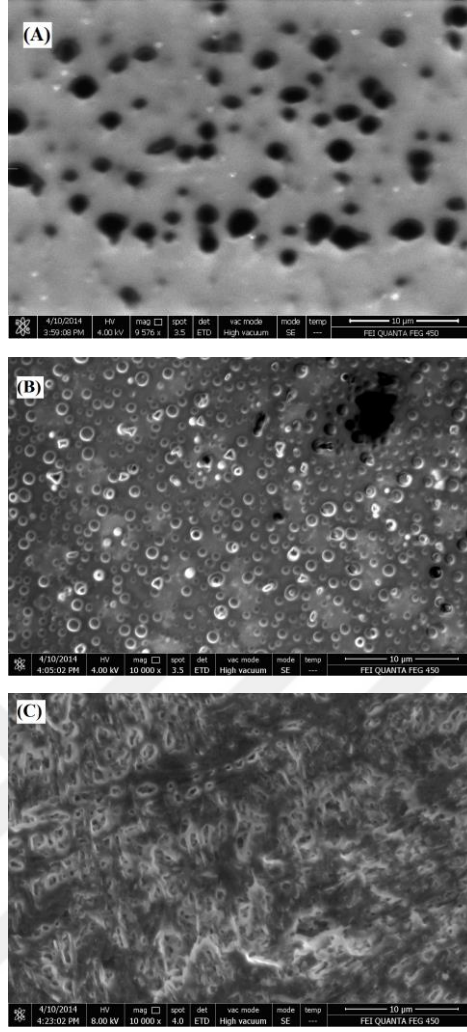


Şekil 3.25 Altın nanopartikül içeren PP-g-Im polimerinin TEM görüntüsü.



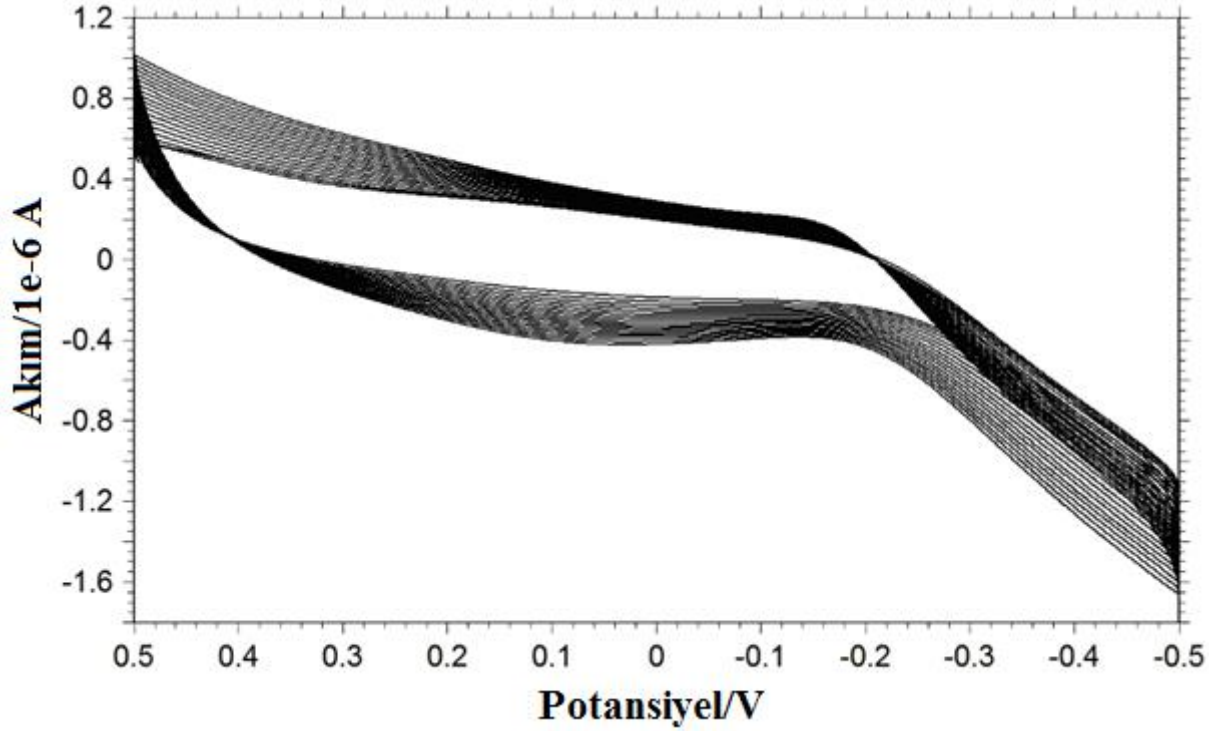
Şekil 3.26 PP-g-Im polimerinin FT-IR spektrumu.

SEM görüntüsü için, altın anot ve katot üzerine 1 mg/mL'lik toluende hazırlanmış polimer çözeltisinden 1'er μL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 1 μg) damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 20 mg/mL GOx enziminden 15 μL , katoda 20 mg/mL BOD enziminden 15 μL damlatılıp kurutularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı. Elektrotlara kaplanan PP-g-Im polimerinin (Şekil 3.27A), GOx immobilize edilen PP-g-Im polimerinin (Şekil 3.27B) ve BOD immobilize edilen PP-g-Im polimerinin (Şekil 3.27C) Quanta FEG 450 model Scanning Electron Microscope (SEM) kullanarak elde edilen görüntüleri aşağıda verilmektedir. Sonuçlar saf ve enzim immobilize edilen PP-g-Im polimerinin yüzey morfolojilerinin değiştiğini göstermektedir.



Şekil 3.27 Saf PP-g-Im polimeri (A), GOx immobilize edilmiş PP-g-Im polimeri (B) ve BOD immobilize edilmiş PP-g-Im polimeri (C) ile kaplanmış elektrotların SEM görüntüleri.

EFC sisteminin katodunun dönüşümlü voltamogramı Şekil 3.28’de gösterilmektedir. CV çalışması 100 mM pH 7.4 fosfat tamponunun 10 mL’inde, -0.5 / +0.5 V potansiyel aralığında ve 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirildi. CV analiz sonuçları polimer filmin, elektrot materyali ve enzim arasındaki elektron transferini engellemediğini göstermektedir.



Şekil 3.28 PP-g-Im tabanlı EFC sisteminin katoduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

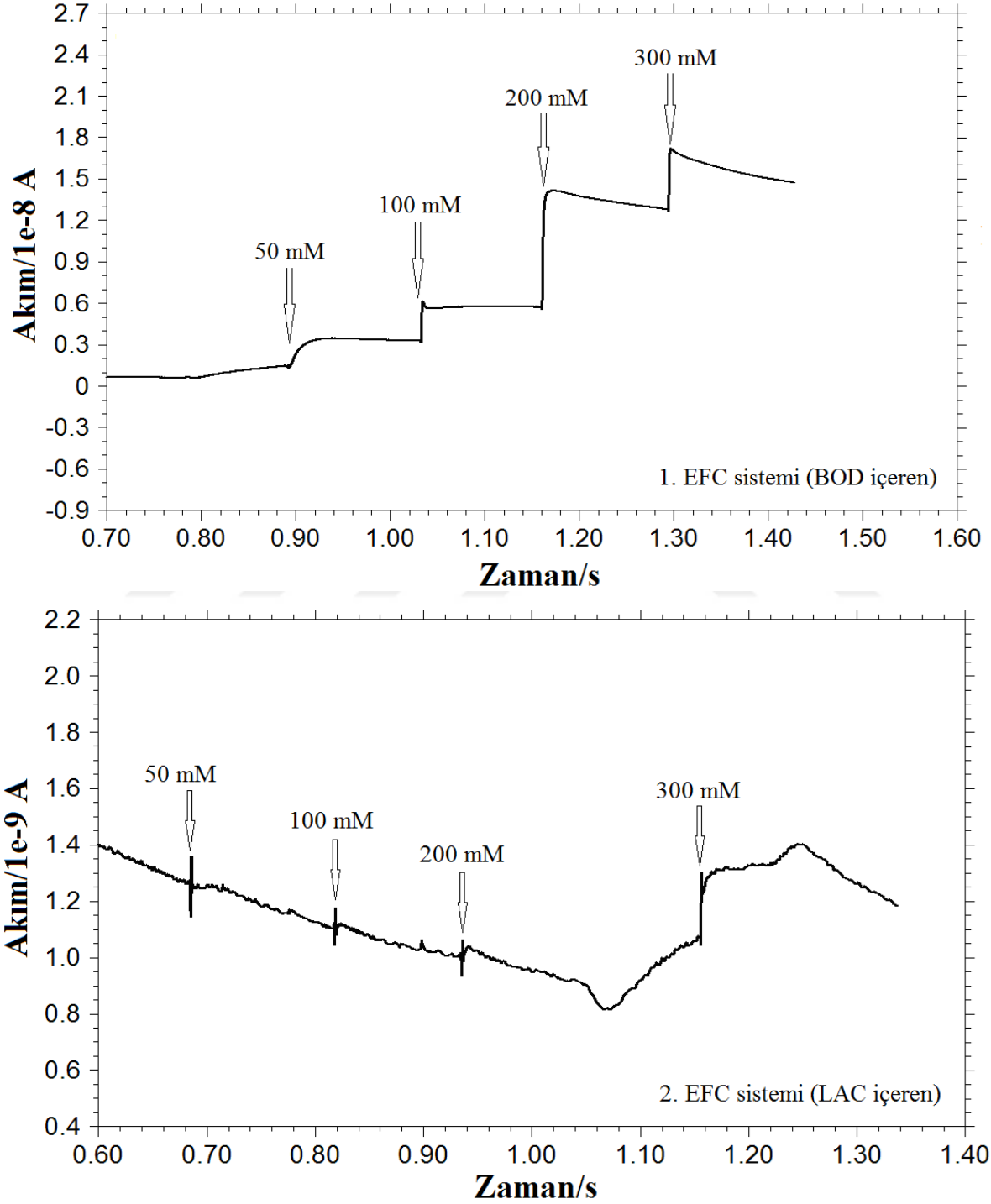
3.4.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Katot için farklı enzimlerin denenmesi (Enzim Seçimi):

PP-g-Im polimerinde bulunan imidazol grupları polipropilen ana zinciri üzerinde uzun dallar oluşturarak enzimlerin fiziksel tutulumlarına olanak sağlamakta ve polimerin yüzey alanını genişletmektedir. Altın nanopartiküller içeren PP-g-Im polimerinin toluende 1 mg/mL'lik çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden altın elektrot yüzeyine 1 μ L polimer damlatılarak kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandı ve sonra 20 mg/mL şeklinde hazırlanan GOx çözeltisinden anoda 15 μ L, 20 mg/mL şeklinde hazırlanan BOD çözeltisinden katoda 15 μ L damlatılarak oda koşullarında 2 saat beklendi, bu şekilde 1. EFC sistemi elektrotları hazırlandı. 2. EFC sisteminin anodu aynı prosedürle katodu ise LAC enzimiyle aynı şekilde hazırlandı.

1. EFC sistemi pH 7.4 fosfat tamponununun 10 mL'sine, 2. EFC sistemi ise pH 5 asetat tamponununun 10 mL'sine Ag/AgCl referans elektrotu ve Pt karşıt elektroduyla birlikte daldırılarak sırayla çalıştırıldı. 1. EFC sisteminin anot tarafına -0.2 V, katot tarafına +0.36 V'luk, 2. EFC sisteminin anot tarafına -0.2 V, katot tarafına +0.59 V'luk potansiyel

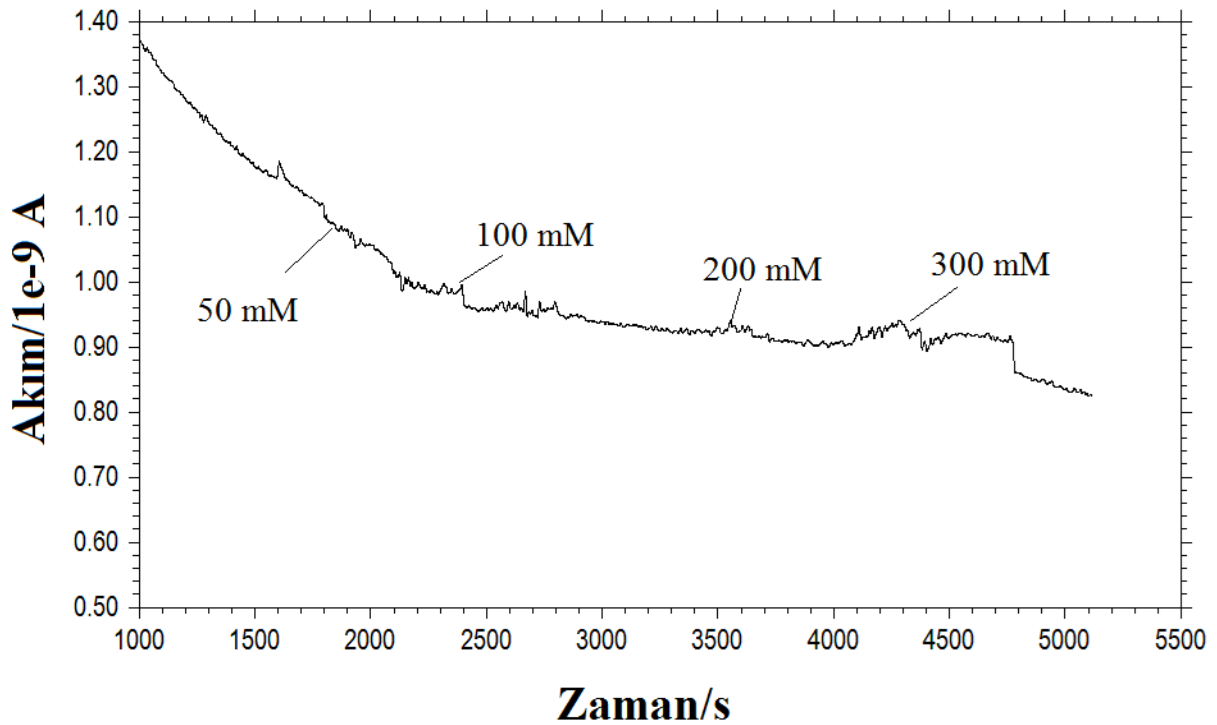
uygulanarak sistem çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra ortamda sırasıyla 50, 100, 200 ve 300 mM glikoz olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her iki sisteme ait elde edilen akım değerleri Şekil 3.29'da gösterilmektedir. Akım/zaman grafiklerinden BOD enziminin PP-g-Im polimeri ile daha iyi sonuç verdiği tespit edildi.



Şekil 3.29 Farklı katot enzimleriyle hazırlanmış altın içeren PP-g-Im tabanlı EFC sistemlerinden üretilen akım sinyalleri.

Elektrot materyali seçimi:

Enzim seçimi tamamlandıktan sonra sistem için uygun elektrot materyali için denemeler yapıldı. Bölüm 3.4.2'deki gibi 1. EFC sisteminin elektrotları hazırlandı. Altın elektrot yerine camsı karbon anot ve katot kullanıldı. Anot tarafına -0.2 V, katot tarafına +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra ortamda sırasıyla 50, 100, 200 ve 300 mM glikoz olacak şekilde eklemeler yapıldı. Üretilen akım değerleri Şekil 3.30'da gösterilmektedir. Deney sonuçları incelendiğinde altın elektrodun glikoz eklemesine karşı cevap verdiği (Şekil 3.24, 1. EFC sistemine ait grafik) ancak camsı karbon elektrodun, glikozun her test edilen konsantrasyonuna tepkisiz olduğu gözlemlendi. Altın elektrot, altın nanopartiküller içeren PP-g-Im polimeri için uygun elektrot materyali olarak seçildi.

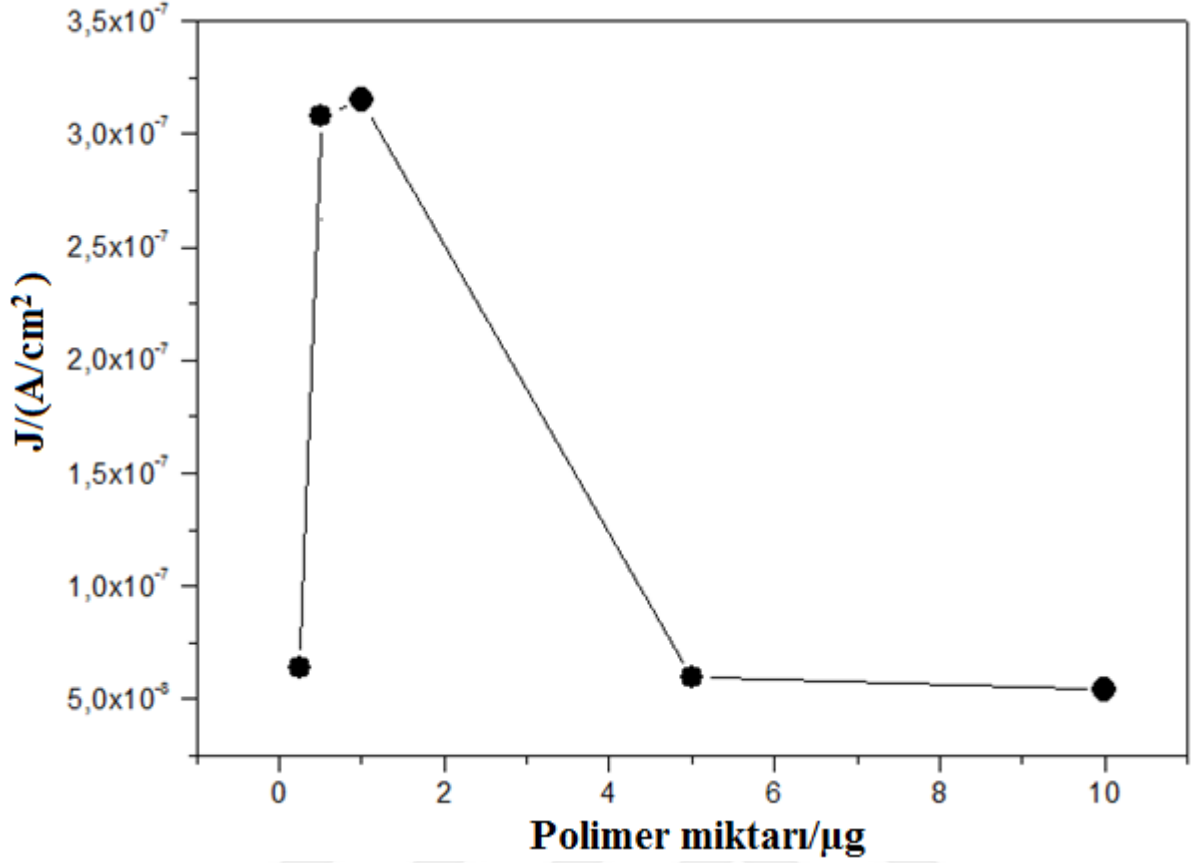


Şekil 3.30 Camsı karbon elektrotlarla hazırlanmış PP-g-Im tabanlı EFC sisteminden üretilen akım sinyalleri.

Film yoğunluğu deneyleri:

Film yoğunluğu deneyleri için altın elektrotların yüzeyinde sırasıyla 0.25-0.5-1-5-10 μg altın nanopartiküller içeren PP-g-Im polimeri olacak şekilde çalışma elektrotları yüzeyi polimerik

filmle kaplandı. Polimer kaplama işlemi polimer çözeltisinden elektrot yüzeyine damlatılıp kurutmak suretiyle gerçekleştirildi. Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanan elektrotların EFC sistemine takılarak glikoz eklemelerinden alınan akım değerleri karşılaştırıldı. Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanan anot üzerine 20 mg/mL GOx enziminden 15 µL, katoda 20 mg/mL BOD enziminden 15 µL damlatılıp kurutularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı. Elektrotlar yıkanarak 10 mL'lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.2 V, katoda +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 10 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi. Bu deney farklı film kalınlığıyla hazırlanan her elektrot için tekrarlandı (Şekil 3.31). Şekil 3.31'den görüldüğü üzere 1 µg polimer içeren çalışma elektrodundan aynı miktardaki glikoz eklemesi için diğer film kalınlıklarında hazırlanan çalışma elektrotlarından elde edilen akım yoğunluklarına göre en yüksek akım yoğunluğu elde edildi. 1 µg polimer miktarından büyük miktarlarda polimer film yoğunluklarında aynı glikoz eklemesine karşı elde edilen akım sinyalleri düşmeye başlamıştır. PP-g-Im polimer tabanlı EFC sisteminde elektrot yüzeylerine uygulanması gereken optimum polimer dozunun 1 µg olduğu belirlenmiştir.

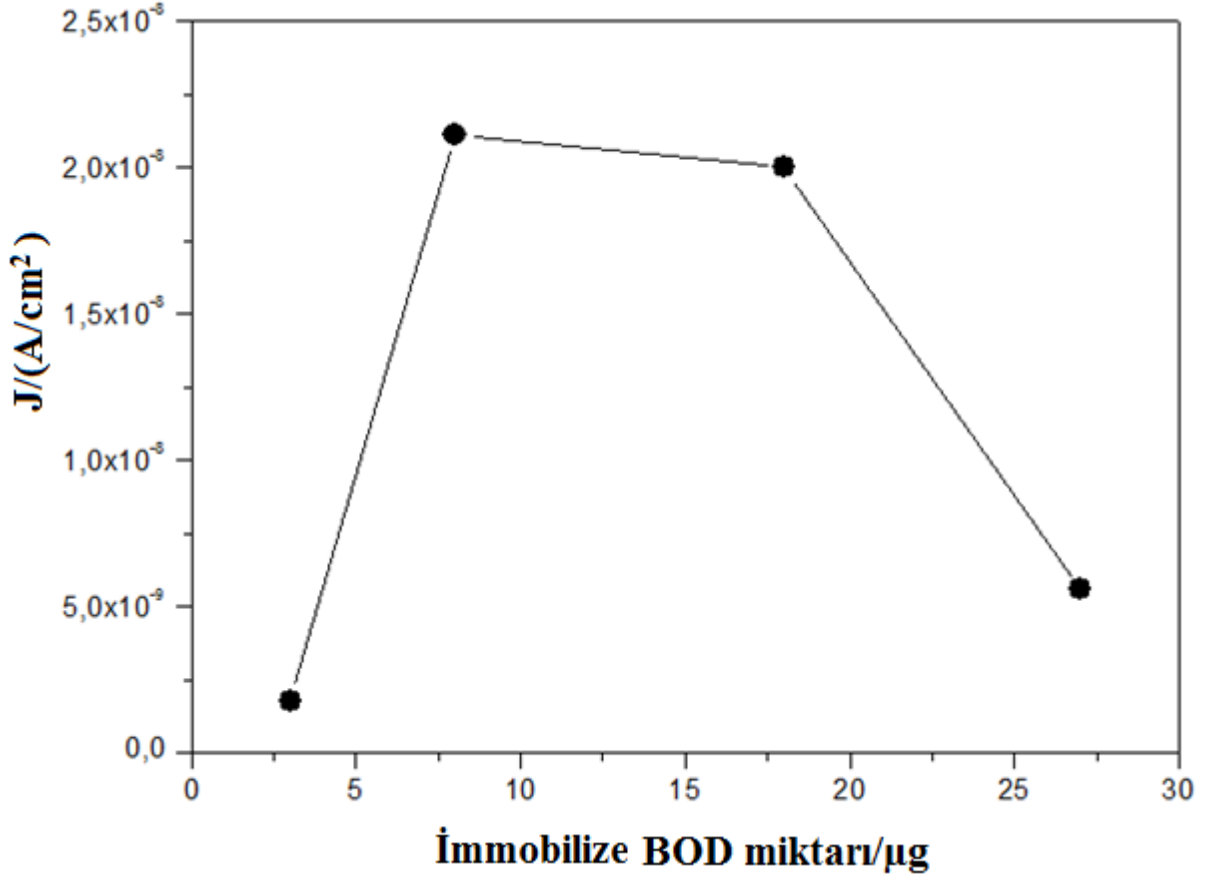


Şekil 3.31 Altın nanopartiküller içeren farklı film yoğunluklarında PP-g-Im polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarının glikoz eklemelerinden elde edilen akım yoğunlukları.

İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Elektrotlar hazırlanırken 20 mg/mL'lik GOx ve BOD enzim çözeltilerinden anot ve katot yüzeyine sırasıyla 10-15-20 ve 25'er µL damlatılarak hazırlanan 5 EFC sistemi dizayn edildi. Farklı hacimlerde enzim damlatılarak hazırlanan elektrotlar test edildi ve en yüksek akım değeri 15 µL'lik enzim damlatmasıyla hazırlanan elektrottan elde edildi. Bradford Protein analizi yapılarak yüzeyde damlatma sonucu bağlanan GOx ve BOD (10-15-20-25 µL damlatma sonucu yüzeye immobilize olan enzim miktarları sırasıyla 3-8-18-27 µg) miktarları tespit edildi. Altın anot ve katot kullanılarak 1 µg'lık polimer film yoğunluğunda değişen miktarlarda GOx ve BOD içeren çalışma elektrotlarıyla kurulan EFC sistemlerinde 0.56 V'luk hücre potansiyelinde 10 mM glikoz eklemelerine karşı elde edilen akımlar kaydedildi (Şekil 3.32). 15 µL'lik damlatma sonucu en yüksek akım değeri elde edildi ve enzim miktarının arttırılmasına gerek olmadığı anlaşıldı. 15 µL'lik enzim damlatma işleminden yüzeye 8 µg BOD immobilize olduğu tespit edildi. Belli bir enzim hacmi yüklemesinden sonra yüzeye

damlatılan enzim hacmi arttıkça yüzeye bağlanan GOx ve BOD miktarı artmasına rağmen akım yoğunluklarının düştüğü gözlemlendi. Bu durum, enzimle aşırı yüklenen elektrot yüzeyinde substrat difüzyonunun yavaşlamasına ve elektron transferi için film yüzeyinin ekstra bir direnç göstermiş olduğuna dayandırılabilir.



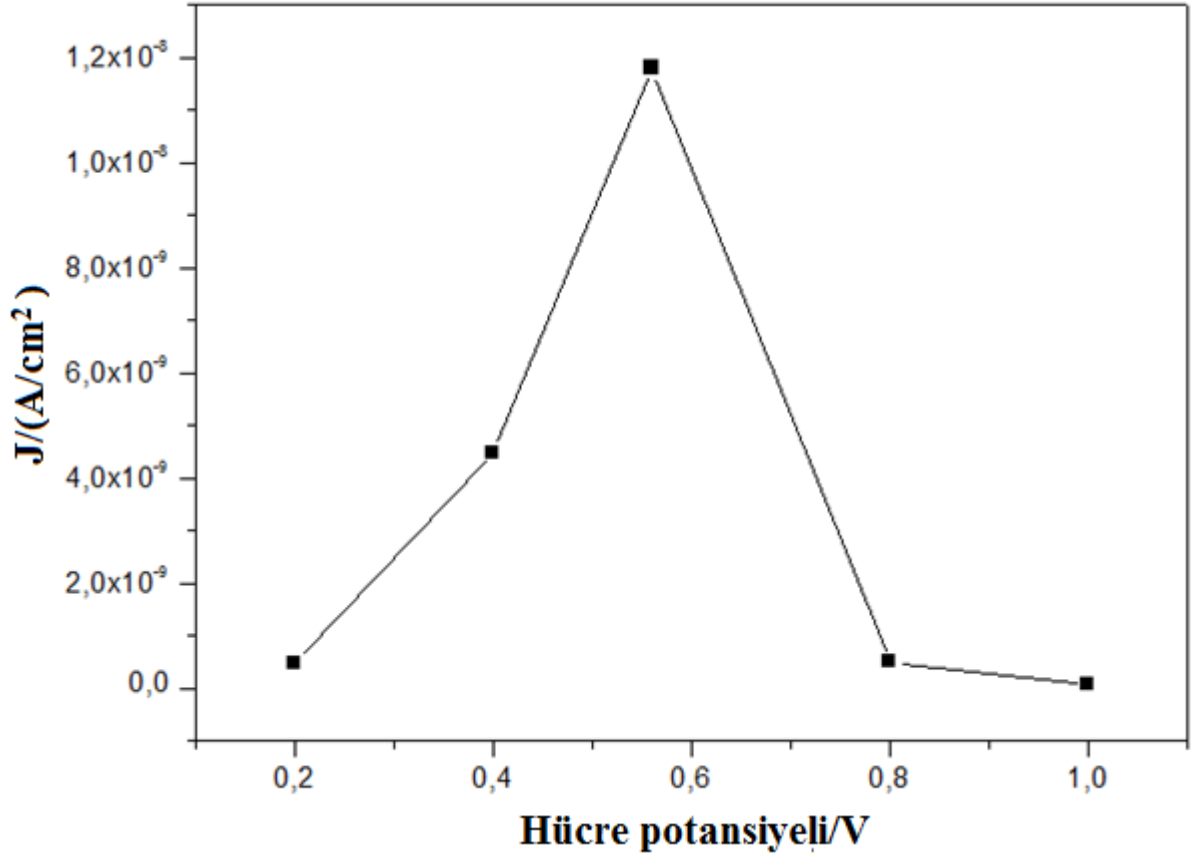
Şekil 3.32 Altın nanopartikül içeren PP-g-Im polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrotlarında farklı immobilize enzim miktarlarından glikoz eklemesine karşı elde edilen akım yoğunlukları.

3.4.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu

Hücre potansiyeli:

Maksimum performansa ulaşabilen EFC sistemi için en uygun anodik ve katodik potansiyel değerlerinin optimizasyon deneylerinde, Anot potansiyel / Katot potansiyel değerleri sırasıyla : -0.1/+0.1, -0.2/+0.2, -0.2/+0.36, -0.4/+0.4, -0.5/+0.5 V olacak şekilde sisteme potansiyel uygulandı. Bu amaçla hazırlanan elektrotlar için EFC sistemi kuruldu ve her hücre potansiyeli değeri için standart olarak sisteme 5 mM glikoz ilave edildi, akım yoğunlukları kaydedildi

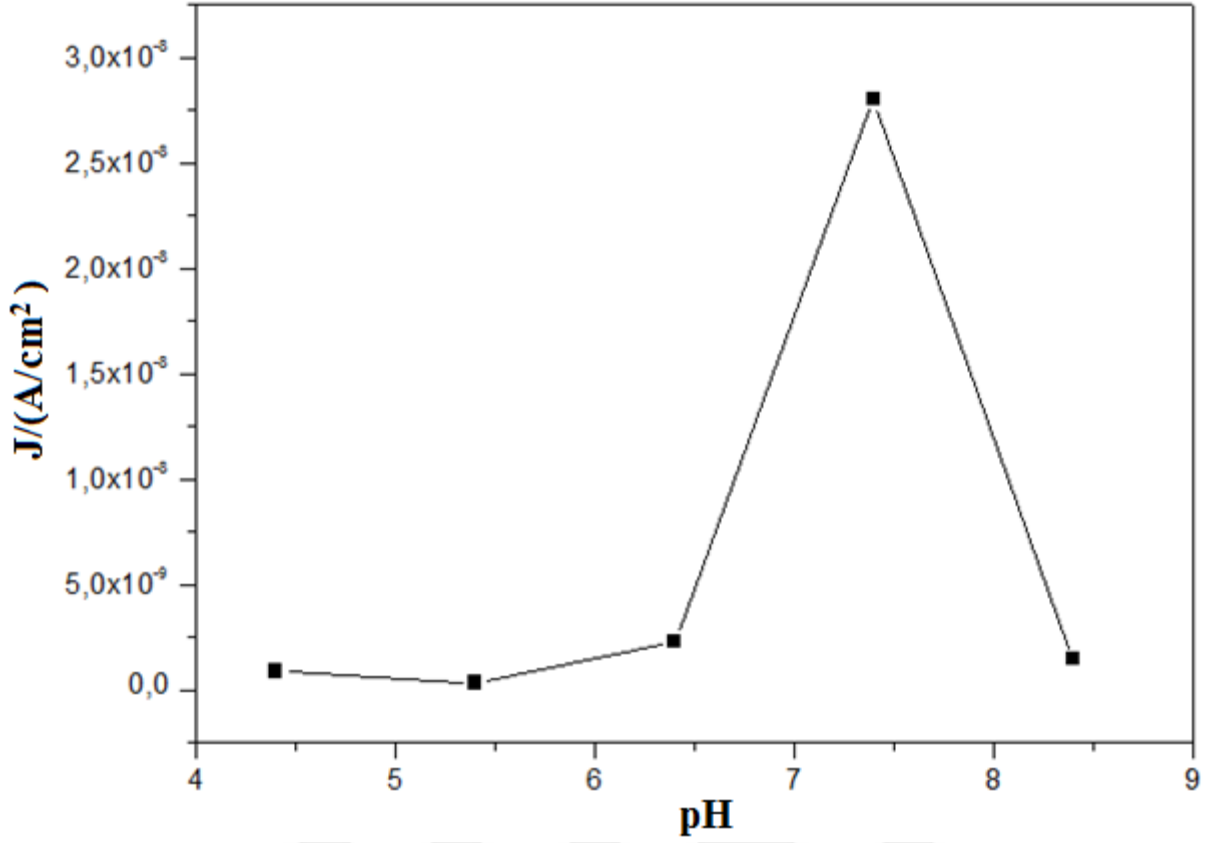
(Şekil 3.33). Maksimum akım yoğunluğuna anot için -0.2 V ve katot için +0.36 V (hücre potansiyeli 0.56 V) uygulandığında ulaşıldı.



Şekil 3.33 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.

pH:

pH değerleri 4.4-5.4-6.4-7.4 ve 8.4 olan 100 mM fosfat ve asetat tamponları hazırlandı ve 15 mM standart glukoz eklemesiyle sistem performansı ölçüldü. Şekil 3.34'den görüldüğü üzere en yüksek akım yoğunluğu pH 7.4 olan fosfat tamponundan elde edildi. Akım yoğunluğu pH 4.4'den pH 7.4'e kadar artarken 7.4'den sonra düşmüştür. Sonuçlar GOx ve BOD enzimleri için en uygun çalışma ortamının pH 7.4 olduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 3.34 pH'nin sistem performansı üzerine etkisi.

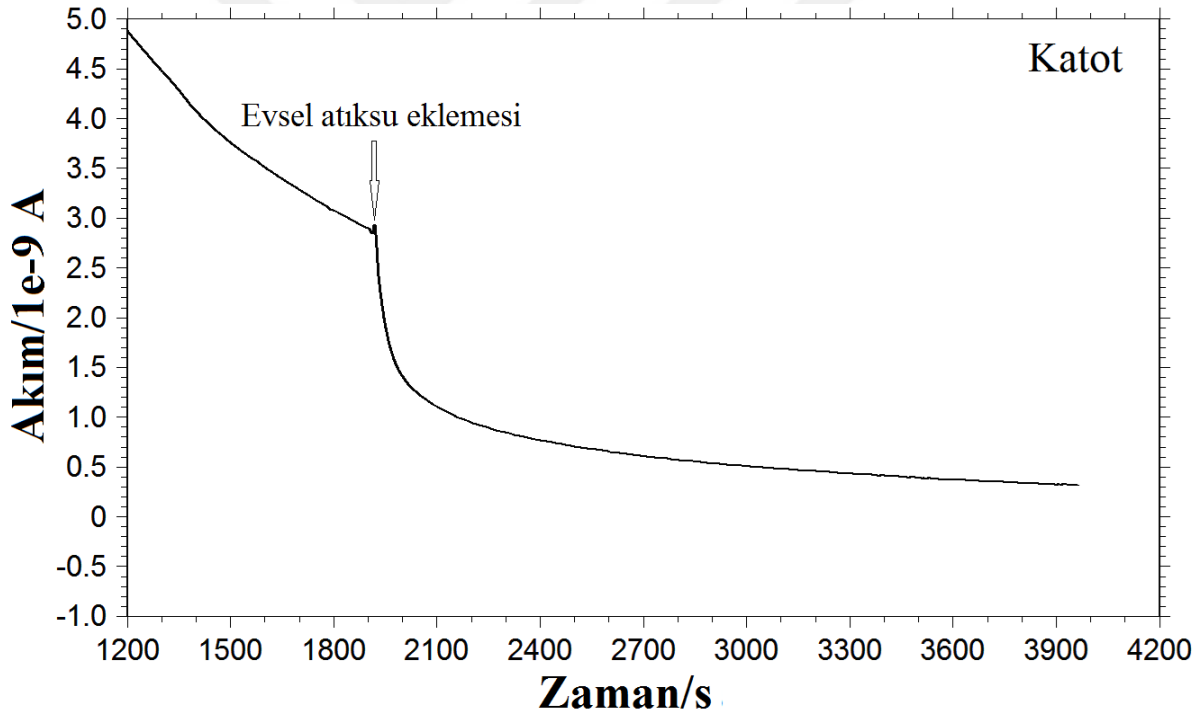
3.4.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi

Optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrot fabrikasyonu ve işletilmesi şu şekilde olmuştur: Altın anot ve katot üzerine 1 mg/mL'lik toluende hazırlanan polimer çözeltisinden 1'er µL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 1 µg) damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 20 mg/mL GOx enziminden 15 µL, katoda 20 mg/mL BOD enziminden 15 µL damlatılıp kurutulularak enzimlerin yüzeye fiziksel adsorpsiyonu sağlandı (yüzeyde bağlı BOD 8 µg olarak hesaplandı). Elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.2 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı (Hücre potansiyeli: 0.56 V). Sistem dengeye ulaştınca, reaksiyon ortamında 5 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ekleme yapıldığında elde edilen akım değerinden yararlanılarak elektriksel güç yoğunluğu $1.7 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 15 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ekleme yapıldığında elde edilen akım değerinden yararlanılarak elektriksel güç yoğunluğu $5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı.

3.4.5 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi

Performansı geliştirilen altın nanopartiküller içeren PP-g-Im polimer tabanlı EFC sisteminin evsel atıksulardan elektrik enerjisi üretebilme potansiyeli araştırıldı. Bölüm 3.4.4’de verildiği şekilde hazırlanan EFC sistemi, 10 mL pH 7.4 fosfat tamponuna daldırılıp, 0.56 V’luk hücre potansiyeli altında çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra, ön işlem görmüş evsel atıksu numunesinden 500 μ L hücreye eklendi (atıksu numunesi güç üretimi sırasında 20 kat seyrelti). Ekleme sırasında cihazın kaydettiği akım değişimi Şekil 3.35’de gösterilmektedir. EFC sisteminden, seyrelmemiş evsel atıksu içeriğindeki glikozun yakıt olarak kullanılmasıyla elde edilen güç yoğunluğu 460 nW/cm^2 olarak hesaplandı.

Altın nanopartiküller içeren PP-g-Im polimer tabanlı EFC sistemi bitki deneyine tabi tutuldu fakat enerji üretiminin yetersiz kaldığı gözlemlendi.

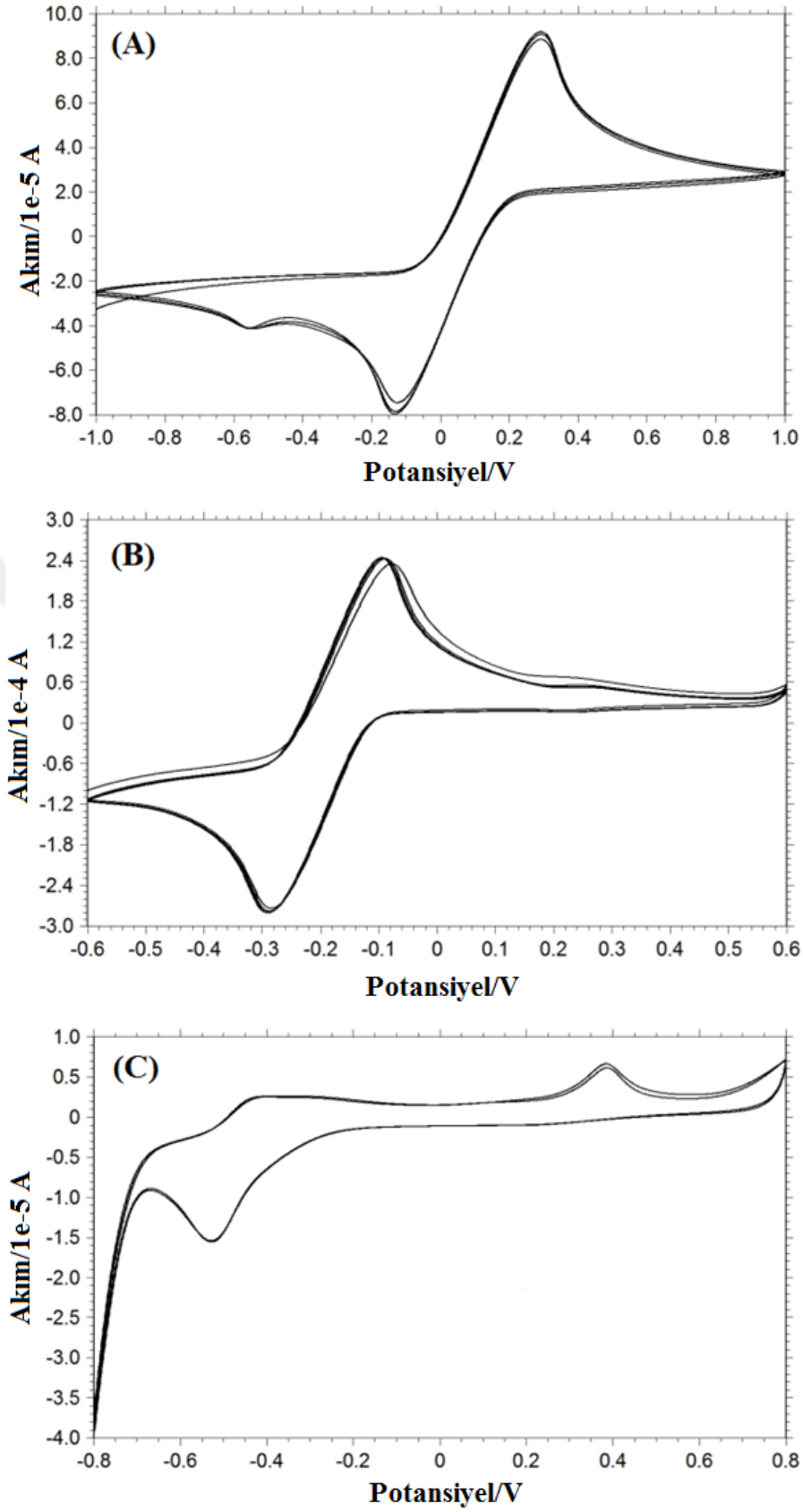


Şekil 3.35 0.56 V’luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC’deki akım değişimi.

3.5 POLİ(TAA-co-MT) TABANLI EFC SİSTEMİ

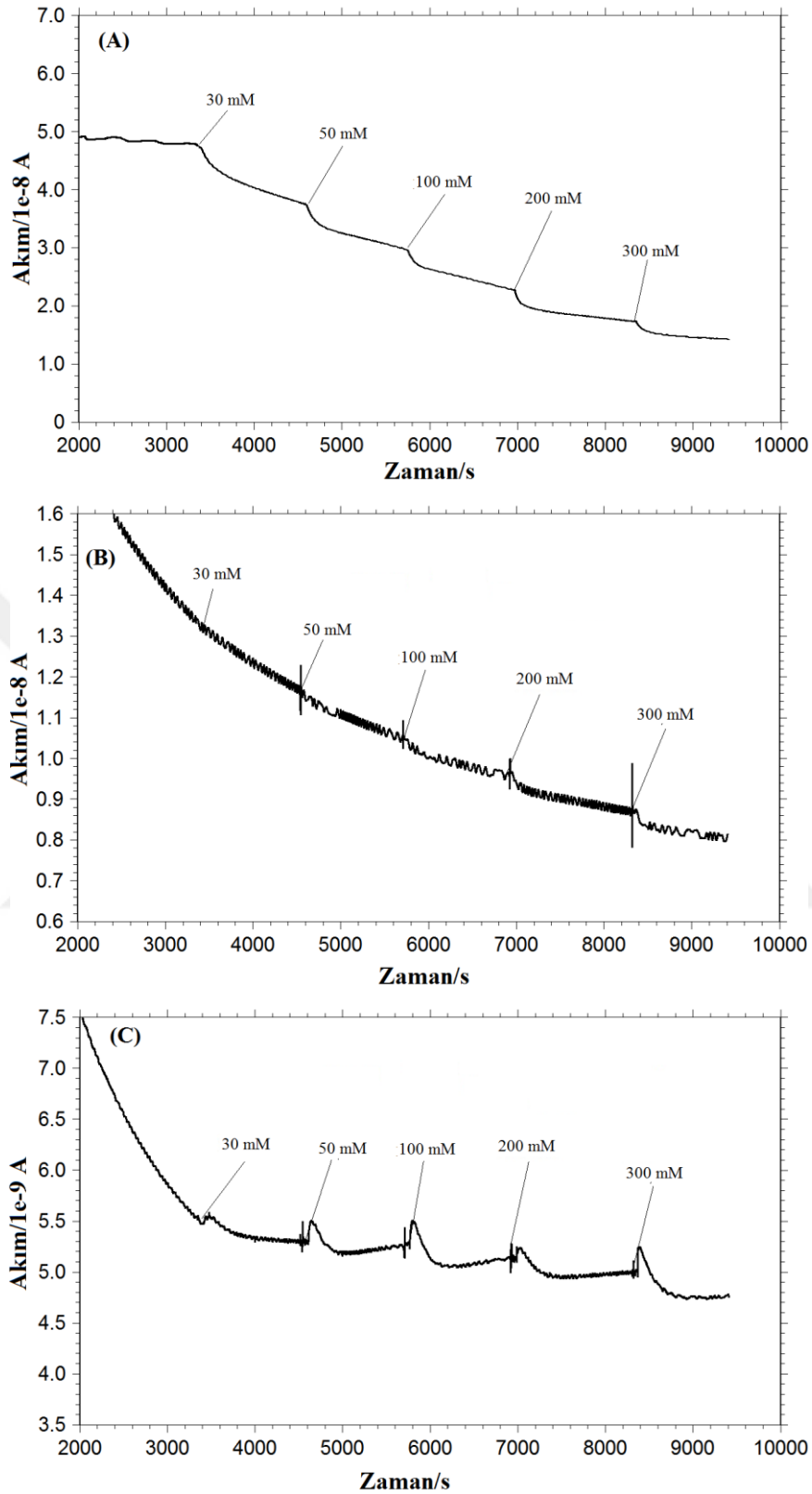
3.5.1 Farklı Medyatörlerin Denenmesi ve CV Çalışmaları

Öncelikle, farklı medyatörlerin elektrot yüzeyinde aktif olacağı/iş yapabileceği uygulama potansiyellerine karar verilmelidir. Bu nedenle yapıya katılan medyatörlerin ayrı ayrı dönüşümlü voltametri analizleri yapıldı. Bu işlem için asetonitril içinde 10 mM medyatör içeren çözeltiler hazırlandı. Medyatörlere ait dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 3.36'da verilmektedir. CV çekimleri, -1, +1 V potansiyel aralığında temizlenmiş altın elektrodun, platin karşıt elektrodun ve Ag/Ag^0 referans elektrodun medyatör çözeltisi içine daldırılmasıyla gerçekleştirildi. Şekil 3.36'da ferrosenin oksidasyon/redüksiyon dalgası -0.15/0.36 V, *p*-benzokinonun oksidasyon/redüksiyon dalgası -0.3/-0.1 V, nötral kırmızısının oksidasyon/redüksiyon dalgası -0.55/0.4 V olarak gözlemlendi. Medyatörün elektrot yüzeyinde elektron aracısı olarak iş yapabilmesi için gözlenen potansiyel değerleri sisteme uygulanmalıdır. Sistemde kullanılan GOx enziminin glikozu oksitlediği teorik potansiyel değeri -0.32 V, BOD enziminin oksijeni suya indirgediği teorik potansiyel değeri ise +0.36 V olarak bilinmektedir. Kullanılacak olan medyatörlerin oksidasyon/redüksiyon potansiyelleri enzimlerin teorik potansiyel değerlerine yakındır bu nedenle EFC sisteminde elektron aracısı olarak kullanılabilir. Sadece *p*-benzokinon kullanılacağı zaman BOD içeren katot elektrodunda *p*-benzokinona ait redüksiyon potansiyeli -0.1 V olduğundan, bu değer de BOD enziminin oksijeni indirgediği teorik potansiyel değeri olan +0.36 V'a yakın olmadığı için katot tarafına ait filme *p*-benzokinon aracısı eklemek anlamlı olmayacaktır.



Şekil 3.36 Ferrosene (A), *p*-benzokinona (B) ve nötral kırmızısına (C) ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

Poli(TAA-*co*-MT) kopolimeri çalışma kapsamında farklı medyatörlerle (ferrosen, *p*-benzokinon ve nötral kırmızısı) modifiye edilerek Bölüm 2.5.1'de açıklanan elektropolimerizasyon metodu kullanılarak hazırlandı. 3 farklı medyatör kullanılarak oluşturulan polimerik filmler Poli(TAA-*co*-MT)/ferrosen, Poli(TAA-*co*-MT)/ *p*-benzokinon ve Poli(TAA-*co*-MT) / nötral kırmızısı olarak tanımlandı. Kaplanan elektrotlar 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisi (15 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid ve 300 mM N-hidroksisüksinamid çözeltilerinin karışımı) içinde bekletildi. Süre sonunda anot ve katot yıkandı ve anot, 1 mg/mL'lik GOx enzimi çözeltisine, katot ise 1 mg/mL'lik BOD enzimi çözeltisine 2 saat süre ile daldırıldı. Elektrotlar saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Uygulama potansiyeline karar verildikten sonra Poli(TAA-*co*-MT)/ferrosen, Poli(TAA-*co*-MT)/*p*-benzokinon ve Poli(TAA-*co*-MT)/nötral kırmızısı kaplı çalışma elektrotlarını içeren 3 EFC sistemi çalıştırıldı. Poli(TAA-*co*-MT)/ferrosen film içeren EFC sistemi için, anoda ve katoda sırasıyla -0.15 V, +0.36 V, Poli(TAA-*co*-MT)/*p*-benzokinon film içeren EFC sistemi için, anoda ve katoda sırasıyla -0.3 V, +0.36 V ve Poli(TAA-*co*-MT)/nötral kırmızısı film içeren EFC sistemi için, anoda ve katoda sırasıyla -0.55 V, +0.4 V potansiyel uygulanarak 3 EFC sistemi 100 mM pH 7.4 fosfat tamponunun 10 mL'sine daldırıldı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında sırasıyla 30-50-100-200 ve 300 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi (Şekil 3.37).



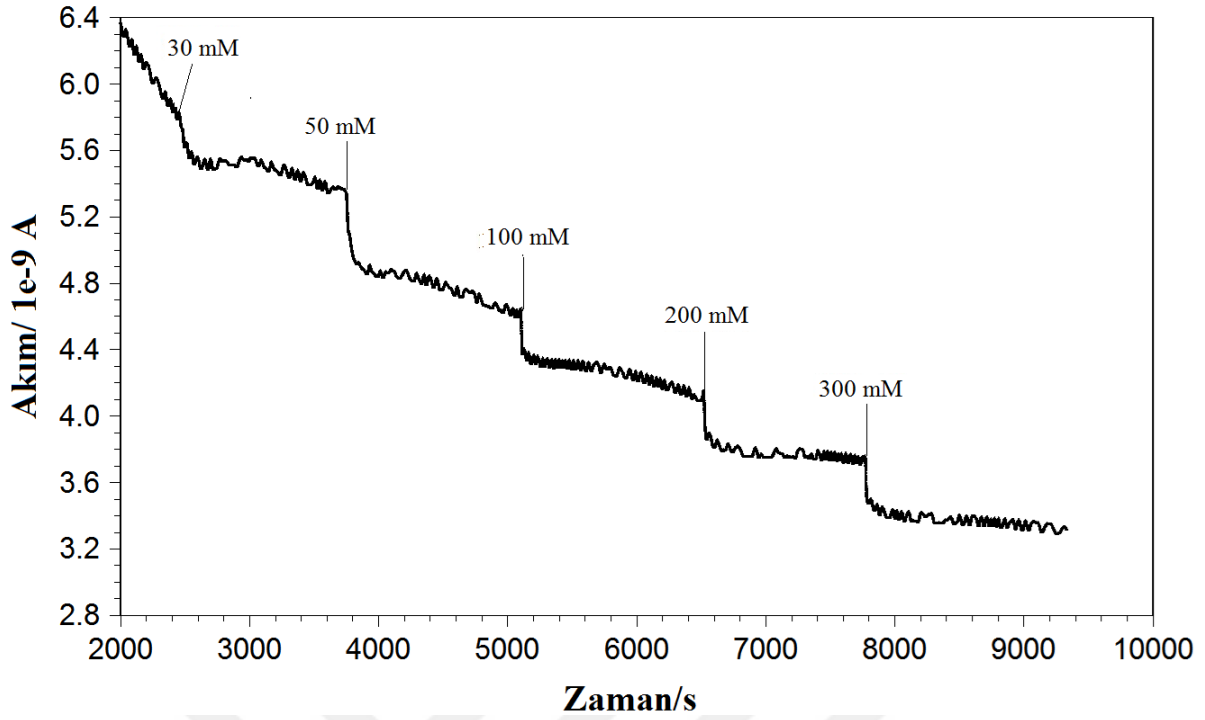
Şekil 3.37 Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film ile kaplanmış (A), Poli(TAA-co-MT)/nötral kırmızısı film ile kaplanmış (B), Poli(TAA-co-MT)/p-benzokinin film ile kaplanmış (C) EFC sisteminin glikoz eklemelerine karşı verdiği akım sinyalleri.

Poli(TAA-co-MT)/nötral kırmızısı film ile kaplanarak hazırlanan EFC sisteminde dengeli kullanılabilir akım değerleri elde edilemedi, buna ek olarak sistem kararlılığı gözlenmedi. Poli(TAA-co-MT) / *p*-benzokinon film ile kaplanan elektrotlardan sonuç alındı fakat akım değerleri diğer filmlere kıyasla oldukça düşük çıktı. Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film kaplanan elektrotlardan anlamlı ve yüksek akım değerleri elde edildi. Medyatör olarak ferrosen kullanılması sistem performansını artırmıştır. Bu nedenle, Poli(TAA-co-MT) filmin ferrosen ile modifiye edilmesi uygun görülmüştür. Bir sonraki aşamada Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film kaplı elektrotlar hazırlanarak elektrot fabrikasyon ve işletme koşulları optimize edilmiştir.

3.5.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Katot için farklı enzimlerin denenmesi (Enzim seçimi):

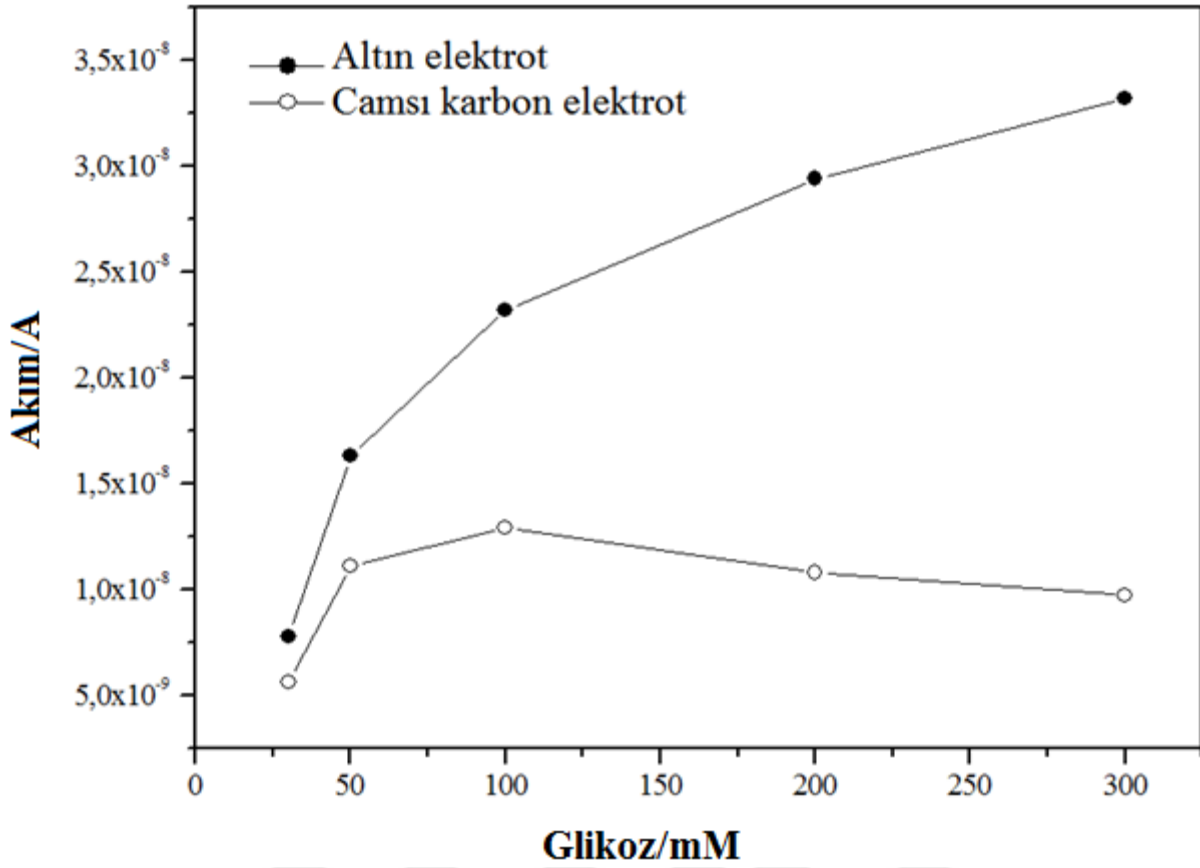
Anot ve katot, Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film ile kaplandıktan sonra, enzimleri kimyasal bağlayabilmek için polimer yapıda bulunan TAA'nın karboksil grupları Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı gibi karbodiimid çözeltisiyle aktifleştirildikten sonra anot, 1 mg/mL'lik GOx enzimi çözeltisine, katodun biri 1 mg/mL'lik BOD, diğeri ise 1 mg/mL'lik LAC enzimi çözeltisine daldırıldı ve 30 dak. bekletildi. İmmobilizasyon süresi sonunda elektrotlar saf suyla yıkanarak bağlanmamış enzimden temizlendi. LAC katodunu içeren EFC sistemi 10 mL 100 mM pH 5 sitrat tamponu içerisinde, BOD katodunu içeren EFC sistemi 10 mL 100 mM pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde çalıştırıldı. Her iki EFC sisteminin anot tarafına -0.15 V, LAC içeren EFC sisteminin katoduna +0.59 V, BOD içeren EFC sisteminin katoduna ise +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı. Her iki EFC sistemi dengeye geldiği zaman 30-300 mM konsantrasyon aralığındaki glikoz çözeltileri ardarda hücreye eklendi ve elde edilen akım değerleri kaydedildi (Şekil 3.38). LAC enzimi immobilize edilen katoda sahip EFC sistemi glikoz eklemelerinden akım üretememiş ve sistemden elektriksel bir güç elde edilememiştir. BOD içeren sistem ise artan konsantrasyonlardaki glikoz eklemelerine karşı stabil ve yüksek akım değerleri üretmiştir. Bu sonuca göre, Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film ile hazırlanan EFC'lerin katodu için kesinlikle BOD enzimi kullanılması gerektiği belirlenmiştir.



Şekil 3.38 Poli(TAA-co-MT)/ferrosen/BOD katodunun glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.

Elektrot materyali seçimi:

Altın elektrotları ve camısı karbon elektrotları içeren 2 EFC sistemi Bölüm 3.5.1’de verildiği şekilde hazırlandı. Altın anot ve katot materyaline ve camısı karbon anot ve katot materyaline sahip EFC sistemleri 10 mL’lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponunda işletildi. Anoda -0.15 V, katoda +0.36 V’luk potansiyel uygulanarak (0.51 V’luk hücre potansiyeli) sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi beklendi. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamına 30-300 mM konsantrasyon aralığındaki glikoz çözeltileri ard arda eklendi ve elde edilen akım değerleri kaydedildi (Şekil 3.39). Altın elektrot ile hazırlanan EFC sistemi, artan glikoz miktarına karşı yüksek akımlar üretirken, camısı karbon ile hazırlanan katotta artan yakıt miktarına karşı neredeyse aynı akım değerleri üretilmiştir. Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film ile hazırlanan EFC’ler için altın elektrot materyalinin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

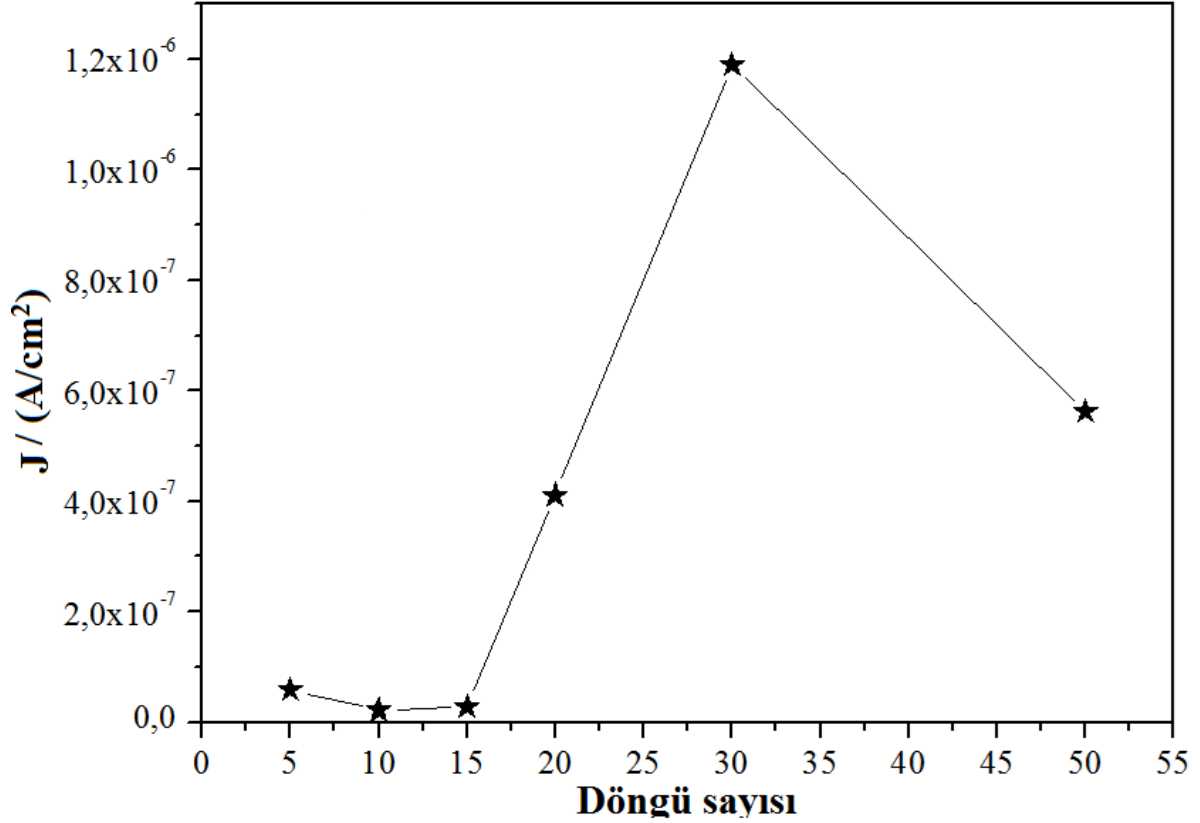


Şekil 3.39 Farklı elektrot materyaliyle hazırlanmış Poli(TAA-co-MT)/ferrosen/BOD katodunun glikoz eklemelerine verdiği akım sinyalleri.

Film yoğunluğu deneyleri:

Altın anot ve katot yüzeyinde Poli(TAA-co-MT)/ferrosen elektropolimerizasyonu, dönüşümlü voltametri döngü sayısı, yani elektropolimerizasyon süresi değiştirilerek gerçekleştirildi. Dönüşümlü voltametri döngü sayısı her bir EFC sistemi ile sırasıyla 5-10-15-20-30 ve 50 döngü olacak şekilde ayarlanarak altın anot ve katot yüzeyleri farklı yoğunlukta polimerik filmlerle kaplandı. Enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra (Bölüm 3.5.1) her film yoğunluğunda hazırlanan anot ve katot EFC sistemine takıldı ve 10 mL'lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.15 V, katoda +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 10 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama eklemeye yapılarak elde edilen akım değeri kaydedildi. Bu deney farklı film yoğunluğuyla hazırlanan her elektrot için tekrarlandı. Farklı film yoğunluklarında hazırlanan EFC sistemlerinin 10 mM glikoz eklemesine karşı ürettiği akım değerleri kullanılarak birim elektrot alanı başına geçen akım miktarları hesaplandı ve Şekil 3.40'da gösterildi. Şekil 3.40'dan görüldüğü üzere 30 döngü

sayısı ile kaplanarak hazırlanan EFC elektrodundan en yüksek akım değeri elde edilmiş, film yoğunluğu arttıkça akımın düştüğü gözlenmiştir. Döngü sayısı arttıkça polimerleşen film içerisindeki enzim bağlayıcı karboksil fonksiyonel gruplarının sayısının artması muhtemeldir. Fakat belli bir film yoğunluğu değerinden sonra yüzeyde oluşan film tabaka elektron akışına direnç göstererek devreden geçecek akımı düşürebilir. Deney sonucu 30 döngü sayısından sonra EFC sisteminde elektron akışının azaldığını göstermiştir.



Şekil 3.40 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.

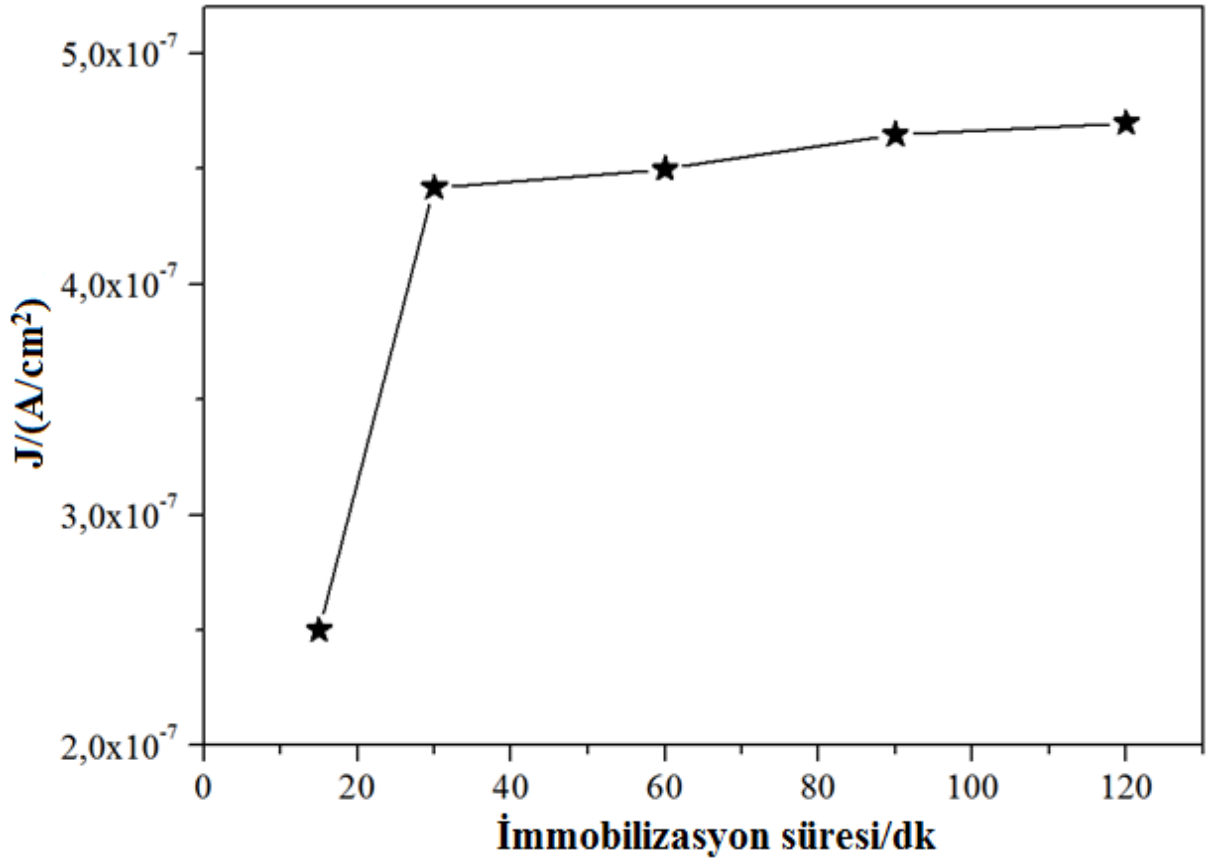
İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Altın anot ve katot yüzeyinde Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film 30 döngülük kaplama ile elektropolimerize edildi. Yüzeyi film ile kaplanan her bir anot 1 mg/mL'lik GOx, katot 1 mg/mL'lik BOD enzim çözeltisine farklı sürelerde daldırılmak suretiyle immobilize edildi. İmmobilizasyon süreleri sırasıyla 15, 30, 60, 90 ve 120 dakika olarak belirlendi. Süre sonunda anot ve katotların yüzeylerinde immobilize enzim miktarı Bradford Protein Analizi ile belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Farklı immobilizasyon sürelerine maruz bırakılmış EFC elektrotlarının yüzeyindeki immobilize enzim miktarları.

İmmobilizasyon süresi/dak.	Yüzeğe bağlanmış GOx miktarı / μg	Yüzeğe bağlanmış BOD miktarı / μg
15	107	126
30	125	164
60	128	168
90	130	172
120	132	172

İmmobilizasyon gerçekleştirildikten sonra, farklı miktarlarda bağlı enzim içeren anot ve katottan oluşan EFC sistemi 10 mL'lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.15 V, katoda +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 10 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ekleme yapıldı, elde edilen akım değerleri kullanılarak birim elektrot alanı başına geçen akım miktarları (J) hesaplandı ve Şekil 3.41'de gösterildi. Sonuçlara göre maksimum akım yoğunluğuna 30 dakikalık immobilizasyon süresinde ulaşıldı. 30 dakikalık sürede anoda 125 μg GOx, katoda 164 μg BOD enzimi bağlanmıştır. 30 dakikadan fazla immobilizasyon sürelerinde üretilen enerji önemli ölçüde artış göstermemiştir. Protein analizi sonuçlarımız da bu durumu desteklemektedir. Çizelge 3.3'de görüldüğü üzere 30 dakikadan fazla immobilizasyon sürelerinde elektrot yüzeylerinde bağlanan enzim miktarları hissedilir seviyelerde artmamıştır. Bu durum Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film bünyesinde bulunan enzim bağlayıcı karboksil gruplarının 30 dakikada dolduğunu göstermiştir. Joule Kanunundan yola çıkılarak, maksimum kapasitede enzim tutmuş (30 dakikalık sürede) EFC için güç üretimi yaklaşık 0.8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı.

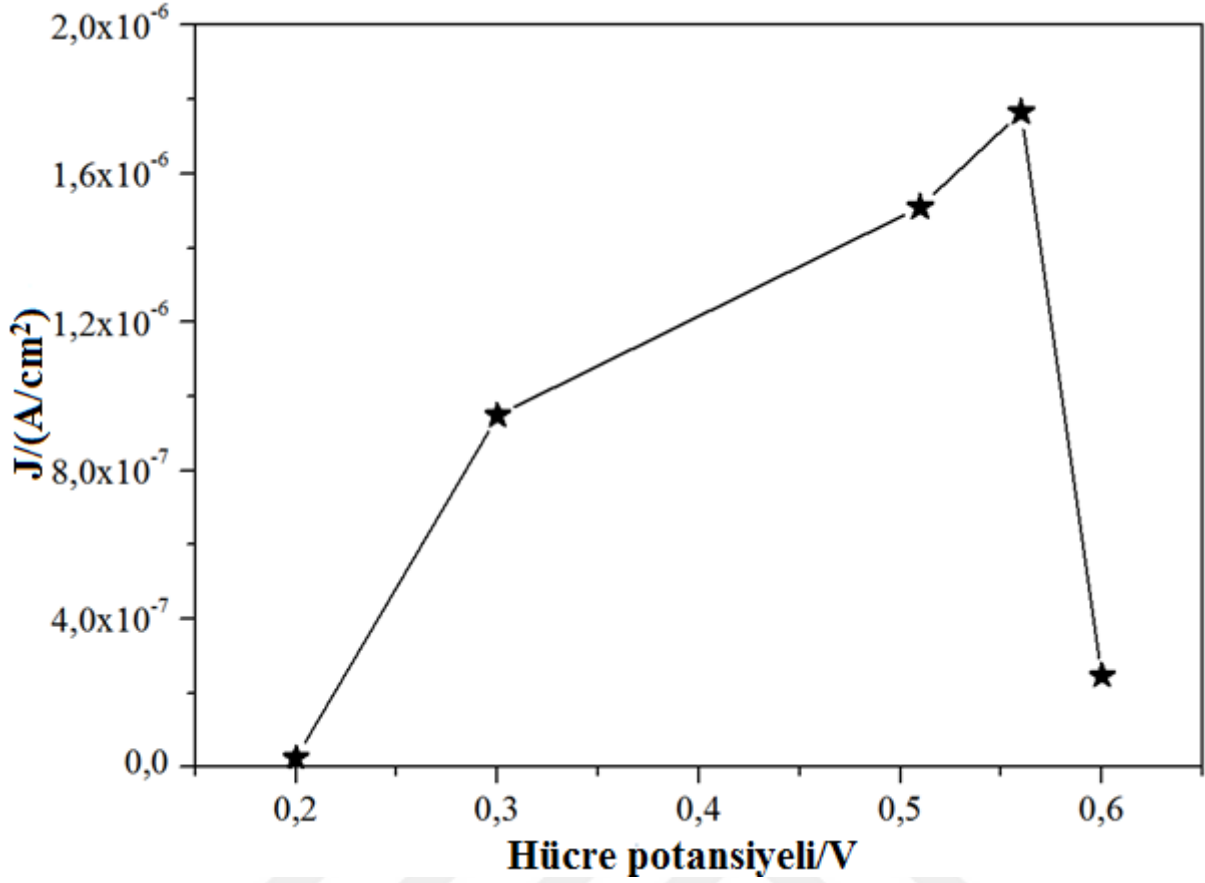


Şekil 3.41 Farklı immobilizasyon sürelerinde hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.

3.5.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu

Hücre potansiyeli:

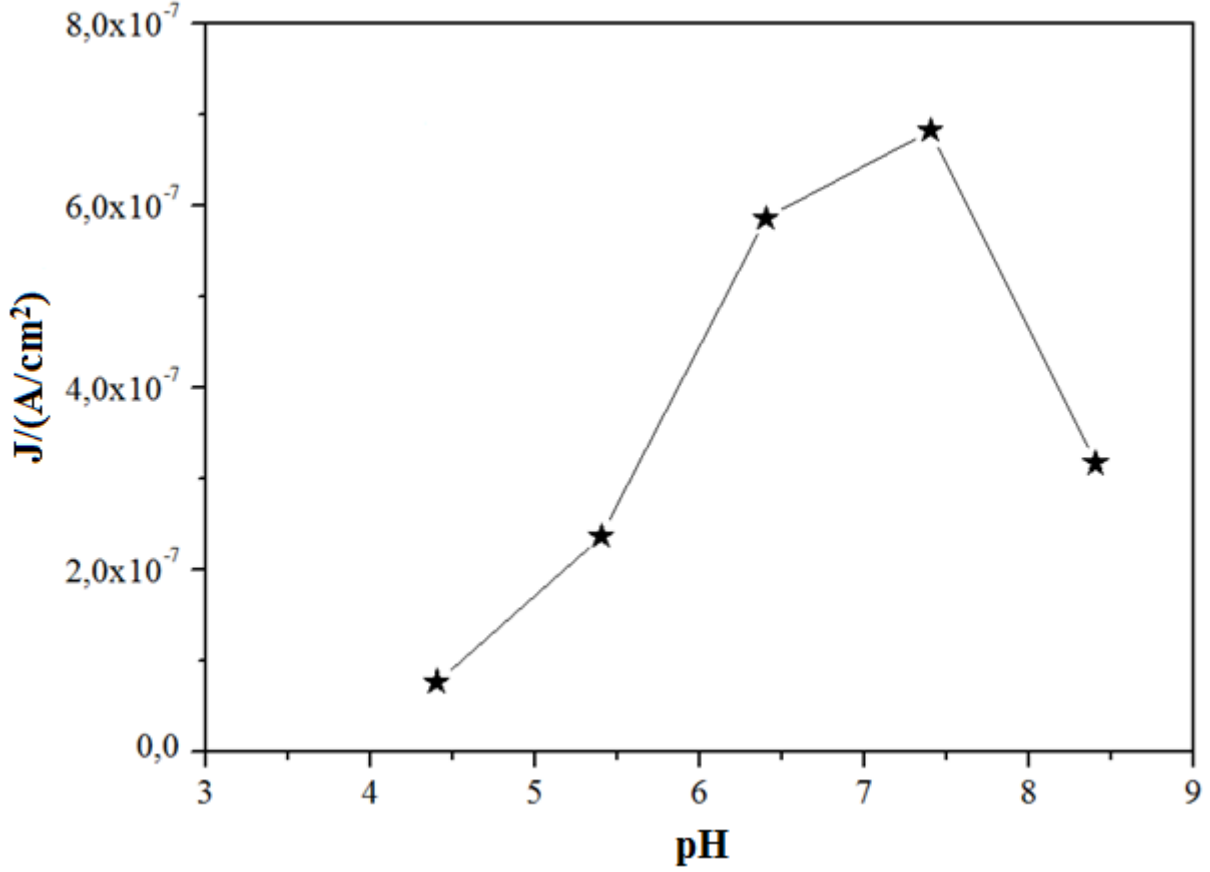
EFC sisteminde en uygun anodik ve katodik potansiyeli tespit edebilmek için bu aşamaya kadar optimize edilen EFC, farklı potansiyel aralıklarında (Anot potansiyel /Katot potansiyel: -0.1/+0.1, -0.1/+0.2, -0.15/+0.36, -0.2/+0.36, - 0.15/+0.45 V) çalıştırıldı. Her hücre potansiyeli değeri için standart olarak sisteme 10 mM glikoz ilave edildi, akım yoğunlukları (J) hesaplandı (Şekil 3.42). Maksimum akım yoğunluğu, anot için -0.2 V ve katot için +0.36 V (hücre potansiyeli 0.56 V) olarak uygulanan potansiyel değerlerinden elde edildi.



Şekil 3.42 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.

pH :

pH değerleri 4.4-5.4-6.4-7.4 ve 8.4 olan 100 mM fosfat ve asetat tamponları hazırlandı. EFC sistemi farklı tampon ortamlarına daldırıldı ve 0.56 V'luk potansiyelde çalıştırıldı. Her pH değerinde ortama 5 mM standart glikoz eklemesinden üretilen akım yoğunluklarına bakarak sistem performansı değerlendirildi. Şekil 3.43'den görüldüğü üzere en yüksek akım yoğunluğuna pH 7.4'de ulaşıldı. Akım yoğunluğu pH 4.4'den pH 7.4'e kadar artarken 7.4'den sonra düşmüştür. Sonuçlar GOx ve BOD enzimleri için en uygun çalışma ortamının pH 7.4 olduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 3.43 pH'nin sistem performansına etkisi.

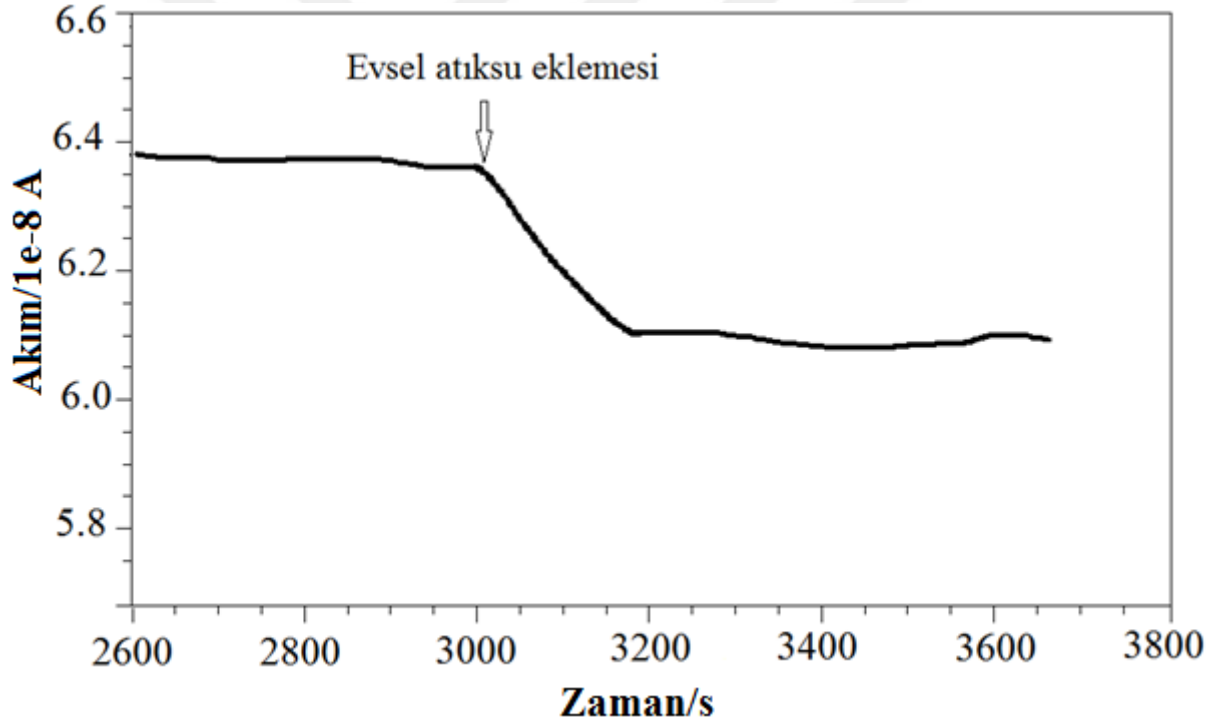
3.5.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi

Optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrot fabrikasyonu ve işletilmesi şu şekilde olmuştur: Altın anot ve katot, 100 mM (TAA), 10 mM (MT), 10 mM ferrosen ve 100 mM tetrabütil amonyum tetrafloroborat içeren 10 mL'lik asetonitril ortamına karşıt ve referans elektrotla birlikte daldırıldı. 100 mV/s'lik tarama hızında, döngü sayısı 30 olacak şekilde 0-2 V arasında yüzeyde kopolimerizasyon sağlandı. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan kopolimerde bulunan karboksilik gruplar karbodiimid çözeltisiyle aktifleştirildi daha sonra anot 1 mg/mL'lik GOx enzim çözeltisine, katot ise 1 mg/mL'lik BOD enzim çözeltisine 30 dakika süreyle yatırıldı. Süre sonunda elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.2 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulanmak (hücre potansiyeli: 0.56 V) suretiyle sistem çalıştırıldı. 0.56 V'luk hücre potansiyelinde EFC sisteminden 10 mM'lık glikoz eklemesi sonucu elde edilen güç yoğunluğu $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 5 mM'lık glikoz eklemesi sonucu elde edilen güç yoğunluğu $0.4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplandı.

3.5.5 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi

Her aşaması optimize edilen Poli(TAA-co-MT)/ferrosen film tabanlı EFC sistemi, 10 mL pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı ve 0.56 V'luk hücre potansiyeli altında sistem çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra süzölmüş olan evsel atıksu numunesinden 500 µL hücreye eklendi (atıksu numunesi güç üretimi sırasında 20 kat seyrelti). Ekleme sırasında cihazın kaydettiği katodik akım değişimi açıkça görüldü ve Şekil 3.44'da verildi. EFC sisteminden, seyrelmemiş evsel atıksu içeriğindeki glikozun yakıt olarak kullanılmasıyla üretilen güç değeri 4 µW/cm² olarak hesaplandı.

Ferrosen ile modifiye edilen Poli(TAA-co-MT) polimer tabanlı EFC sistemi bitki deneyine tabi tutuldu fakat enerji üretiminin gerçekleşmediği gözlemlendi.

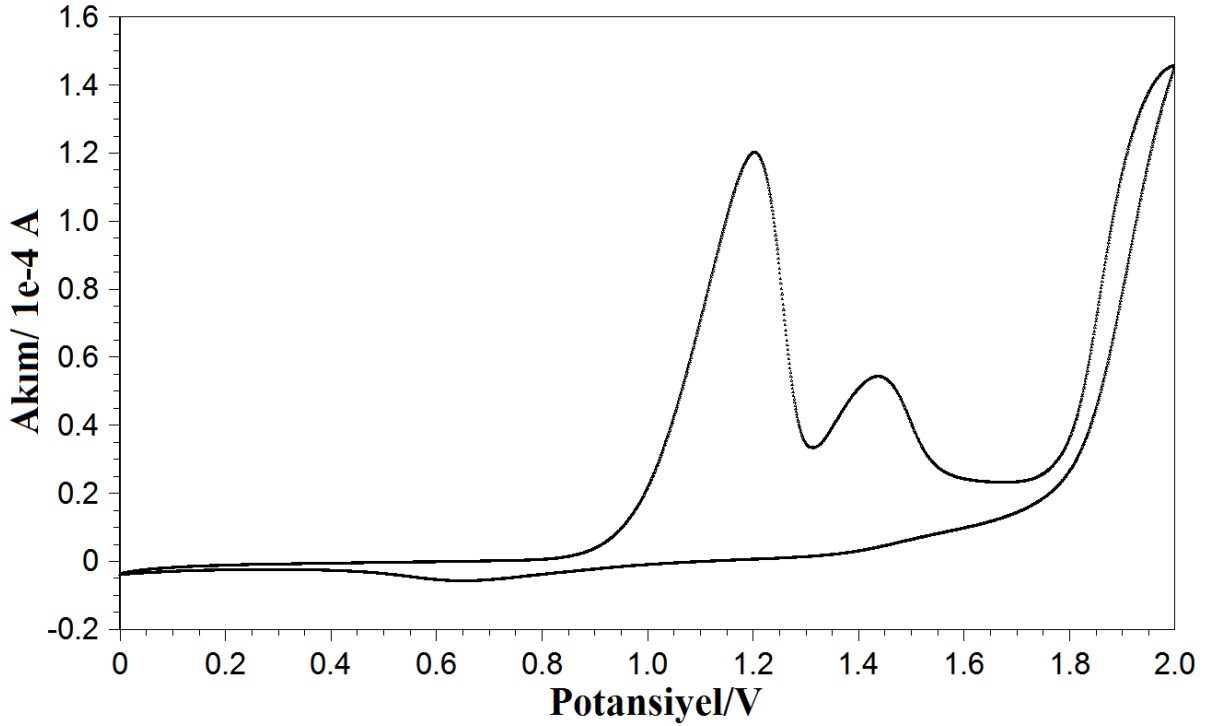


Şekil 3.44 0.56 V'luk hücre potansiyelinde evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen katodik akım.

3.6 POLİ(Py-COOH-co-TAA) TABANLI EFC SİSTEMİ

3.6.1 Karakterizasyon Çalışmaları

p-benzokinon ile modifiye edilen Poli(Py-COOH-co-TAA) film, Bölüm 2.5.2’de açıklandığı şekilde altın anot ve katot üzerinde polimerize edildi. Py-COOH ve TAA’in kopolimerizasyonunu gösteren dönüşümlü voltomogram Şekil 3.45’de verilmektedir. Elektropolimerizasyon metoduyla polimerizasyonda, ortamda bulunan monomerler elektrot yüzeyinde belli bir potansiyel değerinde okside olarak polimerleşirler. Py-COOH monomerine ait oksidasyon piki 1.2 V’da ve TAA monomerine ait oksidasyon piki ise 1.4 V’da gözlemlendi. Reaksiyon ortamına eklenen 2 monomerin de polimerleşerek bir kopolimer oluşturduğu CV grafiğinden gözlemlendi.



Şekil 3.45 Py-COOH ve TAA’ e ait kopolimerizasyonun dönüşümlü voltametri grafiği.

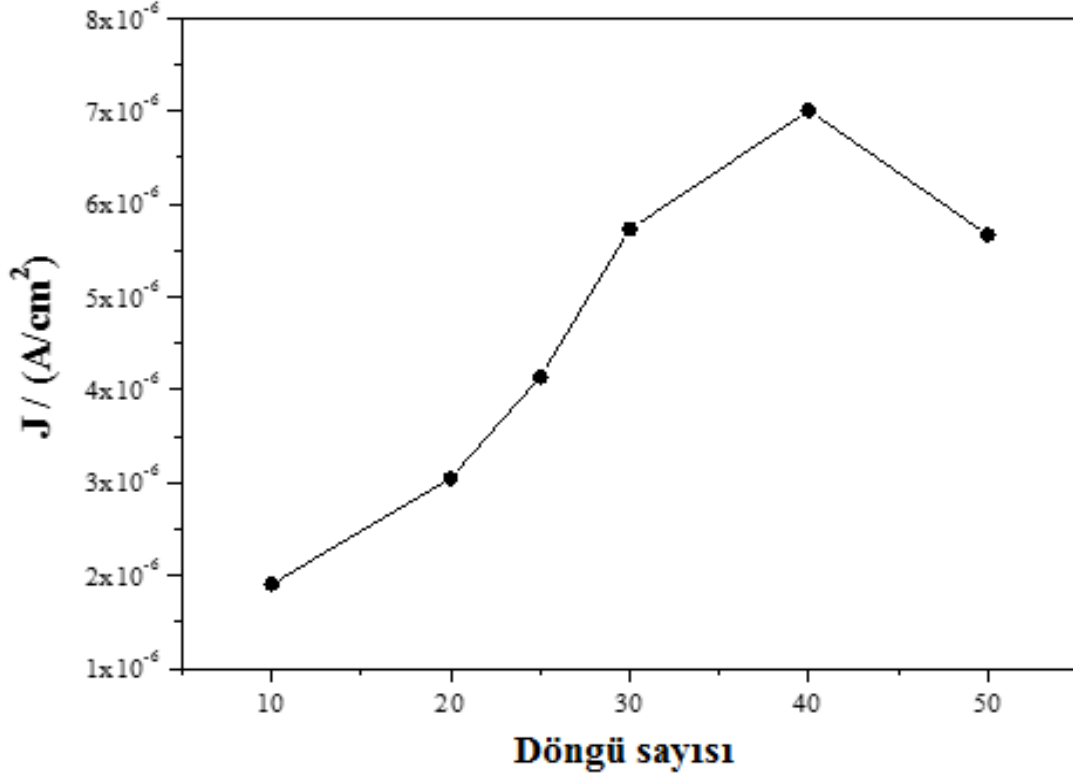
3.6.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Film yoğunluğu deneyleri:

Altın anot ve katot yüzeyinde Poli(Py-COOH-co-TAA)/*p*-benzokinon elektropolimerizasyonu dönüşümlü voltametri döngü sayısı, yani elektropolimerizasyon süresi değiştirilerek

gerçekleştirildi. Dönüşümlü voltametri döngü sayısı her bir EFC sistemi ile sırasıyla 10-20-25-30-40 ve 50 döngü olacak şekilde ayarlanarak altın anot ve katot yüzeyleri farklı yoğunlukta polimerik filmlerle kaplandı (Bölüm 2.5.2). Polimerik film yapısında bulunan karboksilik gruplar, karbodiimid çözeltisi ile 2 saat aktifleştirilerek kimyasal enzim immobilizasyonuna geçildi. Bunun için 10 mg/mL'lik GOx enzim çözeltisinden anoda 10 µL, 10 mg/mL'lik LAC enzim çözeltisinden katoda 10 µL damlatılarak oda koşullarında 2 saat beklendi.

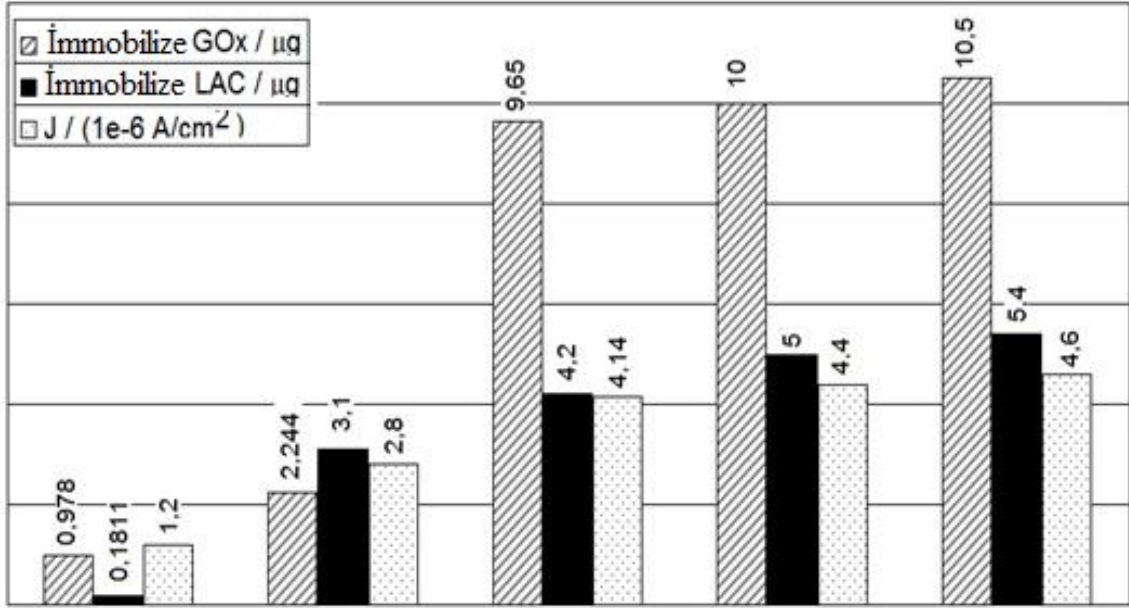
Enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra her film yoğunluğunda hazırlanan anot ve katodu içeren 6 EFC sistemi, 10 mL'lik 100 mM pH 7 sitrat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.35 V, katoda +0.59 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 20 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi. Farklı film yoğunluklarında hazırlanan EFC sistemlerinin 20 mM glikoz eklemesine karşı ürettiği katodik akım değerleri kullanılarak birim elektot alanı başına geçen akım miktarları hesaplandı ve Şekil 3.46'da gösterildi. Şekil 3.46'dan görüldüğü üzere 40 döngü sayısı ile kaplanarak hazırlanan EFC elektrodundan en yüksek akım yoğunluğu elde edildi, bu noktadan sonra film yoğunluğu arttıkça akımın düştüğü gözlemlendi. Döngü sayısı arttıkça polimerleşen film içerisindeki enzim bağlayıcı karboksil fonksiyonel gruplarının sayısının artması muhtemeldir. Fakat belli bir film yoğunluğu değerinden sonra yüzeyde oluşan film tabaka elektron akışına direnç göstererek devreden geçen akım miktarını düşürmüştür.



Şekil 3.46 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.

İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Altın anot ve katot yüzeyinde Poli(Py-COOH-co-TAA)/*p*-benzokinon film 40 döngülük kaplama ile elektropolimerize edildi. Hazırlanan 40 döngülük polimerik film üzerine 10 mg/mL'lik konsantrasyona sahip GOx ve LAC çözeltilerinden farklı miktarlarda (2-5-10-20 ve 30 µL) damlatıldı ve immobilizasyonun gerçekleşmesi için yeterli süre beklendi. Bu şekilde farklı enzim yüklemelerini içeren 5 EFC sistemi dizayn edildi. Bradford Protein analizi yapılarak çalışma elektrotlarına kimyasal olarak bağlanan enzim miktarları saptandı. EFC sistemleri 10 mM glikoz eklemesiyle test edildi. Şekil 3.47'de farklı enzim miktarlarıyla hazırlan EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları ve kimyasal olarak bağlanan enzim miktarları gösterilmektedir. Şekil 3.47 incelendiğinde en yüksek akım yoğunluğunun 30 µL'lik enzim damlatmasından (protein analizi sonucu hesaplanmış bağlanan GOx: 10.5 µg ve LAC: 5.4 µg) elde edildiği açıkça gözükmemektedir. Ancak 30 µL'lik enzim damlatmasıyla 10 µL'lik enzim damlatması (bağlanan GOx: 9.65 µg ve LAC: 4.2 µg) arasında dikkate değer bir akım farkı yoktur. Sonuç olarak sistem için 10 µL'lik enzim damlatmasının daha ekonomik olduğu ve enzim miktarının daha fazla arttırılmasına gerek olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 3.47 Dizayn edilen 5 EFC sisteminin elektrot yüzeylerine bağlanan enzim miktarları ve bu EFC'lerden elde edilen akım yoğunlukları.

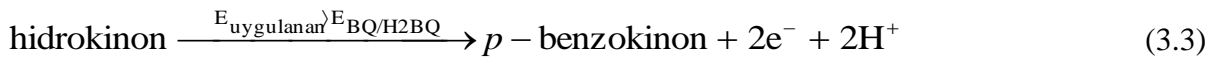
3.6.3. İşletme Koşullarının Optimizasyonu

Hücre potansiyeli:

Glikozun oksidasyon reaksiyonundan salınan elektronlar GOx'ın aktif merkezinden *p*-benzokinona aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi transfer edilir (Yakovleva vd. 2012).

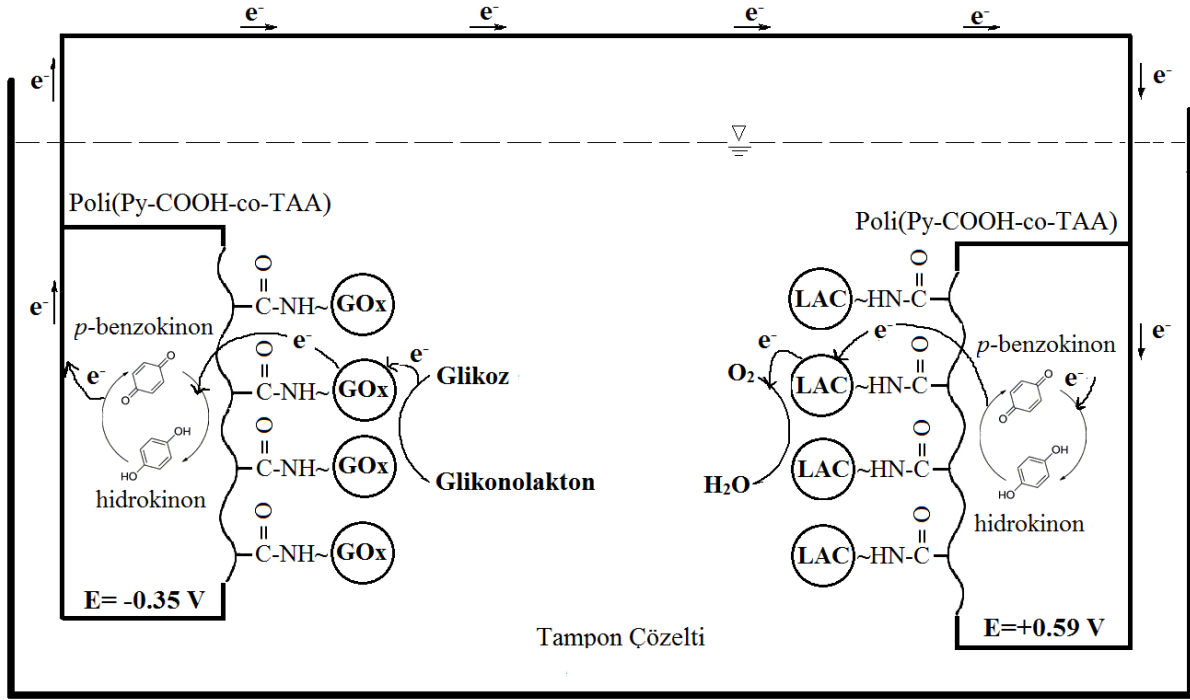


Reaksiyon sonucu oluşan hidrokinon, uygulanan potansiyel (*p*-benzokinon/hidrokinon redoks çifti ($E_{\text{BQ}/\text{H2BQ}}$) potansiyelinden daha yüksek) ile çalışma elektrodu yüzeyindeki elektronları transfer eder.



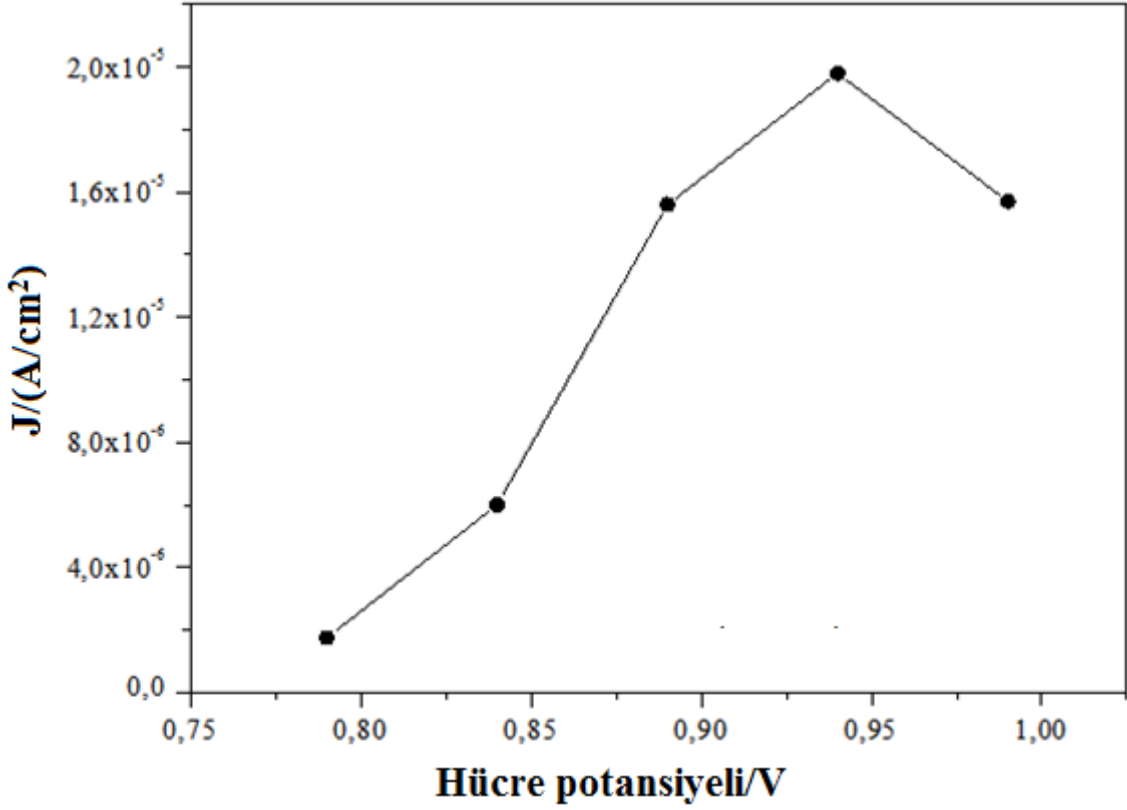
Serbest elektronlar uygulanan anodik potansiyel sayesinde katot tarafına doğru hareket ederler. Bu elektronlar katodik potansiyel ile birlikte katot tarafına çekilir. Daha sonra *p*-benzokinon tarafından *p*-benzokinon/hidrokinon redoks çifti formuna dönüştürülmek üzere hızlıca yakalanırlar. Son olarak LAC bu elektronları kullanarak moleküler oksijeni suya

indirger. Yakıt olarak glikozun ve medyatör olarak *p*-benzokininonun kullanıldığı GOx/LAC yakıt hücresinin çalışma prensibi Şekil 3.48’de gösterilmiştir.



Şekil 3.48 Yakıt olarak glikoz ve medyatör/aracı olarak *p*-benzokininonun kullanıldığı GOx/LAC yakıt hücresinin çalışma prensibi.

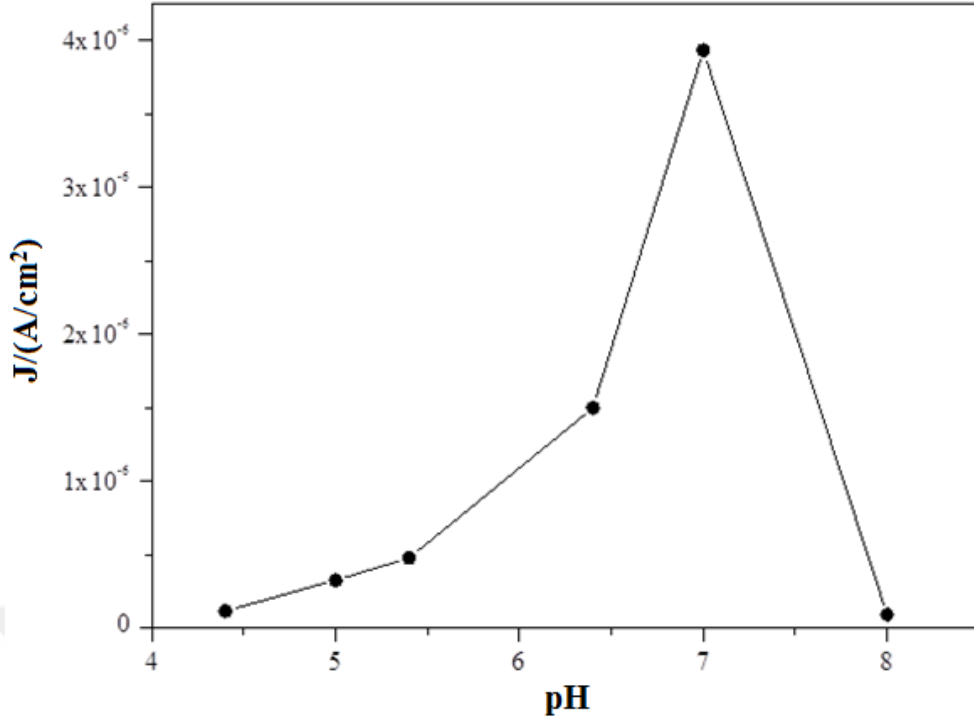
EFC sisteminde en uygun anodik ve katodik potansiyeli tespit edebilmek için bu aşamaya kadar optimize edilen EFC, farklı potansiyel aralıklarında (Anot potansiyel / Katot potansiyel: -0.2/+0.59, -0.25/+0.59, -0.30/+0.59, -0.35/+0.59, -0.40/+0.59 V) çalıştırıldı. Her hücre potansiyeli değeri için standart olarak sisteme 30 mM glikoz ilave edildi ve akım yoğunlukları (J) hesaplandı (Şekil 3.49). Maksimum akım yoğunluğu ($J = 2.10^{-5} \text{ A/cm}^2$), anot için -0.35 V ve katot için +0.59 V (hücre potansiyeli 0.94 V) olarak uygulanan potansiyel değerlerinden elde edildi. LAC enziminin kullanıldığı EFC sistemlerinde oksijenin suya indirgendiği potansiyel değeri 0.59 V'dur ve bu değer her hangi bir medyatörün varlığıyla değişmediği bilinmektedir (Atanassov vd. 2007). Bu nedenle sistemin katot tarafına hep sabit 0.59 V'luk potansiyel uygulandı. *p*-benzokininon ile modifiye edilen Poli(Py-COOH-co-TAA) film kaplı altın elektrodun fosfat tamponu içindeki CV çekiminden, film içerisinde bulunan *p*-benzokininonun maksimum indirgenme akımının da -0.35 V civarında olduğu yapmış olduğumuz ön denemelerde gözlenmiştir.



Şekil 3.49 Hücre potansiyelinin sistem üzerine etkisi.

pH:

Önerilen EFC sisteminde GOx ve LAC enziminin en iyi katalitik aktiviteyi gösterdiği pH değerini saptayabilmek için pH optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla pH değerleri 4.4-5.4-6.4-7 ve 8.4 olan 100 mM sitrat ve fosfat tamponları hazırlandı. EFC sistemi farklı tampon ortamlarına daldırıldı ve 0.94 V'luk potansiyelde çalıştırıldı. Her pH değerinde ortama 10 mM standart glikoz eklemesi yapıldı ve üretilen akım yoğunluklarına bakarak sistem performansı değerlendirildi. Şekil 3.50'den görüldüğü üzere en yüksek akım yoğunluğuna pH 7'de ulaşıldı. Akım yoğunluğu pH 4.4'den pH 7'ye kadar artarken 7'den sonra düşmüştür. Sonuçlar GOx ve LAC enzimleri için en uygun çalışma ortamının pH 7 olduğunu açıkça göstermektedir.



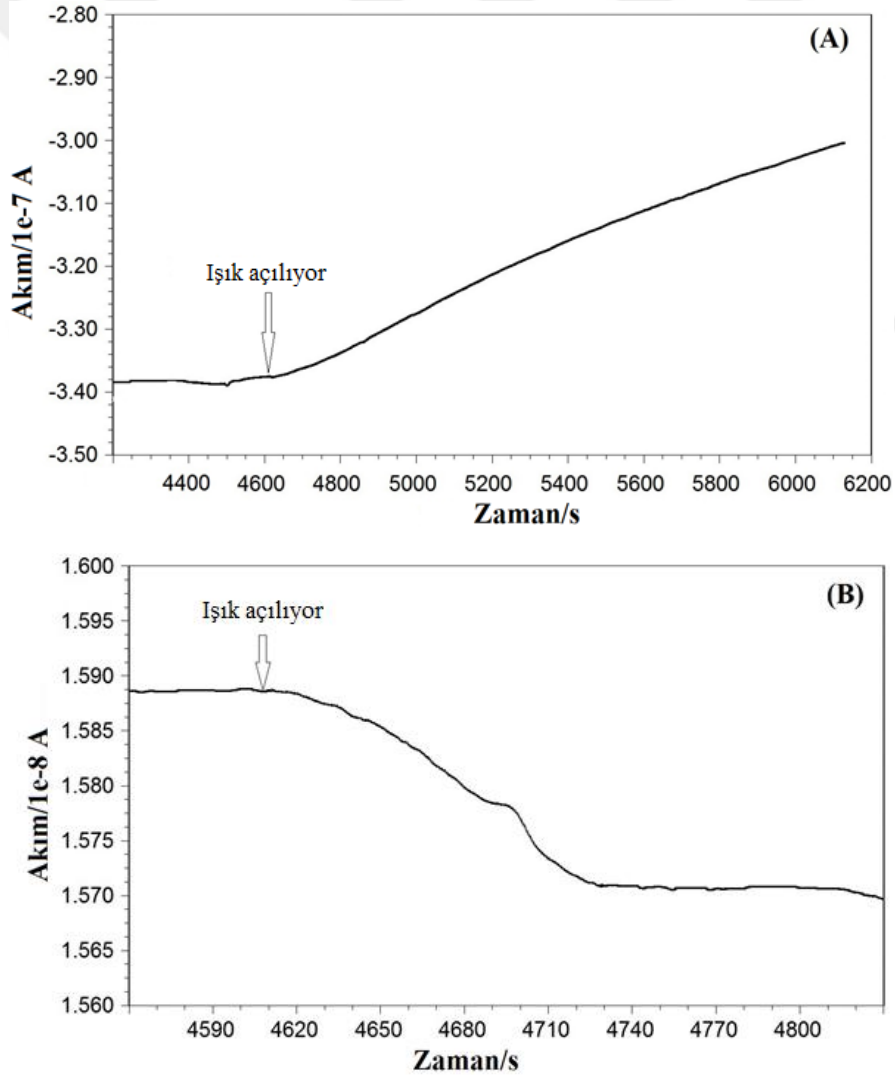
Şekil 3.50 pH'ın sistem performansına etkisi.

3.6.4 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi

Optimizasyon çalışmalarının sonuçlarına göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrot fabrikasyonu ve işletilmesi şu şekilde olmuştur: Altın anot ve katot, 10 mM (Py-COOH), 5 mM (TAA), 10 mM *p*-benzokinon ve 20 mM tetrabutil amonyum tetrafloroborat içeren 10 mL'lik asetonitril ortamına karşıt ve referans elektrotla birlikte daldırıldı. 100 mV/s'lik tarama hızında, döngü sayısı 40 olacak şekilde 0-2 V arasında yüzeyde kopolimerizasyon sağlandı. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra kopolimerde bulunan karboksilik gruplar karbodiimid çözeltisiyle aktifleştirildi daha sonra anot yüzeyine 10 mg/mL'lik GOx enzim çözeltisinden 10 µL, katot yüzeyine ise 10 mg/mL'lik LAC enzim çözeltisinden 10 µL damlatılarak enzimler immobilize edildi. Süre sonunda elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7 sitrat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.35 V, katoda ise +0.59 V potansiyel uygulanmak (hücre potansiyeli: 0.94 V) suretiyle sistem çalıştırıldı. 0.94 V'luk hücre potansiyelinde EFC sisteminden 30 mM'lık glikoz eklemesi sonucu elde edilen güç 18.8 µW/cm², 10 mM'lık glikoz eklemesi sonucunda maksimum akım yoğunluğu 4.10⁻⁶ A/cm² ve güç yoğunluğu 3.8 µW/cm²lik olarak hesaplandı.

3.6.5 EFC Sistemi Kullanılarak *Carpobrotus Acinaciformis* Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi

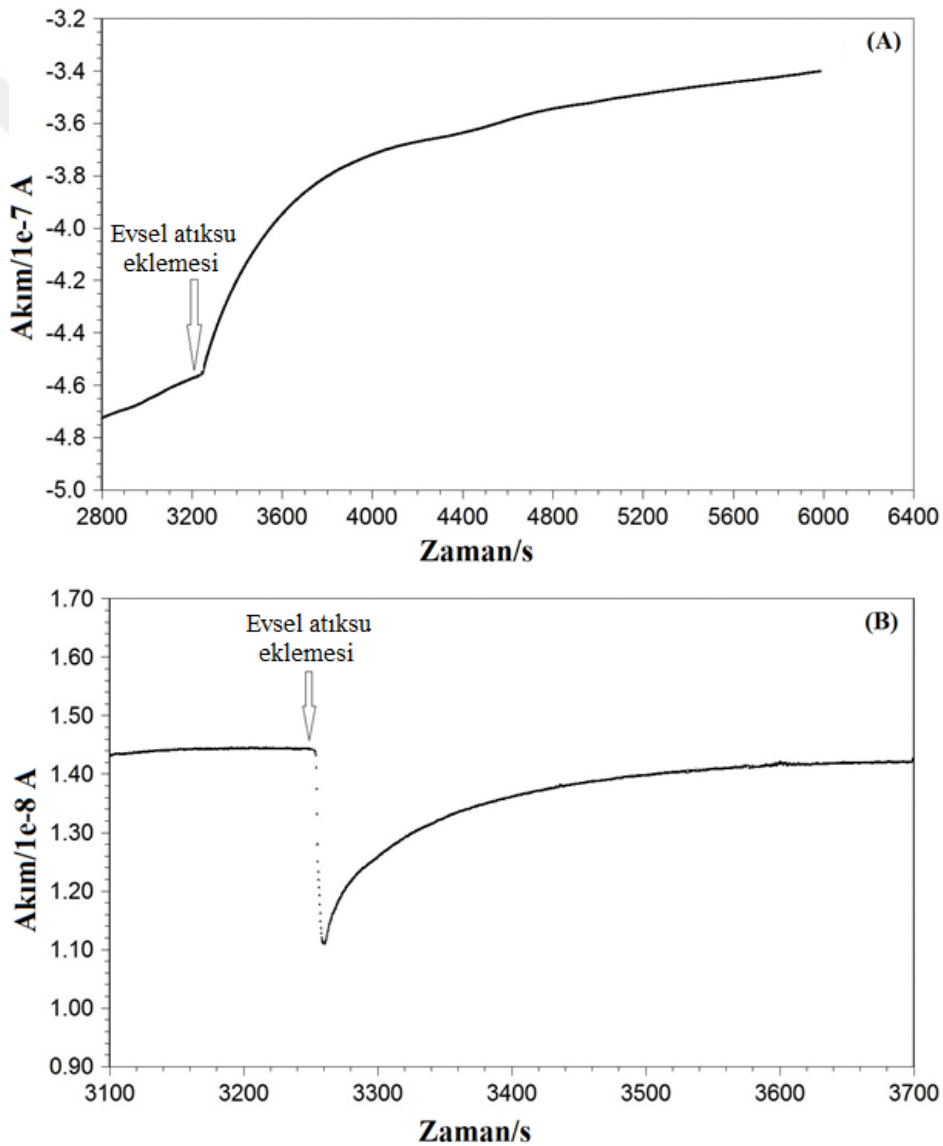
Hazırlanan EFC sisteminin anot ve katot tarafı referans ve karşıt elektrot ile beraber karanlık odada bitkinin yaprağına batırıldı. Sistem 0.94 V'luk hücre potansiyeli altında yaklaşık 80 dakikada dengeye geldi ve sonra ışık kaynağı açıldı. Işık kaynağının açılmasıyla ortam aydınlatılarak bitkinin fotosentez yapması sağlandı. Bu sırada bitki bünyesinde üretilmeye başlayan glikozun EFC sisteminde yakıt olarak kullanılması sonucu anotta glikoz, GOx enzimi tarafından oksitlenmeye başlamış, glikoz üretimi fotosentezle devam ettikçe anotta oksidasyon akımının arttığı, buna bağlı olarak katoda akan elektronlar sayesinde katotta bulunan LAC enziminin oksijeni indirgediği gözlemlendi (Şekil 3.51). 2 dakika boyunca ışık kaynağı ile aydınlatılan bitkiden 9.6 A/cm^2 'lik akım yoğunluğu ve 10 nW/cm^2 'lik bir güç yoğunluğu elde edildi.



Şekil 3.51 Bitki yaprağında fotosentezle oluşan glikozdan 0.94 V'luk hücre potansiyelinde EFC'den üretilen akım değerleri: Anodik akım (A), katodik akım (B).

3.6.6 EFC Sisteminde Evsel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi

Her aşaması optimize edilen Poli(Py-COOH-co-TAA)/*p*-benzokinon film tabanlı EFC sistemi, 10 mL, 100 mM pH 7 sitrat tamponuna daldırıldı ve 0.94 V'luk hücre potansiyeli altında sistem çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra süzölmüş olan evsel atıksu numunesinden 500 μ L hücreye eklendi (atıksu numunesi güç üretimi sırasında 20 kat seyrelti). Ekleme sırasında cihazın kaydettiği akım değişimi açıkça görüldü ve Şekil 3.52'de verildi. EFC sisteminden, seyrelmemiş evsel atıksu içeriğindeki glikozun yakıt olarak kullanılmasıyla 6 dakikalık operasyon süresinde $3.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ lık güç yoğunluğu üretildi.

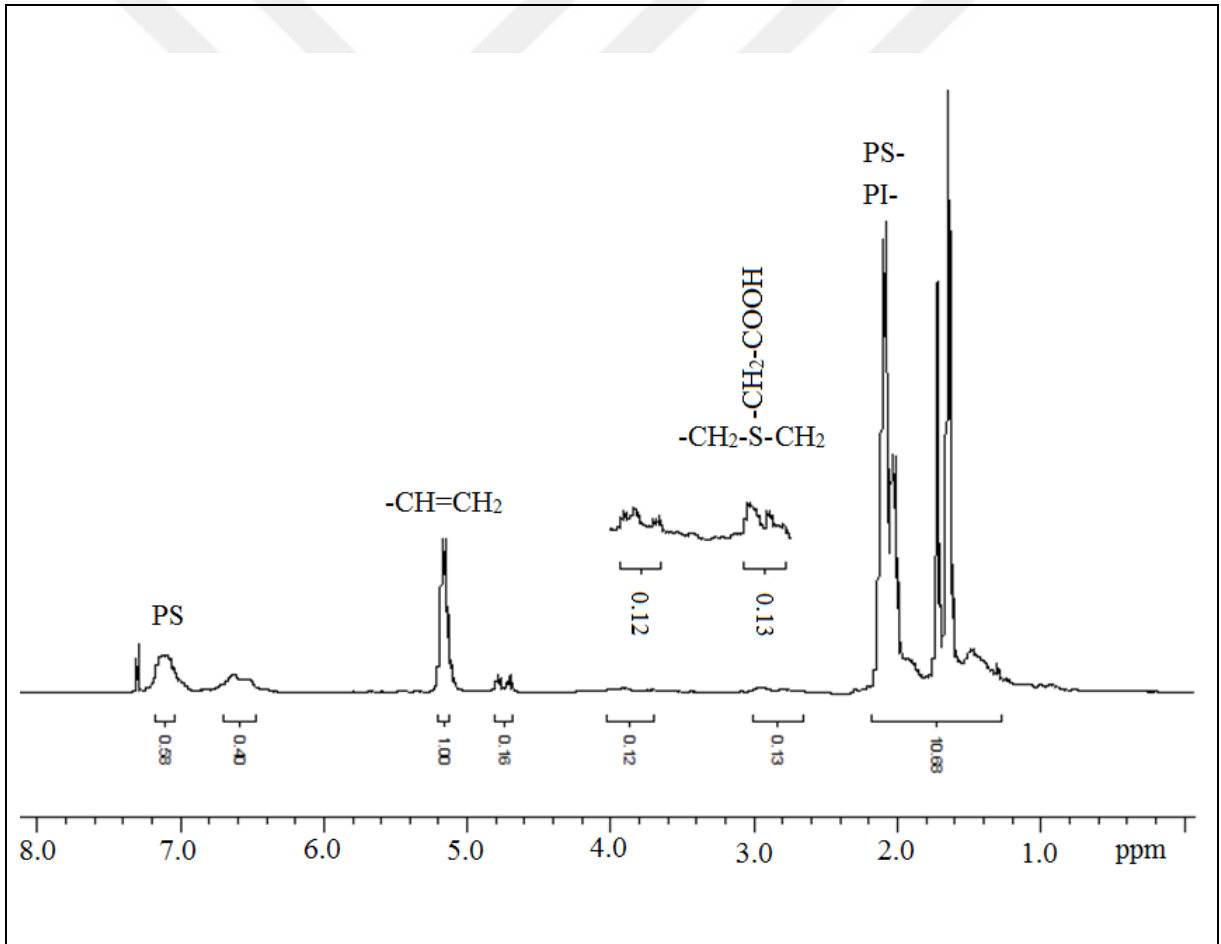


Şekil 3.52 0.94 V'luk hücre potansiyelinde 500 μ L'lik evsel atıksu eklemesi sonucu EFC anot (A) ve katotundan (B) üretilen akım değerleri.

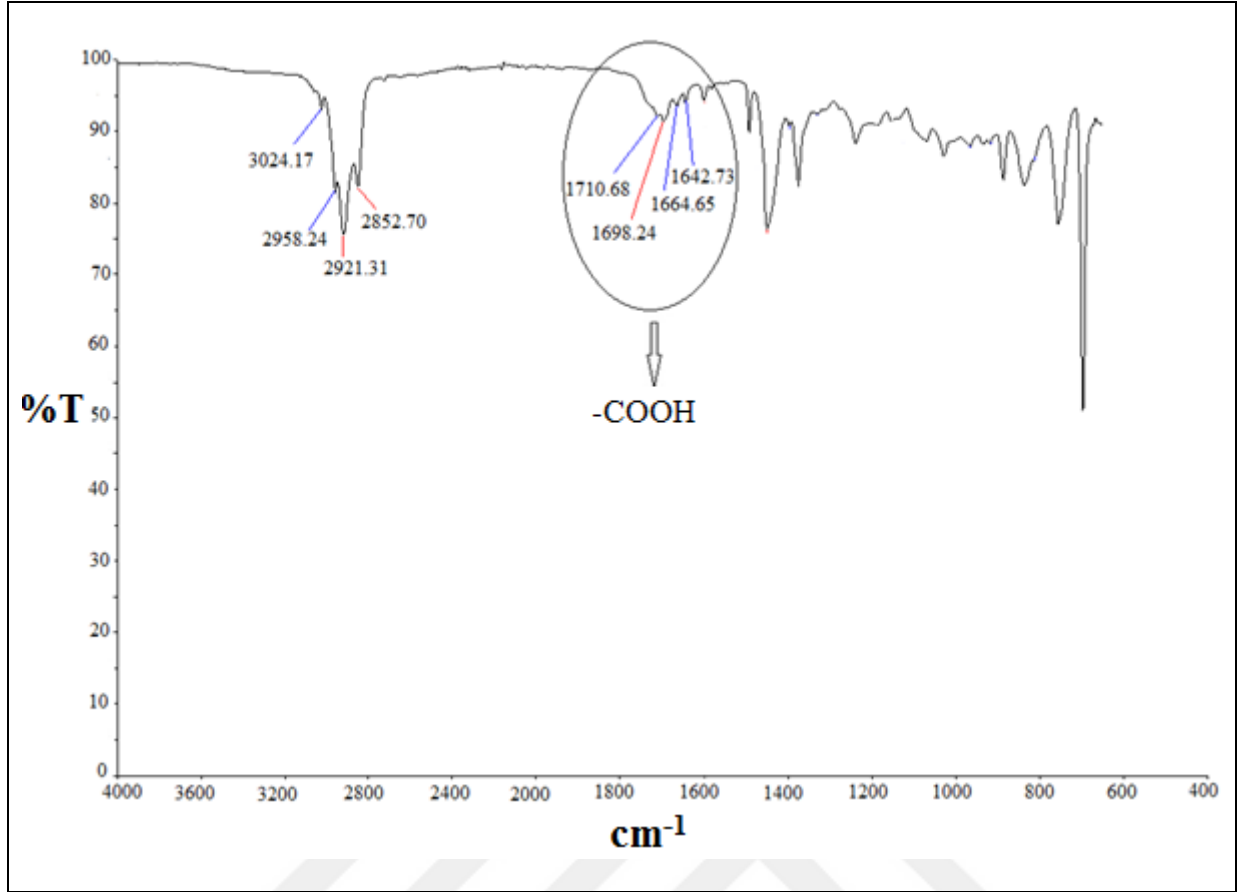
3.7 PSIS-COOH TABANLI EFC SİSTEMİ

3.7.1 Karakterizasyon Çalışmaları

Bölüm 2.3.4’de sentezi verilen saf PSIS-COOH triblok kopolimerine ait H-NMR spektrumu tetrametilsilan internal standartı ile CDCl_3 kullanarak çekilmiştir (Şekil 3.53). Spektrumda 7.1 ppm’de gözlenen pik PS’i (polistiren), 5.2 ppm’de gözlenen pik PI’i (poliizopren), 2.8 ppm’de gözlenen pik $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ gruplarını ve 2 ppm’de gözlenen pik ise PS ve PI’in $-\text{CH}_2$ gruplarını göstermektedir. PSIS-COOH triblok kopolimerinin FT-IR spektrumu Şekil 3.54’de gösterilmektedir. Triblok kopolimerinin FT-IR spektrumunda $-\text{COOH}$ grubu için karakteristik pik 1642 cm^{-1} ve 1710 cm^{-1} arasında tespit edildi.



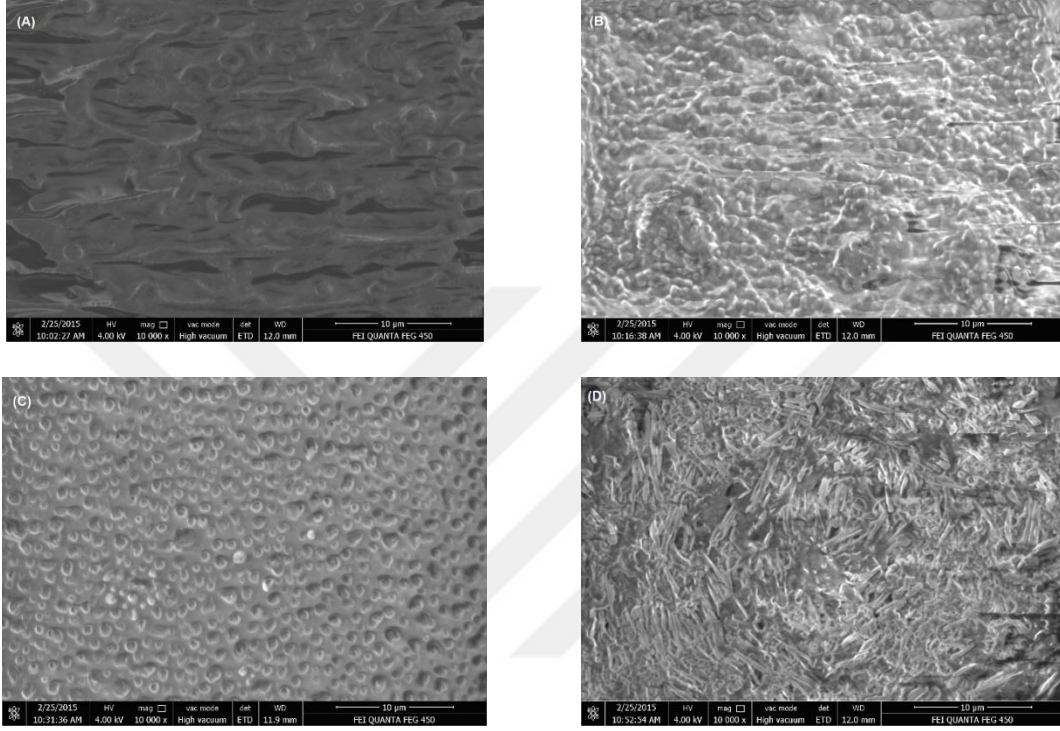
Şekil 3.53 PSIS-COOH kopolimerine ait H-NMR spektrumu.



Şekil 3.54 PSIS-COOH triblok kopolimerinin FT-IR spektrumu.

Saf PSIS-COOH polimeriyle kaplı elektrodun SEM görüntüsü için, altın elektrot üzerine 10 mg/mL'lik kloroformda hazırlanan saf polimer çözeltisinden 3 µL damlatılıp kurutuldu. Grafen ile modifiye edilen PSIS-COOH polimeriyle kaplı elektrodun SEM görüntüsü için, altın elektrot üzerine 0.1 mg grafen içeren 10 mg/mL'lik kloroformda hazırlanan saf polimer çözeltisinden 3 µL damlatılıp kurutuldu. GOx immobilize edilen PSIS-COOH/grafen polimeriyle kaplı elektrodun SEM görüntüsü için altın elektrot üzerine 0.1 mg grafen içeren 10 mg/mL'lik kloroformda hazırlanan saf polimer çözeltisinden 3 µL damlatılıp kurutuldu. Polimerin karboksilik gruplarının aktifleştirilmesi ve kimyasal immobilizasyona olanak sağlaması için elektrotlar 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisinde bekletildi. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra elektrot yüzeyine 20 mg/mL GOx enziminden 9 µL damlatılıp kurularak enzimlerin yüzeye kimyasal bağlanması sağlandı. BOD immobilize edilen PSIS-COOH/grafen polimeriyle kaplı elektrodun SEM görüntüsü için ise yukarıdaki işlemler aynen uygulandı ancak GOx yerine elektrot yüzeyine aynı miktarda BOD enzimi yüklemesi yapıldı. Saf PSIS-COOH triblok kopolimerinin, grafen ile modifiye edilen PSIS-COOH (PSIS-COOH/grafen) triblok kopolimerinin, GOx immobilize PSIS-COOH/grafen'in ve BOD

immobilize PSIS-COOH/grafen'in Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntüleri alındı ve Şekil 3.55'de verildi. Görüntülerden farklı yüzey morfolojileri açıkça gözlemlendi. Grafen ile modifiye edilen PSIS-COOH kaplı elektrodun daha geniş bir üç boyutlu yapıya ve yüzey alanına sahip olduğu gözlemlendi. Bu durum enzim immobilizasyonu ve substrat taşınımı için bir avantaj sağlamaktadır.



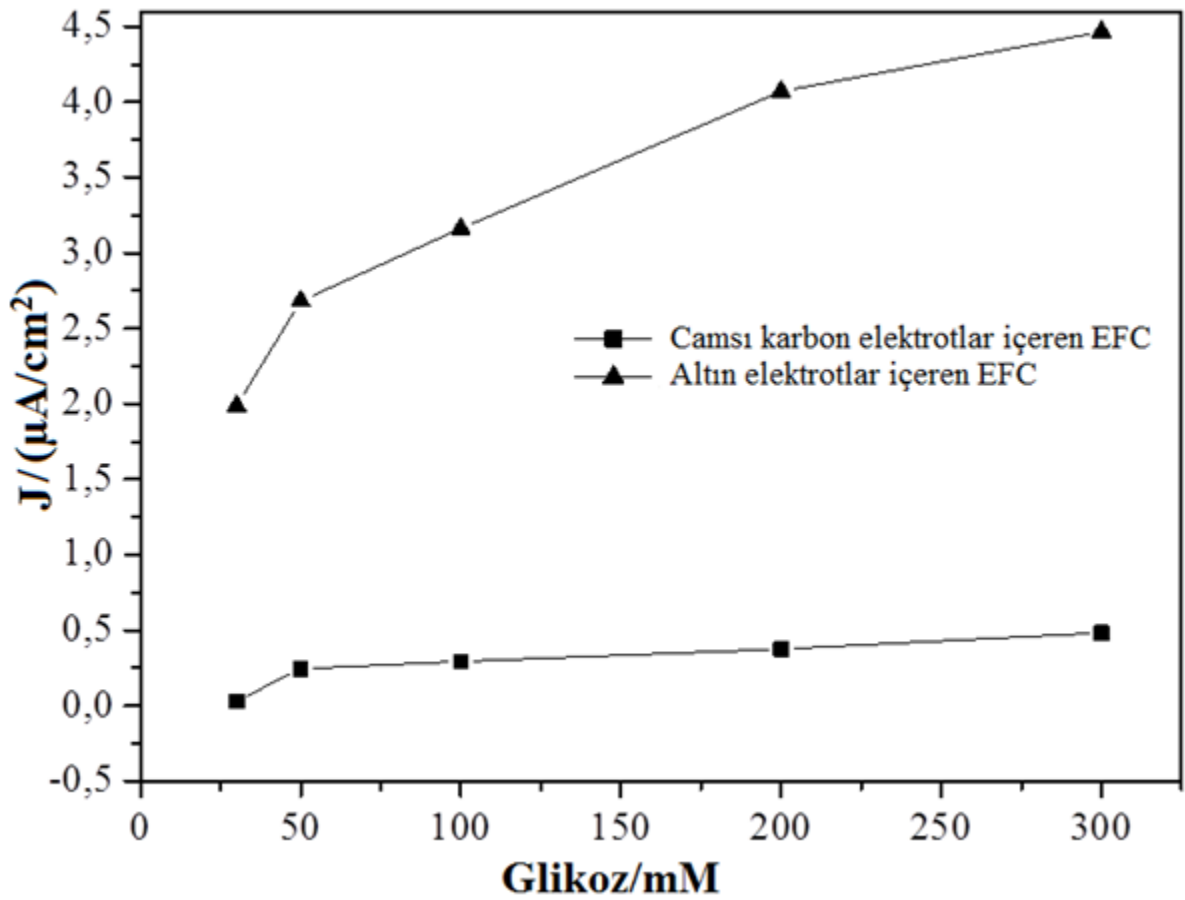
Şekil 3.55 PSIS-COOH'ın (A), PSIS-COOH/grafen'in (B), GOx immobilize PSIS-COOH/grafen'in (C) ve BOD immobilize PSIS-COOH/grafen'in (D) SEM görüntüsü.

3.7.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Elektrot materyali seçimi:

Aynı prosedürle hem altın hem de camı karbon elektrot ile hazırlanan 2 EFC sisteminin performansı incelendi. Bu amaçla elektrot yüzeylerine 0.1 mg grafen içeren 10 mg/mL'lik kloroformda hazırlanan saf polimer çözeltisinden 3 µL damlatılıp kurutuldu. Polimerik film 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisinde aktifleştirildikten sonra 20 mg/mL'lik GOx ve BOD enzim çözeltilerinden 7.5'ar µL olacak şekilde anot ve katoda damlatılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak elektrotlar yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Stok glikoz çözeltisi 2

M olacak şekilde reaksiyon hücresine eklenen tamponla hazırlandı. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.36 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı. Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı, öncelikle arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamında 30-300 mM aralığında glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden eklemeler yapıldı. Sinyaller cihaz tarafından kaydedildi (Şekil 3.56). Altın anot ve katot ile hazırlanan EFC sisteminin, camısı karbon elektrotlarla hazırlanana EFC sistemine kıyasla yakıt miktarıyla orantılı olarak daha iyi akım değerleri verdiği tespit edildi ve altın elektrotlar kullanılarak hazırlanan EFC sisteminin performans açısından daha kullanışlı olduğuna karar verildi.

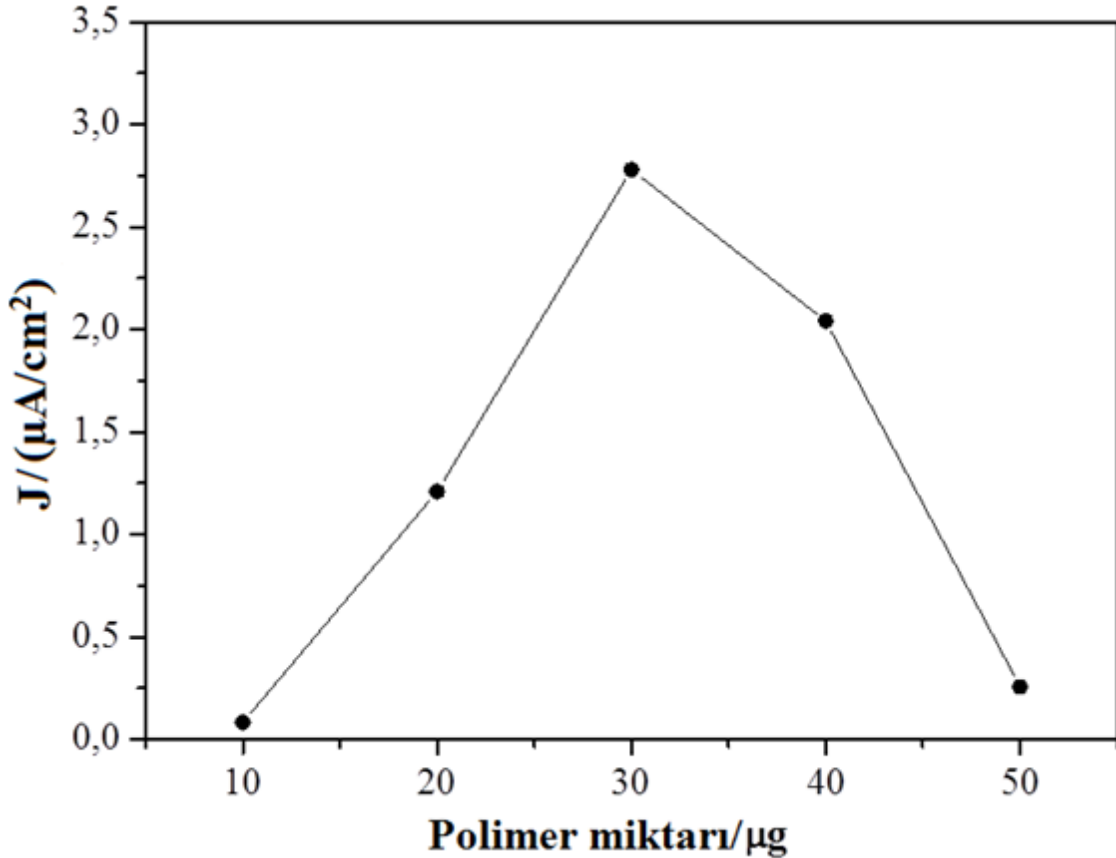


Şekil 3.56 PSIS-COOH/grafen triblok kopolimeriyle hazırlanmış altın ve camısı karbon çalışma elektrotlarını içeren 2 EFC sisteminden glikoz eklemelerine karşı alınan akım değerleri.

Film yoğunluğu deneyleri:

Film yoğunluğu deneyleri için elektrot yüzeyinde sırasıyla 10-20-30-40-50 µg PSIS-COOH/grafen polimeri olacak şekilde çalışma elektrotları yüzeyleri polimerik filmle

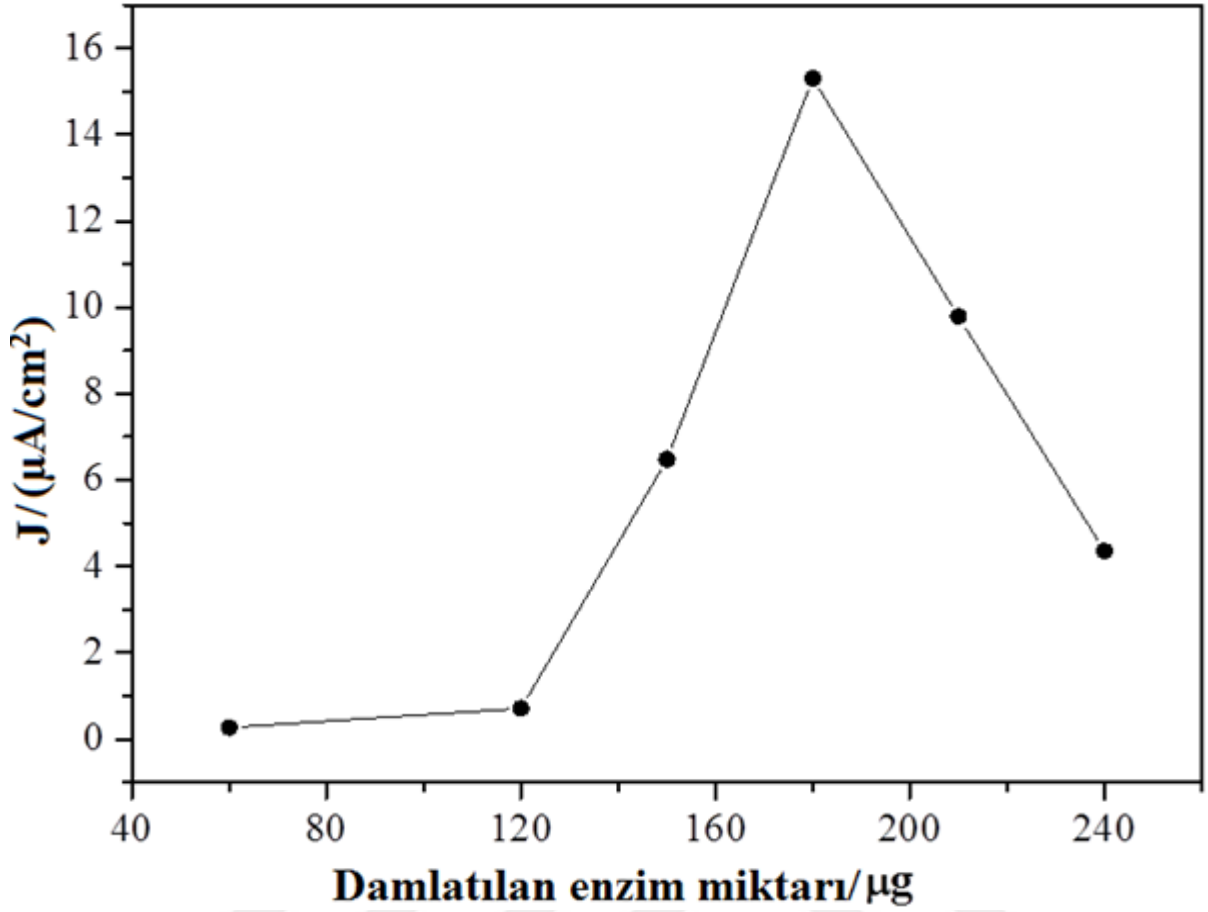
kaplanarak 5 EFC sistemi hazırlandı. Polimerik filmin karbodiimid çözeltisiyle aktifleştirilmesinden sonra, farklı film kalınlıklarıyla hazırlanan anot üzerine 20 mg/mL GOx enziminden 7.5 μ L, katoda 20 mg/mL BOD enziminden 7.5 μ L damlatılıp kurutularak enzimlerin yüzeye kimyasal immobilizasyonu sağlandı. Elektrotlar yıkanarak 10 mL'lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.36 V, katoda +0.36 V'luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında 30 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi. Farklı film yoğunluklarıyla hazırlanan 5 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden alınan akım değerleri karşılaştırıldı (Şekil 3.57). Şekil 3.57'den görüldüğü üzere 30 μ g polimer içeren çalışma elektrodundan, aynı miktardaki glikoz eklemesi için diğer film kalınlıklarında hazırlanan çalışma elektrotlarından elde edilen akım yoğunluğu değerlerine kıyasla daha yüksek sonuç elde edildi. 30 μ g polimer miktarından büyük miktarlarda, polimerik film kalınlığı artarak elektron geçişinin yavaşlamasına yol açmış bunun sonucunda aynı glikoz eklemesine karşı elde edilen akım değerleri düşmüştür.



Şekil 3.57 Farklı film yoğunluklarında hazırlanmış 5 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden ürettiği akım yoğunlukları.

İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Aynı film yoğunluklarında ve aynı enzim immobilizasyon metodu kullanılarak oluşturulan çalışma elektrotlarında yüzeye yüklenen enzim miktarı değiştirilerek, yüzeyde tutulan enzim miktarı optimize edildi. Bu amaçla, altın anot ve katot kullanılarak, 30 µg'lık polimer film kalınlığında GOx ve BOD enzimleriyle hazırlanan çalışma elektrotlarıyla kurulan EFC sistemlerinde 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponuna yapılan 30 mM'lık glikoz eklemelerine karşı anoda -0.36 V, katoda +0.36 V potansiyel uygulanarak elde edilen akım yoğunlukları kaydedildi (Şekil 3.58). Elektrotlar hazırlanırken 20 mg/mL'lik GOx ve BOD enzim çözeltilerinden anot ve katot yüzeyine sırasıyla 3-6-7.5-9-10,5-12 µL (60-120-150-180-210-240 µg enzim yükleme) damlatılıp yüzey kurutuldu ve enzim immobilizasyonu için yeterli süre beklendi. Farklı hacimlerde enzim damlatılarak hazırlanan 6 EFC sisteminin anot ve katot taraflarında immobilize olan enzim miktarlarının tespiti için protein analizi yapıldı ve sonuçlar Çizelge 3.4'de verildi. Elektrot yüzeylerine 180 µg GOx ve BOD yüklendiğinde, maksimum akım yoğunluğuna ($15 \mu\text{A}/\text{cm}^{-2}$) ulaşıldı. Çizelge 3.4'den görüldüğü üzere immobilize olan BOD miktarı, artan BOD yüklemeleriyle orantılı olarak artarken, immobilize olan GOx miktarı, 180 µg'lık yükleme miktarından sonra azalmıştır. Sonuç olarak akım yoğunluğunun immobilize olan GOx miktarıyla doğrudan ilişkili olduğu açıkça gözlemlendiğinden, EFC sisteminin anot kontrollü olduğu tespit edildi.



Şekil 3.58 Farklı enzim miktarı yüklemelerinde hazırlanmış 6 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden ürettiği akım yoğunlukları.

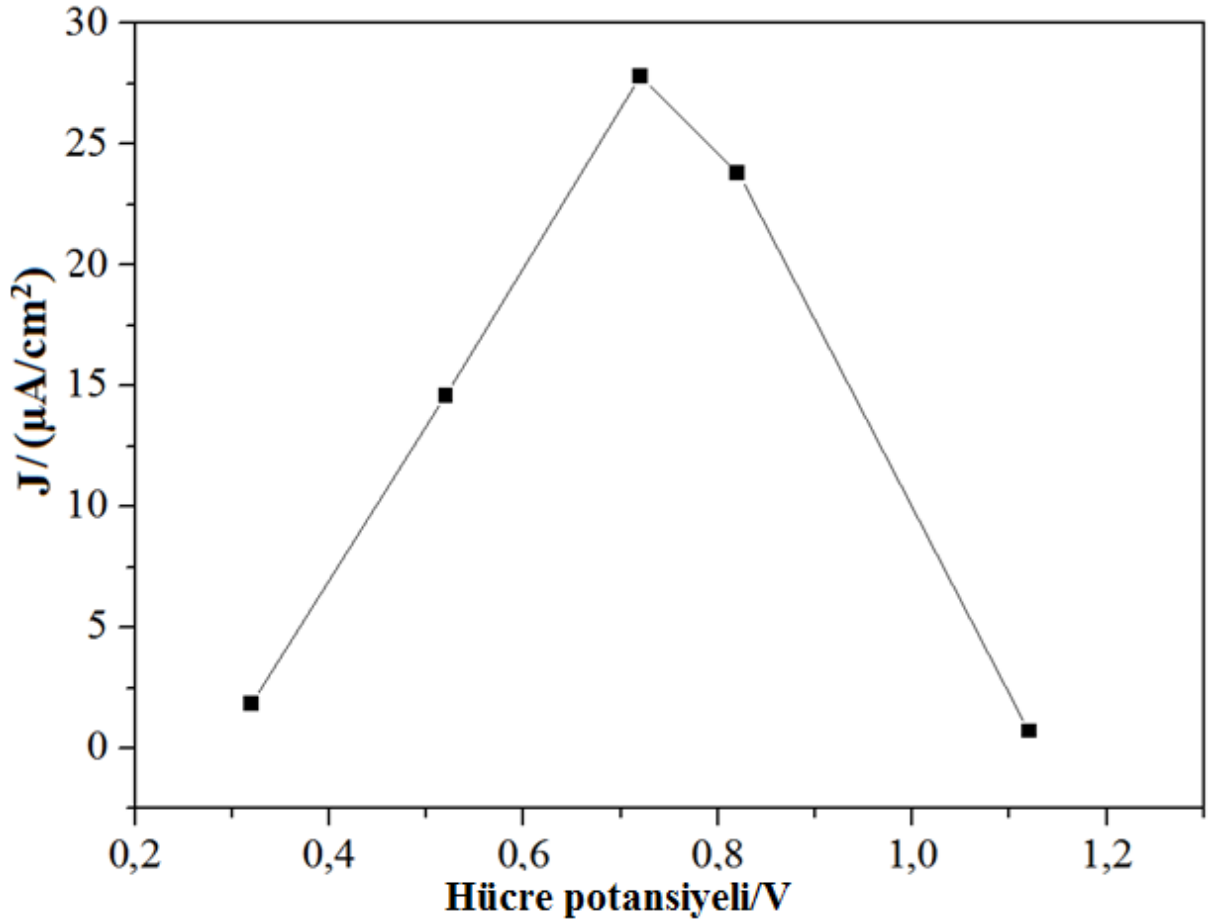
Çizelge 3.4 Farklı miktarlarda enzim yüklemesiyle hazırlanmış 6 EFC sisteminin, yüzeylere immobilize olmuş enzim miktarları.

Elektrot yüzeyine damlatılan enzim miktarı (µg)	İmmobilize GOx miktarı (µg)	İmmobilize BOD miktarı (µg)
60	2	1.7
120	3.5	2
150	12	2.7
180	40	4
210	27	8
240	20	12

3.7.3 İşletme Koşullarının Optimizasyonu

Hücre potansiyeli:

EFC sistemine sırasıyla farklı hücre potansiyelleri uygulanarak (0.32-0.52-0.72-0.82 ve 1.12 V'luk) sistem çalıştırıldı ve potansiyelin performansa etkisi incelendi. Bu amaçla hazırlanan EFC sistemine farklı hücre potansiyellerinde 30 mM glikoz ilave edildi, akım yoğunlukları kaydedildi (Şekil 3.59). Akım yoğunluğu 0.72 V'a kadar artarken bu değerden sonra düşmeye başlamıştır. Maksimum akım yoğunluğu, anot için -0.36 V ve katot için 0.36 V olarak uygulanan potansiyel değerlerinden elde edildi ve hücre potansiyeli 0.72 V olarak belirlendi.



Şekil 3.59 Farklı hücre potansiyellerinde EFC'den üretilen akım yoğunlukları.

pH:

pH değerleri 6.4-7.4 ve 8.4 olan 100 mM fosfat tamponları hazırlandı, sistem 0.72 V'luk hücre potansiyelinde çalıştırılarak her pH değerinde ortama 30 mM standart glikoz eklendi ve

sistem performansı kıyaslandı. Çizelge 3.5’den görüldüğü üzere en yüksek akım yoğunluğu pH 7.4 olan fosfat tamponundan elde edildi. Güç yoğunluğu pH 6.4’den pH 7.4’e kadar artarken 7.4’den sonra düşmüştür. Sonuçlar GOx ve BOD için pH profilini göstermiş ve en uygun çalışma ortamının pH 7.4 olduğunu göstermiştir.

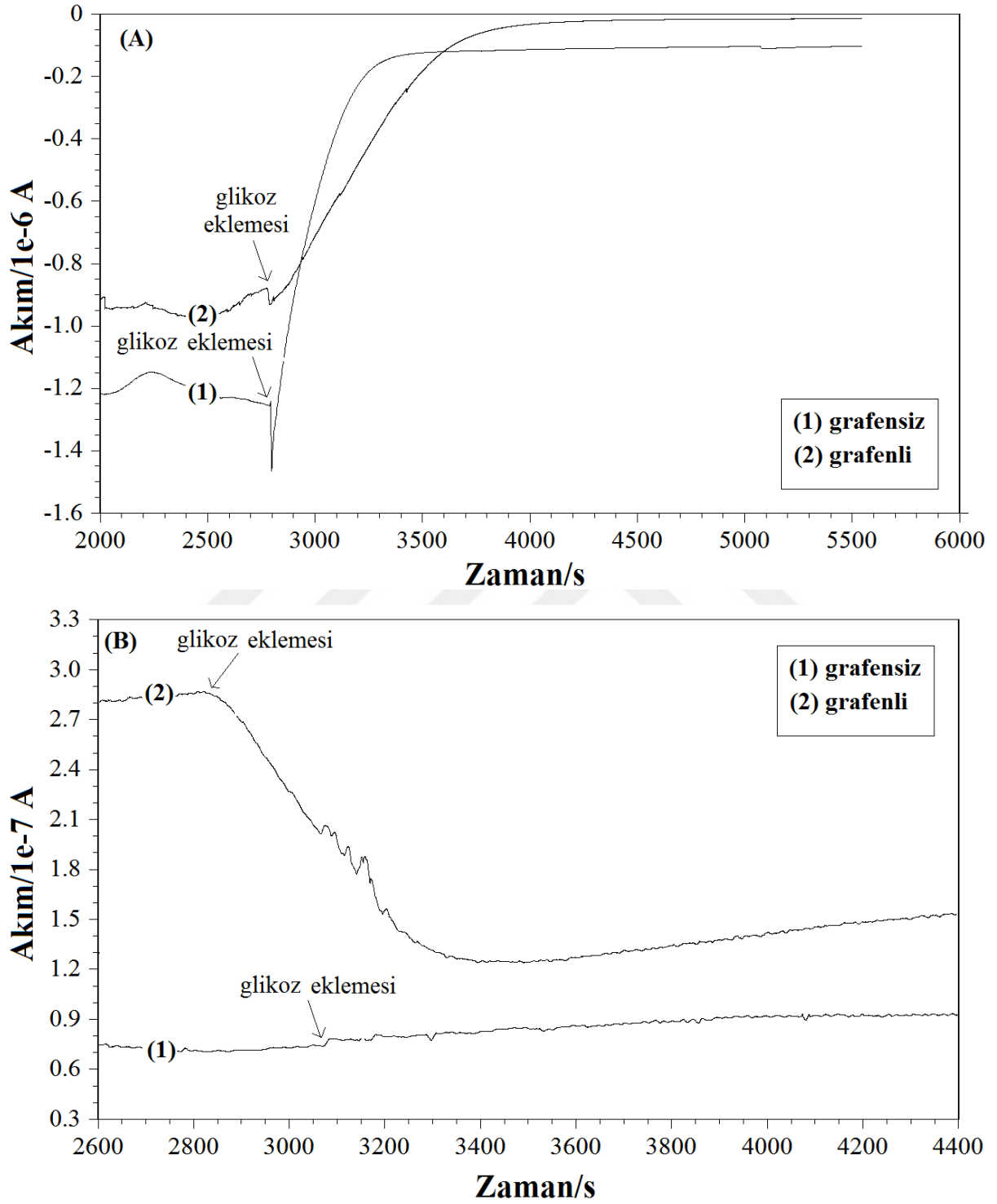
Çizelge 3.5 pH’ın akım yoğunluğuna etkisi.

pH	J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
6.4	8.1
7.4	12
8.4	8.8

3.7.4 Grafenin Sistem Performansına Etkisi

Saf PSIS-COOH ile hazırlanan EFC’den elde edilen akım ve güç yoğunlukları grafenle modifiye edilen PSIS-COOH ile karşılaştırıldı ve grafenin EFC performansına etkisi incelendi. Bu amaçla 1. EFC sisteminin anot ve katot yüzeyinde sırasıyla 30’ar μg saf PSIS-COOH polimeri olacak şekilde, 2. EFC sisteminin anot ve katot yüzeyinde sırasıyla 30’ar μg grafenle modifiye edilen PSIS-COOH polimeri olacak şekilde yüzeyler polimerik filmle kaplanarak EFC sistemleri hazırlandı. Her iki sistemin de elektrot yüzeyleri karbodiimid çözeltisiyle aktifleştirilmesinden sonra, anot üzerine 20 mg/mL GOx enziminden 9 μL , katoda 20 mg/mL BOD enziminden 9 μL damlatılıp kurutularak enzimlerin yüzeye kimyasal immobilizasyonu sağlandı. Elektrotlar yıkanarak 10 mL’lik 100 mM pH 7.4 fosfat tamponuna daldırıldı. Anoda -0.36 V, katoda +0.36 V’luk potansiyel uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamına 5 mM’lık glikoz eklemesi yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi (Şekil 3.60). Şekil 3.60A’dan anot tarafında glikoz oksidasyonunun grafenin sistemde olup olmamasından etkilenmediği açıkça görülmektedir. Fakat Şekil 3.60B incelendiğinde grafenin akım değerini önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Bu sonuçlara göre, grafen GOx aktif merkezi ile anot elektrot materyali arasındaki elektron transferine katkı sağlamazken, grafenin katot tarafında BOD aktif merkezi ile katot elektrot materyali arasındaki elektron akışını hızlandırdığı anlaşılmıştır. Saf PSIS-COOH ile hazırlanan EFC’den elde edilen akım yoğunluğu $0.16 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve güç yoğunluğu $0.115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak hesaplanırken, grafen ile modifiye edilen PSIS-COOH ile hazırlanan EFC’de akım yoğunluğu $5.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ve güç yoğunluğu $3.7 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olarak

bulundu. Değerler incelendiğinde grafen ile modifiye edilen EFC'den 32 kat daha yüksek akım ve güç yoğunluğu elde edildi.



Şekil 3.60 0.72 V'luk hücre potansiyelinde saf ve grafen modifiye edilmiş PSIS-COOH ile hazırlanan EFC'lerden elde edilen anodik (A) ve katodik (B) akım değerleri.

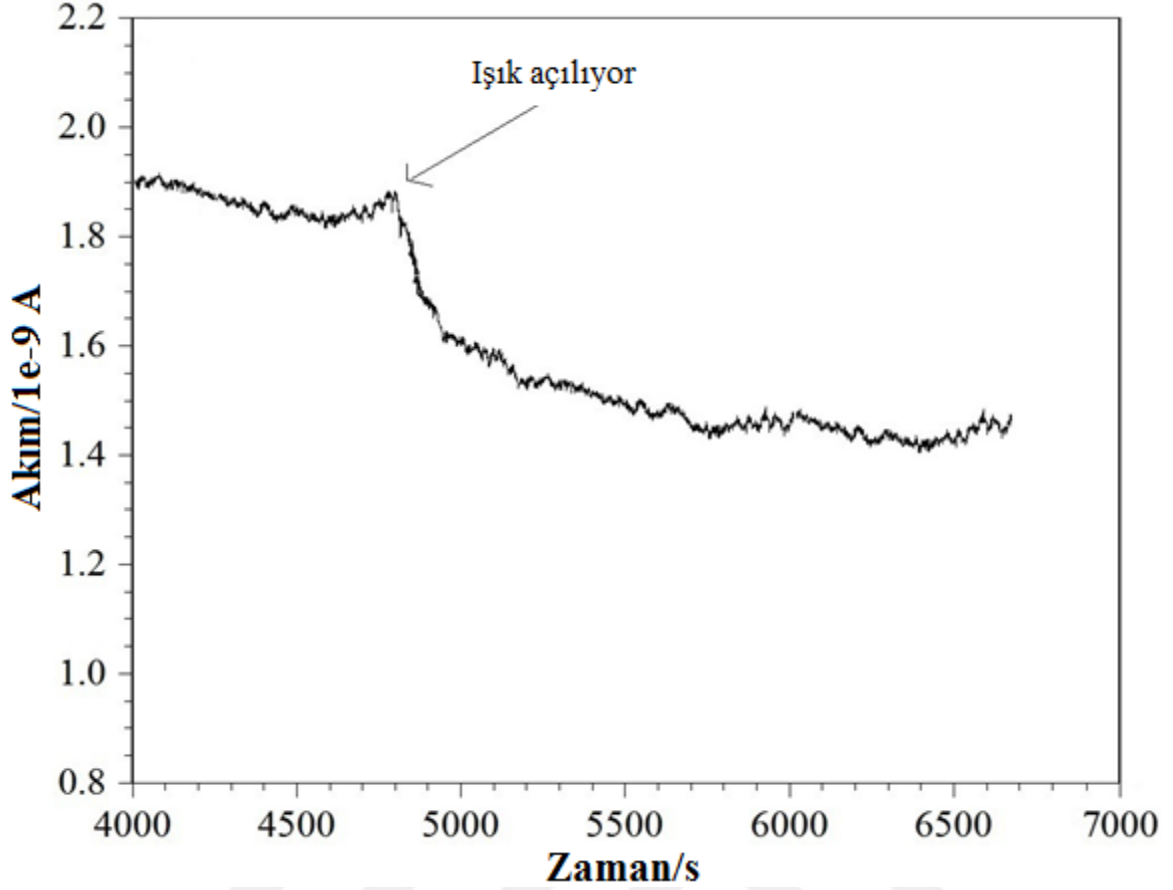
3.7.5 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretimini İncelenmesi

Elde edilen sonuçlara göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrotları aşağıda şekilde hazırlandı: Altın anot ve katot üzerine 0.1 mg grafen içeren 10 mg/mL'lik kloroformda hazırlanan polimer çözeltisinden 3'er µL (elektrot yüzeyindeki polimer miktarı 30 µg) damlatılıp kurutuldu. Polimerin karboksilik gruplarının aktifleştirilmesi ve kimyasal immobilizasyona olanak sağlaması için elektrotlar 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisinde bekletildi. Elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra anoda 20 mg/mL GOx enziminden 9 µL, katoda 20 mg/mL BOD enziminden 9 µL damlatılıp kurularak enzimlerin yüzeye kimyasal bağlanması sağlandı. Elektrotlar saf suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Cam reaksiyon hücresine 10 mL, 100 mM, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.36 V, katoda ise +0.36 V potansiyel uygulandı (Hücre potansiyeli: 0.72 V). Sistem dengeye ulaştığında, reaksiyon ortamında 30 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ekleme yapıldığında elde edilen elektriksel güç yoğunluğu 20 µW/cm², 5 mM glikoz eklemesinden elde edilen güç yoğunluğu 3.7 µW/cm² olarak hesaplandı.

3.7.6 EFC Sistemi Kullanılarak *Carpobrotus Acinaciformis* Bitkisinden Elektrik Enerjisi Üretimi

Bölüm 3.7.5'de verildiği şekilde hazırlanan EFC sisteminin anot ve katot tarafı referans ve karşıt elektrot ile beraber karanlık odada bitkinin yaprağına batırıldı. Sistem 0.72 V'luk hücre potansiyeli altında çalıştırıldı ve dengeye geldikten sonra ışık kaynağı açıldı. Işık kaynağının açılmasıyla ortam aydınlatılarak (30 dakika boyunca) bitkinin fotosentez yapması sağlandı. Bu sırada bitki bünyesinde üretilmeye başlayan glikozun EFC sisteminde yakıt olarak kullanılması sonucu anotta glikoz, GOx enzimi tarafından oksitlenmeye başlamış, glikoz üretimi fotosentezle devam ettikçe anotta oksidasyon akımının arttığı, buna bağlı olarak katoda akan elektronlar sayesinde katotta bulunan BOD enziminin oksijeni indirgediği gözlemlendi (Şekil 3.61). Bitki uygulamasından üretilen akım yoğunluğu 14 nW/cm² (30 dakikalık sürede) olarak hesaplandı.

Gerek sadece PSIS-COOH ile gerekse de grafenle modifiye edilen PSIS-COOH polimeriyle hazırlanan EFC sistemlerinden, sistem optimizasyonu yapılarak performans iyileştirilmesi yapılmış olmasına rağmen evsel atıksudan akım üretimi gözlenememiştir.

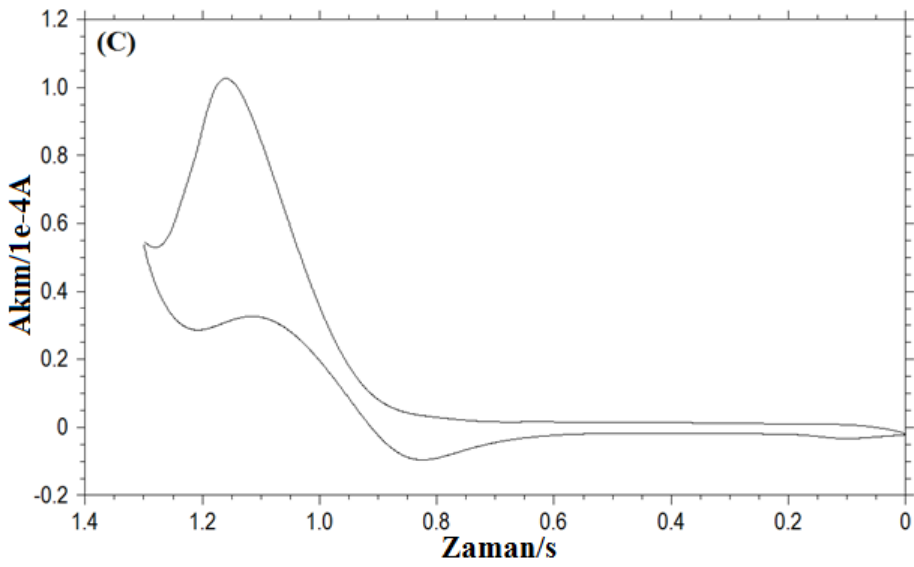
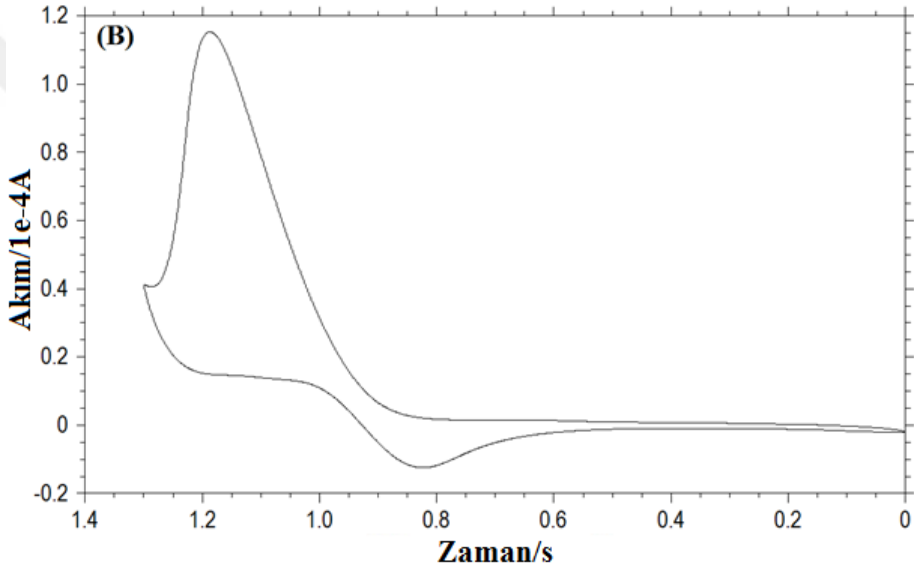
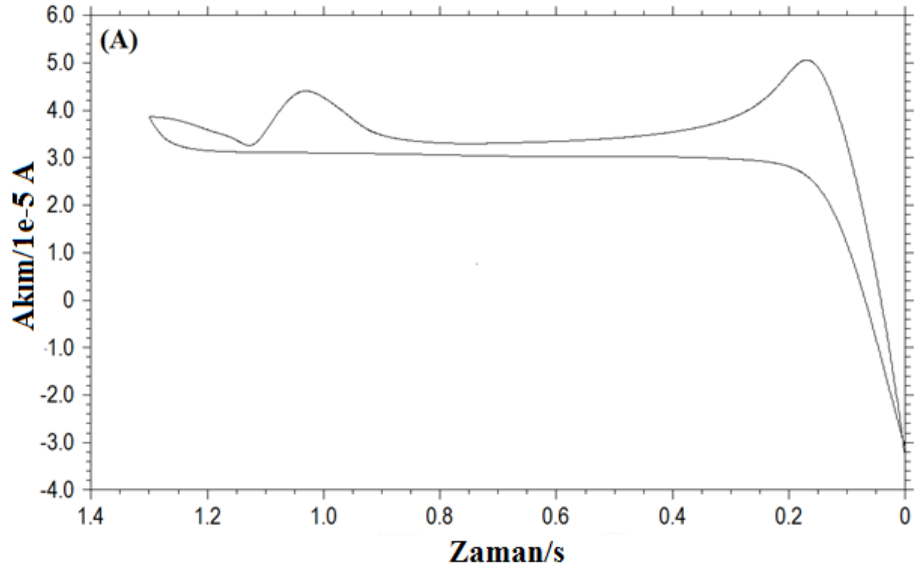


Şekil 3.61 0.72 V'luk hücre potansiyelinde fotosentez reaksiyonları sonucu EFC'de gözlenen akım.

3.8 POLİ(Py-COOH) TABANLI EFC SİSTEMİ

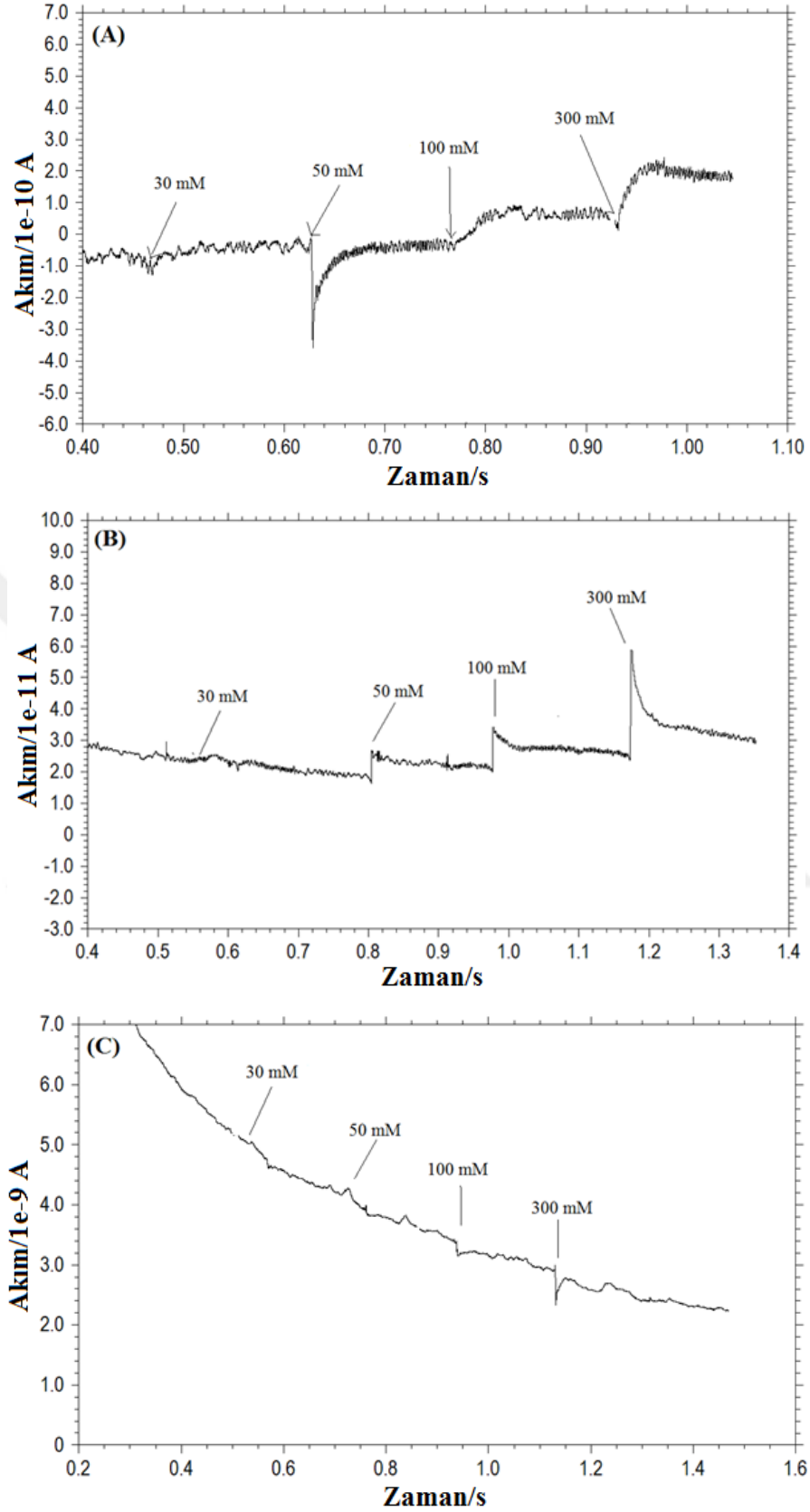
3.8.1 Karakterizasyon Çalışmaları ve Farklı Medyatörlerin Denenmesi

Bölüm 2.5.3'deki açıklandığı şekilde farklı medyatörlerle hazırlanan elektrotların elektropolimerizasyona ait dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 3.62'de gösterilmektedir. Şekil 3.62'de 1-1.2 V arasında Pirol-2-karboksilik asidin oksidasyon piki açıkça görülmektedir (yani bu potansiyel değerinde elektrot yüzeyinde polimerleştiği anlaşılmıştır). Ortamda farklı medyatörlerin olması pirolün okside olduğu potansiyel değerini değiştirmemiştir. Her 3 medyatör için de pirolün elektrot yüzeyinde polimerik film oluşturduğu anlaşılabilmektedir. Çalışılan her bir medyatör için çalışma potansiyeli değişeceğinden ve belirlenmesi gerektiğinden herbir medyatörün redoks dalgalarının görülmesi için dönüşümlü voltametri grafiği daha önceki deneylerde zaten çekilmiş ve medyatörün oksitlenip indirgendiği potansiyel değerleri bu döngülerden tespit edilmişti (Bölüm 3.5.1, Şekil 3.36).



Şekil 3.62 Poli(Py-COOH)/ferrosen (A), Poli(Py-COOH)/*p*-benzokinin (B), Poli(Py-COOH)/Nötral kırmızısı (C) elektropolimerizasyonuna ait CV grafikleri.

Farklı medyatörlerle modifiye edilen polimerle kaplanan elektrotlar 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisi içinde hafif karıştırma altında bekletildi. Karbodiimid çözeltisi 2.5 mL 20 mM N-hidroksisüksinimid ve 2.5 mL 40 mM N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid çözeltisinin karıştırılmasıyla hazırlandı. Süre sonunda anot ve katot yıkandı ve anot üzerine 20 mg/mL GOx enziminden 20 µL, katot üzerine 20 mg/mL LAC enziminden 20 µL damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi ve dörtlü EFC sistemine takıldı. Reaksiyon hücre sine 10 mL 100 mM pH 5 sitrat tamponu eklenerek ortam karıştırıldı. Anoda ve katoda sırasıyla ferrosenli elektrot için -0.15 V, +0.3 V, *p*-benzokinonlu elektrot için -0.3 V, +0.59 V, nötral kırmızısı içeren elektrot için -0.52, +0.59 V (her medyatöre ait redoks dalgalarına bakılarak anot potansiyeli belirlendi, LAC içeren katot tarafalarına enzimin oksijeni redükleyebildiği +0.59 V'luk potansiyel uygulandı) uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamında sırasıyla 30-50-100 ve 300 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ortama ekleme yapıldı ve elde edilen akım değeri kaydedildi (Şekil 3.63). Şekillerden görüldüğü üzere ferrosenle modifiye edilen çalışma elektrotlarından en yüksek akım değeri elde edildi. Ferrosenli çalışma elektrotları uygun çalışma potansiyelinde elektron transferini daha çok hızlandırmıştır. Bu nedenle Poli(Py-COOH) polimeri ferrosen medyatörü ile modifiye edilerek kullanılmıştır.

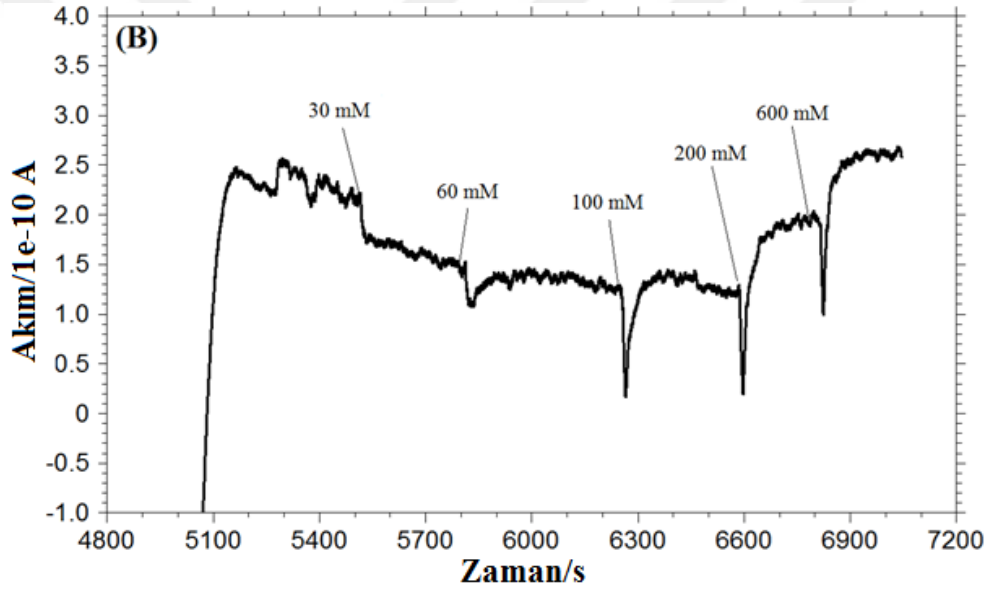
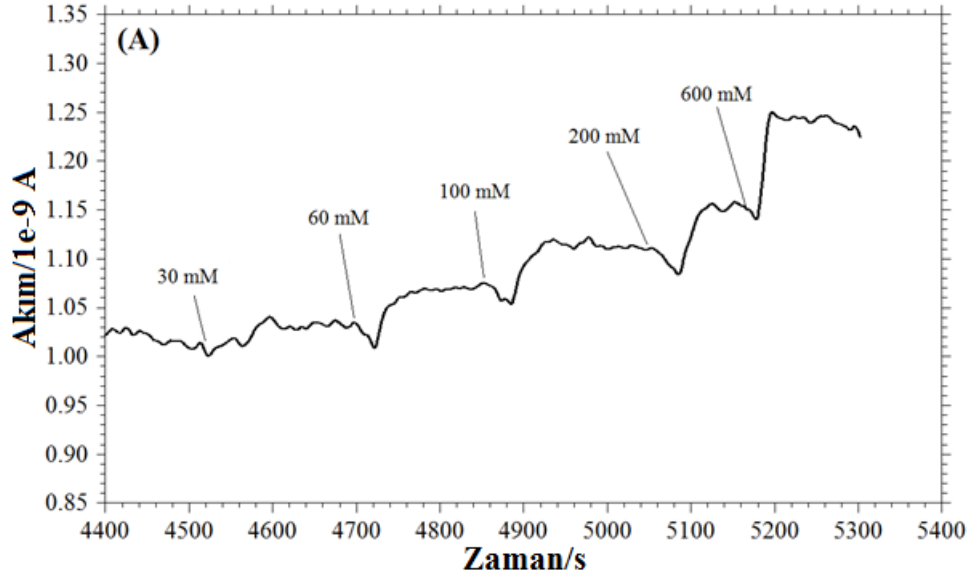


Şekil 3.63 Poli(Py-COOH)/ferrosen (A), Poli(Py-COOH)/*p*-benzokinin (B), Poli(Py-COOH)/Nötral kırmızısı (C) katoduna ait glikoz eklemelerinden elde edilen akım değerleri.

3.8.2 Fabrikasyon Aşamalarının Optimizasyonu

Katot için farklı enzimlerin denenmesi (Enzim seçimi):

Ferrosenle modifiye edilen Polipirol-2-karboksilik asitin elektropolimerizasyonu Bölüm 2.5.3'de anlatıldığı gibi yapıldı. Elektropolimerizasyon ortamında 10 mM ferrosen eklendi. Bölüm 3.8.1'de verilen prosedürle enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan 1. EFC sisteminin katoduna LAC enzimi, 2. EFC sisteminin katoduna ise aynı miktarda LAC yerine BOD enzimi immobilize edildi. LAC katodu içeren 1. EFC sistemi, 10 mL'lik 100 mM, pH 5 sitrat tamponunda, BOD katodu içeren 2. EFC sistemi ise 10 mL'lik 100 mM, pH 7.4 fosfat tamponunda çalıştırıldı. Sistem kurulduktan sonra 1. EFC sistemini anoduna -0.15 V, katoduna +0.3 V potansiyel, 2. EFC sisteminin anoduna -0.15 V, katoduna +0.36 V potansiyel uygulandı. Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı, öncelikle arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamında sırasıyla 30, 60, 100, 200 ve 600 mM glikoz olacak şekilde stok glikoz çözeltilisinden eklemeler yapıldı. Hem anot hem de katot için elde edilen sinyaller cihaz tarafından kaydedildi. (Şekil 3.64). BOD katodunu içeren EFC sisteminden düşük ve gürültülü sinyaller alınmıştır. Bu nedenle uygun katodik enzim olarak LAC seçildi.

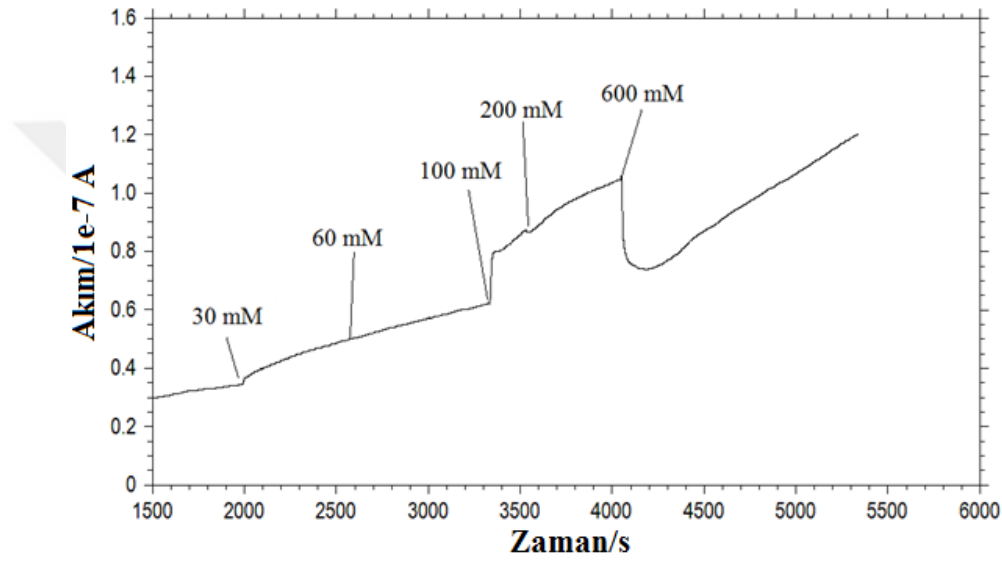


Şekil 3.64 Poli(Py-COOH)/ferrosen polimeriyle hazırlanmış LAC katodunu (A) ve BOD katodunu (B) içeren 2 EFC sisteminin glikoz eklemelerinden üretilen akım sinyalleri.

Elektrot materyali seçimi:

Aynı prosedürle hem altın hem de camı karbon elektrot ile hazırlanan 2 EFC sisteminin performansı incelendi. Bu amaçla elektrot yüzeylerinde ferrosenle modifiye edilen Poli(Py-COOH) kaplanarak yüzey karboksil grupları aktifleştirildi. 2 EFC sisteminin anot tarafına 20 mg/mL GOx enziminden 20 μ L, katot tarafına ise 20 mg/mL LAC enziminden 20 μ L damlatılıp kurutuldu. Cam reaksiyon hücreğine 10 mL, 100 mM, pH 5 sitrat tamponu eklendi. Sistem kurulduktan sonra anoda -0.15 V, katoda ise +0.3 V potansiyel uygulandı.

Potansiyostat, amperometrik akım-zaman programında çalıştırıldı, öncelikle arka akım değerinin dengeye gelmesi beklendi. Akım dengelendikten sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 30, 60, 100, 200 ve 600 mM glikoz eklemeleri yapıldı. Camsı karbon elektrotları içeren EFC sisteminden alınan sinyaller Şekil 3.65’de, altın elektrotları içeren EFC sisteminden alınan sinyaller ise Şekil 3.64A’da verildi. Camsı karbon elektrot kullanılarak hazırlanan EFC sisteminden artan glikoz yüklemeleriyle orantılı akım üretimleri gözlenmedi. Buna karşılık altın elektrodun Poli(Py-COOH)/ferrosen filmi için oldukça uygun olduğu sonucuna varıldı ve bu sistemin artan yakıt eklemelerine karşı orantılı akım değerleri verdiği gözlemlendi.

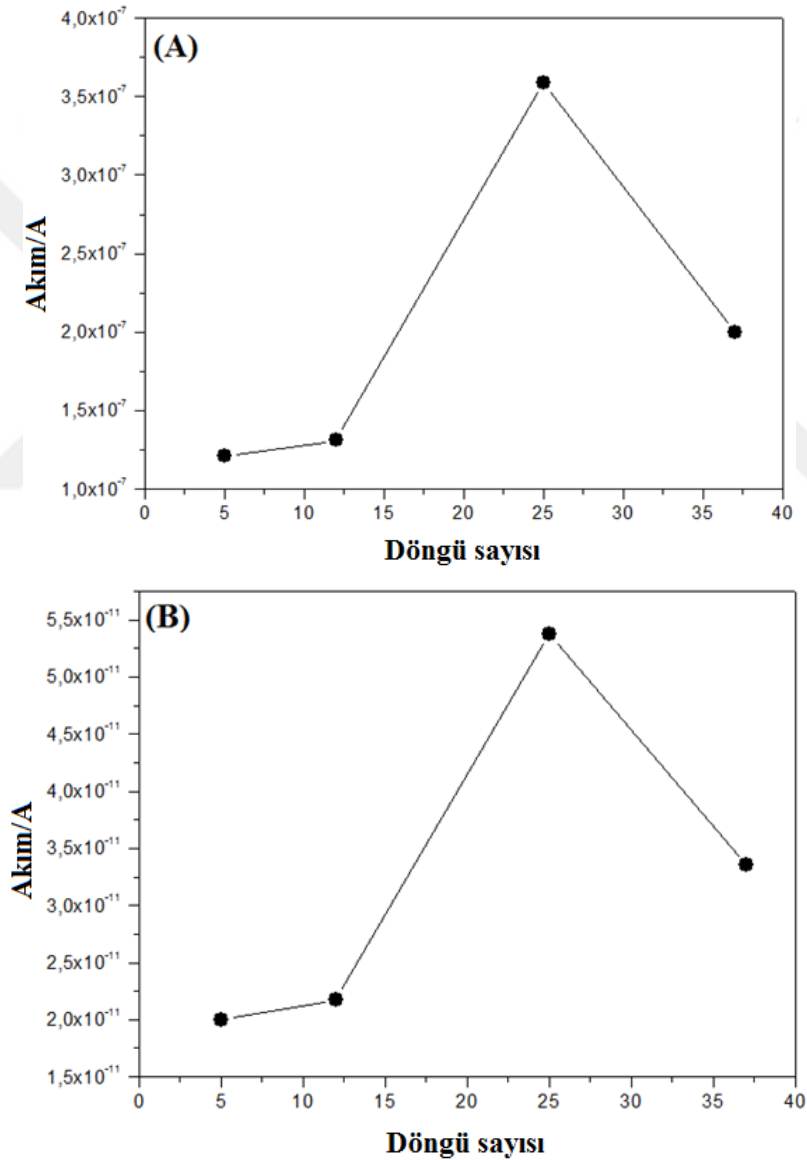


Şekil 3.65 Poli(Py-COOH)/ferrosen polimeriyle hazırlanmış camsı karbon elektrotları içeren EFC sisteminin akım sinyalleri.

Film yoğunluğu deneyleri:

Film yoğunluğu deneyleri için altın elektrot yüzeyinde Poli(Py-COOH)/ferrosen elektropolimerizasyonu dönüşümlü voltametri döngü sayısı yani elektropolimerizasyon süresi değiştirilerek Bölüm 2.5.3’deki gibi yapıldı. Dönüşümlü voltametri döngü sayısı her bir EFC sisteminde sırasıyla 5-12-25 ve 37 döngü olacak şekilde ayarlanarak altın anot ve katot yüzeyleri farklı yoğunluktaki polimerik filmlerle kaplandı. Elektrotlar 2 saat boyunca karbodiimid çözeltisi içinde hafif karıştırma altında bekletildi. Süre sonunda anot ve katot yıkandı ve anot üzerine 20 mg/mL GOx enziminden 20 µL, katot üzerine 20 mg/mL LAC enziminden 20 µL damlatılıp kurutuldu. Elektrotlar saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi ve dörtlü EFC sistemine takıldı. Reaksiyon hücreesine 10 mL 100 mM pH 5 sitrat

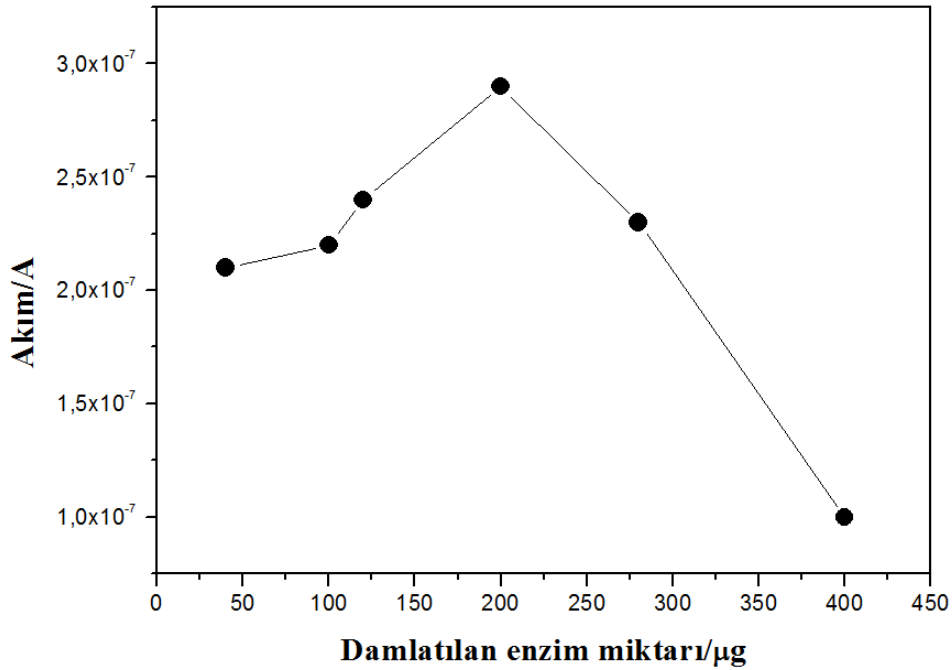
tamponu eklenerek ortam karıştırıldı. Anoda ve katoda sırasıyla -0.15 V ve +0.3 V'luk potansiyel uygulandı (hücre potansiyeli 0.45 V), sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Sistem kararlı hale gelince reaksiyon ortamına 10 mM'lık glikoz eklemesi yapılarak elde edilen akım değeri kaydedildi (Şekil 3.66). Bu deney farklı film yoğunluklarıyla hazırlanan her EFC için tekrarlandı. Şekil 3.66'dan görüldüğü üzere 25 döngü sayısı ile kaplanan anot ve katottan en yüksek akım değeri elde edildi, film yoğunluğu arttıkça akımın düştüğü gözlemlendi. Poli(Py-COOH)/ferrosen filmi ile hazırlanan EFC sistemlerinde optimum film yoğunluğuna 25 döngü sayısında ulaşıldı.



Şekil 3.66 Farklı film kalınlıklarındaki Poli(Py-COOH)/ferrosen filmi ile hazırlanmış EFC sisteminin glikoz eklemelerinden elde edilen anodik (A) ve katodik (B) akım değerleri.

İmmobilize enzim miktarının optimizasyonu:

Aynı film yoğunluğunda ve aynı enzim immobilizasyon metodu kullanılarak oluşturulan çalışma elektrotlarında kullanılan enzim miktarı değiştirilerek, yüzeyde tutulan enzim miktarı optimize edildi. Bu amaçla, altın anot ve katot yüzeyinde 25 döngülük Poli(Py-COOH)/ferrosen filmi elektropolimerizasyonu gerçekleştirildi, daha sonra anot ve katot yüzeyinde sırasıyla 40-100-120-200-280-400 μg enzim olacak şekilde stok enzim çözeltilerinden damlatıldı ve enzim immobilizasyonu için yeterli süre beklendi. Bu şekilde farklı miktarlarda enzim yüklemeleri içeren 6 EFC sistemi dizayn edildi. Reaksiyon hücreesine 10 mL 100 mM pH 5 sitrat tamponu eklenerek ortam karıştırıldı. Anoda ve katoda sırasıyla -0.15 V ve +0.3 V'luk potansiyel uygulandı (hücre potansiyeli 0.45 V), sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. Her enzim miktarında hazırlanan EFC'lerin 10 mM'lık glikoz eklemesine verdiği akım sinyalleri kaydedildi (Şekil 3.67). Sonuçlara göre 200 μg enzim ile hazırlanan çalışma elektrotlarından oluşan EFC sisteminden maksimum akım elde edildi.



Şekil 3.67 Farklı miktarlarda enzim yüklemesine sahip 6 EFC sisteminden glikoz eklemesine karşı elde edilen akım değerleri.

3.8.3 EFC Sisteminin Elektriksel Güç Üretiminin İncelenmesi

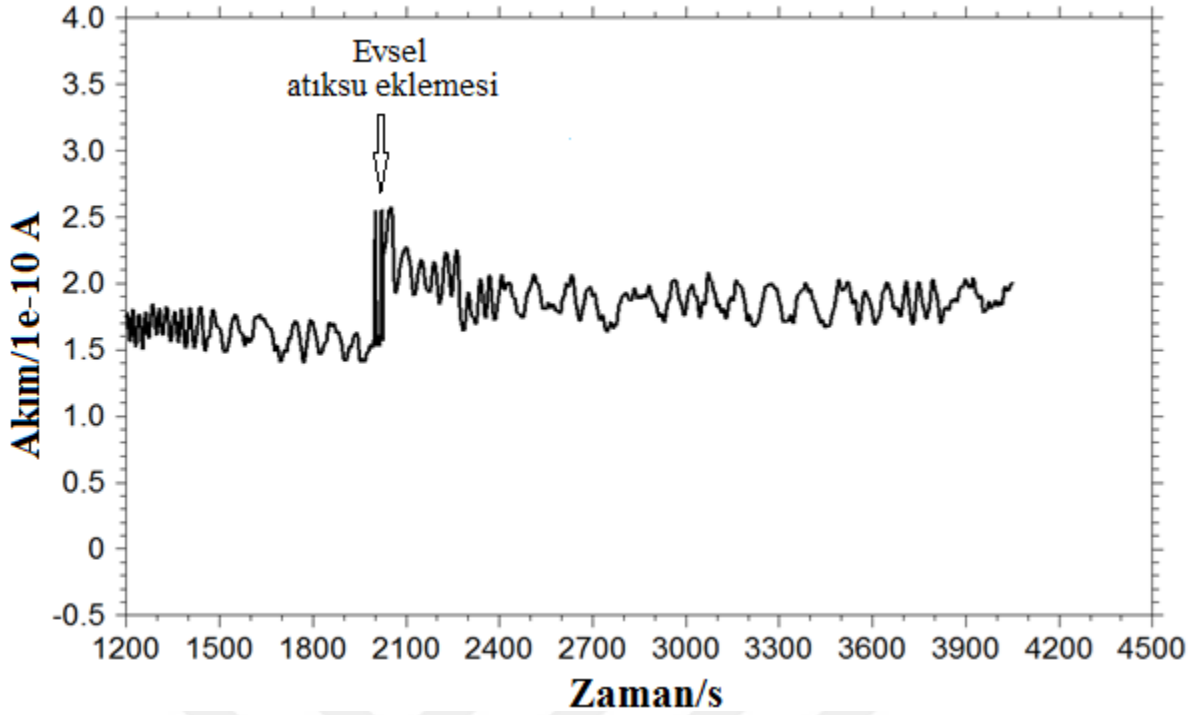
Elde edilen sonuçlara göre maksimum performansta güç üretme kapasitesine sahip EFC sisteminin elektrotları aşağıda şekilde hazırlandı: Poli(Py-COOH)/ferrosen filmin

elektropolimerizasyonu için, 10 mL asetonitril içine konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde Pirel-2-karboksilik asit, konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde tetrabütülamonyum tetrafloroborat (TBAFB) ve 10 mM ferrosen eklenerek bir elektropolimerizasyon ortamı hazırlandı. Altın elektrotlar, bu çözeltiye daldırılarak dönüşümlü voltametri metodunda elektrot yüzeylerinde polimerizasyon sağlandı. Elektropolimerizasyon şartları: tarama hızı 50 mV/s, döngü sayısı 25, uygulanan potansiyel aralığı: 0-1.3 V arasındadır. Polimerle kaplanan elektrotlar, 2,5 mL 20 mM N-hidroksisüksinimid ve 2.5 mL 40 mM N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid karışımından oluşan karbodiimid çözeltisi içinde hafif karıştırma altında 2 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda anot ve katot yıkandı, anot ve katot yüzeyine sırasıyla yüzeyde 200 µg GOx ve 200 µg LAC olacak şekilde enzim çözeltilerinden damlatıldı ve elektrotlar kurutuldu. Elektrotlar saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi ve dörtlü EFC sistemine takıldı. Reaksiyon hücrelerine 10 mL 100 mM pH 5 sitrat tamponu eklenerek ortam karıştırıldı. Anoda -0.15 V, katoda +0.3 V uygulanarak sistem çalıştırıldı ve dengeye gelmesi sağlandı. EFC sistemine 30 mM glikoz yakıt olarak kullanıldığında 0.45 V'luk hücre potansiyeli altında üretilen güç yoğunluğu 100 nW/cm² olarak hesaplandı.

3.8.4 EFC Sisteminde Eysel Atıksudan Elektrik Enerjisi Üretimi

Performansı iyileştirilmeye çalışılan Poli(Py-COOH)/ferrosen film tabanlı EFC sisteminin evsel atıksulardan elektrik enerjisi üretebilme potansiyeli araştırıldı. Bölüm 3.8.3'de verildiği şekilde hazırlanan EFC sistemi, 10 mL pH 5 sitrat tamponuna daldırılıp, 0.45 V'luk hücre potansiyeli altında çalıştırıldı. Sistem dengeye geldikten sonra, önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde ön işlemde geçmiş evsel atıksu numunesinden 500 µL hücreye eklendi. Ekleme sırasında cihazın kaydettiği akım değişimi Şekil 3.68'de gösterilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi hazırlanan EFC sisteminde gürültü problemi gözlemlendi. Gürültü problemi, genel olarak EFC sisteminde sinyal kaybına yol açmakta ve akım değerlerinin düşmesine olanak vermektedir. EFC sisteminden, seyrelmemiş evsel atıksu içeriğindeki glikozun yakıt olarak kullanılmasıyla elde edilen güç yoğunluğu 89 nW/cm² olarak hesaplandı.

Poli(Py-COOH)/ferrosen film ile hazırlanan EFC sisteminde bitkiden enerji üretimi gözlenememiştir.



Şekil 3.68 0.45 V'luk hücre potansiyelinde 500 μ L'lik evsel atıksu eklemesi sonucu EFC'den üretilen akım değeri.

3.9. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

Gerek mikrobiyal gerekse de enzimatik yakıt hücreleri çalışmalarında şimdiye kadar rapor edilen en büyük sıkıntı, hücrelerden elde edilen gücün yetersiz oluşudur. Bu sıkıntının önüne geçebilmek sadece medyatör kullanımıyla mümkün olmamaktadır. Bir EFC sisteminin performansının artırılması için sistemin bel kemiği olan çalışma elektrotlarının fabrikasyon aşamaları ve EFC işletme koşulları aşama aşama incelenerek optimize edilmelidir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, yakıt hücresi performansının iyileştirilmesi amacıyla hücre performansı üzerine büyük etkisi olduğunu düşündüğümüz çalışma elektrodu fabrikasyonu detaylı olarak incelenmemiştir (Ivanov vd. 2011). Bu bakış açısıyla, tez kapsamında çalışma ortamında hali hazırda mevcut ve yenilenebilir glikozu yakıt olarak kullanarak, biyokimyasal reaksiyonlarla kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çeviren ve bu enerjiyi mikro ve mini ölçekli elektronik sistemlerin çalışması için kullandırabilen farklı tiplerdeki yüksek performanslı EFC'ler geliştirildi. Bu amaçla dizayn edilen EFC sistemlerinin elektrot fabrikasyon aşamaları ve işletme koşulları detaylıca optimize edildi.

Özetle, yukarıdaki aşamalar katedilerek geliştirilen EFC'lerde anot ve katoda bağlamak/immobilize etmek suretiyle 2 çeşit enzim kullanıldı, bu enzimleri içeren anot ve

katot arada herhangi bir seçici membran olmadan tek bir kompartımana daldırılarak çalıştırıldı. Bu nedenle, 2 enzimin aynı ortamda çalışabileceği optimum çalışma koşullarının belirlenmesinin sistem performansı üzerine katkısı oldu, çalışılan ortamlarda pH değerinin ve işletme potansiyelinin optimize edilmesi sağlandı. Son olarak, elektrot fabrikasyonları ve işletim şartları optimize edildikten sonra performansı artırılan EFC'lerin öncelikle standart glikoz çözeltilerinde elektrik üretim performansı test edildi, daha sonra EFC'lerin *in vivo* ortama (bitki bünyesine) ve evsel atıksuya daldırılmak suretiyle ürettikleri elektrik akımı ölçülebildi. Bu sayede her bir EFC için güç üretimi hesaplandı. Toplamda tez kapsamında, güç üretim kabiliyetleri geliştirildi, teknik olarak tek bir kompartımanda membran kullanılmadan pratik olarak yenilenebilir enerji kaynaklarını yakıt olarak kullanıp elektrik enerjisine çeviren ve bu enerjinin mikro, mini-ölçekli elektronik sistemlerin çalışması için kullandırılan EFC'lerin dizaynı gerçekleştirilebildi. Elde edilen sonuçların EFC çalışmaları için yol gösterici bir literatür kaynağı olarak katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tez kapsamında, çalışma elektrotlarının fabrikasyon ve işletme koşulları optimize edilerek performansı geliştirilen EFC sistemlerinin ürettiği güç değerleri Çizelge 3.6'da sunulmaktadır. PP-g-PEG tabanlı EFC sistemlerinde, polimer yapısının farklı elektron araçları ile modifikasyonları sonucu farklı elektriksel güç üretimleri sağlanabildi. Örneğin; PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sisteminden 300 mM'lık glikoz eklemelerine karşı 65 nW/cm²'lik güç elde edilirken, altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG tabanlı EFC sisteminden 20 mM gibi daha düşük bir glikoz konsantrasyonundan 23.5 µW/cm²'lik güç üretimi gözlemlendi. Çizelge 3.6'da açıkça görüldüğü üzere, geliştirilen EFC sistemlerinde glikoz konsantrasyonuyla orantılı olarak artan güç üretimleri gerçekleşti. Bu da, altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG tabanlı EFC sisteminden 300 mM'lık glikoz eklemesiyle yaklaşık 350 µW/cm²'lik bir güç üretileceği anlamına gelmektedir. Yani, altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG tabanlı EFC sisteminin, PP-g-PEG/ferrosen tabanlı EFC sistemine göre yaklaşık 5400 kat fazla elektriksel güç üretme kapasitesinin olduğu açıkça söylenebilir. Yine aynı şekilde, Poli(Py-COOH) ve Poli(TAA) polimerlerini içeren farklı modifikasyonlardaki polimerik filmlerle dizayn edilen EFC sistemlerinden de polimer tabanlı benzer olmasına rağmen farklı güç üretimlerinin sağlandığı görüldü. EFC sisteminin performansını artırabilmek için optimizasyon çalışmalarının yanısıra elektrot yüzeyindeki polimer modifikasyonlarının (gerek kopolimerler oluşturularak gerekse de değişik medyatör türlerini kullanarak) oldukça önemli olduğu sonucu çıktı. Çalışma kapsamında dizayn edilen

PP-g-PEG/ferrosen ve Poli(Py-COOH)/ferrosen tabanlı EFC sistemlerinden nanovolt mertebesinde güç üretimleri gözlemlendi.

Genel olarak, tez kapsamında performansı iyileştirilen EFC sistemlerinden literatür sonuçlarıyla kolaylıkla rekabet eden bir güç çıktısı aralığı (65 nW/cm^2 - $23.5 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$) elde edildi. Literatürde, farklı medyatörlerin kullanıldığı EFC sistemlerinde rapor edilen güç aralığı 5 - $10 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'dir (Nazaruk vd. 2008, Tan vd. 2008, Deng vd. 2008). Üstelik bu sistemler, pahalı ve kompleks karbon nanotüp/iyonik sıvı, çok duvarlı karbon nanotüp ve elektriksel olarak üretilmiş polimer yapıları içermektedir. Poroz-silikon üzerine karbon nanotüp biriktirilerek GOx/LAC enzim çiftiyle oluşturulan tek kompartmanlı bir EFC sisteminden 4 mM glikoz eklemesiyle $1.38 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'lik bir güç üretimi (Wang vd. 2009) ve glikoz dehidrogenaz enziminin karbon pastası içine hapsedilerek tutuklanmasıyla elde edilen tek kompartmanlı bir EFC sisteminden 20 mM glikoz eklemesiyle 64 nW/cm^2 'lik bir güç üretimi (Okuda vd. 2007) rapor edilmiştir. Son yıllarda müthiş bir elektron aracı olarak anılan Osmium tabanlı polimerleri içeren EFC sistemleri literatürde yerini almıştır. Osmium materyalini içeren GOx/LAC enzim çiftinin kullanıldığı bir EFC'de 0.24 V 'luk hücre potansiyelinde 700 mM glikoz eklemesiyle 0.11 - $0.17 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ aralığında güç üretimleri rapor edilmiştir (Jenkins vd. 2012). Laktozun yakıt olarak kullanıldığı osmium redoks polimer tabanlı bir EFC'den 34 mM laktoz ilavesinden $1.9 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'lik güç üretilmiştir (Stoica vd. 2009). Ivanov vd. 2010 ferroseni medyatör olarak kullanmış ve GOx/horseradish peroksidaz enzim çiftini içeren EFC sisteminden 1 mM glikoz eklemesiyle $0.15 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'lik güç elde etmiştir. Elektron aracısız/direkt elektron transferiyle işleyen başka bir EFC sisteminden ise 25 mM etanol ilavesiyle $1.5 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'lik güç üretimi rapor edilmiştir (Ramanavicius vd. 2008). Zhaoa vd. 2009, karbon nanotüp-hidroksiapatit nanokompozit tabanlı yeni bir EFC dizayn etmiş ve sistemden 0.28 V 'luk hücre potansiyelinde $15.8 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 'lik güç değeri üretmiştir. Yine tek kompartmanlı GOx/LAC enzim çiftini içeren monoolein kübik fazın immobilizasyon matriksi olarak kullanıldığı ve farklı medyatörlerin test edildiği (ABTS, tetrathiafulvalene, metilen mavisi ve ferrosen karboksilik asit) başka bir çalışmada, 0.125 V 'luk hücre potansiyelinde ulaşılabilen maksimum güç yoğunluğunun tetrathiafulvalene kullanıldığında $7 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$, metilen mavisi kullanıldığında $4.18 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ (0.25 V) ve ferrosen karboksilik asit kullanıldığında ise $1.12 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ (0.20 V) olduğu belirtilmiştir (Nazaruk vd. 2008). 1,1'-ferrosen dikarboksilik asitin medyatör olarak kullanıldığı ve GOx/BOD enzim çiftini içeren bir EFC'de 0.25 V 'luk hücre potansiyelinde maksimum güç yoğunluğunun $13 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ olduğu raporlanmıştır (Shim vd. 2011). Yüksek poroziteye sahip altın elektrotların,

tek duvarlı karbon nanotüplerin ve altın nanopartikül/tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane medyatörlerini barındıran EFC sistemlerinde sırasıyla $6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $9.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ve $0.55 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ güç üretimleri rapor edilmiştir (Du Toit and Di Lorenzo 2014, Yan vd. 2006, Falk vd. 2013). Kıyaslamalardan anlaşıldığı üzere tez kapsamında performansı geliştirilen EFC'lerin güç çıktılarının yüksek olduğu anlaşılmakta ve çalışmamızın amacına ulaştığı görülmektedir.

Evsel atıksudan enerji üretimi kısmında en yüksek güç üretimi altın ve kobalt oksit nanopartiküler içeren PP-g-PEG tabanlı EFC sisteminden sağlandı ($16 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Literatürde şimdiye kadar, enzim tabanlı bir biyolojik yakıt hücresi kullanılarak herhangi bir atıksu içeriğinde bulunan organik maddelerden enerji üretilmemiştir. Atıksudaki organik içerikten enerji üretebilen mikrobiyal yakıt hücresi sistemleri üzerine çalışmalar yapılmış, üstelik bu çalışmaların sayısının da oldukça az olduğu bilinmektedir. Gangrekar and Shinde (2007), organik içerikli sentetik bir atıksudan $0.13 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'lik güç üretmiştir. Başka bir çalışma grubu, bir mikrobiyal yakıt hücresi kullanarak mandıra atıksularını enerji kaynağı olarak değerlendirmiş ve $0.034 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 'lik güç üretimi rapor etmiştir (Yokoyama vd. 2006). Çok çeşitli mikrobiyal yakıt hücreleri kullanılarak evsel atıksulardan enerji üretildiği başka bir çalışmada maksimum güç üretiminin $2.4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ olduğu rapor edilmiştir (Liu vd. 2004). Literatür çalışmalarına bakıldığında tez kapsamında ilk kez bir EFC'nin evsel atıksuda işletilerek, üstelik bu alanda yayınlanmış çalışmalara kıyasla yüksek güç ürettiği anlaşılmıştır. Çalışma kapsamında atıksular, EFC ortamına eklenirken yaklaşık 20 kat kadar seyrelti, bu sayede başka maddelerden ortaya çıkabilecek girişimin önüne geçilebildi. Bununla beraber GOx enziminin özellikle glikoza spesifikliği yüksek olduğundan ve sadece glikoz ile enzim-substrat kompleksi oluşturduğundan, enzimin oldukça seyreltik glikozu algılamasında bir problem yaşanılmamış, ortamda bulunması muhtemel glikozdan çok düşük karbon seviyesine sahip uçucu yağ asitleri ve alkoller gibi diğer maddelerin enzimin kendi substratıyla rekabet etme şansı da oldukça düşük kalmıştır.

Çizelge 3.6 Geliştirilen EFC sistemlerinin elektriksel güç değerleri.

EFC Sisteminde Kullanılan Polimerik Film	Standart Glikozdan Üretilen Güç-Eklenen Glikoz Kons.	Atıksudan Üretilen Güç	Bitkiden Üretilen Güç	Hücre Potansiyeli
PP-g-PEG/ferrosen	65 nW/cm ² - 300 mM	-	-	0.56 V
Altın ve kobalt oksit nanopartiküller içeren PP-g-PEG	23.5 µW/cm ² - 20 mM	16 µW/cm ²	1.3 µW/cm ²	0.56 V
PP-g-Im	5 µW/cm ² - 15 mM 1.7 µW/cm ² - 5 mM	460 nW/cm ²	-	0.56 V
Poli(TAA-co-MT)/ferrosen	1 µW/cm ² - 10 mM 0.4 µW/cm ² - 5 mM	4 µW/cm ²	-	0.56 V
Poli(Py-COOH-co-TAA)/ <i>p</i> -benzokinon	18.8 µW/cm ² - 30 mM 3.8 µW/cm ² - 10 mM	3.3 µW/cm ²	10 nW/cm ²	0.94 V
PSIS-COOH/Grafen	20 µW /cm ² - 30 mM 3.7 µW /cm ² - 5 mM	-	14 nW/cm ²	0.72 V
Poli(Py-COOH)/ferrosen	100 nW/cm ² - 30 mM	89 nW/cm ²	-	0.45 V

Literatürde biyoyakıt hücreleri üzerine yapılan çalışmalarının çoğunda anot ve katot farklı kompartmanlarda çalıştırılmış ve yakıt dışarıdan ortama ilave edilmiştir. İki farklı kompartman, bir yakıt hücresinin *in vivo* ortamlarda (canlı dokularda) kullanımına olanak sağlamamaktadır. Rapor edilen daha az sayıdaki tek kompartımanlı biyoyakıt hücrelerinde ise, tartışma kısımlarında yetersiz güç üretiminden bahsedilmiştir. Söz konusu çalışmalarda elektrot fabrikasyon aşamaları için detaylı çalışmalar yapılmadığından, fabrike edilen çalışma elektrotları performans açısından iyileştirilememiştir. Tez kapsamında farklı tipte çok sayıda çalışma elektrodu, fabrikasyon basamakları optimize edilerek tasarlandı ve maksimum kapasitede güç üretebilen EFC sistemleri geliştirildi. Geliştirilen EFC'ler tek kompartmanda işletilerek *in vivo* ve doğal ortamlarda bulunan yenilenebilir yakıt içeriklerinin kullanımına olanak sağlayabilmiştir. Tez kapsamında elektrot yüzeyindeki elektron akışını hızlandırmaya yönelik tüm önemli parametrelerin tek tek optimize edilmesiyle, kullanılan polimerik filmlerin orijinal olmasıyla, polimer/kopolimer modifikasyonlarıyla, bazı medyatörlerin polimerik film yapısına katılmasıyla ve geliştirilen EFC sistemlerinin çoğunun yenilenebilir yakıt içeren ortamlarda kullanılabilmesiyle elde ettiğimiz EFC sistemleri, literatürdeki diğer

biyoyakıt hücreleri ile kolaylıkla rekabet edebilmiştir. Aynı zamanda çalışma sonuçları, yüksek performanslı bir EFC dizaynında en çok dikkat edilmesi gereken parametreler hususunda literatüre ciddi katkılar sağlamış, *in vivo* ve özellikle atıksu uygulaması EFC literatüründe bir ilk olmuştur. Performansı geliştirilmiş bu EFC sistemleriyle, mini-mikro ölçekli minyatür cihazları çalıştırabilecek güçte enerji üretilebilmiştir.

Tezde, temel bilimler ve mühendislik disiplininin bir arada kullanılmasıyla uygulama ve ticarileşme potansiyeli yüksek EFC sistemleri dizayn edilmiştir. İleriki çalışmalar için yine elektronik ve bilgisayar mühendisliği ile beraber takım çalışmasıyla, tez kapsamında dizayn edilen EFC sistemleri minyatürize edilip kompakt bir hale getirilebilir, çalışma elektrotları çiplere dönüştürülerek bu sayede hem pratik kullanım/işletme sağlanabilir hem de dizayn edilen sistemler ticarileştirilebilir. Tez kapsamındaki sonuçlardan 6 adet SCI makalemiz yayınlanmış bulunmaktadır. Bunun yanında 3 uluslararası kongreye katılım gerçekleştirilerek 3 adet sözlü bildiri, 1 adet poster ve 1 ulusal kongreye katılarak 1 adet sözlü bildiri kongre kitapçıklarında yayınlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Aklaya L, Behçet R ve İlkılıç C** (2008) Yakıt Pilleri ve Uygulama Alanları. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 67-71.
- Allı A and Hazer B** (2008) Poly(N-Isopropylacrylamide) Thermoresponsive Cross-Linked Conjugates Containing Polymeric Soybean Oil and/or Polypropylene Glycol. *Eur. Polym. J.*, 44: 1701-1713.
- Ataman S** (2010) İnorganik Nanoparçacıklar İçeren Polimer Kompozitlerinin Hazırlanması ve İnce Yapı Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Zonguldak, 80 s.
- Atanassov P, Apblett C, Banta S, Brozik S, Barton S C, Cooney M, Liaw B Y, Mukerjee S and Minter S D** (2007) Enzymatic biofuel cells. *Electrochem. Soc. Interface*, 16: 28-31.
- Balcı M, Allı A, Hazer B, Güven O, Cavicchi K and Cakmak M** (2010) Synthesis and Characterization of Novel Comb-type Amphiphilic Graft Copolymers Containing Polypropylene and Polyethylene Glycol. *Polym. Bull.*, 64: 691-705.
- Banerjee S, Paira T K and Mandal T K** (2014) Surface Confined Atom Transfer Radical Polymerization: Access to Custom Library of Polymer-Based Hybrid Materials for Speciality Applications. *Polymer Chemistry*, 5: 4153-4167.
- Bardea A, Katz E, Bueckmann A F and Willner I** (1997) NAD⁺ Dependent Enzyme Electrodes: Electrical Contact of Cofactor-Dependent Enzymes and Electrodes. *J Am. Chem. Soc.*, 119: 9114-9119.
- Barnes D, Martinot E, McCrone A, Roussel J, Sawin J L, Sims R and Sonntag-O'Brien V** (2010) Renewables 2010 Global Status Report: Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, Paris.
- Barton S C** (2009) Enzyme Catalysis in Biological Fuel Cells. *Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology, Applications*, Vielstich W (Ed.), Yokokawa H (Ed.), Gasteiger, H A (Ed.), ISBN: 9780470974001, John Wiley & Sons, Ltd.
- Barton S C, Gallaway J and Atanassov P** (2004) Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chem. Rev.*, 104: 4867-4886.
- Brunel L, Denele J, Servat K, Kokoh K B, Jolivalt C, Innocent C, Cretin M, Rolland M and Tingry S** (2007) Oxygen Transport Through Laccase Biocathodes for A Membrane-Less Glucose/O₂ Biofuel Cell. *Electrochemistry Communications*, 9: 331-336.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bullen R A, Arnot T C, Lakeman J B and Walsh F C** (2006) Biofuel Cells and Their Development. *Biosens. Bioelectron.*, 21: 2015-2045.
- Büyüknohutçu C** (2009) Glukoz Oksidaz Tabanlı Biyoyakıt Pili Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 121 s.
- Chen T, Barton S C, Binyamin G, Gao Z, Zhang Y, Kim H H and Heller A** (2001) A Miniature Biofuel Cell. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 8630-8631.
- Ciszewski A and Stepniak I** (2013) Nanoparticles of Ni(OH)₂ Embedded in Chitosan Membrane As Electrocatalyst for Non-Enzymatic Oxidation. *Electrochim. Acta*, 111: 185-191.
- Coman V, Vaz-Domínguez C, Ludwig R, Harreither W, Haltrich D, Delacey A, Ruzgas T, Gorton L and Shleev S** (2008) A Membrane-, Mediator-, Cofactor-Less Glucose/Oxygen Biofuel Cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10: 6093-6096.
- Cosnier S, Shan D and Ding S** (2010) An Easy Compartment-Less Biofuel Cell Construction Based on The Physical Co-Inclusion of Enzyme and Mediator Redox Within Pressed Graphite Discs. *Electrochemistry Communications*, 12: 266-269.
- Deng L, Shang L, Wang Y, Wang T, Chen H and Dong S** (2008) Multilayer Structured Carbon Nanotubes/Poly-L-Lysine/Laccase Composite Cathode for Glucose/O₂ Biofuel Cell. *Electrochemistry Communications*, 10: 1012-1015.
- Dhara K, Stanley J, Ramachandran T, Nair B G and Babu T G S** (2014) Pt-CuO Nanoparticles Decorated Reduced Graphene Oxide for The Fabrication of Highly Sensitive Non-Enzymatic Disposable Glucose Sensor. *Sensors and Actuators B*, 195: 197-205.
- Dolaştır F** (2009) Polimer Malzemelerin Elektriksel Dirençlerinin ve Optik Geçirgenliklerinin Ölçülmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Edirne, 98 s.
- Du Toit H and Di Lorenzo M** (2014) Glucose Oxidase Directly Immobilized onto Highly Porous Gold Electrodes for Sensing and Fuel Cell Applications. *Electrochimica Acta*, 138: 86-92.
- Falk M, Andoralov V, Silow M, Toscano M D and Shleev S** (2013) Miniature Biofuel Cell As A Potential Power Source for Glucose-Sensing Contact Lenses. *Anal. Chem.*, 85: 6342-6348.
- Flexer F and Mano N** (2010) From Dynamic Measurements of Photosynthesis in A Living Plant to Sunlight Transformation into Electricity. *Anal. Chem.*, 82: 1444-1449.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gezginci M, Uysal Y, Kılıç A ve Çınar Ö** (2011) Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Ekstraselüler Elektron Transferleri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4: 81-85.
- Ghangrekar M M and Shinde V B** (2007) Performance of Membrane-Less Microbial Fuel Cell Treating Wastewater and Effect of Electrode Distance and Area on Electricity Production. *Bioresource Technology*, 98: 2879-2885.
- Guo W, Pi Y, Songa H, Tanga W and Suna J** (2012) Layer-by-Layer Assembled Gold Nanoparticles Modified Anode and Its Application in Microbial Fuel Cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 415: 105-111.
- Gupta G, Lau C, Branch B, Rajendran V, Ivnitski D and Atanassov P** (2011) Direct Bioelectrocatalysis by Multi-copper Oxidases: Gas-diffusion Laccase-catalyzed Cathodes for Biofuel Cells. *Electrochimica Acta*, 56: 10767-10771.
- Hatunoğlu E E** (2010) Biyoyakıt Politikalarının Tarım Sektörüne Etkileri. DPT, Ankara.
- Hazer B** (1995) Grafting on Polybutadiene with Macro or Macromonomer Initiator Containing Poly(Ethylene Glycol) Units. *Macromol. Chem. Phys.*, 196: 1945-1952.
- Hazer B** (2015) Simple Synthesis of Amphiphilic Poly(3-hydroxy alkanooate)s with Pendant Hydroxyl and Carboxylic Groups via Thiol-ene Photo Click Reactions. *Polym. Degr. Stab.*, 119: 159-166.
- Ivanov I, Vidakovic-Koch T and Sundmacher K** (2008) The Influence of A Self-Assembled Monolayer on Gold Activity for Glucose Oxidation. *Electrochem. Commun.*, 10: 1307-1310.
- Ivanov I, Vidakovic-Koch T and Sundmacher K** (2010) Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling. *Energies*, 3: 803-846.
- Ivanov I, Vidakovic-Koch T and Sundmacher K** (2011) Direct Hybrid Glucose–Oxygen Enzymatic Fuel Cell Based on Tetrathiafulvalene–Tetracyanoquinodimethane Charge Transfer Complex As Anodic Mediator. *Journal of Power Sources*, 196: 9260-9269.
- Jenkins P, Tuurala S, Vaari A, Valkiainen M, Smolander M and Leech D** (2012) A Comparison of Glucose Oxidase and Aldose Dehydrogenase As Mediated Anodes in Printed Glucose/Oxygen Enzymatic Fuel Cells Using ABTS/Laccase Cathodes. *Bioelectrochem.*, 87: 172-177.
- Kalaycı Ö A, Cömert F B, Hazer B, Atalay T, Cavicchi K A and Cakmak M** (2010) Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Metal Nanoparticles Embedded into Amphiphilic Comb-Type Graft Copolymers. *Polym. Bull.*, 65: 215-226.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kamitaka Y, Tsujimura S, Setoyama N, Kajino T and Kano K** (2007) Fructose/Dioxygen Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9: 1793-1801.
- Kang C, Shin H, Zhang Y and Heller A** (2004) Deactivation of Bilirubin Oxidase by A Product of The Reaction of Urate and O₂. *Bioelectrochemistry*, 65: 83-88.
- Kashyap D, Kim C, Kim S Y, Kim Y H, Kim G M, Dwivedi P K, Sharma A and Goel S** (2015) Multi Walled Carbon Nanotube and Polyaniline Coated Pencil Graphite Based Bio-Cathode for Enzymatic Biofuel Cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40: 9515-9522.
- Katz E and Willner I** (2003b) Biofuel Cells Based on Monolayer-Functionalized Biocatalytic Electrodes. *Advanced Macromolecular and Supramolecular Materials and Processes*, Geckeler K E (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Katz E and Willner I** (2003c). A Biofuel Cell With Electrochemically Switchable and Tunable Power Output. *J Am. Chem. Soc.*, 125: 6803-6813.
- Katz E, Bueckmann A F and Willner I** (2001) Self-Powered Enzyme-Based Biosensors. *J Am. Chem. Soc.*, 123: 10752-10753.
- Katz E, Filanovsky B and Willner I** (1999a) A Biofuel Cell Based on Two Immiscible Solvents and Glucose Oxidase and Microperoxidase-11 Monolayer-Functionalized Electrodes. *New J Chem.*, 23: 481-487.
- Katz E, Heleg-Shabtai V, Bardea A, Willner I, Rau H K and Haehnel W** (1998) Fully Integrated Biocatalytic Electrodes Based on Bioaffinity Interactions. *Biosens. Bioelectron.*, 13: 741-756.
- Katz E, Shipway N A and Willner I** (2003a) Biochemical fuel cells. *Handbook of Fuel Cells Fundamentals, Technology, Applications*, Vielstich W (Ed.), Lamm A (Ed.), Gasteiger, H A (Ed.), ISBN: 9780470974001, John Wiley & Sons, Ltd.
- Katz E, Willner I and Kotlyar A B** (1999b) A Non-Compartmentalized Glucose-O₂ Biofuel Cell by Bioengineered Electrode Surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, 479: 64-68.
- Kılıçay E, Hazer B, Çoban B and Scholz C** (2010) Synthesis and Characterization of the Poly(ethylene glycol) Grafted Unsaturated Microbial Polyesters. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 38: 9-17.
- Korkut S, Keskinler B and Erhan E** (2008) An Amperometric Biosensor Based on Multiwalled Carbonnanotube-Poly(Pyrrole)-Horseradish Peroxidase Nanobiocomposite Film for Determination of Phenol Derivatives. *Talanta*, 76: 1147-1152.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Krikstolaityte V** (2014) Design and Characterisation of The Electrodes of Enzymatic Biofuel Cells. *Doktora Tezi*, Vilnius University, Faculty of Chemistry, Department of Physical Chemistry, Vilnius, 186 s.
- Kunga C W, Chenga Y H and Hoa K C** (2014) Single Layer of Nickel Hydroxide Nanoparticles Covered on A Porous Nifoam and Its Application for Highly Sensitive Non-Enzymatic Glucose Sensor. *Sensors and Actuators B*, 204: 159-166.
- Larminie J and Dicks A** (2003) *Fuel Cell Systems Explained*. 2nd Edition, ISBN: 978-0-470-84857-9, John Wiley & Sons, Ltd., Chicester, 428 s.
- Laviron E** (1979) The Use of Linear Potential Sweep Voltammetry and of A.C. Voltammetry for The Study of The Surface Electrochemical Reaction of Strongly Adsorbed Systems and Of Redox Modified Electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 100: 263-270.
- Li X, Yao J, Liu F, He H, Zhou M, Mao N, Xiao P and Zhang Y** (2013) Nickel/Copper Nanoparticles Modified TiO₂ Nanotubes for Non-Enzymatic Glucose Biosensors. *Sensors and Actuators B*, 181: 501-508.
- Liu C, Alwarappan S, Chen Z, Kong X and Li C** (2010) Membraneless Enzymatic Biofuel Cells Based on Graphene Nanosheets. *Biosens. Bioelectron.*, 25: 1829-1833.
- Liu H and Logan B E** (2004) Electricity Generation Using An Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in The Presence and Absence of A Proton Exchange Membrane. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 4040-4046.
- Mano N, Mao F and Heller A** (2003a) Characteristics of A Miniature Compartment-Less Glucose-O₂ Biofuel Cell and Its Operation in A Living Plant. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 6588-6594.
- Mano N, Mao F and Heller A** (2005) On The Parameters Affecting The Characteristics of The “Wired” Glucose Oxidase Anode. *J. Electroanal. Chem.*, 574: 347-357.
- Mano N, Mao F, Shin W, Chen T and Heller A** (2003b) A Miniature Biofuel Cell Operating at 0.78 V. *Chem. Commun.*, 7: 518-519.
- Merkoçi A, Pumera M, Llopis X, Perez B, Valle M D and Alegret S** (2005) New Materials for Electrochemical Sensing VI: Carbon Nanotubes. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 826-838.
- Merle G, Habrioux A, Servat K, Rolland M, Innocent C, Kokoh K B and Tingry S** (2009) Long-term Activity of Covalent Grafted Biocatalysts During Intermittent Use of A Glucose/O₂ Biofuel Cell. *Electrochim. Acta*, 54: 2998-3003.
- Minteer S D, Akers N L and Moore C M** (2004) Enzyme Immobilization for Use in Biofuel Cells And Sensors. *U.S. Pat.*, Application Publication, US 200410174.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Nazaruk E, Smolinski S, Swatko-Ossor M, Ginalska G, Fiedurek J, Rogalski J and Bilewicz R** (2008) Enzymatic Biofuel Cell Based on Electrodes Modified With Lipid Liquid-Crystalline Cubic Phases. *J. Power Sources*, 183: 533-538.
- Okuda J, Yamazaki T, Fukasawa M, Kakehi N and Sode K** (2007) The Application of Engineered Glucose Dehydrogenase To A Direct Electron-Transfer-Type Continuous Glucose Monitoring System and A Compartmentless Biofuel Cell. *Chemical Biosensors*, 40: 431-440.
- Osman M H, Shah A A and Walsh F C** (2011) Recent Progress and Continuing Challenges In BioFuel Cells. Part I: Enzymatic Cells. *Biosens. Bioelectron.*, 26: 3087-3102.
- Özöner Ş** (2010) Horseradish Peroxidase Enzimi Kullanılarak Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Gebze, 219 s.
- Pas L** (2007) Alternative Energy: Enzyme-based Biofuel Cells. *Basic Biotechnology eJournal*, 3: 93-97.
- Pizzariello A, Stredansky M and Miertus S** (2002) A Glucose/Hydrogen Peroxide Biofuel Cell Based on A Solid Binding Matrix. *Bioelectrochemistry*, 56: 99-105.
- Pocker Y and Edmond G** (1973) Hydrolysis of D-gluconolactone 1. General Acid-Base Catalysis, Solvent Deuterium Isotope Effects, and Transition State Characterization. *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 113-119.
- Ramanavicius A, Kausaitė A and Ramanaviciene A** (2005) Biofuel Cell Based on Direct Bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.*, 20: 1962-1967.
- Rasmussen M, Abdellaoui S and Minter S D** (2015) Enzymatic Biofuel Cells: 30 Years of Critical Advancements. *Biosens. Bioelectron.* DOI: 10.1016/j.bios.2015.06.029.
- Saçak M** (2004) *Polimer Kimyası*.2. Baskı, ISBN: 975-8640-27-5, Gazi Kitabevi, Ankara, 525 s.
- Shao M** (2012) Design of Efficient Electron Transfer Pathways for Enzymatic Biofuel Cell Anodes. *Doktora Tezi*, Ruhr University, Natural Sciences to the Faculty of Chemistry and Biochemistry, Bochum, 170 s.
- Shim J, Kim G Y and Moon S H** (2011) Covalent Co-Immobilization of Glucose Oxidase and Ferrocenedicarboxylic Acid for An Enzymatic Biofuel Cell. *J. Electroanal. Chem.*, 653: 14-20.
- Shukla A K, Suresh P, Berchmans S and Rajendran A** (2004) Biological Fuel Cells and Their Applications. *Curr. Sci.*, 87: 455-468.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Solomons T W G and Fryhle C B** (2000) *Organik Kimya*, 7. Basım, ISBN: 975-8431-87-0, Literatür Yayıncılık, İstanbul, 1258 s.
- Soukharev V, Mano N and Heller A** (2004) A Four-Electron O₂-Electroreduction Biocatalyst Superior To Platinum and A Biofuel Cell Operating at 0.88 V. *J Am. Chem. Soc.*, 126: 8368-8369.
- Stoica L, Dimcheva N, Ackermann Y, Karnicka K, Guschin D A, Kulesza P J, Rogalski J, Haltrich D, Ludwig R, Gorton L and Schuhmann W** (2009) Membrane-less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode)/Laccase (Cathode) Wired Via Specific Os-Redox Polymers. *Fuel Cells*, 9: 53-62.
- Şanal T, Oruç O, Öztürk T and Hazer B** (2015) Synthesis of pH- and Thermo-responsive Poly(ε-Caprolactone-b-4-vinyl benzyl-g-dimethyl amino ethyl methacrylate) Brush Graft Copolymers via RAFT Polymerization. *J. Polym. Res.*, 22: 1-12.
- Tan Y, Xie Q, Huang J, Duan W, Ma M and Yao S** (2008) Study on Glucose Biofuel Cells Using An Electrochemical Noise Device. *Electroanalysis*, 20: 1599-1606.
- Tsujimura S, Kano K and Ikeda T** (2002) Glucose/O₂ Biofuel Cell Operating at Physiological Conditions. *Electrochemistry*, 70: 940-942.
- Wang S C, Yang F, Silva M and Zarow A** (2009) Membrane-less and Mediator-Free Enzymatic Biofuel Cell Using Carbon Nanotube/Porous Silicon Electrodes. *Electrochem. Commun.*, 11: 34-37.
- Wang Z, Xin L, Zhao X, Qiu Y, Zhang Z, Baturina O A and Li W** (2014) Carbon Supported Ag Nanoparticles With Different Particle Size As Cathode Catalysts for Anion Exchange Membrane Direct Glycerol Fuel Cells. *Renewable Energy*, 62: 556-562.
- Willner I, Arad G and Katz E** (1998) A Biofuel Cell Based On Pyrroloquinoline Quinone And Microperoxidase-11 Monolayer-Functionalized Electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 44: 209-214.
- Xu S** (2014) Development of Direct Electron Transfer (Det)-Based Enzymatic Biofuel Cells. *Doktora Tezi*, The University of Utah, Department of Chemistry, Salt Lake City, 141 s.
- Yakovleva M, Buzas O, Matsumura H, Samejima M, Igarashi K, Larsson P O, Gorton L and Danielsson B** (2012) A Novel Combined Thermometric and Amperometric Biosensor for Lactose Determination Based on Immobilised Cellobiose Dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.*, 31: 251-256.
- Yan Y, Zheng W, Su L and Mao L** (2006) Carbon-Nanotube-Based Glucose/O₂ Biofuel Cells. *Adv. Mater.*, 18: 2639-2643.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Yang X Y, Tian G, Jiang N and Su B L** (2012) Immobilization Technology: A Sustainable Solution for Biofuel Cell Design. *Energy Environ. Sci.*, 5: 5540-5563.
- Yıldızbilir F** (2006) Yakıt Pili ile Elektrik Enerjisi Üretimi. *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Eğitimi Anabilim Dalı, Elazığ, 57 s.
- Yokoyama H, Ohmori H, Ishida M, Waki M and Tanaka Y** (2006) Treatment of Cow-Waste Slurry by A Microbial Fuel Cell and The Properties of The Treated Slurry As A Liquid Manure. *Anim. Sci. J.*, 77: 634-638.
- Yuan M, Liu A, Zhao M, Dong W, Zhao T, Wang J and Tang W** (2014) Bimetallic PdCu Nanoparticle Decorated Three-Dimensional Graphene Hydrogel for Non-Enzymatic Amperometric Glucose Sensor. *Sensors and Actuators B*, 190: 707-714.
- Zayats M, Katz E, Baron R and Willner I** (2005) Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields An Electrically Contacted Biocatalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 12400-12406.
- Zeng M, Zhang X and Chenze Q** (2011) Microporous Composites Prepared by Coagulation of A CS/PEG Solution in NaOH. *International Journal of Polymeric Materials*, 60: 213-222.
- Zhaoa H Y, Zhoua H M, Zhanga J X, Zhenga W and Zhenga Y F** (2009) Carbon Nanotube-Hydroxyapatite Nanocomposite: A Novel Platform for Glucose/O₂ Biofuel Cell. *Biosens. Bioelectron.*, 25: 463-468.

ÖZGEÇMİŞ

M. Samet KILIÇ, 1986 yılında Zonguldak ilinde doğdu. İlk ve orta öğretimini aynı şehirde tamamladı. 2004 yılında Zonguldak Uzun Mehmet Lisesi'nden mezun olduktan bir sene sonra Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2010 yılında BEÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaya hak kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında aynı bölümde doktora eğitimine başladı.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Karaelmas Mah. Babadağ Sok. NO: 2 D: 4 67100 Merkez/Zonguldak

Tel: (+90) 544 743 56 72

E-posta: sametkilig_4274@hotmail.com