

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ETKİN BİYO-ANOT VE BİYO-KATOT
ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT TUTUM

ARALIK 2012

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

MURAT TUTUM tarafından hazırlanan **ETKİN BİYO-ANOT VE BİYO-KATOT ELEKTROTLARIN GELİŞTİRİLMESİ** başlıklı tezinin, 21/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof Dr. Gül Asiye AYÇIK * (**Jüri Başkanı**)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

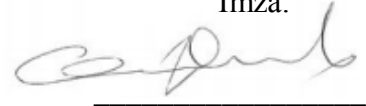
Doç. Dr. Ülkü ANIK ** (**Danışman**)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

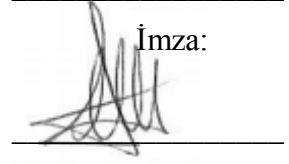
Yrd. Doç. Dr. Aydan GÜLSU (**Üye**)

Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

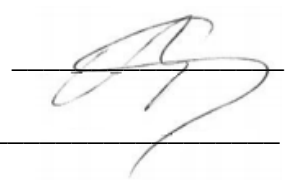
İmza:



İmza:



İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

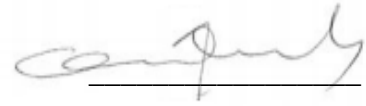
Prof Dr. Gül Asiye AYÇIK

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

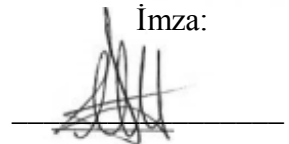
Doç. Dr. Ülkü ANIK

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



İmza:



Savunma Tarihi: 21/12/2012

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

Murat TUTUM

21/12/2012

(İmza)

ÖZET
ETKİN BİYO-ANOT VE BİYO-KATOT ELEKTROTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ

Murat TUTUM

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ülkü ANIK

Aralık 2012, 156 sayfa

Bu çalışmada biyo-anot elektrot, camımsı karbon pasta elektrodun (GCPE) glikoz oksidaz (GOx) ve farklı nanoyapılarla modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Enzim redoks merkezi ile elektrot arasında elektron transferi için p-benzokinon medyatörü, substrat olarak glikoz analiti kullanılmıştır. Farklı nanopartiküllerle modifiye edilen biyo-anot elektrotlara ilişkin substrat miktarı, medyatör derişimi, enzim miktarı, sıcaklık ve pH gibi çalışma parametreleri voltammetrik yöntemlerle optimize edilmiştir. Biyo-katod elektrot olarak ise farklı nanoyapılar ile modifiye GCPE'lar denenmiş ve lakkaz (Lac) modifiye GCPE seçilmiştir. Bu elektroda ilişkin enzim miktarı ve pH gibi çalışma parametreleri optimize edilmiştir. Daha sonra nanoyapı modifiye biyo-anot elektrotlar ile Lac modifiye yalın biyo-katod elektrot birleştirilerek tek hücreli biyo-yakıt hücre (BFC) ve katyon değiştirici olarak tuz köprüsün kullanıldığı çift hücreli BFC oluşturulmuştur. Oluşturulan BFC'lerin performansları bir multimetre yardımıyla değerlendirilmiştir.

Performans çalışmaları sonucu tek hücreli BFC'lerde max akım ve güç yoğunlukları çift hücreli BFC'lere göre çok daha yüksek iken açık devre potansiyeli çift hücreli BFC'lerde çok daha yüksektir. Bu tez çalışmasında enzim modifiye GCPE'ların BFC'lerde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca bu elektrotlara kolay bir şekilde nanoyapılar modifiye edilerek daha pratik ve etkili elektrotlar geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyo-Yakıt Hücre, Biyo-Anot, Biyo-Katod

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF EFFICIENT BIO-ANODE AND BIO-CATHODE ELECTRODES

Murat TUTUM

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ulku ANIK

December 2012, 156 pages

In this work bio-anode electrode was obtained by modification of glassy carbon paste electrode (GCPE) with glucose oxidase (GOx) and different nano-structures. P-Benzoquinone mediator was used for the electron transfer between enzyme redox center and electrode where glucose analyte was used as substrate. Optimization of experimental parameters (e.g. substrate concentration, mediator concentration, enzyme amount, temprature and pH) of bio-anode that was modified by different nanoparticles were carried out by voltammetric methods. Nanostructure modified GCPEs were examined and laccase (Lac) modified plain GCPE was choosen as bio-cathode electrode. Experimental parameters like enzyme amount and pH of this electrode were optimized. Then nanostructure modified bio-anode electrodes and Lac modified plain bio-cathode electrode were combined to fabricate single cell bio-fuel cell (BFC) and double cell BFC in which salt bridge was used as cation exchanger. Performances of developed BFCs' were analyzed with multimeter.

As a result after performance studies single cell BFCs showed better maximum current and power densities but lower open circuit potential than double cell BFCs. It is showed that enzyme modified GCPEs can be used at BFCs in this thesis. Also more practical and effective electrodes were developed by easy modification of these electrodes by nano-structures.

Key Words: Bio-Fuel Cell, Bio-Anode, Bio-Cathode

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca çok büyük desteğini gördüğüm, çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitim süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen, gerekli bilgiye ulaşma ve bana yönümü belirleme yeteneği kazandıran tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Ülkü ANIK'A teşekkür eder, gösterdiği ilgi, sabır ve anlayıştan dolayı şükranlarımı sunarım.

Araştırma süresince yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ilgi ve destekleriyle çalışmalarım boyunca yanımda olan nanosensing ve nanobiosensing araştırma laboratuvarı grubu çalışma arkadaşlarım Meliha ÇUBUKÇU, Serdar ÇEVİK, Sema ASLAN, Yeliz YAVUZ, Özge TOKUL ve Sinan CEMGİL SULTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hep yanımda olduklarını bildiğim, yaşamımın her döneminde daima bana destek ve fedakarlıklarda bulunan canım annem, babam, biricik ablalarım ve her şeyden çok sevdiğim kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Enerji ve Türleri	3
2.1.1. Enerjinin genel durumu ve yeni alternatifler	4
2.2. Yakıt Hücreleri	5
2.2.1. Yakıt hücrelerinin tarihsel gelişimi	7
2.2.2. Yakıt hücrelerinin çalışma prensibi ve türleri	8
2.2.2.1. Çalışma sıcaklığına göre yakıt hücreleri	8
2.2.2.2. Çalışma basıncına göre yakıt hücreleri	9
2.2.2.3. Kullandıkları yakıt ve oksitleyiciye göre yakıt hücreleri	9
2.2.2.4. Kullandıkları elektrolit türüne göre yakıt hücreleri	9
2.3. Biyo-Yakıt Hücreler	10
2.3.1. Biyo-yakıt hücrelerinin tarihsel gelişimi	10
2.3.2. Biyo-yakıt hücrelerinin çalışma prensibi	12
2.3.3. Biyo-yakıt hücrelerinin türleri	13
2.3.3.1. Mikrobiyal yakıt hücresi	14
2.3.3.2. Enzimatik yakıt hücresi	16
2.3.4. Biyo-yakıt hücrelerinin uygulama alanları	17
2.3.5. Biyo-yakıt hücrelerinin avantaj ve dezavantajları	20
2.3.6. Biyo-yakıt hücrelerinde elektron transferi.....	21
2.3.6.1. Doğrudan elektron transferi (DET).....	21
2.3.6.2. Medyatörlü elektron transferi (MET)	22
2.3.7. Biyo-yakıt hücre dizaynı	23
2.3.7.1. Tek hücreli biyo-yakıt hücreler	23
2.3.7.2. Çift hücreli biyo-yakıt hücreler	24

2.3.8. Biyo-yakıt hücre performansı	25
2.3.8.1. Yakıt hücresinde voltaj düşüş sebepleri	25
2.3.8.2. Polarizasyon eğrisi	25
2.3.8.2. Güç yoğunluğu.....	26
2.4. Enzim	27
2.4.1. Enzim yapısı ve spesifikliği.....	28
2.4.2. Enzim sınıfları ve isimlendirilmesi	29
2.4.3. Enzimlerin etki mekanizması	30
2.4.3.1. Aktivasyon enerjisi.....	31
2.4.3.2. Aktif bölgedeki değişiklikler	32
2.5. Enzim İmmobilizasyonu	33
2.5.1. Enzim immobilizasyonunun biyo-yakıt hücrelerindeki önemi.....	34
2.5.2. İmmobilize enzimlerin avantaj ve dez-avantajları.....	35
2.5.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri	35
2.5.3.1. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri	36
2.5.3.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri	38
2.5.4. İmmobilizasyon yönteminin seçimi	42
2.5.3.1. Enzim destek materyali	43
2.5.5. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	44
2.6. Glikoz Oksidaz (GOx)	45
2.6.1. GOx'in genel özellikleri	46
2.6.1.1. Aktif merkezi	47
2.6.1.2. Substratları.....	47
2.6.1.3. Aktivatörleri.....	48
2.6.1.4. İnhibitörleri	48
2.6.1.5. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık	49
2.6.1.6. Optimum pH	49
2.6.2. GOx'in reaksiyon mekanizması.....	49
2.6.3. GOx'in aktifliğinin saptanması.....	49
2.6.4. GOx'in kullanım alanları.....	50
2.7. Lakkaz (Lac)	52
2.7.1. Lakkaz enziminin yapısal özellikleri	53
2.7.2. Lakkaz enziminin kristal yapısı	55

2.7.3. Lakkaz katalizli reaksiyonlar	56
2.7.4. Lakkaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar	56
2.8. Nanoteknoloji	57
2.8.1. Nanoyapılar	57
2.8.1.1. Mangan (IV) oksit nanopartiküller	58
2.8.1.2. Altın nanopartiküller	59
2.8.1.3. Karbon nanotüp (CNT)	59
2.8.1.4. Manyetik nanopartiküller	61
2.8.1.5. Seramik oksit ($Al_2O_3.TiO_2$)	62
2.9. Elektrokimyasal Ölçümler	62
2.9.1. Voltammetri ve voltammetrik yöntemler	62
2.9.1.1. Doğrusal Taramalı Voltammetri	63
2.9.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar	64
2.9.2.1. Yardımcı elektrot	64
2.9.2.2. Referans elektrotlar	64
2.9.2.3. Çalışma elektrotları	65
2.9.2.4. Karbon bazlı elektrotlar	65
2.10. Kompozit	66
2.10.1. Kompozit malzeme	66
2.10.2. Nanokompozit	66
3. MATERYAL VE METOT	67
3.1. Kullanılan Cihazlar	67
3.2. Kullanılan Elektrotlar	69
3.3. Kimyasallar ve Reaktifler	69
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	70
3.4.1. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması	70
3.4.1.1. Fosfat tamponu çözeltisinin (PBS) hazırlanması	70
3.4.1.2. Asetat tamponu çözeltisinin hazırlanması	71
3.4.2. Reaktiflerin hazırlanması	71
3.4.2.1. Medyatör çözeltisinin hazırlanması	71
3.4.2.2. Substrat çözeltisinin hazırlanması	71
3.4.3. Çalışma hücreinde kullanılan çözeltinin hazırlanması	71
3.5. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması	71

3.5.1. Kompozit elektrotların hazırlanması.....	71
3.5.1.1. Anot elektrotların hazırlanması.....	72
3.5.1.2. Katot elektrotların hazırlanması	72
3.5.2. İmmobilize elektrotların hazırlanması	73
3.5.2.1. Anot elektrotların hazırlanması.....	73
3.5.2.2. Katot elektrotların hazırlanması	74
3.6. Elektrotların Performans Çalışmaları	74
3.6.1. Anot elektrot performans çalışmaları.....	74
3.6.2. Katot elektrot performans çalışmaları.....	75
3.7. Biyo-Yakıt Hücre Çalışmaları.....	75
3.7.1. Biyo-yakıt hücre kurulumu.....	75
3.7.2. Biyo-anot.....	76
3.7.3. Biyo-katot.....	76
3.7.4. Açık devre potansiyeli.....	76
3.7.5. Kısa devre akım yoğunluğu.....	76
3.7.6. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	76
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	77
4.1. Uygun Biyo-Anot Elektrodun Belirlenmesi	77
4.1.1. Uygun biyo-anot elektrotların karşılaştırması	83
4.1.2. Biyo-anot elektrodun çalışma koşullarının optimizasyonu	84
4.1.2.1. Medyatör derişimi optimizasyonu	84
4.1.2.2. Enzim miktarı optimizasyonu	91
4.1.2.3. Substrat derişimi optimizasyonu.....	91
4.1.2.4. Sıcaklık optimizasyonu.....	98
4.1.2.5. pH optimizasyonu	105
4.1.3. Optimize edilmiş biyo-anot elektrotların karşılaştırılması.....	106
4.2. Uygun Biyo-Katot Elektrodun Belirlenmesi.....	107
4.2.1. Farklı nanoyapı modifikasyonu	108
4.2.2. Biyo-katot elektrotların çalışma koşullarının optimizasyonu.....	109
4.2.2.1. Enzim miktarı optimizasyonu	109
4.2.2.2. pH optimizasyonu	111
4.3. Biyo-Yakıt Hücre Çalışmaları.....	113

4.3.1. Optimize edilmiş biyo-anot biyo-katot sistemlerin tek-hücreli biyo-yakıt hücrede performanslarının incelenmesi	113
4.3.1.1. Açık devre potansiyeli.....	114
4.3.1.2. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	115
4.3.2. Optimize edilmiş biyo-anot biyo-katot sistemlerin çift-hücreli biyo-yakıt hücrede performanslarının incelenmesi	119
4.3.2.1. Açık devre potansiyeli.....	119
4.3.2.2. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	120
4.3.3. Biyo-yakıt hücrede elektrotların kararlılığı	124
4.4. Sonuç	126
KAYNAKLAR.....	129
ÖZGEÇMİŞ	155

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enerji kaynaklarının sınıflandırılması	3
Çizelge 2.2. EFC uygulamaları	19
Çizelge 2.3. BFCs'de kullanılan indirgeyici/yükseltgeyici enzimler	28
Çizelge 2.4. Enzim hapsetme yönteminde kullanılan bazı destek maddeleri	40
Çizelge 2.5. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	44
Çizelge 2.6. GOx'in farklı substratlara karşı olan bağıl oksidasyon hızları	47
Çizelge 2.7. Lac enziminin fiziksel özellikleri.....	53
Çizelge 4.1. BQ immobilize GCE	78
Çizelge 4.2. BQ immobilize GCPE	79
Çizelge 4.3. BQ çözeltideyken GCE	81
Çizelge 4.4. BQ çözeltideyken GCPE	82
Çizelge 4.5. Biyo-anot elektrotların karşılaştırılması	83
Çizelge 4.6. Yalın elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri.....	85
Çizelge 4.7. MnO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri.....	86
Çizelge 4.8. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri.....	87
Çizelge 4.9. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri.....	89
Çizelge 4.10. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri.....	90
Çizelge 4.11. Yalın elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	92
Çizelge 4.12. MnO ₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri.....	93
Çizelge 4.13. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	94
Çizelge 4.14. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	96
Çizelge 4.15. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri.....	97
Çizelge 4.16. Yalın elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	99
Çizelge 4.17. MnO ₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	100

Çizelge 4.18. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	101
Çizelge 4.19. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri	103
Çizelge 4.20. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri.....	104
Çizelge 4.21. pH optimizasyon akım değerleri	105
Çizelge 4.22. Optimum elektrotların akım değerlerinin karşılaştırılması.....	107
Çizelge 4.23. Biyo-katot elektrotların karşılaştırılması	108
Çizelge 4.24. Farklı nanoyapı modifiye biyo-katot elektrotların akım değerleri	109
Çizelge 4.25. Biyo-katot elektrodun lakkaz miktarı optimizasyon akım değerleri ..	110
Çizelge 4.26. Biyo-katot elektrodun PBS’de pH optimizasyon akım değerleri.....	111
Çizelge 4.27. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon akım değerleri.....	113
Çizelge 4.28. Tek ve çift hücreli BFCs’de elektrot performanslarının karşılaştırılması.....	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Klasik bir yakıt hücresinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.2. Elektrolit türüne göre sınıflandırılmış yakıt hücrelerinin çalışma prensipleri.....	9
Şekil 2.3. BFC'nin çalışma prensibi	13
Şekil 2.4. BFC türlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5. MFC'nin çalışma prensibi	15
Şekil 2.6. EFC'nin çalışma prensibi	16
Şekil 2.7. DET'nin şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.8. MET'nin şematik olarak gösterimi	22
Şekil 2.9. Tek ve çift hücreli BFCs'e örnekler.....	24
Şekil 2.10. Yakıt hücre polarizasyon eğrisi.....	26
Şekil 2.11. Yakıt hücre güç eğrisi.....	27
Şekil 2.12. Reaksiyon sürecinde serbest enerji değişimi	32
Şekil 2.13. Substratın enzime bağlanma modelleri	33
Şekil 2.14. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	36
Şekil 2.15. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyon.....	37
Şekil 2.16. Çapraz bağlanma yöntemi ile immobilizasyon.....	38
Şekil 2.17. Adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyon	39
Şekil 2.18. Kafes tipi tutuklanmış/hapsedilmiş enzimlerin şematik gösterimi	41
Şekil 2.19. Mikrokapsül tipi tutuklanmış/hapsedilmiş enzimlerin şematik gösterimi	42
Şekil 2.20. GOx'in reaksiyon mekanizması.....	45
Şekil 2.21. <i>A.Niger</i> kökenli GOx'ın 3 boyutlu yapısı.....	46
Şekil 2.22. Lakkazın bakır merkezleri	54
Şekil 2.23. <i>Trametes Versicolor</i> kaynaklı lac enziminin 3 boyutlu yapısı.....	55
Şekil 2.24. CNT'lerin sınıfları; (A) Tek-duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), (B) Çok-duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), (C) İki-duvarlı karbon nanotüp (DWCNT).....	60
Şekil 2.25. LSW'de (a) gerilimin taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltammogram.....	64
Şekil 3.1. AUTOLAB PGSTAT 12	67
Şekil 3.2. μ -AUTOLAB TYPE III	67

Şekil 3.3. (a) ORION STAR SERIES model pH, (b) PRECISA XR 205SM-DR model hassas terazi	68
Şekil 3.4. BANDELİN SONOREX (RK 102 H) model sonikatör.....	68
Şekil 3.5. Metrohm üçlü elektrot sistemi	69
Şekil 3.6. Kompozit elektrot hazırlama basamakları	72
Şekil 3.7. İmmobilize elektrot hazırlama basamakları.....	73
Şekil 3.8. (a) Tuz köprülü BFC, (b) Tek hücreli BFC	75
Şekil 4.1. BQ immobilize GCE'nin voltammogramları	78
Şekil 4.2. BQ immobilize GCE	78
Şekil 4.3. BQ immobilize GCPE'nin voltammogramları	79
Şekil 4.4. BQ immobilize GCPE	80
Şekil 4.5. BQ çözültüdeyken GCE'nin BQ voltammogramları	80
Şekil 4.6. BQ çözültüdeyken GCE	81
Şekil 4.7. BQ çözültüdeyken GCPE'nin voltammogramları	82
Şekil 4.8. BQ çözültüdeyken GCPE	82
Şekil 4.9. Biyo-anot elektrotların voltammogramları.....	83
Şekil 4.10. Yalın elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları	84
Şekil 4.11. Yalın elektrodun BQ optimizasyon grafiği.....	85
Şekil 4.12. MnO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları	86
Şekil 4.13. MnO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği	86
Şekil 4.14. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları	87
Şekil 4.15. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği.....	88
Şekil 4.16. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları	88
Şekil 4.17. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği.....	89
Şekil 4.18. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları	90
Şekil 4.19. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği	90
Şekil 4.20. Yalın elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları.....	91
Şekil 4.21. Yalın elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	92
Şekil 4.22. MnO ₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	93
Şekil 4.23. MnO ₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği ..	93

Şekil 4.24. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	94
Şekil 4.25. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	95
Şekil 4.26. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	95
Şekil 4.27. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	96
Şekil 4.28. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	97
Şekil 4.29. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	97
Şekil 4.30. Yalın elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları.....	98
Şekil 4.31. Yalın elektrodun substrat optimizasyon grafiği	99
Şekil 4.33. MnO ₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	100
Şekil 4.34. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	101
Şekil 4.35. Au-Fe ₂ O ₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	102
Şekil 4.36. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	102
Şekil 4.37. Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	103
Şekil 4.38. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları	104
Şekil 4.39. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği.....	104
Şekil 4.40. pH optimizasyon voltammogramı	105
Şekil 4.41. pH optimizasyon grafiği	106
Şekil 4.42. Optimum elektrotların voltammogramları.....	106
Şekil 4.43. Biyo-katot elektrotların voltammogramları	107
Şekil 4.44. Farklı nano-yapı modifiye biyo-katot elektrotların voltammogramları ..	108
Şekil 4.45. Biyo-katot elektrodun lac miktarı optimizasyon voltammogramları	110
Şekil 4.46. Biyo-katot elektrodun lac miktarı optimizasyon grafiği	110
Şekil 4.47. Biyo-katot elektrodun PBS'de pH optimizasyon voltammogramı	111
Şekil 4.48. Biyo-katot elektrodun PBS'de pH optimizasyon grafiği.....	112
Şekil 4.49. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon voltammogramı	112

Şekil 4.50. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon grafiği.....	113
Şekil 4.51. Tek hücreli BFCs'nin OCPs'i.....	114
Şekil 4.52. Tek hücreli BFC'de yalın biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	115
Şekil 4.53. Tek hücreli BFC'de MnO ₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	116
Şekil 4.54. Tek hücreli BFC'de Au-Fe ₂ O ₃ modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	117
Şekil 4.55. Tek hücreli BFC'de Al ₂ O ₃ -TiO ₂ modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	117
Şekil 4.56. Tek hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	118
Şekil 4.57. Tek hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin Asetat tamponunda polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	119
Şekil 4.58. Çift hücreli Au ve MnO ₂ np modifiye biyo-anot içeren BFCs'nin OCPs'i.....	120
Şekil 4.59. Çift hücreli BFC'de MnO ₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katot PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	121
Şekil 4.60. Çift hücreli BFC'de MnO ₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katot PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	121
Şekil 4.61. Çift hücreli BFC'de MnO ₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot PBS ve biyo-katotun asetat tamponundayken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	122
Şekil 4.62. Çift hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katot PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri.....	123
Şekil 4.63. Çift hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot PBS ve biyo-katotun asetat tamponundayken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri	123
Şekil 4.64. Tek ve çift hücreli BFCs'de akım yoğunluğunun zamanla değişimi	124
Şekil 4.65. Tek ve çift hücreli BFCs'de akım yoğunluğunun zamanla değişimi	125

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

s	Saniye
dk	Dakika
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
L	Litre
mL	Mililitre
μ	Mikron
μ L	Mikrolitre
μ A	Mikroamper
μ W	Mikrowatt
V	Gerilim-potansiyel
$V_{\text{hücre}}$	Hücre potansiyeli
P	Güç
W	Güç Yoğunluğu
I	Akım
i	Akım Yoğunluğu
Ω	Ohm
k Ω	Kilo Ohm
M Ω	Mega Ohm
A	Alan
$\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{TiO}_2$	Aluminyum Titanat (IV) Oksit
MnO_2	Mangan (IV) Oksit
$\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$	Altın-Demir (III) Oksit Korşel Yapı
NaOH	Sodyum Hidroksit
CH_3COOH	Asetik Asit
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
O_2	Oksijen

N ₂	Azot
Au	Altın
np	Nanopartikül
BFC	Biyo-Yakıt Hücre
EFC	Enzimatik Biyo-Yakıt Hücresi
MFC	Mikrobiyal Biyo-Yakıt Hücre
GCPE	Camımsı Karbon Pasta Elektrot
GCPE	Camımsı Karbon Elektrot
GC	Camımsı Karbon
GCP	Camımsı Karbon Pasta
LSV	Lineer swepp Voltammetri
BQ	p-Benzokinon
GOx	Glikoz Oksidaz
Lac	Lakkaz
PBS	Fosfat Tamponu
DET	Doğrudan Elektron Transferi
MET	Medyatörlü Elektron transferi
GA	Glutaraldehit
CS	Kitosan
CNT	Karbon Nanotüp
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp

1. GİRİŞ

Enerji talebini karşılamak için kaynağı tükenmek üzere olan fosil yakıtların kullanımı, sera gazı emisyonuna büyük bir katkı yaparak biyo-çeşitliliğin kaybı, deniz seviyelerinde artış, buzulların erimesi ve iklim değişikliği gibi birçok olumsuz etkiye yol açmaktadır. Enerji tüketiminde ve sera gazı emisyonundaki artış ile geleneksel fosil yakıtların hızla tüketilmesi, daha az emisyonu, ekonomik, etkili, sürdürülebilir ve yenilenebilir alternatif enerji kaynaklarını kullanmayı zorunlu kılmıştır (Nigam ve Singh, 2011). Elektrokimyasal Yakıt/Biyo-yakıt hücreleri bir tür alternatif enerji kaynağıdır (Cracknell vd., 2008). Biyo-yakıt hücreler (BFCs), biyokatalizörlerin katalizlediği reaksiyonla kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren sistemlerdir (Moehlenbrock ve Minteer, 2008). Bu hücrelerde yenilenebilir kaynaklardan uygun substratlar kullanılarak elektrik üretilirken, zararsız yan ürünler oluşur (Mohan vd., 2008).

BFC'ler biyokatalizörlerine göre sınıflandırılabilirler. Mikrobiyal yakıt hücreler (MFCs) mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sayesinde biyo-kütleyi elektrik akımına dönüştüren biyo-elektrokimyasal cihazlardır (Arechederra vd., 2009 ; Arechederra and Minteer, 2009; Kim HJ, 2002). Enzimatik yakıt hücreler (EFCs) ise katalizör olarak izole edilmiş spesifik enzimleri kullanarak kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürürler (K. Kendall, 2002). Yükseltgen olarak oksijenin ve yakıt olarak glikozun kullanıldığı BFC, enzimler ile çalışan BFCs'nin en çok kullanılan türüdür. Glikoz anotta, Glikoz oksidaz (GOx) enzimi tarafından glukanolaktone yükseltgenirken, oksijen molekülü katotta bilirubin oksidaz (BOD) veya lakkaz (Lac) gibi spesifik enzimler tarafından suya indirgenir (Robert, 2002).

Enzimlerin redoks merkezleri protein yapısının içinde gömülüdür. Bu durum elektroda doğrudan elektron transferini (DET) engellemektedir (Giroud vd., 2011). Aktif biyo-katalitik bölgelerden elektrotlara elektron transferine aracılık eden ve sistemin içine katılan moleküllere medyatör denir. Birçok medyatör elektron

transferini kolaylaştırmak için geliştirilen elektrot sistemlerine katılmaktadır (Robert, 2002). Nano-teknolojinin gelişimi ile birlikte birçok nanoyapı elektrokimyasal sistemlerin modifikasyonunda kullanılmaktadır. Kimyasal materyallerle sinerji yaratan bu nanoyapılar, sistemlere entegre edildiği zaman, enzim aktivasyonunu ve elektrot kararlılığını artırır. Nanoyapıların geniş yüzey alanları elektron iletim hızını artırmakta ve sonuç olarak BFCs'in g yğunluğunu artırmaktadır (Kim vd., 2006).

Bu alışmada, BFCs'de kullanılmak üzere etkin biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar geliştirildi. Enzim olarak biyo-anotta GOx, biyo-katotta Lac kullanıldı. Anot medyatörü olarak ise yüksek verimliliğinden dolayı p- Benzekinon (BQ) tercih edildi. Biyo-anot ve biyo-katot elektrot olarak kullanılmak üzere farklı elektrotlar, değişik kombinasyonlarda voltammetrik olarak incelendi. En iyi yanıt alınan kombinasyondaki elektroda farklı nanoyapılar da eklenerek voltammetrik olarak karakterize edildi ve optimum koşullar belirlendi. Optimize edilen nanoyapı modifiye biyo-anot ile biyo-katot elektrotlar tek ve çift hücreli BFCs'de performansları değerlendirildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enerji ve Türleri

Enerji, insana yönelik yaşamsal faaliyetlerin devam edebilmesi için gerekli temel kaynaktır. İnsanlığın gelişimi ile birlikte enerji ihtiyacı sürekli olarak artarken sınırlı rezervi olan fosil yakıtlar da her geçen gün tükenmektedir. Günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin en önemli gereksinimi enerjidir.

Enerji, temelde birincil ve ikincil enerji kaynakları olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Çizelge 2.1.'de enerji kaynaklarını sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Enerji kaynaklarının sınıflandırılması

Birincil Enerji Kaynakları	<i>Yenilenemeyen Enerji Kaynakları</i>	Kömür, petrol, doğalgaz gibi fosil yakıtlar ve nükleer enerji...
	<i>Yenilenebilir Enerji Kaynakları</i>	Biyo-kütle, rüzgar, hidrolik, jeotermal ve güneş enerjisi...
	<i>Alternatif Enerji Kaynakları</i>	Bunların yerine geçebilecek enerji kaynakları.
İkincil Enerji Kaynakları	Elektrik (termik santraller, nükleer santraller, barajlar); ısı enerjisi (kazanlar, özel nükleer santraller); mekanik enerji (fosil yakıtlı motorlar)...	

Birincil enerji kaynakları doğadan çıktıkları ilk halleriyle kullanılabilen enerji kaynaklarıdır. Kömür, petrol, doğal gaz gibi fosil yakıtlar ve nükleer enerji vb. yenilenemeyen enerji kaynakları ile su, jeotermal, biyo-kütle, rüzgâr ve güneş enerjisi vb. yenilenebilir enerji kaynaklarının tümünü içermektedir.

Alternatif enerji kaynakları ise yenilenebilir ve yenilenemeyen tüm enerji kaynakları yerine geçebilecek kaynakları olarak tanımlanabilir.

İkincil enerji kaynakları ise birincil enerji kaynaklarının fiziksel durumu farklı olacak şekilde dönüştürülerek tüketime hazır hale getirilmiş enerji kaynaklarıdır. Elektrik enerjisi (termik santraller, nükleer santraller, barajlar); ısı enerjisi (kazanlar, özel nükleer santraller) ve mekanik enerji (fosil yakıtlı motorlar) gibi enerji kaynakları ikincil olarak oluşan enerji kaynakları arasında yer alır (Kurtcephe, 2006; Büyüknohutçu, 2006; EIA, 2008).

2.1.1. Enerjinin genel durumu ve yeni alternatifler

Dünyada motorlu araçlar ve endüstri alanındaki ilerleyiş hampetrol temelli yakıtların talebinde aynı oranda artışa neden olur (Agrawal, 2007). Bugün dünyada tüketilen birincil enerjilerin %80'ini fosil yakıtlar oluşturur ki bunların yalnızca % 58'i taşıma sektörü ile tüketilmiştir (Escobar vd., 2009). Bu fosil yakıtların kaynağı tükenmek üzeredir ve enerji talebini karşılamak için fosil yakıtların tüketimi ise sera gazı emisyonuna major bir katkıda bulunarak, biyo-çeşitliliğin kaybı, deniz seviyelerinde artış, buzulların erimesi, iklim değişikliği ve hava kirliliği gibi birçok olumsuz etkiye yol açar (Gullison vd., 2007; Prasad vd., 2007; Zhao vd., 2009a; Singh vd., 2010). Enerji talebindeki artış ham petrol bedelinde bir artışa yol açar. Bu durum global ekonomi faaliyetini doğrudan etkiler (He vd., 2010). Enerji tüketimindeki ve sera gaz emisyonundaki artış ile geleneksel fosil yakıtların azalmasında ilerleme, daha az emisyon ile uygun maliyetli, etkili, sürdürülebilir ve yenilenebilir alternatif enerjiler bulma konusunu gündeme getirmiştir (Prasad vd., 2007; Singh vd., 2010; Nigam ve Singh, 2011).

Enerji, herhangi bir şekilde, modern dünyada en önemli rolü oynar. Enerjiye, elektrik enerjisi başta olmak üzere örneğin ekmek kızartma makinesinden demir çelik fabrikasının çalışmasına günlük yaşamımızda ihtiyaç duyarız. Enerji sarfiyatı ülkelerin gelişmişliğini belirleyen faktör haline gelmiştir. Oldukça uzun bir zaman kömür ve petrol gibi geleneksel enerji kaynaklarına tamamen muhtaçtık. Yeniden doldurulamayan bu iki kaynağın enerjisi, tüketimimizin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Dünya enerji talebinde, bu yakıtlara olan ilginin her geçen gün

artmasından dolayı hızla kıt hale gelmesi yavaşça yaklaşan bir sahnedir. Günümüzde rezervleri azalan, çevreyi kirleten fosil enerji kaynaklarının yerine doğa ile dost, yenilenebilir kaynakların kullanımı gündeme gelmiştir. BFCs, enerji üretmek için doğal yolların kullanılması sayesinde bütün bu problemlerin olası çözümü olarak ortaya çıkmaktadır. (Mohan vd., 2008).

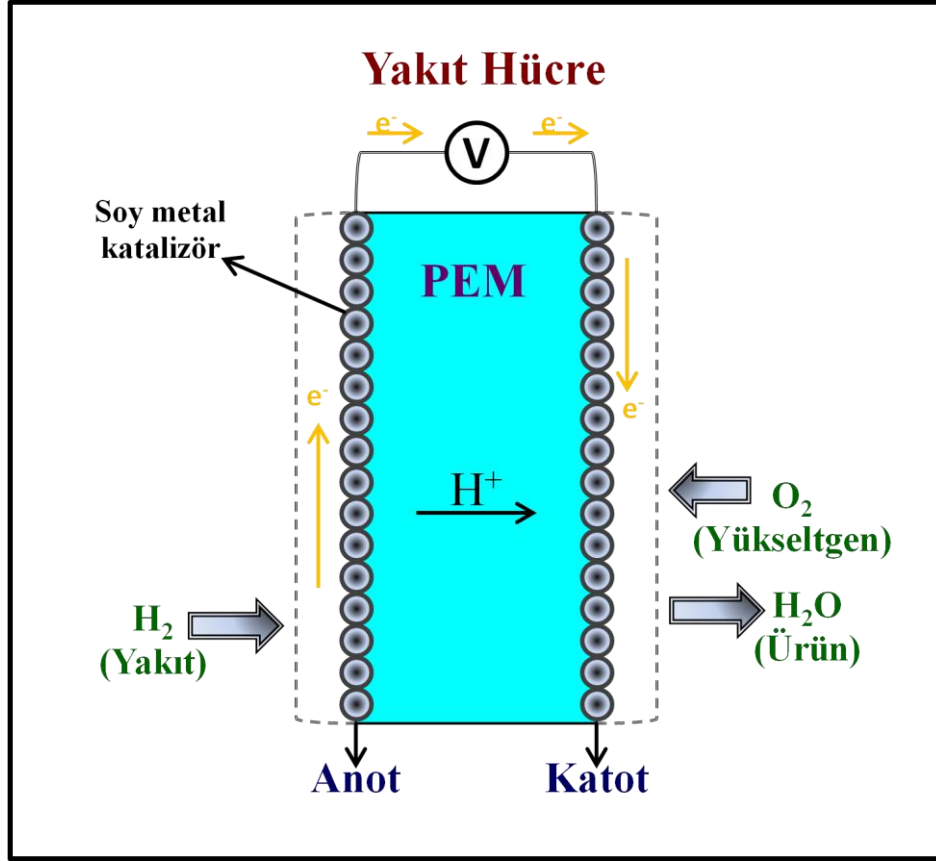
Uluslararası Enerji Ajansı'nın yayınladığı rapordaki tahmine göre, dünyanın enerji ihtiyacı 2005 yılından 2030 yılına kadar %50 oranında büyüme gösterecektir (EIA, 2008).

Sonuç olarak diyebiliriz ki, günümüzde artan nüfusla beraber enerjiye olan talep te hızla artmakta, mevcut enerji kaynaklarının yetersizliği nedeniyle alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, giderek büyüyen çevre problemlerini de dikkate alarak teknolojik, bilimsel ve sektörel anlamda yeni, temiz, yenilenebilir enerji kaynakları bulunması ve kullanılabilir hale getirilmesi gibi beklentiler yaratmıştır.

2.2. Yakıt Hücreleri

Enerji ihtiyacının büyük bölümü kaynağı tükenmekte olan ve çevresel probleme yol açan fosil yakıtlardan temin edilmektedir. Artan enerji ihtiyacı son yıllarda global olarak üzerinde en çok tartışılan önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle temiz, güvenli ve yüksek verimli olması gibi özellikleri içinde barındıran yakıt hücreleri, gelecekte ihtiyaç duyulan enerjinin büyük bir kısmını karşılaması beklendiğinden araştırmalar bu yöndedir (Oğuz, 2006; Büyüknohutçu, 2009).

Yakıt hücreleri hidrojeni oksijen veya hava kullanarak oksidasyon yolu ile doğrudan elektrik üretiminde kullanılırlar. Şekil 2.1'de hidrojen/oksijen yakıt hücresinin çalışma mekanizması gösterilmiştir. Yüksek verimle güç üretimi ve düşük çevresel zarara yol açmaları, geleceğin enerji kaynağı olarak sayılmasında büyük payı olan iki önemli özelliğidir. (Appleby and Foulkes, 2004; Edwards vd., 2008; Büyüknohutçu, 2009; Öncel, 2009).



Şekil 2.1. Klasik bir yakıt hücresinin şematik gösterimi

Yakıt hücrelerinin, farklı yakıtların kullanıldığı geleneksel elektrik üretimine göre en önemli üstünlüğü kimyasal, termal ve mekanik basamaklar olmaksızın, hidrojeni oksijen yardımıyla doğrudan elektriğe dönüştürebilmeleridir. Verimliliklerinin yüksek olması da bu nedendir (Zegers, 2006; Yang, 2008; Öncel, 2009).

Özellikle ulaşım sektöründe kullanılan içten yanmalı sistemlerle karşılaştırıldığında yakıt hücreleri, yüksek verimlerinin yanısıra düşük gaz emisyonları, ses kirliliği, hareketli parça içermemeleri, modüler olmaları, kullanım pratikliği bakımından da üstündür. Gelişen teknoloji ile sistemlerin ekonomik maliyetlerinin azaltılması, toplum bilincinin gelişmesi ile kullanım yaygınlığının artma potansiyeli günümüzde yakıt hücrelerine verilen önemi arttırmıştır (Ross, 2006; Qi vd., 2007; Moch and Schmitt, 2009; Öncel, 2009).

2.2.1. Yakıt hücrelerinin tarihsel gelişimi

Yakıt hücreleri 150 yıldır bilinmesine rağmen güç üretimi alanında kullanımı ancak son yıllarda önem kazanmıştır (Ar, F.F., 1988; Sarıtaş, 2004).

Yakıt hücre fikri ilk olarak, 1839 yılında suyun elektrolizi konusunda araştırmalar yapan William Grove tarafından ortaya atılmıştır. Elektrolizin tersine çevrilmesiyle hidrojen ve oksijenden elektrik enerjisi üretilebileceğini göstermiştir. Geliştirdiği hücreyle yaklaşık 1.8 volt civarında gerilim ve 12 amperlik akım üretmiştir. 1882 yılında Lord Rayleigh platin elektrotların verimini arttırmak için katı elektrot, gaz ve sıvı arasındaki işlem yüzeyini arttırarak ve yakıt olarak kömür gazı kullanarak çalışmalar yapmıştır. 1889 yılında Kudwing Mond ve asistanı Charles Langer, oksijen kaynağı olarak havayı, hidrojen kaynağı olarak da endüstriyel kömür gazını kullanarak 1.5 W güç üreten ve % 50 verimle çalışan bir yakıt hücre geliştirmişlerdir ve ilk olarak literatüre yakıt hücresi (fuel cell) terimini geçirmişlerdir. 1893'de Wilham Oswald kömür türevli yakıtlar ile çalışan bir elektrokimyasal hücre yapmıştır Oswald'ın yakıt hücresinin kimyasıyla ilgili açıklamaları daha sonraki araştırmalara temel teşkil etmiştir. Yakıt hücreleri konusunda en önemli bilim adamlarından biri olan Francis T. Bacon 1930 yıllarında çalışmalarına başlamış 1939 yılında hidrojen-oksijen hücre ve alkalın elektrolitin kullanıldığı ilk başarılı yakıt hücreyi geliştirmiş ve o dönemde birçok projeye imza atmıştır. 1959'da Bacon, Mond ve Langer, daha sonraları modifiye edilerek Amerikan uzay programlarında kullanılacak olan, 5 kW'lık güç üreten bir yakıt hücre yapmışlardır. Aynı yılın sonunda Harry Karl Ihring, 20 beygir (yaklaşık 15 kW) gücünde yakıt hücreyle çalışan traktör tasarlamış ve günümüzdeki modern yakıt hücreyle çalışan makineler için bir ilki gerçekleştirmiştir (Bıykoğlu, 2003; Çavuşoğlu, 2006; Yıldızbilir, 2006; Büyüknohutçu, 2009).

1960'da NASA, hafif, güvenli ve yan ürün olarak su üretmeleri yanı sıra; düşük gürültü ve titreme, yüksek verim ve enerji yoğunluğu gibi avantajlarından dolayı uzay çalışmaları için oldukça muazzam bu yeni teknolojiye ciddi yatırımlar yapmıştır. Apollo ve Gemini, uzay mekiklerinde elektrik ve su üretiminde yakıt hücrelerini kullanmış ve ilk olarak Gemini uzay aracında General Elektrik tarafından üretilen PEM yakıt hücresini kullanmıştır (Oğuz, 2006; Çavuşoğlu, 2006; Yıldızbilir, 2006; Büyüknohutçu, 2009).

21. yüzyılda artık bilim ve teknoloji alanında gelişmiş devletler, geleceğe dönük enerji yatırımlarının büyük kısmını yakıt hücre teknolojisi yönünde yapmaktadırlar. Gelecekte yakıt hücrelerinin geleneksel güç kaynaklarının yerini alması beklendiğinden hem kanunlarla hem de teşviklerle bu teknolojinin bir an önce ülke çapında yayılması çabası içerisindeyler. (Çavuşoğlu, 2006; Yıldızbilir, 2006; Büyüknohutçu, 2009).

2.2.2. Yakıt hücrelerinin çalışma prensibi ve türleri

Yakıt hücre, kimyasal reaksiyon enerjisini doğrudan elektrik enerjisine dönüştüren elektrokimyasal bir cihazdır.

Anot bölümünde hidrojen, katot bölümünde ise yükseltgeyici elektrokimyasal indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Elektrolitler asit, baz, tuz, polimer veya seramik gibi farklı iletkenlerden oluşabilmektedir. Elektrolit, elektrotlar arasında iyon transferine olanak sağlarken elektronlar dış direnç üzerinden geçerek elektrik akımı (doğru akım) ve ısı oluşturur. Protonlar katotta oksijenle birleşerek yakıt türüne göre su ve/veya karbondioksit açığa çıkarır (Smitha vd., 2005; Barbir, 2006; Öncel, 2009).

Günümüzde kullanım alanlarına yönelik yakıt hücreleri arasında farklılıklar olmakla birlikte tüm yakıt hücreleri temel olarak birbirlerinden katı veya sıvı bir elektrolit ile ayrılan iki elektrottan (anot ve katot) oluşmaktadır (Öncel, 2009).

Yakıt hücreleri, bilim ve teknoloji alanında gerçekleştirilen araştırmalar ve yaşanan gelişmeler sonucunda çeşitlenmiştir. Çalışma sıcaklığı ve basıncına, kullanılan yakıt ve oksitleyicinin türüne, yakıtın dolaylı veya doğrudan verilmesine ve ayrıca kullanılan elektrot ve elektrolit cinsine bağlı olarak yakıt hücreleri sınıflandırılırlar (Linden, 1984; Büyüknohutçu, 2009).

2.2.2.1. Çalışma sıcaklığına göre yakıt hücreleri

- Düşük sıcaklıkta çalışan yakıt hücreleri (0-150 °C)
- Orta sıcaklıkta çalışan yakıt hücreleri (150-500 °C)
- Yüksek sıcaklıkta çalışan yakıt hücreleri (500-1000 °C)

2.2.2.2. Çalışma basıncına göre yakıt hücreleri

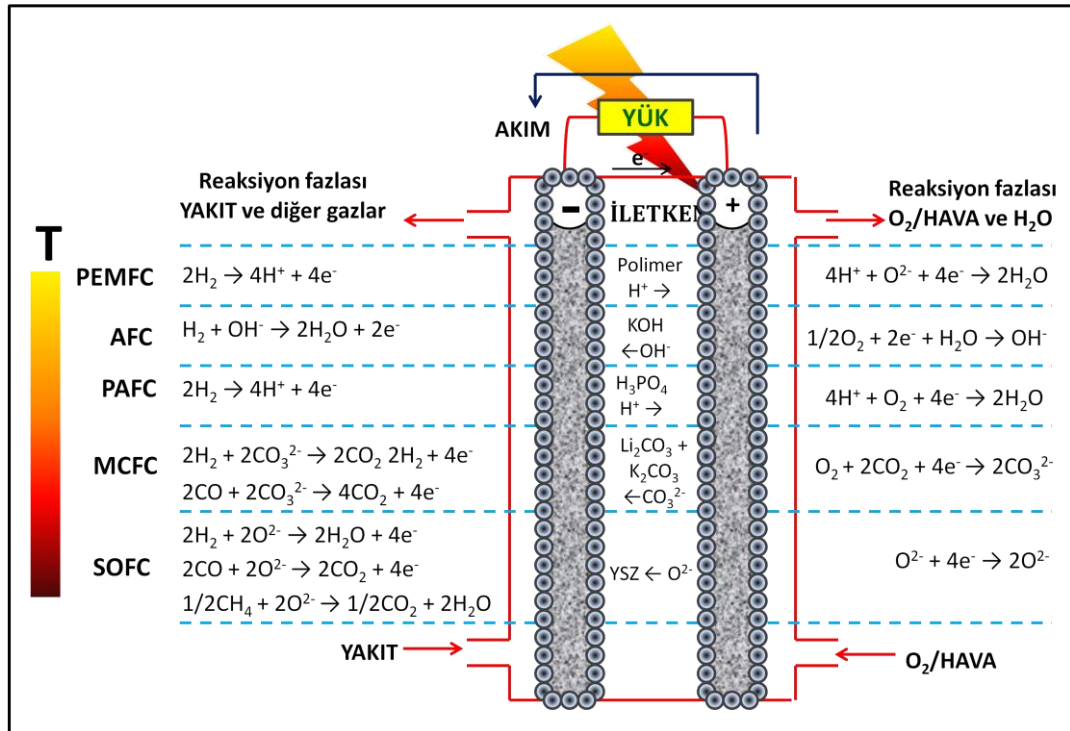
- Düşük basınçta çalışan yakıt hücreleri
- Orta basınçta çalışan yakıt hücreleri
- Yüksek basınçta çalışan yakıt hücreleri

2.2.2.3. Kullandıkları yakıt ve oksitleyiciye göre yakıt hücreleri

- Gaz girdili yakıt hücreleri (hidrojen, amonyum, hava ve oksijen vb.)
- Sıvı yakıtlı yakıt hücreleri (alkoller, hidrokarbonlar vb.)
- Katı yakıtlı yakıt hücreleri (kömür, hibritler vb.)

2.2.2.4. Kullandıkları elektrolit türüne göre yakıt hücreleri

- Polimer elektrolit (proton değişim) membranlı (PEM) yakıt hücreleri
- Alkali yakıt hücreleri
- Fosforik asit yakıt hücreleri
- Erimiş karbonat yakıt hücreleri
- Katı oksit yakıt hücreleri



Şekil 2.2. Elektrolit türüne göre sınıflandırılmış yakıt hücrelerinin çalışma prensipleri

2.3. Biyo-Yakıt Hücreler

BFC'ler geniş anlamda, kimyasalın biyo-kimyasal metabolik yol üzerinden doğrudan elektrik enerjisine dönüşümünü yapabilen sistemlerdir. Enerji üretimi, anotta yükseltgenme reaksiyonu ile katotta indirgenme reaksiyonunun eşleşmesiyle başarılmıştır (Katz vd., 2003; Shukla vd., 2004; Bullen vd., 2006; Osman vd., 2011)

Geleneksel anorganik yakıt hücreleri örneğin; PEM, doğrudan-metanol ve katı-oksit sistemler pahalı nadir metal katalizörlere yada iyileştirilmiş fosil yakıtlara ihtiyaç duyarlar. BFC'lerde ise kimyasal reaksiyonlar, yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının, yani glikoz ya da etil alkol gibi yakıtları ve katalizör olarak da enzim ya da mikroorganizmaları kullanarak elektriksel güç üretirler. Biyo-yakıtların üretim/tüketim döngüsü nötral karbon (karbon döngüsü) olarak nitelendirilir ve prensipte geleneksel yakıt hücrelerinden daha sürdürülebilirdirler. Yakıt hücreleri pahalı metal katalizörlere ihtiyaç duyarken, BFC'lerde katalizör olarak spesifik enzimler ve mikroorganizmalar kullanılır. Nötral pH ve düşük çalışma sıcaklığı gibi avantajlara sahiptirler (Larminie ve Dicks, 2003; Osman vd., 2011).

BFC'ler ılıman koşullarda çalışma, biyo-uyumluluk, yüksek verim ve membran gereksinimini ortadan kaldıracak substratta seçicilik gibi avantajlara sahiptir. Bu sayede potansiyel uygulama alanları taşınabilir cihazların, mesela mobil telefon veya gps, medikal uygulamalarda güç kaynağı olarak, kalp cihazları için, nörolojik uygulamalarda koklear tedavisinde, mikrobik ilaçlar gibi alanlara genişlemiştir (Giroud vd., 2011). Bu özelliklere sahip olmasıyla geleneksel enerji sistemlerinden tümüyle farklı olan BFC'ler bilimsel araştırmaların ve geliştirme çalışmalarının odak noktası olmuştur. Bu ve benzeri dikkate değer özellikleri ve çeşitli alanlarda gerçekleştirilen çarpıcı uygulamaları araştırmacıları BFC teknolojisini geliştirmeye motive etmiştir (Inamuddin vd., 2009; Büyüknohutçu, 2009).

2.3.1. Biyo-yakıt hücrelerinin tarihsel gelişimi

Biyolojik reaksiyonlar ile elektrokimyasal olayların birbiriyle bağlantısı ilk olarak 1780'li yıllarda Galvani'nin yaptığı deney sırasında statik elektrik üreticinden çıkan

akımın bir kurbağanın bacağına seğirmeye yol açtığını keşfetmesiyle ortaya çıkmıştır (Galvani, 1791). Bundan sonra ise biyolojik bir prosesin elektriksel enerji kazanımı için kullanılabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Bu konuda atılan ilk adım 1910 yılında Potter tarafından geliştirilmiş, mikroorganizma (*Escherichia coli*) kullanarak elektrik üreten bir yarı pil yapılmıştır. Bu sonuçlar 1931 yılında sonra sıklaşmış ve 35 V gerilim üreten mikrobiyal yakıt hücresi Cohen tarafından geniş bir şekilde rapor edilmiştir (Cohen, 1931). 1960'ların sonuna doğru, BFCs'inde serbest enzim kullanımı başlamış ve kalıcı implant kalp için güç kaynağı oluşturma fikrinin temelleri atılmıştır (Wingard vd., 1982).

BFC kavramı ilk olarak 1982 yılında Wingard ve ekibi tarafından öne sürülmüş ve bu alanda araştırmalara yön verilmiştir (Wingard vd., 1982). Daha sonra Aston ve Turner 1984'te enzimler ile elektrotların elektriksel ilişkilerini incelemişler, ancak çalışmalarında enerji üretiminden çok biyosensör tasarım ve kullanımına odaklanmışlardır (Aston and Turner, 1984). Van Dijk ve ekibi bir sonraki yıl yaptıkları çalışmalarda enzim katalizli BFC'leri, bunların elektro-sentezlerini ve amperometrik biyosensörleri incelemişlerdir (Van Dijk vd., 1985). 1960'larda NASA uzay mekiğinde insan atığından enerji üretimi üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. BFC gelişiminde R&D'nin çabaları geniş bir alana ilham vermiştir. Metan ve üre gibi çeşitli substratlardan enerji üreten BFC oluşturulmuş ve belirli aralıklarla test edilmiştir. İlk enzim tabanlı BFC, yakıt olarak glikoz ve anot katalizörü olarak GOx'ın kullanımı 1964'te bildirilmiştir (Yahiro vd., 1964; Kim Vd., 2006). Palmore ve Whitesides, 1994 yılında önemli bir giriş yaptıktan sonra 1985 ve 1992 yılları arasında yapılmış foto-MFC deneylerini de içeren mikrobiyal ve EFC ile ilgili çalışmalarının bir özetini yayınlamışlardır. Palmore ve ekibi enzimleri tek-tabakalı veya çok-tabakalı şeklinde yeniden yapılandırılarak ve bağlayıcı kofaktörleriyle kullanarak biyosensör elektrotlarına bağlanması için uygulanacak metotları araştırmışlardır (Palmore and Whitesides, 1994). 1998 yılında da mikroperoksizazı altın katot üzerine immobilize ederek, GOx ve kinon ile katodu modifiye ederek bir yakıt hücre tasarlamışlardır (Willner vd., 1998a,b). Katz ve ekibi 1999 yılında bir yakıt hücrede, anot ile katodu yarı geçirgen bir membran ile ayırmanın zorunlu olmadığını göstermişler ve yine aynı sene içerisinde GOx ile immobilize edilmiş anot ve sitokrom c oksidaz bağlanmış katottan oluşan bir BFC oluşturmuşlardır (Katz vd., 1999b). 1999'da Cosnier daha çok biyosensör açısından

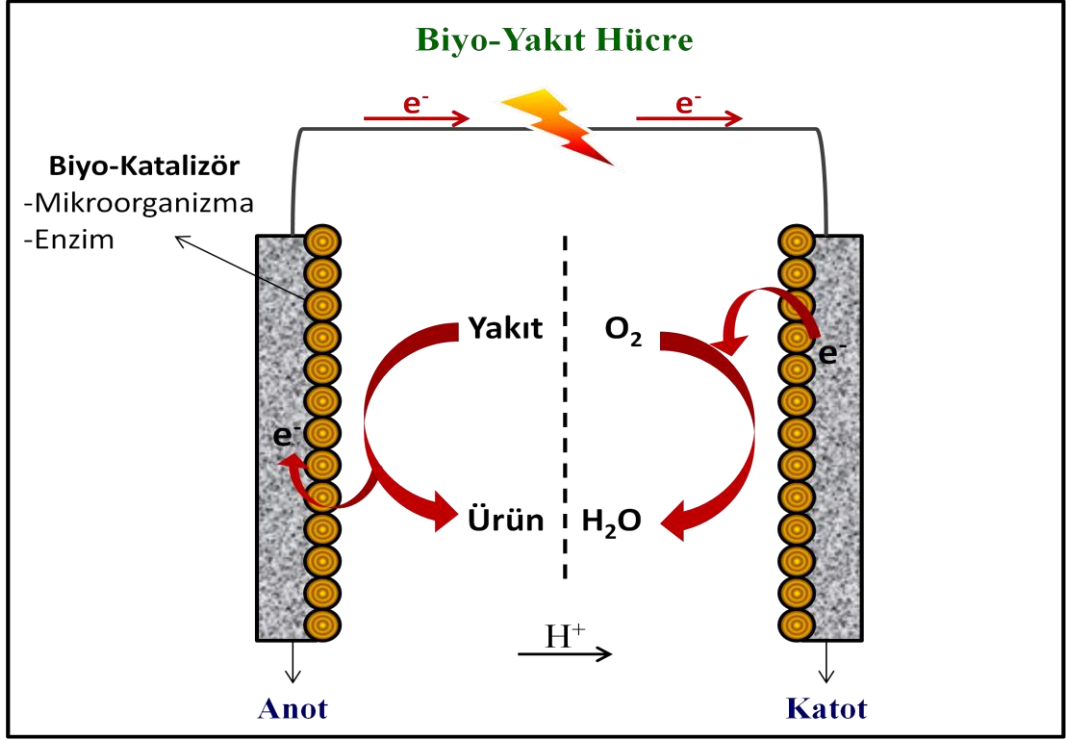
yaklaşımlarda bulunmakla birlikte biyo-moleküllerin elektrot yüzeylerine tutuklanması ya da elektrokimyasal polimerizasyonla oluşturulmuş filmlere bağlanması konusunda çalışmalar yapmıştır (Cosnier, 1999).

Son yıllarda BFC çalışmalarında atılan en büyük adım medyatör kullanımıyla sağlanan elektron transferi (MET) yerine DET sağlayan sistemin tasarlanması olmuştur. DET sistemi daha önce bazı elektro-analitik uygulamalarda yer alsa da BFCs'inde ilk olarak 2006 yılında uygulanmıştır. Bu çalışmalar, Lac kullanılarak oksijenin indirgendiği biyo-katod geliştirilmesi (Yan vd., 2006), BOD kullanılarak oksijenin indirgendiği biyo-katod geliştirilmesi (Duma and Minteer, 2006) ve GOx kullanan biyo-anot geliştirilmesi (Ivnitski vd., 2006) konuları ile literatürde yer almıştır.

Ulaşılan bir diğer büyük gelişme immobilize edilen enzimlerin aktif yaşam sürelerinin uzatılması olmuştur. Tampon çözelti içerisinde 8-20 saat kadar aktif yaşam sürelerinin olduğu bilinen enzimlerin ömürleri hapsetme (tuzaklama) yoluyla elektrot yüzeyine tutuklanması, kimyasal bağlanma ve çapraz-bağlanma yöntemleri kullanılarak 7-20 güne kadar uzatılabilmektedir (Kim vd., 2006). Günümüzde enzimlerin aktivitesi misel yapısındaki polimerler içine hapsetme yöntemiyle 1 yıla kadar uzatılabilmektedir. Bu tip polimerler fiziksel olarak enzimi hapsederek, sağlanan biyo-uyumlu hidrofobik ortamda enzimi denaturasyondan korurlar (Moore vd., 2004; Topcagic vd., 2004; Akers vd., 2005; Büyüknohutçu, 2009).

2.3.2. Biyo-yakıt hücrelerinin çalışma prensibi

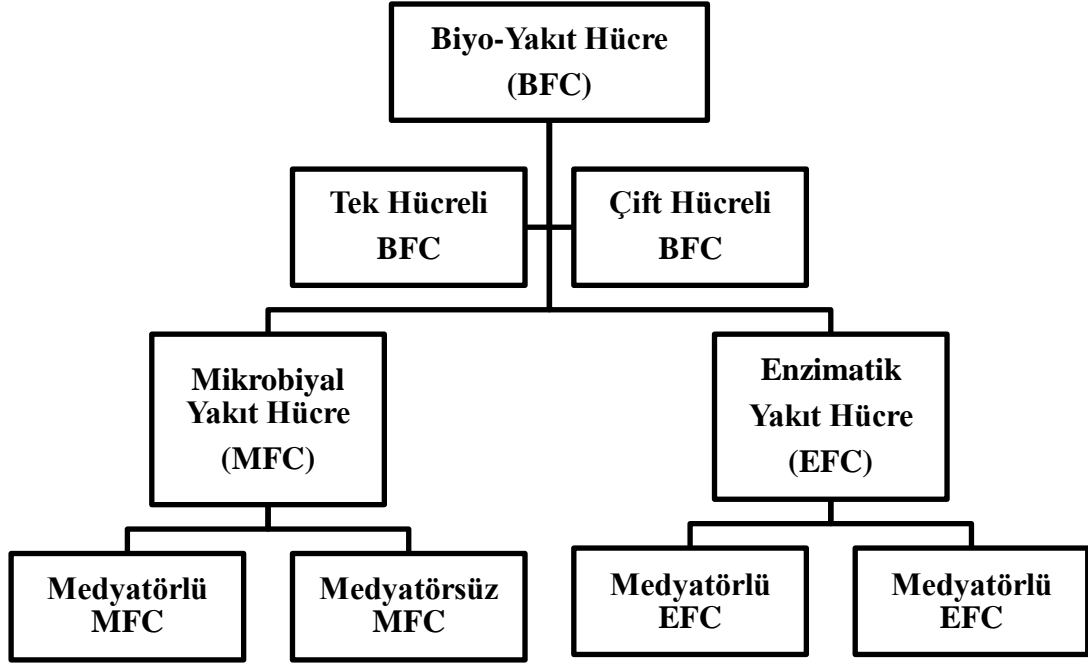
BFCs, yenilenebilir kaynaklardan uygun substratlar kullanarak biyokatalizörlerin yardımıyla biyo-kimyasal metabolik yol üzerinden elektrik enerjisi ile birlikte zararsız yan ürün oluşturan aygıtlardır (Mohan vd., 2008). Şekil 2.3'te bir BFC'nin çalışma mekanizması şematik olarak gösterilmiştir.



Bir BFC'de anot ve katot olmak üzere iki bölüm bulunmaktadır. Bunlardan anot bölümdeki anot elektrotta yakıt, biyolojik bileşen (mikroorganizma veya enzim) üzerinde yükseltgenir (oksidasyon) ve açığa çıkan elektronlar doğrudan ya da medyatör yardımıyla katot bölümdeki katot elektroda transfer olur. Pozitif yük ise elektrolit içerisinde katoda geçerek anottan gelen elektron ve oksijenle birleşerek su oluşturur ve böylece devre tamamlanarak elektrik üretilmiş olur.

2.3.3. Biyo-yakıt hücrelerinin türleri

BFC'ler temelde "MFC'ler" ve "EFC'ler" olmak üzere ikiye ayrılır. Bunların her biri yine kendi içlerinde elektron transferine aracı olarak medyatör kullanılıp kullanılmadığına göre de medyatörlü ve medyatörsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Bazı durumlarda BFCs yukarıdaki sınıflandırmaların yanında, yine onları da kapsayacak şekilde tek hücreli ve çift hücreli olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 2.4).



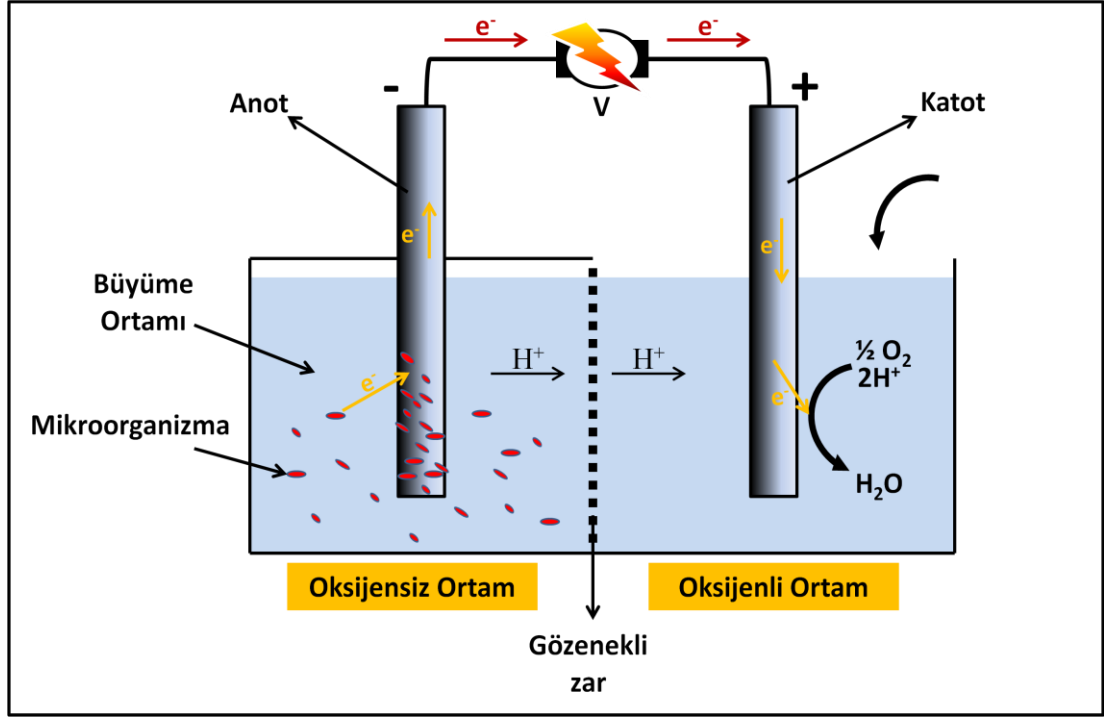
Şekil 2.4. BFC türlerinin şematik gösterimi

2.3.3.1. Mikrobiyal yakıt hücresi

BFCs’de mikroorganizmaların kullanımı özgün enzimlerin izolasyonunu ortadan kaldırır böylece biyolojik yakıt hücreleri için ucuz substratlar sağlar (Mohan vd., 2008).

MFCs’de kullanılan mikroorganizmalar, bünyesinde birden çok enzim ve substrat sistemi barındırdığından, bu organizmaların bir yakıt hücresinde kullanımı, enzimlerin tek başına yakıt hücre sistemlerinde işleyişine oranla daha yüksek bir verim sağlamaktadır. Çünkü tek başlarına kullanımlarında, enzimlerin ihtiyaç duyulan yalıtım problemi ortadan kalkmaktadır. Organizmaların bünyesinde bu biyo-aktif materyaller kendi doğal ortamlarında ve optimum koşullarda çalışmaktadırlar (Katz vd., 2003; Bullen vd., 2006; Büyüknohutçu, 2009).

MFC’ler, mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sayesinde biyo-kütleyi elektrik akımına dönüştüren biyo-elektrokimyasal cihazlardır (Ieropoulos vd., 2005). Bir MFC, oksijensiz anot bölümü, oksijenli katot bölümü ve bir katyon değiştirici olmak üzere 3 önemli kısımdan oluşur. Şekil 2.5’te MFC gösterilmiştir.



Şekil 2.5. MFC'nin çalışma prensibi

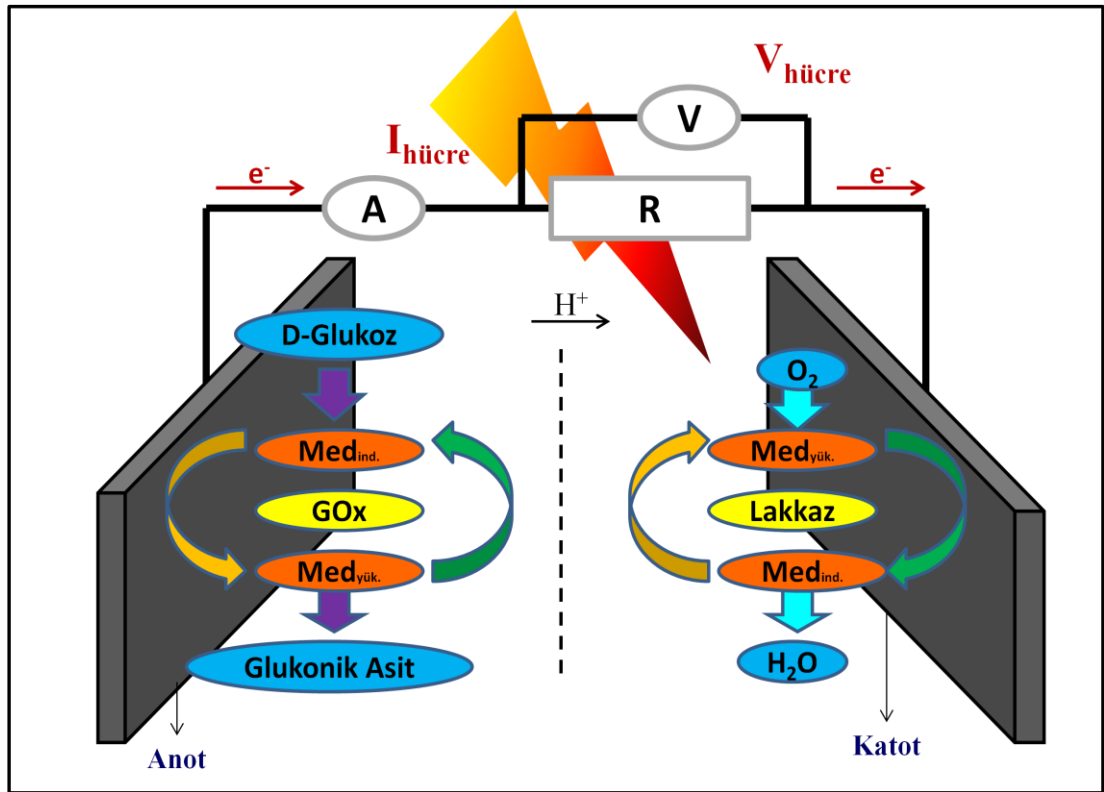
Anot bölüm, uygun mikroorganizmaların yetişmesi için gerekli bütün şartların sağlandığı gelişim kompartımanıdır (Kim vd.,2002). Bölüm, MFC'nin anodu olarak görev alan elektrot, organizma ve büyüme ortamı ile beslenir. Bu bölümdeki bakteriyal gelişim, metabolik reaksiyonlar boyunca gerekli olan elektronları ve protonları üretir (Liu ve Logan, 2005).

Katot bölüm; protonlar, oksijen molekülleri ve kullanılmış (etkisiz) elektronlar için yeniden birleşim kompartımanıdır. Katot bölüm; kullanılmış elektronlar, protonlar ve oksijen molekülleri arasındaki reaksiyonu katalizleyen platin yada karbon elektrottan meydana gelir (Oh vd., 2004).

Katyon değiştirici, reaksiyonun tamamlanması için anot ve katot bölümleri arasında ara duvar (bölme) olarak görev alır. En yaygın kullanılan katyon değiştirici Nafion zardır ki bu bir proton değiştirici zar olarak hareket eder. Proton değiştirici zarlar floropolimer (florin içeren polimer) zarlardır ki bunlarda protonlar, daha düşük bir indirgenme potansiyel bölgesinden daha yüksek bir indirgenme potansiyel bölgesine transfer edilir (Kim vd., 1999). Bu amaçla kullanılan diğer katyon değiştiriciler; diyaliz zarları, tuz köprüsü, karbon kağıtlar, likit nafyon katman vb'dir (Min vd., 2005).

2.3.3.2. Enzimatik yakıt hücresi

EFC'ler, katalizör olarak spesifik enzimleri kullanarak kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürürler. Enzimatik yakıt hücreleri taşınabilir cihazlar veya biyo-medikal cihazlar için güç kaynağı olarak güçlü adaylardır. Yükseltgen olarak oksijenin ve yakıt olarak glikozun kullanıldığı, enzimler ile çalışan BFCs'in geliştirilmesinde yeni bir eğilim vardır (Kendall, 2002; Robert, 2002). En çok karşılaşılan EFC'lerinden biri olan "glikoz/O₂" EFC'de; glikoz anotta, GOx enzimi tarafından glukonolaktone elektronik olarak yükseltgenirken oksijen molekülü katotta, BOD veya Lac gibi spesifik enzimler tarafından suya indirgenir (Zebda vd., 2009). Şekil 2.6'da EFC'nin çalışma prensibi gösterilmiştir.



Şekil 2.6. EFC'nin çalışma prensibi

Enzim tabanlı yakıt hücreleri, yenilenebilir katalizöre sahip olma, yakıt çeşitliliği, oda sıcaklığı ve basıncı gibi normal koşullarda çalışabilir olma ve benzeri özellikleriyle enerji dönüşümü için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Buna rağmen, bu tip yakıt hücreleri kısıtlı ömür, düşük güç yoğunlukları ve daha az etkili yakıt oksidasyonu gibi kısıtlamalara da sahiptir. Bilim ve teknolojinin EFC alanında üzerinde yoğunlaştığı çalışmalar bu tip kısıtlamaları ortadan kaldırmaya yöneliktir ve

hedef daha uzun ömürlü, daha yüksek güç yoğunluklu EFC'lerdir (Minteer vd., 2007; Büyüknohutçu, 2009).

MFC'lerde kullanılan mikroorganizmalar bünyesinde birden çok enzim ve substrat sistemi barındırırken EFC'lerde enzim, tek başına katalizleyeceği hedef substrat (ya da yakıt) için spesifik olarak seçilebilmesi, yakıt hücre sistemlerinde membran ihtiyacını kaldırabilmesi ve çeşitli durumlarda daha yüksek verimlere ulaşılabilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır (Katz vd., 2003; Büyüknohutçu, 2009).

EFC'lerin en etkili uygulaması güçlü implantlardır. Enzim gibi biyokatalizörler, sıcaklık ve pH gibi çeşitli uygun biyolojik şartlar altında etkili redoks reaksiyonları yapabilirler ve canlı hücrelerde bir dizi reaksiyonu gerçekleştirebilen biyolojik olarak uygun türlerdir. Katalizör olarak enzimlerin kullanımı böyle şartlar altında güçlü avantajlara sahiptir çünkü soy metal katalizör kullanılması durumuna kıyasen organizmaya implant olarak uygulanabilirler. Ek olarak, genellikle biyokatalizörler nötrale yakın pH ve biyolojik olarak uygun sıcaklıklarda (25-50 °C) yüksek aktiviteye sahiptir. Bu yüzden biyo-katalitik elektrotların fizyolojik sıvılardan yalıtılması veya ayrılması gerekmez. Bu sayede daha basit hücre dizayn edilebilirken hemde konveksiyon (aktarım) ortamının varlığından dolayı kütle transfer oranlarını yükseltmeye yardımcı olur (Barton vd., 2004; Lee vd., 2011).

2.3.4. Biyo-yakıt hücrelerinin uygulama alanları

Alternatif enerji olarak BFC'lerin gelişimi üzerine yoğun çalışmalar yapılması, gelecekte ilerleyen teknolojiyle beraber birçok alanda kullanımına olanak tanyacaktır. Bu uygulama alanları; ulaşım, taşınabilir cihazlar, sensörler, mikroçipler, implant edilebilen cihazlarda güç kaynağı, sensörler, atık su arıtılarak enerji üretimi, robotlar ve daha değişik alanları da kapsayan çok geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır.

Yakıt olarak karbonhidratların kullanıldığı BFC'ler geliştirildiği takdirde bu alanda enerji problemleri de en aza indilecektir. 1L derişik karbonhidrat çözeltisinin (Glikoz) bir arabaya 25-30 km gidebilecek kadar güç sağlayabileceği hesaplanmıştır (Shukla vd., 1999). Bu gibi alanlarda BFC kullanımı çevresel problemleri ortadan

kaldıracağı gibi, trafik kazaları sonucu yakıtın taşınımından doğan yangın tehlikesini de ortadan kaldıracaktır (Büyüknohutçu, 2009).

BFC'ler içinde özellikle EFC'lerin minyatürüze edilebilme, nötral pH ve vucut sıcaklığında çalışabilme gibi avantajları vardır. Çalışması için gerekli yakıt ve oksijeni de yakın çevrelerinden sağlanabildiğinden canlı sistemlerde kullanılabilme potansiyelleri yüksek olan EFC'ler implant edilebilen medikal aletlerde güç kaynağı olarak kullanılabilirler. Örneğin, glikoz tayini için, anot olarak GOx ve katotta sitokrom c'nin kullanıldığı bir biyosensör, elektrik akımı üretmek üzere geliştirilmiştir. Bu proses 1-80 mM aralığında glikoz derişiminin ölçümü için biyosensör olarak kullanılabilir. (Katz vd., 2001; Büyüknohutçu, 2009).

Enerji ihtiyacını BFC'lerden sağlayan robotlar geliştirilerek insanların yaşayamadığı şartlarda kullanılması düşüncesi uzun yıllardır tartışılan bir konudur. Kendi enerji ihtiyacını kendi karşılayan Slugbot isimli robot bu alanda ilk örneklerden biridir. Salyangoz avlayan Slugbot, avladığı böcekleri yakıt olarak kullanarak bir MFC gibi davranıp kendi enerjisini kendisi üretebilmiştir (Kelly, 2003). Bir diğeri Chew-Chew olarak isimlendirilen robot besini tüketerek kendi enerjisini üretebilmektedir. (Davis ve Higson, 2007; Büyüknohutçu, 2009).

BFC'ler hem atık suların arıtılmasında hemde bu suyu arıtırken enerji elde edilmesinde kullanılabilir. İki faydalı amaç için gerçekleştirilecek bu prosedürde yapılan bir hesaba göre 150000 kişilik bir kasabanın atık suyu, potansiyel olarak %100 verimlilik varsayımı ile 2,3 MW'a kadar güç üretmek üzere kullanılabilir. Atık suyun kimyasal oksijen ihtiyacının yaklaşık %80 kadarı bir MFC'de arıtım ile uzaklaştırılabilir ve bu şekilde üretilen elektriğin ileride atık su arıtımına güç sağlamada da kullanılabilmesi olasıdır (Logan, 2005; Büyüknohutçu, 2009).

BFC'lerin gerçek uygulamalarında kısa ömür ve düşük güç yoğunluğu aşılması gereken en önemli problemdir. Bunları gidermek için önemli gelişmeler son 10 yıl içinde olmuştur. Örneğin GOx ve mikroperoksidaz-11, altın elektrot üzerine tek katmanda kaplayarak "glikoz/cumene" peroksit BFC oluşturulmuştur (Katz vd., 1999a). Projektif (izdüşümsel) elektrot bölgesine dayalı $4,1\text{mW}/\text{cm}^2$ ye eşdeğer $510\mu\text{W}$ 'lık bir güç çıkışı gözlenmiştir. Hacim veya alan başına güç yoğunluğu iyileşmesi ise minyatür "glikoz/O₂" BFC'ler ile başarılmıştır (Heller, 2004). Başka bir çalışmada bilirubin oksidaz ve GOx gibi enzimler karbon lifin yüzeyine

Osmyum içeren redoks polimerlere tuzaklanmış 1,63 mW/mm³'lük bir çıkış gücü başarılmıştır. Diğer bir çalışmada modifiye nasyon zarda tuzaklanan enzimler 45 gün boyunca aktivitesini sürdürmüştür (Minteer vd., 2004; Moore vd., 2004; Kim vd., 2006).

20 yıldır üzerinde çalışılan BFC'lerin performansı ile kıyaslandığında, son zamanlarda gelişen BFC'lerin güç yoğunluğu çok daha iyi düzeydedir. Bu gelişmeler BFC teknolojisini ticari uygulamalar yönünde bir adım daha ileri taşımıştır. Hatta 1mW/cm²'den daha fazla güç yoğunluğu ile zaten BFC'ler cep telefonu şarjının yapımı için yeterli güce sahiptir (Narayanan ve Valdez, 2003; Schroder vd., 2003; Niessen vd., 2004a,b; Kim vd., 2006).

Çizelge 2.2. EFC uygulamaları

Yakıt/Yakıt Anot/Katot	Enzimler Anot/Katot	Medyatörler Anot/Katot	Güç Yoğunluğu (µW/cm²)	Yakıt Konsantrasyonu (mM)	Kaynaklar
Glikoz/O ₂	GOx/COx, Sitokrom c	PQQ/-	5	1	Katz vd., 1999b
Glikoz/O ₂	GOx/Lac	Ferrosen/-	15,8	10	Zhao vd., 2009b
Glikoz/O ₂	GOx/BOD	HQS/ABTS	42	10	Habrioux vd., 2008
Glikoz/O ₂	GOx/Lac	TFF/ABTS	7	15	Nazaruk vd., 2008
Glikoz/O ₂	GOx/Lac	Os polimer/Os polimer	137-350	15	Chen vd., 2001; Mano vd., 2003; Soukharev vd., 2004
Glikoz/O ₂	GOx/BOD	Os polimer/Os polimer	50-480	15	Kim vd., 2003; Mano ve Heller, 2003; Mano vd., 2003; Mano vd., 2004
Glikoz/H ₂ O ₂	GOx/MP-11	PQQ/-	160	1	Willner vd., 1998a
Glikoz/H ₂ O ₂	GOx/HRP	Ferrosen/Ferrosen	0,15	1	Pizzariello vd., 2001
Glikoz/O ₂	GDH/Lac	Azino boya/-	58/38,7	45/60	Li vd., 2008; Zhou vd., 2009
Glikoz/O ₂	GDH/BOD	Azino boya/-	52/53,9	40	Gao vd., 2007; Li vd., 2009
Glikoz/O ₂	GDH/BOD	VK ₃ /Ferrisiya nit	1450	400	Sakai vd., 2009
Glikoz/O ₂	CDH/-	Os polimer/-	157	100	Tasca vd., 2008
Laktoz/O ₂	CDH/Lac	Os polimer/Os polimer	1,9	34	Stoica vd., 2009

Çizelge 2.2.^(devam)

Yakıt/Yakıt Anot/Katot	Enzimler Anot/Katot	Medyatörler Anot/Katot	Güç Yoğunluğu ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Yakıt Konsantrasyonu (mM)	Kaynaklar
Fruktoz/O ₂	FDH/Lac	-/-	850	200	Kamitaka vd., 2007
Fruktoz/O ₂	FDH/BOD	-/-	126	200	Wu vd., 2009
Metanol/O ₂	ADH/-	Benzilviyolojen/-	670	100	Palmore vd., 1998c
Etanol/H ₂ O ₂	PQQ-ADH/AOx MP-8	-/-	1,5	25	Ramanavicius vd., 2008
Etanol/O ₂	ADH AldDH/BOD	Poly(Metilen yeşili)/Ru(bpy) ₃	460	1	Topcagic ve Minteer., 2004
Gliserol/O ₂	PQQ-ADH PQQ-AldDH/OOx	Poly(Metilen yeşili)/-	1320	100	Arechederra ve Minteer, (2009)
Pirüvat/O ₂	PDH/-	Poly(Metilen yeşili)/-	930	100	Sokic-Lazic vd., 2009

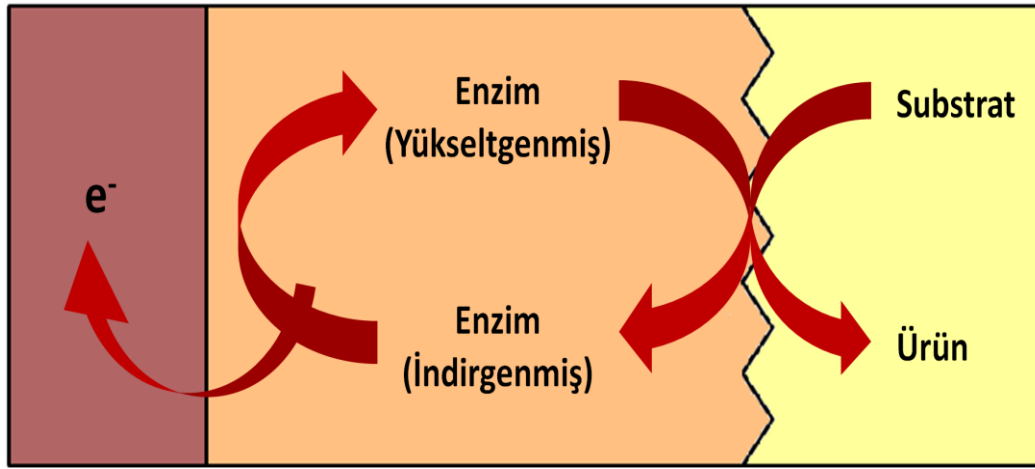
2.3.5. Biyo-yakıt hücrelerinin avantaj ve dezavantajları

- EFC'ler daha küçük uygulamalara olanak verecek, bu sayede küçük cihazlarda kullanılabilir ve gündelik yaşama daha kolay adapte edilebileceklerdir.
- Spesifik olma özelliğinden dolayı geleneksel yakıt hücrelerindeki membran gereksinimi ortadan kalkmaktadır.
- Biyokatalizörler, geleneksel ve kıymetli metal katalizörlerden daha avantajlıdır. Nötral pH ve düşük sıcaklık gibi ılıman koşullarda çalışabilirler.
- Bazı durumlarda çevreye zarar vermediği gibi aksine faydası olan bir enerji kaynağıdır.
- Mikroorganizmaların kullanıldığı yakıt hücrelerindeki çeşitli sıhhi tehlikeler enzimin spesifikliği sayesinde substrat ile doğrudan etkileşim söz konusu olduğundan önlenmektedir.
- Sınırlı enzim ömrü ve aktivitesi, bu tip yakıt hücrelerinin geliştirilmesi gereken yönlerindedir.
- Halen güç yoğunluğu ve çalışma kararlılığı koşullarında BFC'lerin performansı kimyasal (inorganik) yakıt hücrelerinin çok altında kalmaktadır (Kim vd., 2006; Büyüknohutçu, 2009).

2.3.6. Biyo-yakıt hücrelerinde elektron transferi

2.3.6.1. Doğrudan elektron transferi (DET)

BFC uygulamalarında en önemli gelişmelerden biri şüphesiz ki DET'dir. DET sayesinde medyatör kullanımı ortadan kalkarak enzim reaksiyonu sonucu oluşan elektronlar, ilave basamaklar olmadan elektrot ile enzim aktif merkezi arasında doğrudan olarak alınıp verilir. (Pas, 2007). Elektrot ile doğrudan elektron aktarımı yapabilme özelliğine sahip bazı enzimler bulunmaktadır (Allen ve Hill, 1987; Büyüknohutçu, 2009). Şekil 2.7'de DET şematik olarak gösterilmiştir.

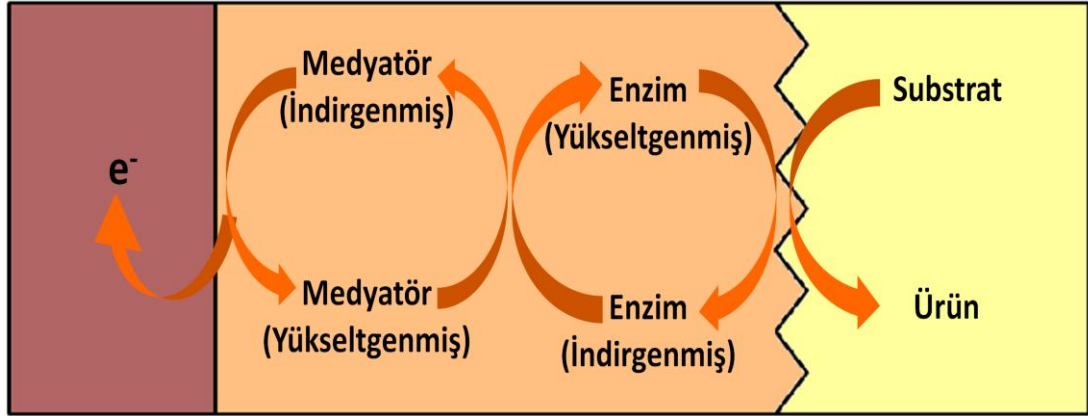


Şekil 2.7. DET'nin şematik gösterimi

Elektrot ve enzim arasında DET mikroperoksidaz içeren birkaç peroksidaz ve sitokrom c, Lac, hidrogenaz gibi yalnızca birkaç enzimle sağlanabildiği gözlenmiştir (Varfolomeec vd., 1996; Ghindilis vd., 1997; Schuhmann, 2002; Freire vd., 2003). Elektrot yüzeyi ile enzim aktif bölümünün yakın teması DET için kritiktir. Lac katalizörü ile oksijenin doğrudan elektro-indirgenmesi için elektrot yüzeyi ve enzim aktif bölümü arasındaki kritik uzaklık 20\AA olması önerilmiştir (Yaropolov vd., 1981). Bu kritik uzaklıktan daha fazla bir uzaklıkta tüm reaksiyon yavaşlar ki bu elektron iletimi karşısında hız belirleyici basamak olur, halbuki elektron iletimi daha kısa bir uzaklıkta yapılmış olsa enzim reaksiyon kinetiği bir hız belirleme basamağı haline gelerek daha etkili olabilir. Benzer bir durum ayrıca, kritik uzaklığı 18\AA olan horseradish peroksidaz (yaban turbu peroksidazı) için de söz konusudur (Kulys ve Samalius, 1984; Kim, 2006).

2.3.6.2. Medyatorlı elektron transferi (MET)

MET, enzim ile elektrot arasındaki elektron transferini hızlandırarak yakıt hücresindeki verimliliği ve güç yoğunluğunu artırmaktadır (Pas, 2007). Şekil 2.8’de MET şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8. MET'nin şematik olarak gösterimi

Medyatörler, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan elektronları alarak elektroda tedarik etmek için spesifik derişimlerde ortama eklenen redoks molekülleridir (Shukla vd., 2004). Aynı zamanda ilerideki hücre reaksiyonlarından bile daha düşük redoks potansiyeline sahiptir (Mohan vd., 2008).

Birçok durumda DET, enzim aktif bölümüne konuk olan yoğun ve yalıtkan protein kılıf tarafından sınırlanmıştır. Bu bariyerin aşılması için enzimler, kimyasal modifikasyon yoluyla iletken forma dönüşebilirler (Willner vd., 1996; Guiseppi-Elie vd., 2002; Zhao vd., 2002; Cai ve Chen, 2004). Diğer bir strateji ise, elektrotların yüzeyi ile enzim aktif bölümü arasında elektron mekiği gibi davranan ve elektronların taşınmasını kolaylaştıran redoks medyatorlarının kullanılmasıdır. Bu yaklaşım hem MFC hemde EFC'ler için çok önemlidir (Lewis, 1966; Govil ve Saran, 1982; Palmore ve Whitesides, 1994; Katz vd., 2003). Redoks reaksiyon zincirinde yakıttan elektron üretiminde medyatorlar, ilave bir reaksiyon basamağı oluştursalar bile BFC'lerin çok daha yüksek etkinliği genellikle gözlenmiştir. MET'teki en temel sorun, bir BFC'ye yakıtın sürekli beslenmesi gerekliliğinde medyatoründe sürekliliğini sağlamaktır (Kim vd., 2006).

Ayrıca enzim içerisinde dibe gömülü redoks merkez ile elektrotlar arasında elektron transferi yavaş olduğundan, oksijen ve hidrojen peroksit gibi yan substratların varlığı

elektron kaybına neden olmaktadır. Medyatörler, enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronları yan substratlarla etkileşime girmeden enzimden dış devreye veya çözeltiye elektron geçişi içinde kullanılabilirler. Medyatörler serbest oksijen sistemleri için gereklidir ve medyatörün seçimi önemlidir. Literatür incelendiğinde ferrosen ve kinon türevleri yaygın olarak kullanılan medyatörlerdendir (Willner ve Katz, 2000; Yu ve Sundmacher, 2007; Harper vd., 2008). Ferrosen (Long vd., 2009), quersetin (Chen vd., 2009), BZQ (Lau vd., 2003) ve bunlardan türetilen (Babkina vd., 2006) medyatörler girişimcilerin elenmesi ve algılama potansiyelini azaltması gibi ilave avantajlar sağlarlar. (Nien vd., 2010).

Medyatör kullanılan BFC sistemi kurulurken bazı önemli parametrelere dikkat etmek gerekir ki bunlar, uygun yakıt, enzim, medyatör ve elektrot kombinasyonunu sağlamaktır. Yakıt seçiminde yükseltgenme potansiyeli ve maliyet önemlidir. Medyatörün ise hızlı elektrokimyasal kinetiğe sahip olması, enzimle girişim yapmayacak yükseltgenme seviyesi ve kimyasal kararlılık gibi özellikleri barındırmalıdır. Ayrıca kullanılan yakıtın potansiyeline yakın bir potansiyelde redoks tepkimesine sahip medyatör seçimi güç yoğunluğunu artıracaktır (Liu ve Dong, 2007; Büyüknohutçu, 2009).

2.3.7. Biyo-yakıt hücre dizaynı

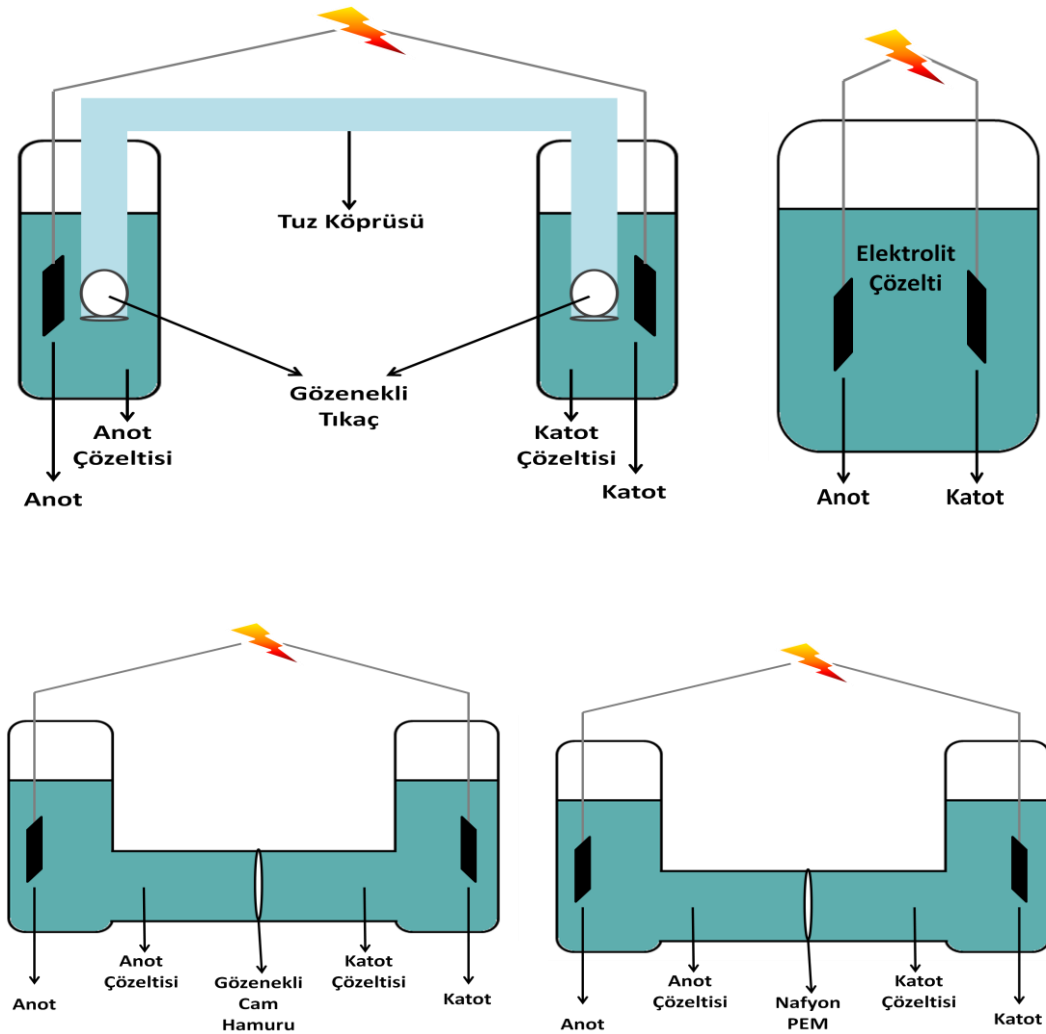
Biyo- yakıt hücreler kullanılan enzim, mikroorganizma, substrat ve malzemelere göre sistem performansının artırılması için farklı şekillerde dizayn edilebilir (Zhang vd., 2009; Fan vd., 2007; Osman vd., 2010).

2.3.7.1. Tek hücreli biyo-yakıt hücreler

İndirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinin gerçekleştiği anot ve katot elektrotların tek bir hücreye daldırılarak reaksiyonlarını sürdürdüğü yakıt hücre tipidir. Bu şekilde tasarlanan edilen BFC'de yakıt, oksidan ve elektrolit ortam birbirinden ayrılmaz. Bu şartların oluşturulmasında bazı nanoyapılardan faydalandığı (CNT vb.) gibi katot elektrodun aynı çözelti içerisinde olmasına rağmen zarla muhafaza edildiği çalışmalar da vardır (Klotzbach ve Minteer, 2007). Şekil 2.9'da tek hücreli BFC'ye örnek gösterilmiştir.

2.3.7.2. Çift hücreli biyo-yakıt hücreler

Bu tip BFC'lerde anot ve katot elektrotlar birbirlerinden cam tozu, tuz köprüsü, proton değiştirici zar vb. katyon değiştiricilerle (nafyon vb.) ayrılmışlardır (Klotzbach ve Minteer 2007; Mohan vd., 2008). Anot ve katot elektrotlarda reaksiyonlar aynı şartlarda gerçekleşmediği durumlarda bu ayırım söz konusudur. Bazen anotta oksijen istenmezken katot için gerekli olabildiği gibi anot ve katot elektrolitlerinin farklı olması gerekebilir yada kullanılan çeşitli malzemeler (medyator, nanoyapı) birbirine girişim yapabilir. Buda BFC'de güç kaybına yada çalışmamasına neden olabilir. Şekil 2.9'da çift hücreli BFC'ye örnekler gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Tek ve çift hücreli BFC'ye örnekler

2.3.8. Biyo-yakıt hücre performansı

Teorik olarak BFC'ler, yakıt ve oksitleyici temin edildiği sürece çalışmasını sürdürür ve enerji üretmeye devam eder. Ancak pratik uygulamalara geçildiğinde ise yakıt hücrenin performansı farklı olabilir; elektrot, elektrolit ve biyolojik bileşenin kalitesine bağlı olarak BFC performansı beklenen performanstan çok daha düşük olabilir (Erdal, 2008).

2.3.8.1. Yakıt hücresinde voltaj düşüş sebepleri

Yakıt pilinin karakteristik voltaj-akım (V-I) grafiğindeki akım arttıkça voltaj düşüşüne neden olan kayıplar aşağıda verilmiştir.

Aktivasyon kayıpları: Bu kayıplar elektrot yüzeyindeki reaksiyonların yavaş gerçekleşmesinden kaynaklanmaktadır.

Yakıt geçişi ve içsel akımlar: Bu kayıplarda elektrolitten katot tarafına geçen yakıt katot tarafında elektrokimyasal reaksiyona girerek bölgesel kısa devre oluşturmasından ve ideal olarak sadece iyon geçirmesi gereken elektrolitin aynı zamanda bir miktarda elektron geçirmesinden kaynaklanmaktadır.

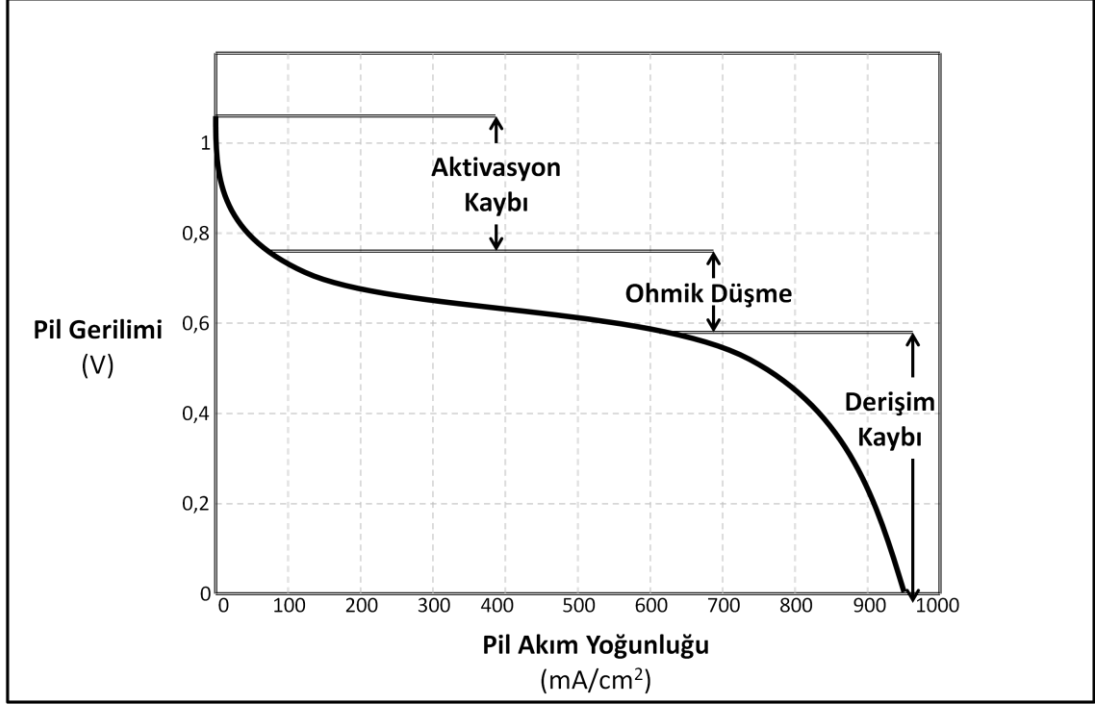
Ohmik kayıplar: Bu kayıplar elektrot malzemelerinin, akım toplayıcı vb. malzemelerin elektron geçişine ve elektrolitin iyon geçişine olan direncinden kaynaklanmaktadır. Ohmik kayıplar akım yoğunluğu ile doğru orantılıdır.

Kütle taşınımı ya da derişim kayıpları: Bu kayıplar elektrot yüzeyinde yakıt ve oksijen derişiminin değişmesinden kaynaklanmaktadır. Özellikle yüksek akım yoğunluklarında katalitik yüzeyde reaksiyon çok hızlı olduğu için gözenekli elektrot yapısından dolayı katalizör yüzeyine yeterince malzeme taşınmamaktadır. Bu nedenle reaksiyon için gerekenden daha az yakıt veya oksijen olması gerektiği kadar voltaj üretilmemesine neden olmaktadır (Kurtcephe, 2006).

2.3.8.2. Polarizasyon eğrisi

Genel olarak yakıt hücrelerinde sistem verimliliği yakıttan ne kadar güç elde edildiğine bağlıdır. Daha fazla güç eldesi daha fazla akım çekmek anlamına gelir ki

bu da yakıt hücresindeki kayıpları artırarak verimin düşmesine yol açar. Kayıplar genelde hücrede voltaj düşüşü olarak kendini gösterir. Hücre potansiyelindeki düşüş verimle ilişkilendirilebildiğinden, yakıt hücre polarizasyon eğrileri hücre verimliliği hakkında önemli göstergelerdir (Büyüknohutçu, 2006; Kurtcephe, 2006). Şekil 2.10'da yakıt hücre polarizasyon eğrisi örneği gösterilmiştir.

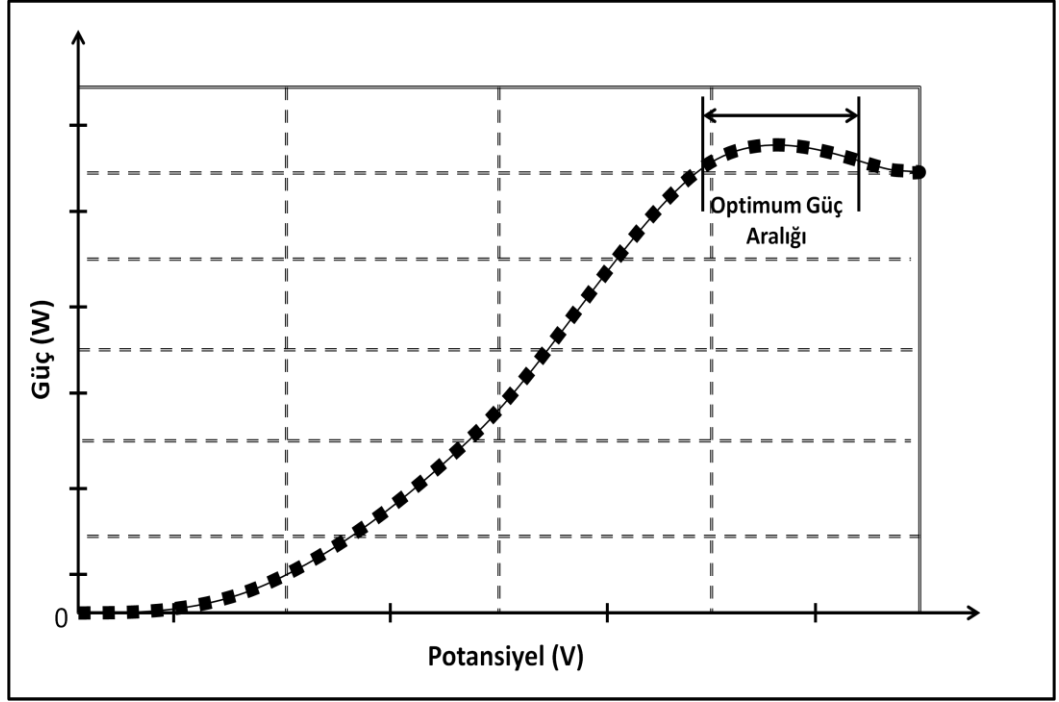


Şekil 2.10. Yakıt hücre polarizasyon eğrisi

Yakıt hücresi çalıştığında elde edilen voltajın, teorikteki değerden epeyce küçük olduğu görülür. Yakıt hücrenin karakteristik voltaj-akım (V-I) grafiğindeki akım arttıkça voltaj düşüşüne neden olan kayıplar Şekil 2.10'da görülmektedir.

2.3.8.2. Güç yoğunluğu

Bir yakıt hücreden elde edilen elektriksel güç voltaj ve akımın çarpımına eşittir. Yakıt hücre polarizasyon eğrisi potansiyel ve akım arasındaki ilişkiyi verdiği için güç eğrisi türetmek için kullanılabilir. Polarizasyon eğrisinin altında kalan alan anlık güç değerini verir. Şekil 2.11'de bir yakıt hücrenin güç eğrisi verilmiştir.



Şekil 2.11. Yakıt hücre güç eğrisi

2.4. Enzim

Kendiliğinden gerçekleşmeyen reaksiyonların belirli bir hızda gerçekleşebilmeleri için katalizlenmeye ihtiyaçları vardır. Katalizörler, substratın kimyasal olarak başka bir maddeye dönüşümünü sağlamak için gerekli enerji bariyerini düşüren moleküllerdir. Katalizörler reaksiyon sırasında harcanmazlar ya da değişime uğramazlar. Prensipinde substratın ürüne dönüşümünde sınırsız olarak kullanılırlar, ancak pratikte bu katalizörün stabilitesiyle sınırlıdır (Illanes, 2008; Bilge, 2010).

Enzimler ise protein yapısında canlı organizmalarda meydana gelen biyo-kimyasal reaksiyonlar sırasında tüketilmeyen katalizörlerdir. Organizmadaki çeşitli moleküllerin yapımını, yıkımını ve yeniden düzenlenmesini sağlayan reaksiyonları hızlandırarak; organizmaların fonksiyonlarını ve canlılığını sürdürmesi için gerekli enerji ve maddeleri sağlarlar. Enzimler enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyon arasında substratları seçici olarak belirli bir reaksiyona yönlendirirler. Böylece enzimler bütün metabolik olayları yönlendirirler (Chanp ve Harvey, 1997). Enzimleri, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan “biyokatalizörler” olarak da tanımlayabiliriz. Bununla

birlikte; yeterli koşullar sağlandığında etkilerini canlı organizma dışında da gösterebilmeleri, doğal ortamlarının dışında pek çok alanda yararlanabilme imkânını ortaya çıkarmaktadır (Chanp ve Harvey, 1997; İçli, 2008).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni: mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok daha yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha istikrarlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (İçli, 2008).

Çizelge 2.3. BFCs’de kullanılan indirgeyici/yükseltgeyici enzimler (Beilke vd., 2009)

Yakıt	Enzim	Kofaktör
<u>Anot</u>		
Metanol	Alkol Dehidrogenaz	NAD ⁺
Formaldehit	Formaldehit Dehidrogenaz	NAD ⁺
Format	Format Dehidrogenaz	NAD ⁺
Etanol	Alkol Dehidrogenaz	NAD ⁺
Asetaldehit	Alkol Dehidrogenaz	PQQ
	Aldehit Dehidrogenaz	NAD ⁺
	Aldehit Dehidrogenaz	PQQ
Glikoz	Glikoz Oksidaz	FAD
	Glikoz Dehidrogenaz	NAD ⁺ /PQQ
	Glikoz Dehidrogenaz	PQQ
Fruktoz	Fruktoz Dehidrogenaz	NAD ⁺
Laktat	Laktat Dehidrogenaz	NAD ⁺
<u>Katot</u>		
Oksijen	BOD	Bakır
	Lakkaz	Bakır
Peroksit	Horseradish Peroksidaz	Heme
	Mikroperoksidaz-11	Heme

2.4.1. Enzim yapısı ve spesifikliğı

Enzimler yüzlerce amino asidin meydana getirdiğı proteinlerdir. Bu amino asitler birbirlerine peptid bağı ile kovalent olarak bağlanmışlardır. Radikal grubunun özelliğine göre amino asitler hidrofilik ya da hidrofobik özellik gösterebilirler. Amino asitlerin protein molekülü üzerindeki dağılımları molekülün davranışını

belirler. Proteinlerin birincil yapısını amino asit dizilimi belirler. Birincil yapıyı belirleyen amino asitlerin dizilimi ise yapıdaki deoksiribonükleotid dizilimi ile belirlenir. Proteinin üç boyutlu yapısı genetik olarak belirlenir fakat ortamdaki moleküllerle de etkileşim içinde olduğundan çevresel faktörlerden de etkilenir. Proteinin ikincil üç boyutlu yapısı hidrojen bağları etkileşimleri sonucu oluşur. Tersiyer üç boyutlu yapı hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler ile sıkı ve sarmal bir konfigürasyon oluşturmaları sonucu oluşur. Proteinin biyolojik fonksiyonu için tersiyer yapı temeldir. Kuaterner yapı ise farklı polipeptid zincirlerinin etkileşimi sonucunda oluşur . Düzenleyici proteinlerinde içinde olduğu bazı enzimler kuaterner üç boyutlu yapıya sahiptir. (Bugg, 2004; Bilge, 2010).

Enzimlerin çok azı belirli bir substrat için spesifiktir. Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki edebilirler. Örneğin, üreaz sadece üreye, karbonik anhidraz karbonik aside ve fumaraz yalnız fumarik aside etki eder. Enzimlerin bazıları ise stereo spesifiklik gösterirler. Bunlar substratlarının stereo izomerlerine etki etmezler. Örneğin arginaz sadece L-arginini hidroliz eder, D izomerine etki etmez. Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir boşluk bulunur. Aktif bölge substratın yapısına spesifik aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge, yalnızca bu substratı bağlayarak bir enzim substrat (ES) kompleksi meydana getirebilir (İçli, 2008).

2.4.2. Enzim sınıfları ve isimlendirilmesi

Her enzime iki isim verilmiştir. Birincisi, günlük kullanım için olan kısa, önerilen isimdir. İkincisi, enzimin detaylı olarak tanımlanması gerektiğinde kullanılan daha kapsamlı sistematik isimdir (Chanp ve Harvey, 1997). Önerilen isim oluşturulurken reaksiyonun substratına, örneğin “glikozidaz”, “üreaz”, “sükraz” veya yapılan işin tanımına, “laktat dehidrojenaz”, “adenilat siklaz” gibi “az” eki eklenmiştir (Chanp ve Harvey, 1997). Enzimler etkili olduğu substratın sonuna “litik” eki getirilerek de isimlendirilirler. Örneğin proteinleri parçalayan enzimlere “proteazlar” denildiği gibi “proteolitik enzimler” de denilir. Uluslararası Biyo-kimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), enzimlerin her birinin sayısız alt grup içeren altı ana sınıfa bölüdüğü bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir. IUBMB isimleri net ve bilgi vericidir fakat genel kullanım için oldukça zordur (Chanp ve Harvey, 1997; İçli, 2008).

Enzimler başlıca altı sınıfa ayrılır. Bunlar kısaca şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalize eden enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer tepkimesini katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağlarını hidrolizler ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerizasyon tepkimelerini katalizlerler.
6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Telefoncu ve Dinçkaya, 1997).

2.4.3. Enzimlerin etki mekanizması

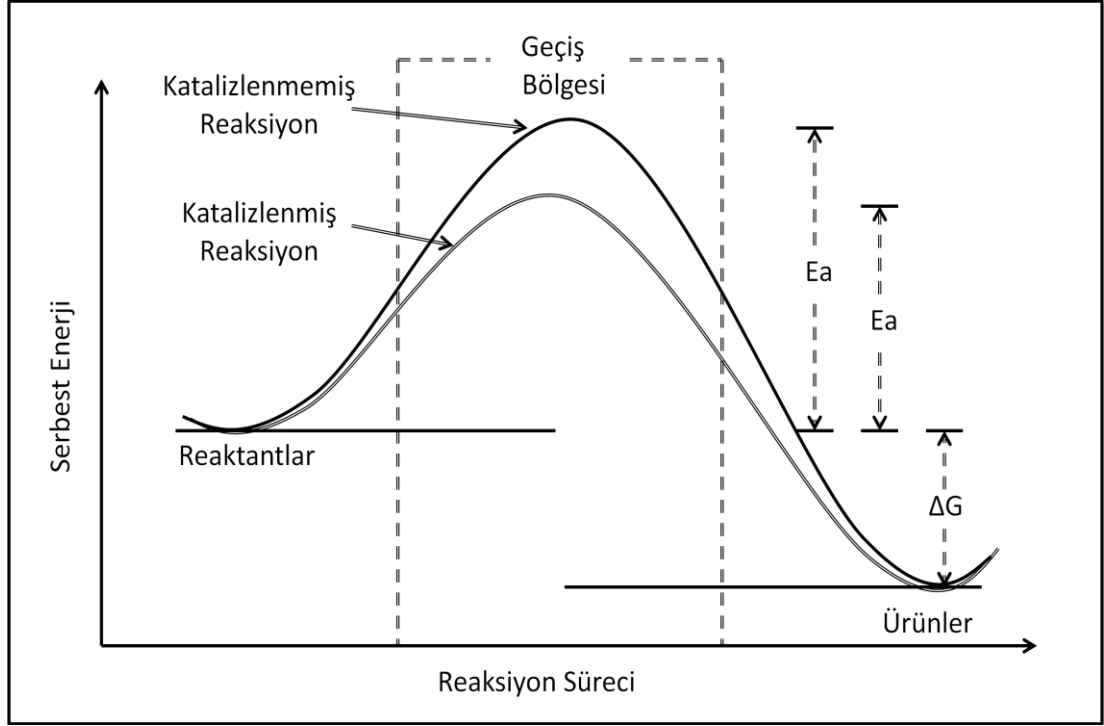
Enzimlerin katalitik etki gösteren kısmı proteinin polipeptid zinciridir. Bir çok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için proteinden başka metal iyonuna, bazılarının protein olmayan bir organik bileşiğe, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak “kofaktör” adı verilir. Enzimlerin protein kısmına “apoenzim” denir. Organik bileşik, enzimin protein kısmı ile kovalent bağla bağlı ve ayrılmıyorsa “prostetik grup” çok sıkı birleşmemiş, ayrılabilirse “koenzim” adını alır. Koenzimi ile birleşik halde bulunan apoenzim-koenzim bütününe “haloenzim” adı verilir. Yani haloenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdaki halidir. Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyonları aynı olan enzimlere “izoenzim” veya “izozim” adı verilmektedir. Örneğin pirüvik asidin laktik aside dönüşümünü katalizleyen laktat dehidrogenaz enziminin 5 tane izoenzimi vardır. Enzimin spesifik olarak etki ettiği maddeye veya madde karışımına bu “enzimin substratı” denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “ürün” adı verilir (İçli, 2008).

Enzimlerin aktif merkezi yoğun protein kılıf tarafından sarılmıştır. Aktif merkez, enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölgede bulunur. Enzimlerin etki mekanizması iki farklı açıdan ele alınabilir. Bunlardan birincisi tepkime süresince gerçekleşen enerji değişikliklerinin, diğeri ise kataliz sırasında aktif bölgedeki yapısal değişikliklerin incelenmesi ile ilişkilidir (Köklükaya, 2008).

2.4.3.1. Aktivasyon enerjisi

Moleküllerin birbirleri ile tepkimeye girerlerken dışarıdan enerji alırlar yada dışarıya enerji verirler. Dışarıdan enerji gerektiren (ekzotermik) kimyasal tepkimelerde aktivasyon enerjisi (E_a) olarak bir enerji bariyerinin aşılması gerekmektedir. Tepkime hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Katalizör substrat ile ES kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir. Tepkime sonunda serbest kalan enzim ortamdaki diğeri substrat moleküllerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini düşürecek ve onlarında ürüne dönüşümünü hızlandıracaktır. Enzimle katalizlenen tepkimelerin çoğu katalizlenmeyen tepkimelere göre çok daha hızlı olarak gerçekleşir. Tipik olarak bir enzim molekülü saniyede 100-1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir (Tekman ve Öner, 1994; Tüzün, 1997; Köklükaya, 2008).

Şekil 2.12'de katalizör mekanizması gösterilmiştir. E_a , katalizlenmemiş reaksiyonun aktivasyon enerjisi; E_a' , katalizlenmiş reaksiyonun aktivasyon enerjisi; ΔG , reaksiyonun serbest enerjisindeki değişim (Illanes, 2008; Bilge, 2010).



Şekil 2.12. Reaksiyon sürecinde serbest enerji değişimi

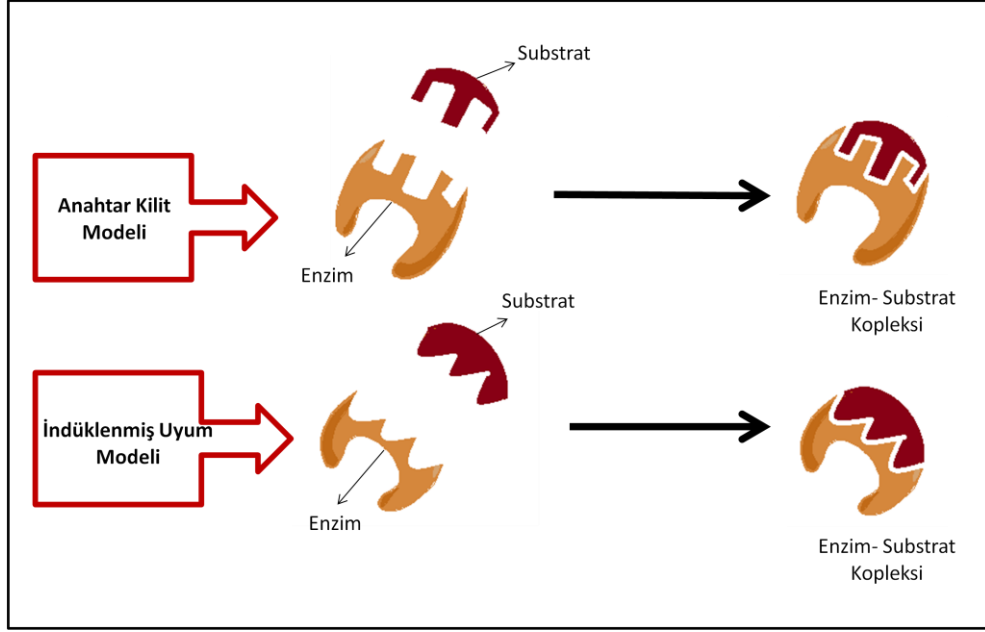
2.4.3.2. Aktif bölgedeki değişiklikler

Aktif merkez, bir enzimin substrata yapıştığı bölge ile kataliz olayının gerçekleştirildiği bölge (katalitik yer) olmak üzere 2 kısımdan oluşur.

Aktif merkez substrata uyumlu olan üç-boyutlu yüzey oluşturan aminoasit yanzincirleri içerir. Aktif merkez ile substrat, bir anahtar kilit gibi birbirine uygunluk gösterir. Bu şekil Emil-Fischer'in tarif ettiği "anahtar-kilit" modeli durumuna uyar (Şekil 2.13). Enzim ile substratın buluşmasından sonra enzimin özel yapısını almasıyla substrat aktif bölgeye bağlanır ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Substrat ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır. Bir enzimatik tepkime şu şekilde gerçekleşmektedir (Tüzün, 1997; Onat vd., 2002; Aksoy ve Yanardağ, 2003; Köklükaya, 2008).



Bu tepkimeye göre enzim (E), substratı (S) enzimi ile birleşerek bir ES kompleksi oluşturmakta, daha sonra da bu ES kompleksinden (Ü) ürün oluşmaktadır, enzim ise tepkime ortamında tekrar serbest hale geçmektedir (Öztañ, 2007; Köklükaya, 2008).



Şekil 2.13. Substratın enzime bağlanma modelleri

Aktif merkezin bazı özellikleri:

- Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez belirli sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanmaktadır.
- Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.
- Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır (Telefoncu, 1986; Köklükaya, 2008).

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon kelimesi “hareketi sınırlandırma-sabitleme” anlamına gelmektedir. İmmobilize enzimler, katalitik aktivite gösterecek şekilde bir desteğe tutturularak yada hapsedilerek, sürekli ve tekrar tekrar kullanılabilen enzimler olarak tanımlanır (İçli, 2008).

Biyosensörler ve EFC’lerin gelişimi, enzimin aktivite kaybı, ömrü ve stabilitesiyle ilgili problemlerin çözümüne bağlıdır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için farklı immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. İletken bir yüzey üzerine enzim

immobilizasyonu yapılırken uygulanan yöntem oluşturulan elektrokimyasal cihazın performansını artıracaktır (Ahuja vd., 2007; Bilge, 2010).

Enzim molekülünün etkin bir şekilde yüzeyde tutunabilmesi için uygulanan immobilizasyon yöntemi;

- Enzimin iletken yüzeye etkili ve kararlı bir şekilde tutunmasının sağlanması,
- Enzimin biyolojik özelliklerini (aktivite) etkilememesi,
- Biyo-uyumlu ve kimyasal olarak inert olması gerekmektedir.

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Grifin tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır (Aksoy, 2003; Gökgöz, 2006).

2.5.1. Enzim immobilizasyonunun biyo-yakıt hücrelerindeki önemi

BFC'lerin ömrünü pratik uygulamalarında da etkili olan birkaç faktör düzenler. BFC'de kullanılan redoks medyatörlerinin ömrü ise başka bir problemdir (Allen ve Bennetto, 1993; Barton vd., 2004). Hatta çoğu durumda, biyokatalizörlerin kararlılığı BFC'nin ömrünü belirleyen faktör durumundadır. EFC'lerin çoğu genellikle birkaç gün dayanmaktadır. İmmobilizasyon, enzimlerin ömrünü uzatmak için yardımcı olabilir (Willner vd., 1998b; Katz vd., 1999a; Kang vd., 2004).

Osmium redoks polimeri içeren GOx-BOD immobilize bir minyatür BFC aktivitesini 37°C'de 20 gün devam etmiştir (Mano vd., 2002). Moore ve arkadaşları Dehidrogenaz tuzaklayan tetrabütiamonyum bromid modifiye nasyon zarlar kullanılarak daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Moore vd., 2004). Doğal kaynaklı enzimin yarı ömrü çözeltide yalnızca 7-8 s iken, immobilizasyondan sonra 45 günden daha fazla aktif bir ömre ulaşılmıştır. Hatta immobilizasyon tekniğinden faydalanılan BFC'lerin, birkaç hafta boyunca sürekli çalıştığında kayda değer bir güç kaybı gözlenmemiştir (Kim vd., 2006).

2.5.2. İmmobilize enzimlerin avantaj ve dez-avantajları

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre pek çok işlevsel avantajları vardır. Bunlardan en önemlileri şu şekilde sıralanabilir (Mosbach, 1976; Zaborsky, 1973; Pitcher, 1978).

- Reaksiyon bitiminde ortamdaki, süzme veya santifürüj gibi basit teknikler kullanılarak kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Böylelikle ürünlerin enzim tarafından kirlenmesi engellenmiş olur.
- Sürekli proseslere uygulanabilir.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- İmmobilize enzim preparatlarının mikrobiyal kontaminasyona karşı direnci, serbest enzime göre daha yüksektir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (otoliz) olasılığı azalır.

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar da şu şekilde sıralanabilir (Trevan, 1980; Durante vd., 2004).

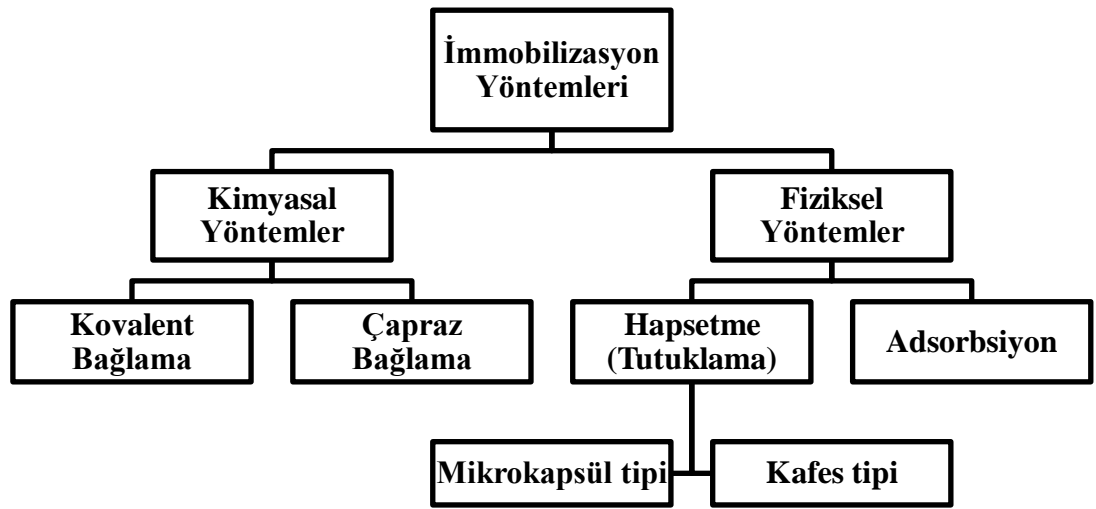
- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesi azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.
- Kimyasal işlemler sonucunda aktif bölge zarar görebilir (Telefoncu ve Dinçkaya, 1997; Kicheol vd., 2005; Gökgöz, 2006, İçli, 2008).

2.5.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1960'lı yıllardan bu yana enzimlerin immobilizasyonu için birçok immobilizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak yöntemi seçerken, immobilizasyon sırasında veya immobilizasyondan sonra enzim aktif merkezinin zarar görmeyeceği bir yöntem olmasına dikkat edilmelidir. Böyle bir seçim yaparken enzimin yapısı çok iyi bilinmelidir. Enzim ile destek arasında

herhangi bir bağlanma söz konusu ise bu bağlanmanın, aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır (Telefoncu, 1986; Wiseman, 1986; Chase ve Yang, 1998; Köklükaya, 2008).

Enzim immobilizasyon yöntemleri çok farklı kaynaklarda değişik şekillerde sınıflandırılmalarına karşın fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

2.5.3.1. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri

Kimyasal immobilizasyon yöntemlerinde suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek maddesi ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu yada birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumu söz konusudur. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Yani serbest enzimin tekrar geri kazanımı mümkün değildir (Zaborsky, 1973; Srere ve Uyeda, 1976).

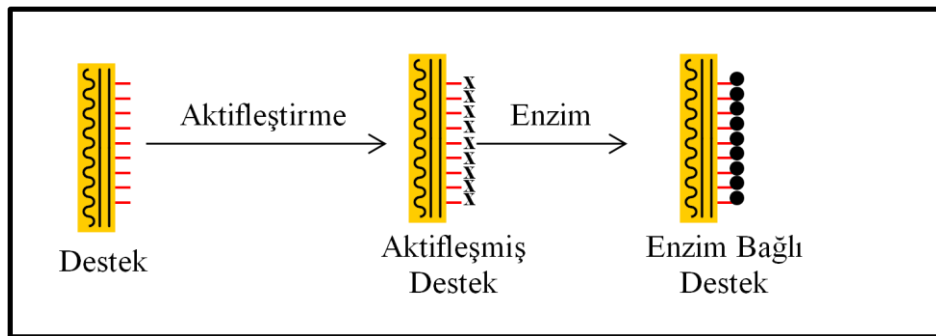
Kimyasal yöntemlerle immobilizasyonda, enzimin çok kararlı olması ve destek maddesinin dayanıklı olması gibi avantajlar vardır. Ancak immobilizasyon veriminin sınırlı olması, özel reaksiyon şartları gerektirmesi, kimyasal olarak inert olan destek

maddelerine uygulanması için aktivasyon işlemi gerektirmesi gibi sorunlar da söz konusudur.(Smith, 1985; Gökğöz, 2006).

Kovalent Bağlama: Enzim ile suda çözünmeyen aktiveleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller (Zaborsky, 1973; Saburo ve Atsuo, 1985). Kovalent bağlanma, genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır. Enzim immobilizasyonunda, enzimin özellikleri, aktif bölgesi, pH, sıcaklık ve organik çözücü gibi faktörlerden dolayı sınırlı sayıda yöntem kullanılabilir (Srere, ve Uyeda, 1976).

Kovalent bağlı destek-enzim kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve tepkime sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır (Dumitriu vd., 1988)

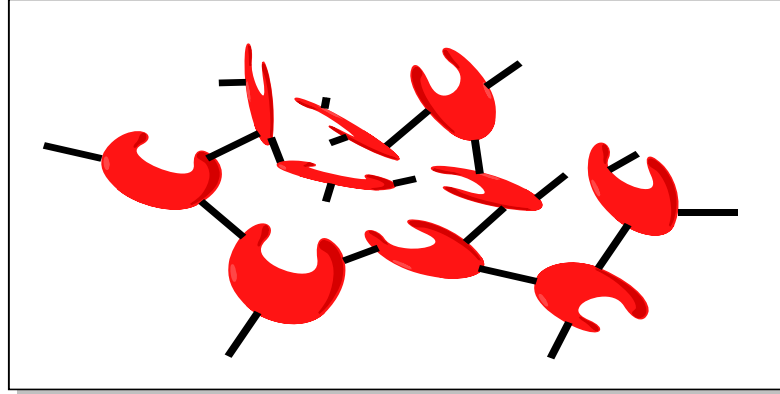
Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak destek maddesinin aktiveleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir (Şekil 2.15). Destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir (Köklükaya, 2008).



Şekil 2.15. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyon

Çapraz bağlama: Enzim molekülleri herhangi bir taşıyıcı destek maddesine ihtiyaç duymadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlar yaparak immobilize olabilirler (Şekil 2.16). Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı

olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulması zordur (Gaffield vd., 1979).



Şekil 2.16. Çapraz bağlanma yöntemi ile immobilizasyon

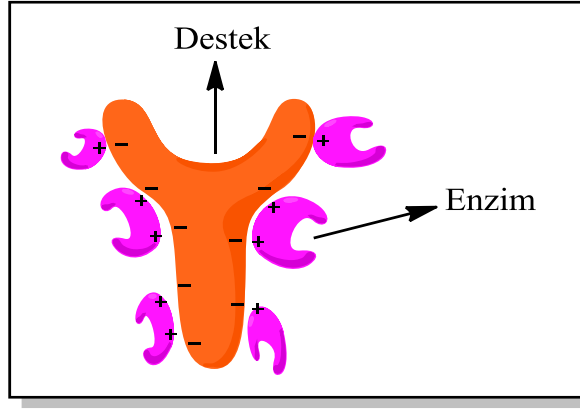
Enzim aktifliği, reaksiyon süresi, sıcaklık, iyon şiddeti, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

Bu metodun en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki yada çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu metodun dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır. Çapraz bağlayıcı olarak enzim immobilizasyonun da kullanılan maddeler, diazobenzidin, 1,5-1,7difloro-2,4-dinitrobenzen, glutraldehit, triklor-s-triazin, heksametilendiizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanotoluen dir (Telefoncu ve Dinçkaya, 1997; Gökgöz, 2006).

2.5.3.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri

Bu yöntemlerde enzim herhangi bir kimyasal bağ olmadan, destek maddesine tutturulur veya hapsedilir. İmmobilizasyon, bazı fiziksel kuvvetlerin etkileştirilmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu vb.) enzimin destek maddesindeki boşluklar içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Fiziksel immobilizasyon metotları tersinirdir. Ancak bazı çalışmalarda, tersinmez bağ oluşumları da gözlenmiştir. Fiziksel immobilizasyon metotları adsorbsiyon ve hapsedme/tuzaklama olarak iki gruba ayrılabilir (Gökgöz, 2006).

Adsorbsiyon: Suda çözünmeyen bir taşıyıcı üzerinde enzimin fiziksel olarak tutunmasını temel alır (Şekil 2.17). Enzim proteininin aktif bölgesinde hemen hemen hiçbir hasara ve konformasyonel değişime yol açmayan bir immobilizasyon yöntemidir.



Şekil 2.17. Adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyon

Uygun bir taşıyıcı yüzey bulunursa hem ucuz hem de kolay olabilmektedir. Bu yöntemde enzim ve taşıyıcı yüzey arasındaki kuvvetlerin zayıflığından dolayı enzim kaybı söz konusudur. Enzimlerin fiziksel adsorbsiyonu için uygulanan bazı yöntemler aşağıdaki gibidir.

- Statik işlem
- Elektro-boşalım
- Reaktörde bekletme
- Çalkalama ya da karıştırma banyosunda bekletme

Bu metodun en önemli avantajı bağlama için kimyasal madde kullanılmaması ve aktivasyon için minimum basamağa ihtiyaç duyulmasıdır. Adsorbsiyonda bağlanma, hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waal's kuvvetleriyle olduğundan kimyasal bağlama yöntemlerine göre enzim aktif bölümüne daha az zarar vermektedir. Yöntemin en büyük dezavantajı ise oluşan zayıf bağlardan dolayı ortam pH'nın, sıcaklığın, iyonik kuvvetlerin değişimiyle ve substrat varlığıyla enzimin desorbsiyonu çok kolaydır. Bir diğer dezavantaj ise çok spesifik bir yöntem olmamasından dolayı istenmeyen maddelerin de immobilize edilebilmesi ve girişime neden olmasıdır. Bu durum immobilize enzimin özelliklerini değiştirmekte ve reaksiyon hızını düşürmektedir (Bilge, 2010).

Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan adsorbanslar; anyon ve katyon değiştirici reçineler, aktif karbon, sentetik ve doğal polimerler, silikajel, nişasta, killer, alümina, bentonit, seramikler ve gözenekli camlardır (Carr ve Bowers, 1980, Gökğöz, 2006).

Tutuklama /Hapsetme: Bu yöntemle immobilizasyonda enzim, bir polimer matriks örgü yapısı içinde veya etrafı çevrili bir membran içinde hapsedilmesi esasına dayanır (Dumitriu vd., 1988). Polimer matriksin yapısı, substrat giriş ve çıkışına izin verirken enzimin dışarıya sızmasını engelleyecek yapıdadır. Bu yöntemin kovalent ve çapraz bağlanma yöntemlerinden farkı enzimin jel matriks, taşıyıcı yüzey, membran yada birbirine bağlı olmamasıdır. Her tür enzimi, biyokatalizörleri, bazı canlı hücreleri ve farklı büyüklükteki mikroorganizmaları hapsetmek için kullanılabilen genel bir yöntemdir.

Çok kolay uygulanabilen bu fiziksel yöntemde kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcılara ihtiyaç yoktur. Ancak enzimin immobilizasyon işlemi sırasında inaktive olabilmesi gibi sorunlar söz konusudur.

Enzim hapsetme yöntemi için organik ve anorganik yapıya sahip partikül, tüp, membran ve fiber şeklinde birçok taşıyıcı destek maddesi kullanılabilir. Çizelge 2.4.'te enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Enzim hapsetme yönteminde kullanılan bazı destek maddeleri

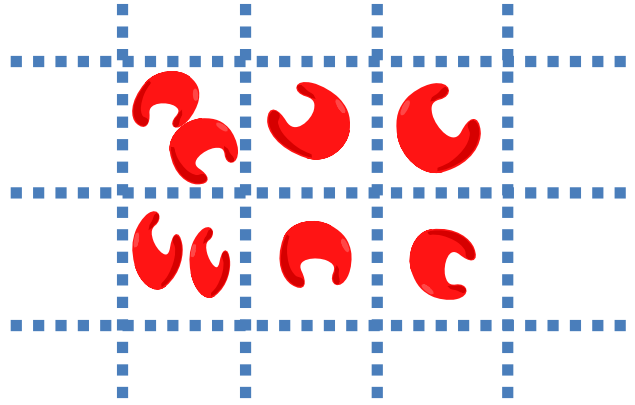
Doğal Destek Maddeleri	Sentetik Destek Maddeleri
Polisakkarit Kökenliler	Poliakrilatlar
Selüloz	polistiren
Aljinat	Vinil ve alil polimerler
Karragenan	Poliamitler
Protein Kökenliler	Maleik andrit bazlı kopolimerler
Kollajen	

Enzim hapsedilmesi için taşıyıcı destek maddesi seçilirken; fiziksel form, sertlik ve dayanıklılık gibi mekanik özellikler, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı direnç,

hidrofilik/hidrofobik uç oranı, geçirgenlik, yüzey alanı, maliyet ve kolay bulunabilirlik gibi faktörleri göz önünde bulundurmak gerekir.

Hapsetme ile immobilizasyon yöntemi, mikrokapsül ile hapsetme, kafes tipi hapsetme olarak iki şekilde yapılır (Gökgöz, 2006).

Kafes tipi tutuklama/hapsetme: Kafes tipi hapsetme yöntemi, çapraz bağlı iletken polimerlerin boşlukları içinde enzimin hapsedilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer yada polimer çözeltilerine UV veya gama (γ)-ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde hapsedilir ve jel matriksinin dışına çıkamazken, substrat ve ürün sürekli kafes içine giriş-çıkış yapabilir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Kafes tipi tutuklanmış/hapsedilmiş enzimlerin şematik gösterimi

Çapraz bağlı polimer oluşturarak enzim hapsedilmesinde en çok kullanılan polimer, N,N-metilen-bis-akrilamit ile çapraz bağlanarak oluşturulan poliakrilamittir (Karadağ, 2001).

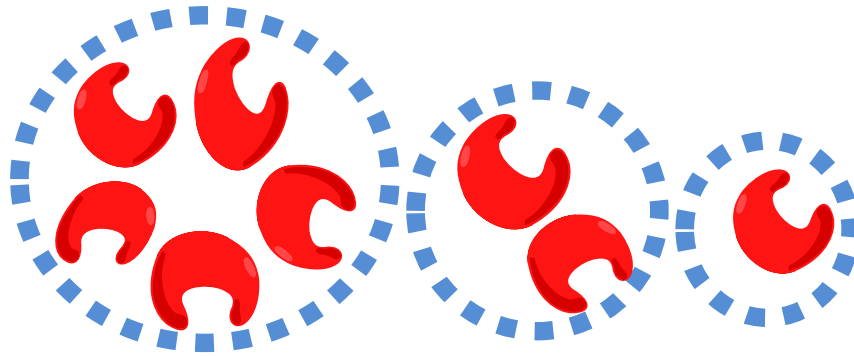
Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Kaetsu vd., 1979; Michael, 1980; Saburo ve Atsuo, 1985; Arıca ve Hasırcı, 1987);

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifliğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.
- Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimi değiştirilerek, farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
- Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.

Metodun dezavantajları ise;

- Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması,
- Küçük hacimli enzimler için sınırlı olması,
- Makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesidir (Gökgöz, 2006)

Mikrokapsül tipi tutuklama: Bu yöntemde enzim molekülleri, 10-1000 µm çaplı yarı geçirgen membranlara hapsedilir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir (Şekil 2.19). Enzimlerin mikrokapsüllemesi için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur.



Şekil 2.19. Mikrokapsül tipi tutuklanmış/hapsedilmiş enzimlerin şematik gösterimi

Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsül oluşturacak çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emülsiyeye edilir. Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllemiş olur.

Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır (İnam vd., 2001). Mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein derişimine ihtiyaç olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur (Köklükaya, 2008).

2.5.4. İmmobilizasyon yönteminin seçimi

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler gözönünde bulundurulmalıdır (Mosbach, 1976).

- Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.
- Enzim, tepkimenin yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile tepkimeye girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
- Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri, glutatyon veya sistein ile tepkimeye sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
- İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde devamlı olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır.

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı da dikkate alınmalıdır (D'Souza ve Godbole, 2002; Köklükaya, 2008).

2.5.3.1. Enzim destek materyali

Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanır. Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar, bağlanmada etkilidir. Bunların yanında immobilizasyonda kullanılacak destek materyallerinde de bazı özellikler aranır, bunlar şu şekilde sıralanabilir (Karadağ, 2001; Gökgöz, 2006);

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli yapı
- Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
- Kimyasal ve termal dayanıklılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Ucuzluk
- Zehirsizlik

2.5.5. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Araştırmacılar, enzim immobilizasyonu için birçok farklı yöntem uygulamış ve önermişlerdir. Ancak enzimlerin birbirlerinden farklı kimyasal karakteristiği olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri nedeniyle bütün enzimler için ve her şartta uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır (Kahn, 1999). Bu nedenle immobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği, aktivitenin sınırlanmadığı ve girişimlere engel olan bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının ve girişimcilerin çok iyi bilinmesi gerekir (Zaborsky, 1973; Kahn, 1999). Çizelge 2.4'te kısaca immobilizasyon yöntemleri kıyaslanmıştır.

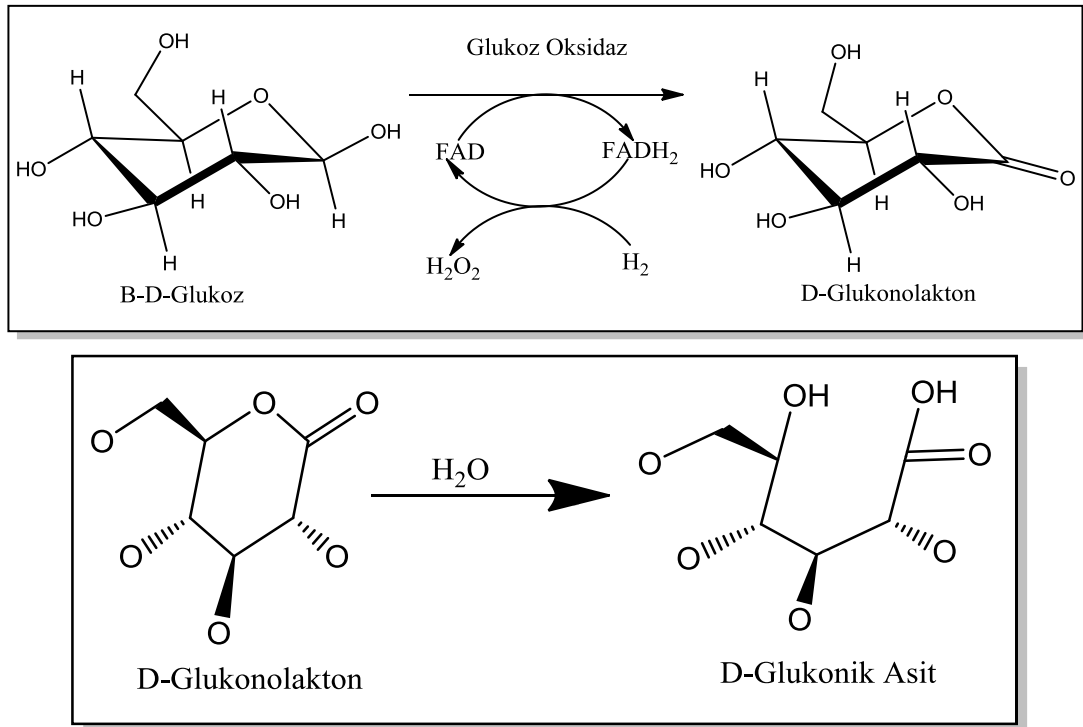
Çizelge 2.5. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Köklükaya, 2008)

Yöntem	Kovalent Bağlama	Adsorpsiyon	Çapraz Bağlama	Tutuklama
Destek Maddesi	Agoroz, Selüloz, PVC, İyon Değiştirici Reçine, Gözenekli Cam	İyon Değiştirici Reçine, Aktif Kömür, Silika Jel, Kil, Gözenekli Cam	Fonksiyonel Olarak İnert Poteinler	Aljinat, Karegeenan, Kolojen, Poliakrilamid, Jelatin, Silikon Kauçuk Poliüretan
Bağlanmanın Şekli	Tersinir Bağlanma	Tersinir, pH'a göre değişken, İyonik şiddetin yüksek olması ile enzim ayrılabilir	Gluteraldehit, Bisizosiyanat, Bisdiazobenzidin ile çapraz bağlama	Fiziksel Hapsetme
Hazırlama	Zor	Kolay	Orta	Zor
Enzim Aktifliği	Yüksek	Orta	Düşük	Düşük
Substrat Spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Desteğın Tekrar Kullanılabilirliğı	Nadiren	Mümkün	İmkansız	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Yüksek	Düşük	Orta	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek

2.6. Glikoz Oksidaz (GOx)

GOx, *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından salgılanan bir enzim türüdür . (Dai vd., 2002; Clark vd., 2006) En çok bu fungusların etrafını çevreleyen hücre dışı sıvıda ve müsilaj tabakası içinde bir kısmı da hücre duvarında bulunur. Fungusların yüzeyinde bakteriyel enfeksiyona karşı ve doğal koruyucu olarak da balda bulunur (Petuccioli vd., 1999; Miron vd., 2002). GOx, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen oksidoredüktaz enzim sınıfının bir üyesidir. GOx'ın sistematik adı β -D-Glikoz:Oksijen 1-Oksido redüktaz, EC 1.1.3.4' tür (Wolffarht vd., 2004; İçli, 2008).

GOx, β -D-glikoz'un D-glukono-1,5-lakton ve hidrojen peroksit'e (H_2O_2) oksidasyonunu katalizler. D-glukono-1,5-laktonda eşzamanlı olarak glukonik asite hidrolize olur. Şekil 2.20 bu reaksiyonları göstermektedir.



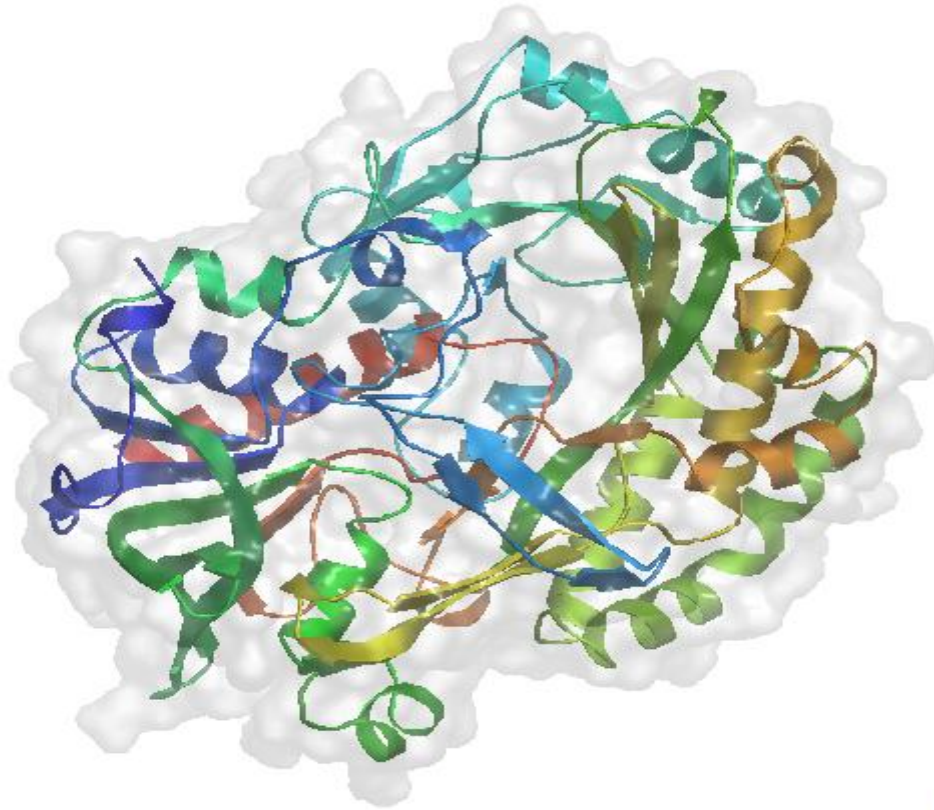
Şekil 2.20. GOx'in reaksiyon mekanizması (Wolffarht, 2004)

GOx aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından *Aspergillus niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleodit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948),

oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H₂O₂ ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır. (Özyılmaz, 2005; Can, 2010).

2.6.1.GOx'in genel özellikleri

GOx enzimi ilk defa 1928 yılında Muller tarafından *Aspergillus niger* ve *Penicillium glaucum*'da keşfedilmiştir. Daha sonra *Aspergillus oryzae*, *Penicillium anagaskiense* ve *Penicillium notatum* gibi diğer küflerde de rastlanmıştır. Yüksek organizmalı bitkilerde ve hayvanlarda rastlanmamıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen GOx enzimleri benzerlik gösterirler. Molekül ağırlıkları yaklaşık 160 kDa 180 kDa arasındadır. Bir mol enzim 2 mol FAD içerir ve izoelektrik noktaları yaklaşık pH 4,2'dir. Çalışmalarda en yaygın kullanılan GOx, *A.Niger*'den elde edilen molekül ağırlığı 186 kDa olan dimerdir. Şekil 2.21'de *A.Niger* kökenli GOx'ın 3 boyutlu yapısı gösterilmiştir (Richardson and Finley, 1985; Bilge, 2010).



Şekil 2.21. *A.Niger* kökenli GOx'ın 3 boyutlu yapısı

2.6.1.1. Aktif merkezi

GOx iki özdeş alt birimden oluşan (MA 160 kDa) dimerik bir proteindir. Her monomer 583 amino asit kalıntısından oluşan tek polipeptid zincirine sahiptir. Monomerler tuz köprüleri ve hidrojen bağlarıyla birleşirler (Wolhfarht vd., 2004). Monomerler kendi içlerinde katlanarak iki bölge oluştururlar. Bölgenin birine substrat (β -D-Glikoz) bağlanırken diğer bölgeye güçlü bir yükseltgeyici ajan olarak FAD kofaktörü sıkıca bağlıdır (Haouz, 2001). Her monomer bir mol demir içerir. Katalitik reaksiyonun merkezi FAD'ın izoalloksazin halkasının N5 pozisyonudur. Bu reaksiyon merkezini örtecek kadar yakında yalnız üç amino asit yan zinciri vardır (Wolhfarht vd., 2005).

2.6.1.2. Substratları

GOx enzimi yüksek derecede β -D-glikoza spesifiktir. Ama başka monosakkaritleri de düşük hızlarda oksitleyebilir (El-Enshasy, 1998; Egi, 2009). GOx'ın farklı substratlara karşı olan bağıl oksidasyon hızları Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. GOx'in farklı substratlara karşı olan bağıl oksidasyon hızları (Raba ve Mottola, 1995)

Şekerler	Bağıl Oksidasyon Hızı
β -D-Glikoz	100
2-Deoksi-D-Glikoz	25
6-Deoksi-6-Floro-D-Glikoz	3
6-Metil-D-Glikoz	1,85
4,6-Dimetil-D-Glikoz	1,22
D-Mannoz	0,98
D-Ksiloz	0,98
α -D-Glikoz	0,64
Tetraloz	0,28
Maltoz	0,19
Galaktoz	0,14
Melobioz	0,11

2.6.1.3. Aktivatörleri

Aktivatörler arasında; Blue dekstran, Kazein, CaCl₂, CuCl₂, KCN ve NaF gibi çeşitli moleküller bulunmaktadır. Bazılarının aktivasyon etkileri aşağıda açıklanmıştır.

- Blue dekstran: Enzime bağlanması sonucu aktivitesi % 40 oranında artar (Solomon vd., 1981).
- CuCl₂: Ortama eklendiğinde *phanerochaete chrysosporium*'den elde edilen GOx enziminin aktivitesini % 23 oranında artırır (Kelley ve Reddy, 1986).
- KCN: Ortama eklendiğinde *phanerochaete chrysosporium*'den elde edilen GOx enziminin aktivitesini % 35 oranında artırır (Shin vd.,1993; Kelley ve Reddy, 1986).

2.6.1.4. İnhibitörleri

İnhibitörler arasında; Adenin nukleotid, 2-Deoksi-D-glikoz, Hidrazin, hidroksilamin, 8-Hidroksikinolin, D-Arabinoz, dimedon, Fenilhidrazin, o-Fitalat, Putresin, sodyum kolat, Semikarbazid, Ag⁺, Br⁻, Cl⁻, F⁻, AgNO₃, CuCl₂, CuSO₄, FeSO₄, H₂O₂, HgCl₂, NaCl, NaF, NaHSO₄ ve NaNO₃ gibi moleküller bulunmaktadır. Bunlardan bazılarının inhibisyon etkileri aşağıda açıklanmıştır.

- Adenin nukleotid: Apoproteine FAD-bağlanmasını inhibe eder (Swoboda, 1969).
- Br⁻, Cl⁻, F⁻: Bu iyonlar düşük pH'ta kompetitif inhibisyona sebep olurlar (Bright ve Porter, 1975).
- NaNO₃: Mikronemülsiyonda ve sulu ortamda non-kompetitif inhibisyona neden olur (Gupta vd., 2003).
- Sodyum kolat: Mikroemülsiyon içerisinde non-kompetitif inhibisyona neden olur (Gupta vd., 2003).
- H₂O₂: Enzimin 1-palmitoil-2-oleil-sn-glisero-3-fosfokolin içerikli lipozom içerisinde enkapsülasyonu sonucu enzim stabilitesi artar. Çünkü bu fosfokolin glikoz oksidasyonu sonucu oluşan H₂O₂'in neden olduğu katalitik inhibisyonunu azaltır (Yoshimoto vd., 2004).

2.6.1.5. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık

Kaynağına bağlı olarak GOx enzimi için optimum sıcaklık değeri 28 °C (Witt et al., 1998) ila 65 °C (Semashko vd., 2003) aralığında değişmektedir. *Aspergillus niger*'den elde edilen GOx enzimi 60 °C de 15 dakika içerisinde aktivitesinin %80'lik kısmını yitirmektedir (Jan ve Husain, 2004). *Aspergillus niger*'den elde edilen GOx enziminin koruyucu olmaksızın yarı ömrü; 67 °C de 4,5 dakika; 63 °C de 7,5 dakika; 60 °C de 13 dakika ve 56 °C de 86 dakika olduğu belirlenmiştir (Gouda vd., 2003).

2.6.1.6. Optimum pH

Kaynağına bağlı olarak GOx enzimi için optimum pH değeri pH 4 (Rando vd., 1997; Semashko vd., 2003) ila pH 6 (Karube vd., 1977; Kim ve Schmid, 1991; Garzillo vd., 1995; Ko vd., 2002) aralığında değişim göstermektedir. *Aspergillus niger* kaynaklı GOx enzimlerinde ise optimum pH aralığı pH 5–6 arasındadır (Egi, 2009).

2.6.2. GOx'in reaksiyon mekanizması

GOx enzimi glikozu, glukonik aside oksitler. Reaksiyon flavo enzimin önce indirgendiği, sonra da yükseltgendiği iki basamakta gerçekleşir. İndirgenme yarı basamağında glikoz iki proton ve elektronu enzime aktarır glukonolaktone dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve H₂O₂ oluşur. Reaksiyon mekanizması tam olarak anlaşılammış olmakla beraber, aktif bölgede bulunan His 516, His 559 ve Glu 412 aminoasit artıklarının redoks reaksiyonda rol aldıkları bilinmektedir (Weibel ve Bright, 1971).

2.6.3 GOx'in aktifliğinin saptanması

Spektrofotometrik olarak,

- ✓ β -D glikoz, Horce Radish Peroksidase, o-toluidin varlığında (oluşan H₂O₂ ile renkli ürün oluşur.) 410 nm'de absorbans ölçülür (Cosnier vd., 2002).

- ✓ β -D glikoz, benzokinon, sodyum sitrat varlığında (enzimatik indirgenmeyle hidrokinon oluşur) 290 nm'de absorbans artışı ölçülür (Eryomin vd., 2006).
- ✓ β -D glikoz, horce radish peroksidase, o-dianisidin varlığında (oluşan H₂O₂ ile renkli ürün oluşur.) 460 nm'de absorbans ölçülür (Hestekin vd., 2002; Karmali vd., 2004; Wolhfarht vd., 2004).
- ✓ β -D glikoz, p-hidroksibenzoik asit, 4-aminoantipiridin, NaN₃, HRP, potasyum fosfat varlığında (renkli ürün oluşur) 500 nm'deki absorbans ölçülür (Rauf vd. 2006).

Çözünmüş oksijen metoduyla,

- ✓ β -D glikoz varlığında oksijenin tüketiminden yararlanır. Sulu glikoz çözeltisinden saf oksijen geçirilerek belli bir derişimde çözünmüş oksijen sağlanır. Bir oksimetre kullanılarak çözünmüş oksijen derişimindeki azalma ölçülür (Tomotani ve Vitolo, 2005).

Glikoz derişiminin azalması ölçülerek,

- ✓ Deney çözeltisinden alınan örnekler bir HPLC cihazı kullanılarak analiz edilir. Zamanla glikoz derişimindeki azalma ölçülür (Hestekin vd., 2002; İçli, 2008).

2.6.4. GOx'in kullanım alanları

GOx, düşük maliyeti ve yüksek stabilitesi nedeniyle endüstriyel, biyo-medikal ve biyo-teknolojik araştırmalarda kullanılan, yüksek ticari önemi sahip bir enzimdir. Başlıca GOx enziminin kullanıldığı uygulama alanları; glikoz tayini, glikoz giderimi, oksijen giderimi ve bazı maddelerin (glukonik asit, hidrokinon ve karvon) sentezidir.

GOx enzimi kanda, ürede, gıdalarda ve diğer biyolojik sistemlerde glikozun analitik olarak ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

GOx'ın hem tek başına hem de katalaz ile polivinilalkol jeli içerisinde membran formunda pamuk üzerine immobilizasyonu gıda ve farmakoloji endüstrilerinde kullanılmaktadır (Kozhukharova vd., 1988; Egi, 2009).

Hipoglisemi ve hiperglisemiye neden olan kandaki glikoz derişimlerinin değişimlerini izlemek için glikoz biyosensörlerinde kullanılırlar (Eryomin vd., 2006).

GOx, yiyecek ve içeceklerin raf ömrünü uzatmak amacıyla içlerinde bulunan artık

glikoz ve oksijeni çıkarmak için kullanılır (Karmali vd., 2004; Eryomin vd., 2006; Rauf vd., 2006; Mislovicova vd., 2007).

Enzim tarafından üretilen H_2O_2 , iyi bir bakterisit olarak iş yapar ve daha sonra H_2O_2 , katalaz enzimiyle ortadan kaldırılabılır (Karmali vd., 2004; Rodriguez-Nogales, 2004). Ayrıca yiyeceklerde renk ve aroma kaybını önler (Clark vd., 2006). H_2O_2 tekstil sanayisinde beyazlatmada kullanılan bir kimyasaldır. GOxın ürettiği H_2O_2 tekstil beyazlatma proseslerinde kullanılır (Tzanov vd., 2002).

Şarap üretiminde glikozun bir kısmı GOx tarafından D-glukono-1,5-lakton' a dönüştürülerek glikozun tamamen alkole dönüşümü engellenir. Böylece alkol içeriğini ayarlar ve bakterisit etkisiyle şarabın bozulmasını önleyerek şarabın kalitesini artırır (Karmali vd., 2004; Eryomin vd., 2006; Rauf vd., 2006).

GOx, ağızda bulunan ve diş çürümelerine neden olan bakterilere karşı bakterisit etkisiyle ağız bakım ürünlerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılır (Petucciolivd., 1999; Rodriguez-Nogales, 2004).

GOx bir de glukonik asit üretiminde kullanılır (Betancorvd., 2006; Eryomin vd., 2006; Rauf vd., 2006). Glukonik asit, yiyecek ürünlerinde beyazlatıcı ve asit düzenleyici görevi vardır. Sterilizasyon solüsyonlarında ve ilaçların bileşimine giren bir tuz olarak kullanılır. İnşaat endüstrisinde anormal hava koşullarına karşı stabilite ve direnç artışını sağlayan bir çimento katkısıdır. (İçli, 2008).

Pek çok GOx biyosensörü ile glikoz derişiminin belirlenmesi enzimatik reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin indirgenme akımının veya açığa çıkan H_2O_2 'nin yükseltgenme akımının izlenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Adeloju ve Moline, 2001; Can, 2010).

2.7. Lakkaz (Lac)

Lac (EC 1.1.3.2, p-difenol; dioksijen okidoreductase) 70 kDa molekül ağırlığında bir polifenol oksidazdır (Sakurai, 1992; Feng, 1996). Moleküler oksijenin $4e^-$ unun suya indirgenmesini katalizleyebilen bir grup mavi çoklu bakır oksidaz ailesinin üyesidir. Moleküler oksijenin indirgenmesi indirgen substratın $1e^-$ oksidasyonu ile birlikte yürütülür (Piontek, 2002). Fenol için organik solventlerdeki gibi analitik biyosensör uygulamaları, BFCs'de oksijen katotlarının geliştirilmesi, tekstil boyalarının degredasyonu, organik sentezler, immunoassay labelling, lignin giderimi, metil giderimi ve kağıt hamuru beyazlatılması gibi çeşitli biyo-teknolojik ve çevresel kullanımları bulunmaktadır (Bourbonnais ve Paice, 1992; Bourbonnais vd., 1995; Feng, 1996; Call ve Mucke, 1997; Li vd., 1999; Mayer ve Staples, 2002; Novotny vd., 2004).

Lac enzimi 19. yy'dan bu yana üzerinde çalışılmış enzimlerden biridir (Levine, 1965). İlk olarak 1883 yılında Yoshida tarafından japon Lacquer (vernik) ağacı olan *Rhus vernicifera*'nın reçine kanal sıvılarından ekstrakte edilmiştir (Levine, 1965; Thurston, 1994). İzolasyonu ve pürifikasyonundan yaklaşık 10 yıl sonra "lakkaz" ismini almıştır (Bertrand, 1894). Sonrasında 1896 yılında Bertrand ve Labord, Lac'ın funguslar tarafından da salgılanan bir enzim olduğunu bulmuştur. *Coriolus versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Junghuhnia separabilma*, *Phanerochaete cryosporium*, *Phlebia ochraceofulva*, *Phlebia radiata*, *Rigidoporus lignosus* çok çalışılmış ve önemli beyaz çürükçül funguslardan bazılarıdır (Call ve Mucke, 1997). Lac aktivitesi gösteren tek bakteri de *Azospirillum lipoferum*'dur. Lac ayrıca ağaç, lahana, şalgam, şeker pancarı, elma, şeftali, kuşkonmaz gibi birçok sebze de teşhis edilmiştir (Thurston, 1994). Çizelge 2.6'da lac enzimine ait fiziksel özellikler gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Lac enziminin fiziksel özellikleri (Call ve Mucke, 1997)

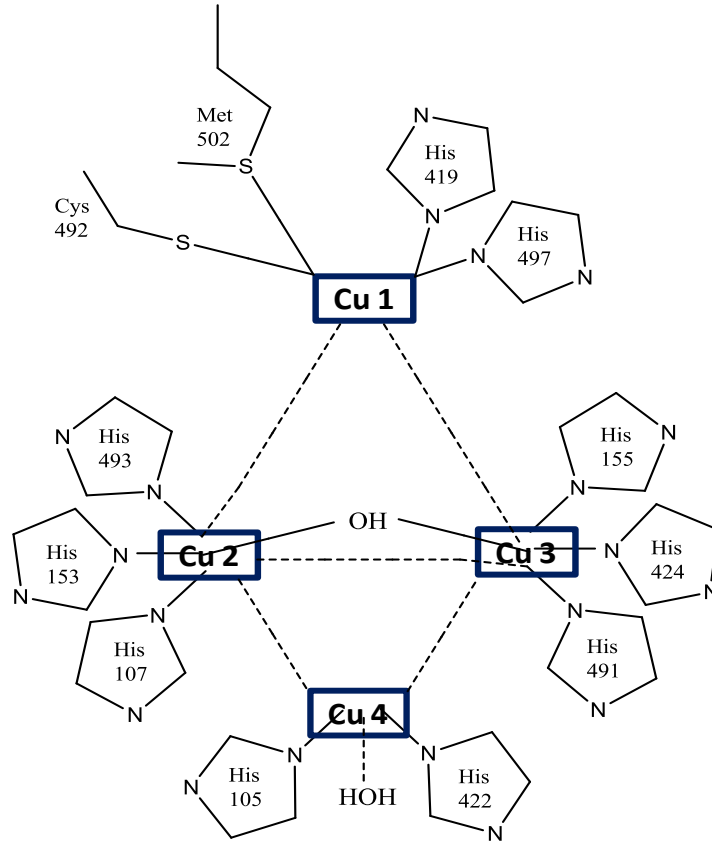
Özellik	Lakkaz (Genel)	Lakkaz (<i>Trametes</i>)
Optimum pH	3 – 7,5	3,6 – 5,3
Optimum Sıcaklık (°C)	40 - 80	60
Molekül Ağırlığı (kDa)	60 - 390	60 - 65
Molekül Başına Bakır İçeriği	2 - 16	4
Redoks Potansiyeli (mV)	180 - 800	T1 (pH 5,5) 785 T3 (pH 5,5) 782
İzozimlerinin Sayısı	>5	Farklı Genlerde 2 -3 Kromatografik Formda Bulunabilir
İzoelektrik Nokta (pI)	2,6 – 7,8	3,1; 3,3; 4,6; 6,8
Karbonhidrat İçeriği	10 - 45	14
İnhibitörleri	-CN; -N ₃ ; -F; Halojen ve Anyonlar; pH; Dietilkarbomik Asit; Tiyoglikolik Asit; Fenil Tiyoüre EDTA, Coniferyl Alkol	
Katalizlediği Reaksiyonlar	Metil, Metoksi ve Karboksil Giderimi; Fenoksi Radikallerinin Oluşumu; C _α -C _β Yarılmaları; Aril Alkil Yarılmaları; C _α Oksidasyonu	
Substratları	-o ve-p difenol; polifenol; Aminofenol; klorofenol, Askorbik Asit; Ferrosiyanit	

2.7.1. Lakkaz enziminin yapısal özellikleri

Aktif formu olarak Lac molekülü dimer veya tetradimer yapısında bir glikoproteindir. Genellikle monomer başına, üç redoks bölgesine bağlı dört bakır atomu içerir. Monomer sınıflarının molekül ağırlığı 50-100 kDa arasındadır. Önemli bir özelliği de yapısında bulunan % 10-45 oranındaki karbonhidrat kısmının enzime yüksek stabilite sağlamasıdır (Durán vd., 2002; Dizge, 2007).

Lakkazlar monomerik veya multimerik bakır içeren enzimlerdir ve bu enzimlerde bakır atomu önemli bir prostetik gruptur (Call ve Mucke, 1997). Monomerik lakkaz moleküllerinin çoğu yapılarında 4 tane bakır atomu içerir ve yapıları UV/visible ile elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi teknikleri kullanılarak üç gruba ayrılmıştır:

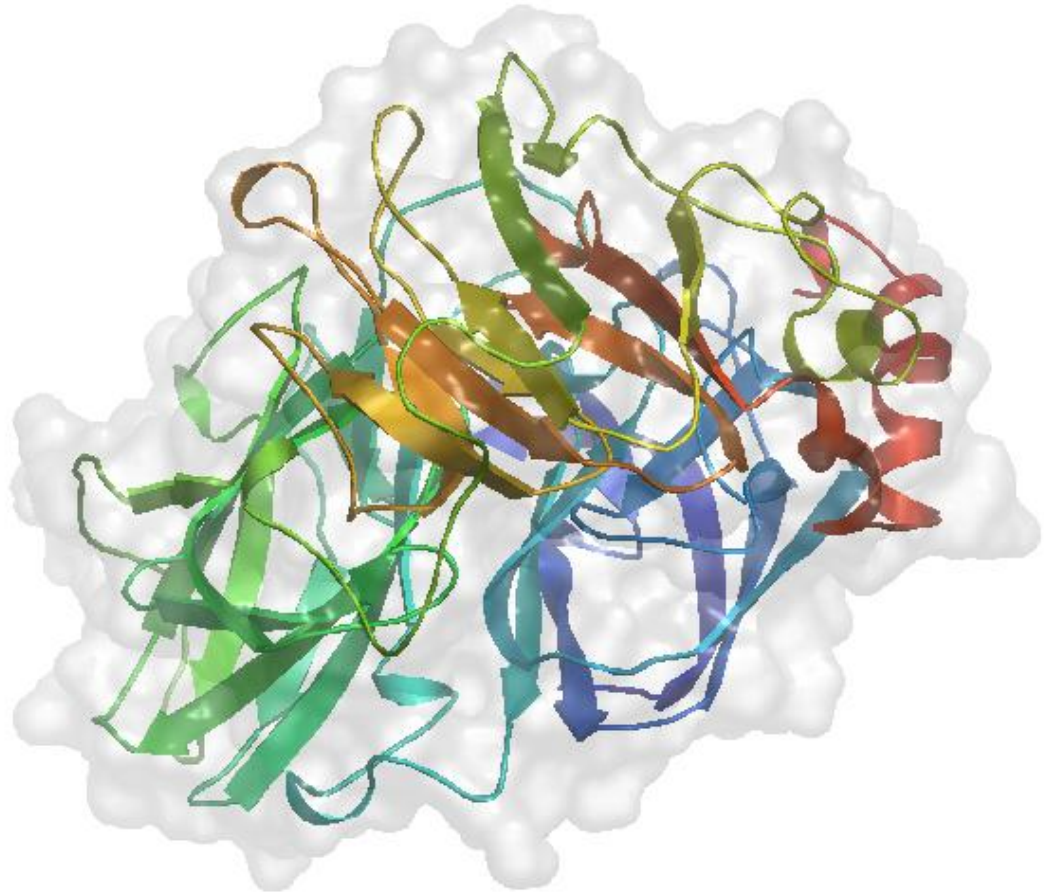
- Tip I bakır (T1); enzimin 600 nm’ de gözlenebilen yoğun mavi renginden sorumludur ve elektron paramanyetik rezonans ile belirlenebilir. T1 bakırı çoğunlukla iki histidin aminoasitinin iki azotu ve sistein amino asitinin de kükürt grubu ile bağ yapmış durumdadır (Şekil 2.22). Lac enziminin karakteristik mavi renginden TipI bakırın, sistein (Cys) aminoasidinin kükürt (S) grubu ile yaptığı bağ sorumludur (Ducros vd., 1998; Dizge, 2007).
- Tip II bakır (T2); renksizdir. Görünür bölgede çok zayıf absorbands vermesine karşın EPR ile belirlenebilir,
- Tip III bakır (T3); iki çekirdekli konformasyonda bir çift bakır atomu içerir. T3 bölgesinin iki bakırı yakın UV’de 330 nm’de verdiği zayıf absorbands bandıyla karakterize edilirken elektron paramanyetik rezonansda sinyal vermeyen bir çift bakır atomu içerir (Thurston, 1994; Durán vd., 2002, Piontek vd., 2002; Dizge, 2007).



Şekil 2.22. Lakkazın bakır merkezleri

2.7.2. Lakkaz enziminin kristal yapısı

Lakkazın mükemmel şekildeki elektron yoğunluğu dört bakır atomunun tamamı ve toplamda da 7 N-asetil glikozamin kısmı ile 5 ayrı N-glikozilasyon bölgesinin polipeptidinin tamamının modellenmesine izin verir (Erwin vd., 1993). *Trametes versicolor* kaynaklı lac yapısı monomerdir. Sahip olduğu üç domainin boyutları yaklaşık olarak 65 x 55 x 45 Å'dur. Her domain benzer β -barrel yapısına sahiptir (Piontek vd., 2002; Dizge, 2007). Şekil 2.23'te *Trametes versicolor* kaynaklı lac enziminin 3 boyutlu yapısı görünmektedir.



Şekil 2.23. *Trametes Versicolor* kaynaklı lac enziminin 3 boyutlu yapısı

- Domain 1: iki adet dört stranddan oluşan β -sheet ve 4 tane 310-helix içerir.
- Domain 2: bir adet altı iplikli ve bir tane de 5 iplikli β -sheet içermesinin yanında 1. domaindeki gibi üç tane 310-helix içerir.
- Domain 3: β -barrel formunda 2 tane beş iplikli ve bir tane iki iplikli β -sheet içerir. α -helix ve β -sheet ile birlikte T1 bakırının yerleştiği bir boşluk oluşturur (Piontek vd., 2002; Dizge, 2007).

2.7.3. Lakkaz katalizli reaksiyonlar

Lakkazlar, fenolik bileşik ve aromatik amin substratlarının çok büyük bir miktarının $1e^-$ oksidasyonunu katalizleyen hem mono hem de multi bakır içeren oksidazlardandır. (Ducros vd., 1998). ABTS gibi belirli substratlar potansiyel olarak iki elektronunu verebilmesine rağmen lakkazlar sadece $1e^-$ oksidasyonunu tamamlayabilmektedirler. Bu nedenle sonradan oluşan enzimatik olmayan reaksiyonlarla radikaller oluşturulur (Mester ve Tien, 2000; Dizge, 2007).

Lakkazın katalitik mekanizmasında bakır atomları önemli rol oynarlar. Lakkaz katalizli reaksiyonlar üç ana basamaktan oluşurlar.

- ✓ İndirgen substratın kendisi yükseltgenirken T1 bakırını indirger.
- ✓ Açığa çıkan elektron T1 bakır bölgesinden üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgelerine taşınır.
- ✓ Üç çekirdekli olarak kümelenmiş T2 ve T3 bakır bölgesinde moleküler oksijen suya indirgenir.

2.7.4. Lakkaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar

Lakkaz enzimi oksidoredüktaz bir enzim olarak özellikle fenoller gibi aromatik bileşiklerin oksidasyonunu moleküler oksijeni suya indirgeyerek katalizler (Thurston, 1994; Karam ve Nicell, 1997; Gianfreda ve Bollag, 1997; Sulak 2009). Delanoy ve arkadaşları T. Versicolor'dan elde edilen Lakkazın, farklı miktarlarda kitosan (CS) ile konjuge etmişler ve konjuge Lakkazların aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkisini inceleyip, kinetik parametreleri belirlemişlerdir (Delanoy vd., 2005; Gökgöz, 2006).

Jiang ve arkadaşları, süspansiyon yöntemi ile CS mikro kürelerini GA çapraz bağlayarak hazırlamışlar ve kürelerin üzerine Lac enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin, immobilizasyon şartları incelenmiş ve bunlarla bağlantılı olarak pH, sıcaklık ve kinetik parametreler tayin edilmiştir (Jiang vd., 2005; Gökgöz, 2006).

Rogalski ve arkadaşları, Cerrena unicolor'dan üretilen lakkazı poroz cam yüzeyine immobilize etmişler ve immobilize enzimin 8 farklı substrata göre aktifliğini etkileyen parametreleri incelemişlerdir (Rogalski vd., 1999; Gökgöz, 2006).

Timur ve arkadaşları Lakkazı polianilin matriksine immobilize ederek ince film hazırlamışlar ve farklı fenoller kullanarak bu sensörün özelliklerini incelemişlerdir (Timur vd., 2004; Gökğöz, 2006).

Lakkaz enzimi yaygın bir şekilde BFC'nin katodu olarak oksijenin katalitik indirgenmesinde kullanılmaktadır (Zebda vd., 2009; Nien vd., 2010; Lee vd., 2011).

2.8. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji kelimesini ilk defa kullanan Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Norio Taniguchi olmuştur. Nanoteknoloji ölçü olarak "nanometre" adı verilen (kısa şekli nm) bir ölçme birimini kullanır. Bir nanometreyse, metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. İnsan saç teli çapının yaklaşık 100,000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılır. Bir başka deyişle, bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilir; yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturur (Çubukçu, 2010).

Nanoteknolojide de atomlar veya moleküller tek tek alınıp hassas şekilde birleştirilerek istenen ürün elde edilir. Bilindiği gibi bütün maddeler atomlardan oluşmuştur. Özelliklerini de atomlarının dizilişlerinden alırlar. Atomları hareket ettirebilecek boyutlarda aletler geliştirilebildiği takdirde, doğadaki atomik dizilim taklit edilerek her şey kopyalanabilir. Maddeler nano boyutta farklı davranışlar gösterir. Olağan halde elektriği ve ışığı iletmeyen maddelerin, nano boyutta tam tersi özellikler göstermesi günümüzde nanoteknolojiyi gündeme getirmiştir (Yavuz, 2011).

2.8.1. Nanoyapılar

Nanopartiküller 100nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. 1970'lerden beri bilim adamları bunları incelemekte ve anlamaya çalışmaktadır. Başlarda optik ve elektronik cihazlar üzerinde çalışmalar ilerlerken şimdilerde biyo-ölçümler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle

biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Biyo- ölçümler için ilk uygulamaları 1970'lerde 5-50nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır (Hayatt, 1989; Yıldırım, 2009).

Nanopartiküller ile modifiye edilmiş elektrotlar, elektroanaliz için kullanıldıklarında çıplak elektrotlara göre dört önemli avantaj sağlamaktadırlar: bunlar geniş yüzey alanı, etkin kütle taşınımı, kataliz ve kontrol edilebilirlik olarak sıralanabilir (Katz vd., 2004).

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler olarak sınıflandırılmaktadır (Yavuz, 2011).

Metal/metal-oksit nanopartiküller, geniş yüzey alanına sahip oldukları ve boyutlarına bağlı olarak önemli fiziksel ve kimyasal özellikler sergiledikleri için modifiye elektrotlarda ve biyosensörlerde kullanılmaktadırlar (Fernández-García vd., 2004; Rodríguez ve Hrbek, 2010). Titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküller geniş yüzey alanına sahiptirler ve ayrıca biyo-uyumlu ve iletken malzemelerdir TiO_2 np haricinde mangan (IV) oksit nanopartiküller de (MnO_2 np) biyosensörlerin yapımında kullanılmaktadır. MnO_2 np modifiye elektrotların H_2O_2 'e karşı elektrokimyasal anlamda katalitik etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Raouf vd., 2009; Yavuz, 2011).

2.8.1.1. Mangan (IV) oksit nanopartiküller

MnO_2 np geniş bir aralıkta çeşitli kristal yapılara ve aynı zamanda yüksek elektrokimyasal aktiviteye sahip düşük maliyetli, toksik olmayan nanopartikül çeşididir (Mališić vd., 2010).

MnO_2 np'lerin toz olarak elde edilen MnO_2 ye göre farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. MnO_2 tozlarının sulu çözeltilerde dağılımı zor iken nanopartikül hali oldukça kolay dağılmaktadır (Yao vd., 2006).

MnO_2 nanoyapılar potansiyelleri nedeniyle ayırma, kimyasal algılama cihazları, biyoloji ve elektronik de dahil olmak üzere bir çok alanda ilgi görmektedir (Li vd., 2007). Ayrıca MnO_2 np kataliz, iyon değişimi, moleküler adsorpsiyon ve özellikle enerji depolama uygulama yelpazesine sahip olması yanında düşük maliyetli ve

çevre dostu olması nedeniyle de oldukça ilgi çekici bir inorganik metal oksittir (Yavuz, 2011).

2.8.1.2. Altın nanopartiküller

Son yıllarda nanopartiküllerin önemli özellikleri hakkındaki gelişmeler biyosensör alanlarında bu materyallerin uygulanabilirliği ve elektrokimyasal davranışları hakkındaki ilgiyi arttırmıştır. Büyük yüzey alanı, iyi elektronik özellikler ve redoks proteinlerinin doğrudan elektron transferine katkı sağlaması biyosensör yapımındaki kullanılabilirliğini arttırmıştır. (Çubukçu, 2008).

Enzim biyosensörünün performansının sadece enzim molekülünün doğasına değil aynı zamanda immobilizasyon yoluyla bu moleküllere uygulanan etkilere bağlı olduğu bilinir. Biyo-moleküllerin belirli yüzeylere immobilizasyonunda Au np etkin rol oynamaktadırlar (Bharathi ve Nogami, 2001; Xiao vd., 1999). Çünkü bu yapılar immobilizasyon esnasında biyo-moleküller için doğal ortamlarına yakın bir çevre oluştururlar. Crumbliss ve çalışma arkadaşları pek çok enzimin Au np ile immobilizasyonunda enzimatik ve elektrokimyasal aktivitelerini devam ettirdiklerini göstermiştir (Wang ve Wang, 2004; Zhaoi vd., 1992; Yıldırım, 2009).

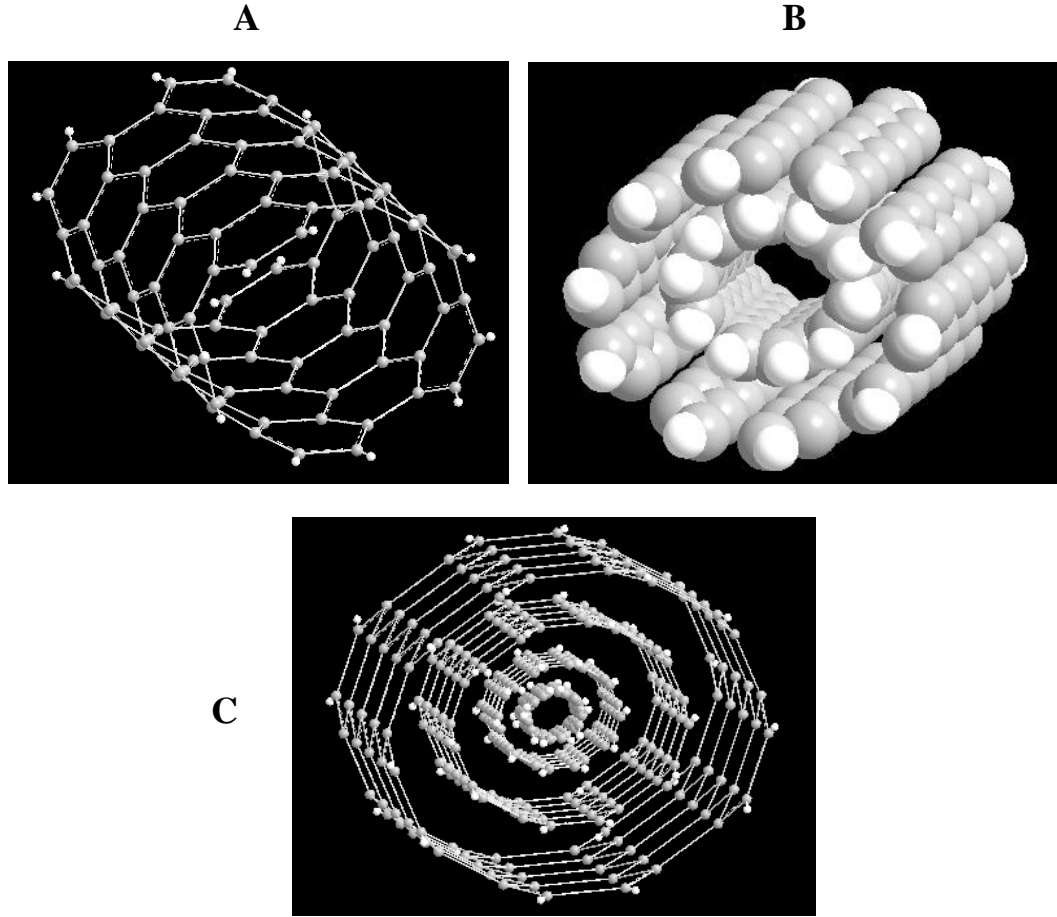
Au np yüzey morfolojisi, nanopartiküller arasındaki uzaklık ve elektrot yüzeyi, elektrot materyali ve redoks proteini arasındaki elektriksel bağlantının meydana getirilmesinde rol oynayan önemli faktörlerdir. Au np'lerin nanometrik sınırları, elektron transferi için biyo-molekül redoks kısmım ve elektrot arasındaki uzaklığı azaltması yoluyla hafifçe protein içine girer. Au np'ler kendilerine has optik, elektronik ve moleküler tanıma özellikleri yüzünden çeşitli alanların uygulamaları ile birlikte elektronik, nanoteknoloji ve önemli özellikteki yeni materyallerin sentezini içeren araştırmaların da konusu olmuştur. (Mena, 2005; Çubukçu, 2008).

2.8.1.3. Karbon nanotüp (CNT)

Karbon nanotüpler oldukça önemli yapısal, mekaniksel ve elektronik özelliklere sahip nanomateryallerdir. Karbon nanotüplerle yapılan iletimde, polifenilen esaslı zincirlerden 10 ila 100 kat daha fazla akım iletimi sağlanmaktadır. Karbon Nanotüplerin ısı iletkenlikleri, en iyi ısı iletken olan elmasın 2 katıdır ve bakır

telden 1000 kat daha fazla elektrik taşıyabilir. İç veya dış yüzeylerinin, atom veya molekülleri soğuracak özellikler taşıması, CNT'leri daha kullanışlı hale getirmektedir.

Nanotüplerin üç farklı sınıfı vardır: tek-duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT), çift-duvarlı karbon nanotüpler (DWCNT) ve çok-duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT), (Şekil 2.24) bunlardan çok ve tek duvarlı karbon nanotüplerin uygulama alanı daha geniştir.



Şekil 2.24. CNT'lerin sınıfları; (A) Tek-duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), (B) Çok-duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), (C) İki-duvarlı karbon nanotüp (DWCNT)

CNT lerin küçük çaplarından dolayı kuantum mekanik etkileri elektronik yapılarını belirler. Bunun anlamı kuantizasyon şartlarının nanotüp çevresi boyunca nanotüpün metal ya da yarı-iletken olarak davranıp davranmadığını belirler. CNT'lerin en önemli uygulamalarından birini gösteren bu özellikler gelecekte nano-elektronikğin temelini oluşturacağı düşünülür (Merkoçi vd., 2005). Karbon nanotüpler, geometrilerine bağlı olarak yarı-iletken ve metalik özellik gösterirler. Hiç bir katkı

maddesi olmaksızın, geometrik parametrelerinin değiştirilmesiyle, elektronik özellikleri de değiştirebilir (Çubukçu, 2008).

Son yıllarda CNTs'in en önemli kullanım alanlarından biri de biyosensörlerdir. Farklı özellikte birçok enzim elektrodunun hazırlanmasında karbon nano tüpler çok farklı şekillerde kullanılmaktadır. Son çalışmalar gösteriyor ki CNT'ler güçlü bir elektrokatalitik aktivite gösterirken elektrokimyasal cihaz üzerinde yüzey bozulmasının azalmasına yardımcı olmaktadır (Wang ve Musameh, 2003). Sistemin bir başka avantajı ise BFC yapımına uygulatabiliyor olmasıdır. Sistemde diğer enzimler ve biyo-moleküller kullanılarak yeni biyosensörler, BFC'ler ve biyo-elektrokimyasal aletler geliştirilebilir (Liu vd., 2006; çubukçu, 2008; Sulak, 2009).

Zheng ve çalışma arkadaşları CNT ile modifiye edilmiş GCE ve Lac arasındaki DET dönüşümlü voltametri yöntemini kullanarak 0,1 M fosfat ortamında çalışmışlardır. Çalışmalar sonucu elde edilen formal potansiyel (+530 mV) lakkaz enziminde bulunan T1 bakır merkezinin potansiyeline oldukça yakındır. Lakkaz katalizli oksijen indirgenmesinin muhtemel uygulaması “askorbat/O₂” BFC yapılarak örneklendirilmiştir (Zheng vd., 2008; Sulak, 2009).

2.8.1.4. Manyetik nanopartiküller

Manyetik nanomateryaller güçlü manyetik özellikleri, yüksek ayırma etkinliği, geniş yüzey alanı, doğa dostu olmaları ve zehirleyici olmamaları gibi özellikleri nedeniyle son zamanlarda ilgi görmektedir (Du vd., 2011; Qiu vd., 2009). Dışarıdan bir manyetik alan uygulanarak içinde buldukları reaksiyon karışımından ayrılmaları sağlanabilir. Bu özellik sayesinde substrat yüzeylerine enzimlerin immobilize edilebilmesi (Dyal vd., 2003) ve böylece manyetik olarak kontrol edilebilen biyo-elektrokimyasal sistemlerin geliştirmesi olanağı tanımaktadır (Hirsch vd., 2000; Katz ve Willner, 2002; Willner ve Katz, 2003; Katz ve Willner, 2005).

Fe₃O₄ np'ler biyo-uyumlulukları, güçlü paramanyetizmi, düşük toksitidesi ve hazırlık sürecinin kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadırlar. (Li ve Gao, 2008). Manyetik nanopartiküller enzim, antikorlar ve deoksiribo nükleik asitlerin immobilizasyonu ile biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li vd, 2010; Yavuz, 2011).

Au-Fe₃O₄ np'ler, Fe₃O₄ np üzerine Au np'lerin biriktirilmesiyle üretilen korşel yapıdaki manyetik nanopariküllerdir. Au np'lerin benzersiz özellikleri yanı sıra Fe₃O₄ np'lerin manyetik özelliğini bir arada bulundurlar. Bu korşel yapı yüksek aktif immobilizasyon kapasitesi ve magnetik özelliği sayesinde geniş bir uygulama alanında kendine yer edinmiştir (Wu, 2010; He ve Zeng, 2010; Li vd., 2011).

2.8.1.5. Seramik oksit (Al₂O₃.TiO₂)

Al₂O₃.TiO₂ ısı genleşme katsayısının, ısı iletkenlik ve Young modülü'nün düşük olmasından kaynaklanan mükemmel ısı şok direnci göstermesi ve iyi derecede kimyasal dirence sahip olması gibi özellikleriyle tanınan bir seramik oksittir. Geçtiğimiz on yılda, yeni Al₂O₃-temelli "özellikle TiO₂ içeren" nanokompozit kaplamalar üzerinde geniş bir çalışma yürütülmüştür (Shav vd., 2000; Gell vd., 2001; Goberman vd., 2002; Lin vd., 2003; Yang vd., 2009; Dejang vd., 2010) Al₂O₃.TiO₂ kaplamalar monolitik Al₂O₃ kaplamalara kıyasla daha iyi dayanıklılık ve aşınma direnci göstermeleri sebebiyle araştırmaların ilgi odağı olmuştur (Fervel vd., 1999).

2.9. Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrot yüzeylerinde gerçekleştirilen iletken polimer, enzim ve çeşitli nanoyapıların modifikasyonu işlemlerinden sonra elektrokimyasal yöntemlerle yüzeylerin performansı değerlendirilebilir.

2.9.1. Voltammetri ve voltammetrik yöntemler

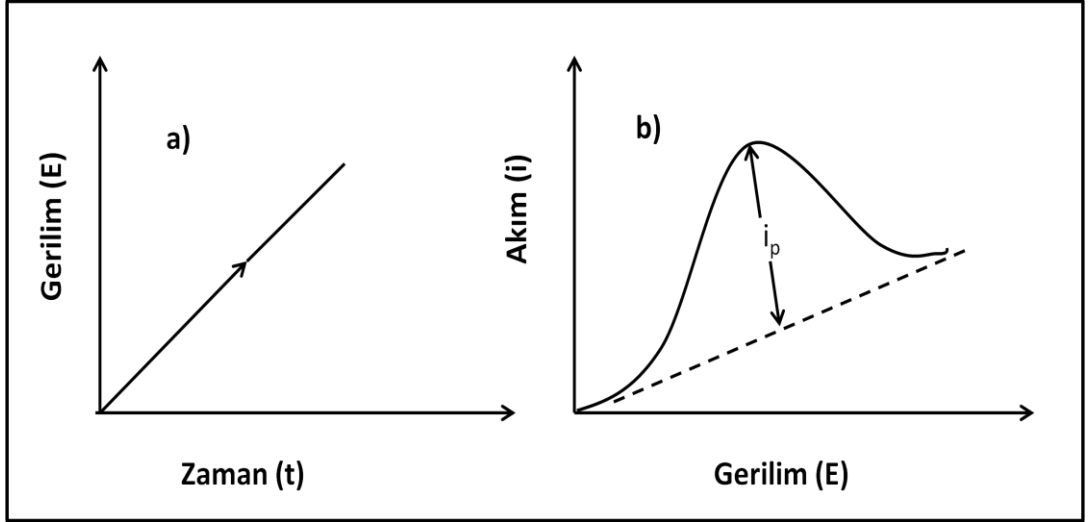
Voltammetri, akım-gerilim ve derişim ilişkilerinin çalışma elektrodu denilen ve bu elektrodun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen, bir grup elektro analitik metotlara verilen isimdir. Akım-gerilim eğrileri, iki ya da üç elektrotlu sistemlerle elde edilir. Voltammetride değişik türden çalışma elektrotları kullanıldığı gibi, değişik türden gerilim kaynakları da kullanılmaktadır. Bunları

doğru akım, doğru akıma bindirilmiş alternatif akım, kare dalga akım, değişik türden pulslu akımlar ve döngüsel akım şeklinde sıralayabiliriz.

Voltammetrik yöntemde çalışma elektrotu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda akım oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Bu yöntemle herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışının incelemesi elektrotta uygulanabilecek gerilim aralığının sınırlarına, kullanılan çalışma elektrotuna, kullanılan çözücü ve destek elektrolitin türüne bağlıdır (Özcan, 2008; ubuku, 2008; evik, 2009; Can, 2010; Yavuz, 2011).

2.9.1.1. Doğrusal Taramalı Voltammetri

Doğrusal taramalı voltammetride (LSV) elektroaktif bir madde içeren durgun bir çözeltide bir çalışma elektrotu ile karşılaştırma elektrotu arasına zamanla doğrusal olarak değişen bir gerilim uygulanır ve çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında oluşan akım ölçülür. Elde edilen akım-gerilim cevap eğrisine “doğrusal voltammogram” denir. LSV yönteminde önemli bir deneysel değişken olan gerilim tarama hızı, 0,01-1,00 V/s arasında değiştirilebilmektedir. Çalışma elektrotuna uygulanan gerilim elektroaktif maddenin indirgenme veya yükseltgenme gerilimine ulaşınca elektrot yüzeyindeki maddenin çok hızlı tüketilmesi akımda artışa neden olur. Bu işlem elektrot yüzeyi ile çözelti arasında bir derişim farkı doğurur. Bunun sonucu olarak çözeltiden elektrot yüzeyine difizyonla kütle aktarımı başlar. Difüzyonla kütle aktarımı, elektron aktarım işleminin hızı ile yarışamadığından akımda üstel bir düşüş gözlenir ve bir pik elde edilir (şekil 2.25) (Can, 2010).



Şekil 2.25. LSW’de (a) gerilimin taramasının zamanla değişimi ve (b) elde edilen voltammogram

2.9.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar

Voltammetride iki ya da üç elektrotlu sistemler kullanılabilir, yaygın olarak üç elektrotlu sistemler kullanılmaktadır.

2.9.2.1. Yardımcı elektrot

Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasından geçirilir ve çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır. Kaynaktan gelen elektriğin çözeltinin içinden geçerek elektroda aktarılmasını sağlayan yardımcı elektrot diğer bir deyişle karşıt elektrottur (Tural vd, 2006 Çubukçu, 2008; Çevik, 2009; Yavuz, 2011).

2.9.2.2. Referans elektrotlar

Potansiyeli deney süresince sabit kalan elektrot, referans elektrottur. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur. Polarize olmayan bu elektrotlar, akım şiddeti artınca ideal konumlarından saparak reaksiyon boyunca potansiyelleri değişmeden sabit kalmaktadır (Tural vd, 2006 Çubukçu, 2008; Çevik, 2009; Yavuz, 2011).

2.9.2.3. Çalışma elektrotları

Voltammetride kullanılan elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri önemlidir. Potansiyeli değişen elektrot, indikatör elektrot veya çalışma elektrodu adını alır. Genel olarak, kullanılan çalışma elektrotlarında, polarizasyonu arttırmak için yüzey alanları küçük tutulur (genellikle 1cm^2 ' den küçük).

Voltammetride çok çeşitli tür ve şekilde çalışma elektrotları kullanılmaktadır. Bunlar cıva, platin, altın, bizmut, ve karbon kökenli katı elektrotlar ile modifiye elektrotlardır. Bizim çalışmalarımızda kullandığımız karbon bazlı elektrotlar, “camımsı karbon pasta” ve “camımsı karbon” elektrotlardır.

Sabit ya da döndürülerek kullanabileceğimiz çalışma elektrotların hepsinin kendine has potansiyel çalışma aralığı vardır. Bu aralık elektrot türüne bağlı olduğu gibi, çözücüye, kullanılan elektrolit türüne ve pH'ye de bağlıdır (Tural vd, 2006; Çubukçu, 2008; Çevik, 2009; Yavuz, 2011).

2.9.2.4. Karbon bazlı elektrotlar

Karbon bazlı elektrotlar, hızlı yanıt veren, ekonomik, farklı konfigürasyon ve çaplarda kolaylıkla oluşturulabilen elektrotlardır. Camımsı karbon (GC) ve karbon pasta (CP) en yaygın kullanılan karbon elektrotlarıdır. CP çok düşük zemin akımına, yenilenme ve modifikasyon kolaylığı içeren kompozit doğası gibi avantajlara sahipken, GC elektrot önemli elektrokimyasal reaktiviteye, iyi mekaniksel katılığa ve ihmal edilebilir gözenekliliğe sahiptir. Karbon elektrotların bu önemli özellikleri karbon temelli elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir (Anık-Kırgöz vd., 2001; Yeliz, 2011).

Camımsı karbon pasta elektrot: GCPE, camımsı karbon mikro partiküllerin organik pasta sıvısı ile karıştırılmasını içeren hazırlanması kolay yeni bir karbon elektrot türüdür, bu özelliği kompozit elektrotlar ile birleşerek kolaylıkla hazırlanabilmektedir.

GC' nin yüzey modifikasyonu ile karşılaştırıldığında GCP elektrotlarının hazırlanma kolaylığı, biyosensör olarak bu elektrot materyalinin kullanımında önemli avantaj sağlamaktadır (Anık-Kırgöz vd., 2004; Yeliz, 2011).

Camımsı karbon elektrot: Karbon geniş bir anodik potansiyel aralığına, düşük elektriksel dirence, düşük artık akıma ve tekrarlanabilir yüzey yapısına sahip oluşu gibi birçok özellikleri ile ideal bir elektrot malzemesidir. Camımsı karbon elektrotlar özel yöntemle gözenek büyüklüğü azaltılarak elde edilir. Kimi polimerlerin 1800°C’de ısı bozundurulmaları sonucu oluştururlar. +0,65 voltta ön polarizasyon işlemi uygulanarak kullanıma hazır hale getirilir. Durağan ve dönen disk şeklinde kullanılabilirler. Çalışma potansiyel sınırları +1,00 V ile -0,75 V dur.

2.10. Kompozit

2.10.1. Kompozit malzeme

İki veya daha fazla sayıdaki aynı veya farklı gruptaki malzemelerin, en iyi özelliklerini bir araya toplamak yada ortaya yeni bir özellik çıkarmak amacıyla, bu malzemelerin makro seviyede birleştirilmesiyle oluşan malzemelere “Kompozit Malzeme” denir (Çubukçu, 2008).

2.10.2. Nanokompozit

Nano boyuttaki malzemelerin bir araya gelerek yeni bir yapı oluşturmasıdır. Nano boyuttaki malzemelerin değişik kombinasyonlarının karıştırılmasıyla hazırlanan elektrotlar farklı elektrokimyasal özellikler gösterebilmektedir. Bu şekilde hazırlanan nanokompozit yapılar sayesinde elektrokimyasal ölçümler için elektrotlar geliştirilebilmektedir (Çubukçu, 2008).

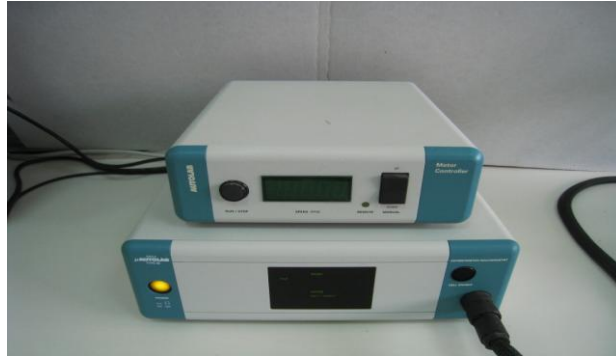
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

Elektrot performanslarının değerlendirilmesi için yapılan ölçümlerde, elektrokimyasal Potentiostat/Galvonostat ölçüm cihazları AUTOLAB PGSTAT 12 (Şekil 3.1) ve μ -AUTOLAB TYPE III (Şekil 3.2.) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. AUTOLAB PGSTAT 12



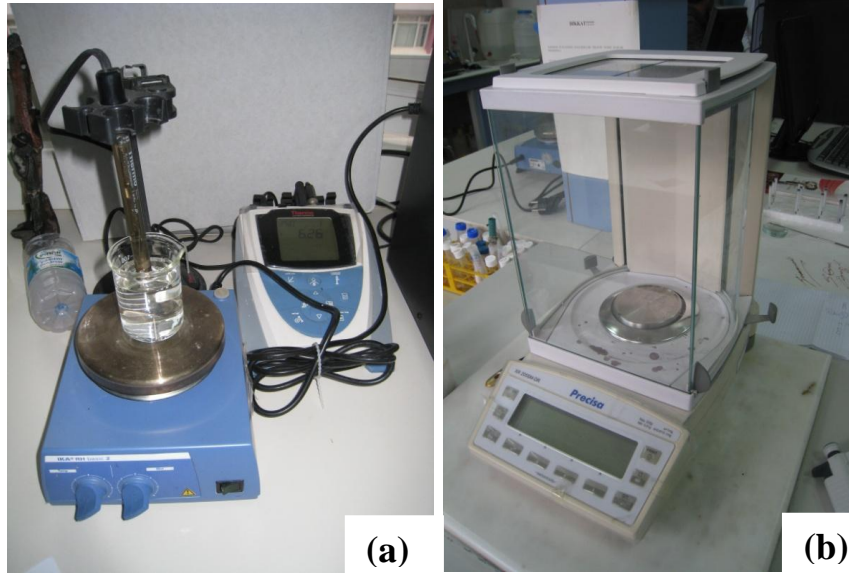
Şekil 3.2. μ -AUTOLAB TYPE III

Bilgisayar kontrollü olan AUTOLAB PGSTAT 12 ve μ -AUTOLAB TYPE III cihazlarının sinyalleri GPES Windows 4.9 ve Nova 1.8 yazılımı ile değerlendirilmiştir.

Yakıt hücresi performans denemelerinde akım-gerilim ölçümleri için Autoranging Mini Multimeter (MN16A) cihazı kullanılmıştır.

Deney süresince kullanılan diğer cihazlar ve kullanım amaçları şöyledir:

- ✓ 25 °C'de pH 7 ve pH 7,5'da standart elektrot çözeltileriyle kalibre edilmiş ORION STAR SERIES (Şekil 3.3.a) model pH metre ile pH ölçümleri yapılmıştır.
- ✓ Kimyasal çözeltileri hazırlamak için katı kimyasalların tartımı PRECISA XR 205SM-DR (Şekil 3.3.b) model hassas terazi ile yapılmıştır.



Şekil 3.3. (a) ORION STAR SERIES model pH, (b) PRECISA XR 205SM-DR model hassas terazi

- ✓ Katı elektrotları temizlemek ve zor çözünen maddeleri çözmek amacıyla BANDELİN SONOREX (RK 102 H) model sonikatör (Şekil 3.4) kullanılmıştır.

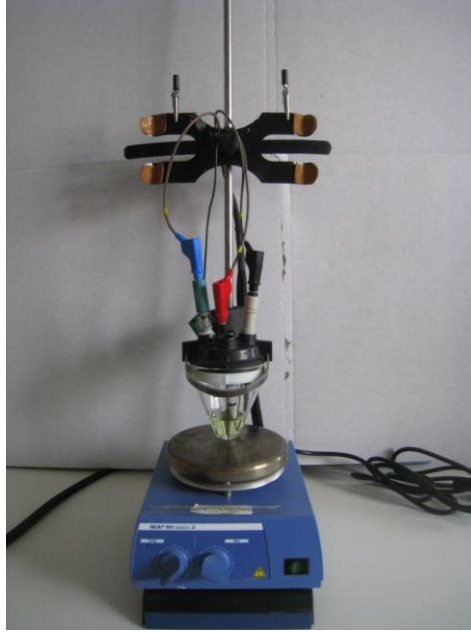


Şekil 3.4. BANDELİN SONOREX (RK 102 H) model sonikatör

- ✓ Karıştırma ve ısıtma işlemlerinde IKA-RH basic 2 kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Elektrotlar

Deneyler oda sıcaklığında 10 ml' lik hücrede Metrohm üçlü elektrot sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Metrohm üçlü elektrot sistemi

Enzim ve çeşitli nanoyapılar ile modifiye GCE ve GCPE'lar çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl (Metrohm), yardımcı elektrot olarak ise Pt elektrot (Metrohm) kullanılmıştır.

3.3. Kimyasallar ve Reaktifler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik safliktadır.

Bütün elektrokimyasal ölçümler ve BFC denemelerinde elektrolit çözelti olarak, çeşitli pH'larda fosfat (PBS) (KH_2PO_4 , %99.995 saflıkta, Merck) ve asetat (CH_3COOH , %100 saflıkta, Merck) tamponu kullanılmıştır. Tampon hazırlanırken üzerine 1 M NaOH (%97 saflıkta, Merck) ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır.

Biyo-anot elektrodun tasarımımda, enzim olarak GOx (*Aspergillus niger* kökenli, 39,8 U/mg, Sigma), substratı Glikoz (D(+)) Glikoz monohidrat, Merck) ve medyatör olarakta p-Benzokinon (%98 saflıkta, Merck) kullanılmıştır. Elektrodun modifikasyonunda; Au-np (gold colloid, 0,75 A₅₂₀ units/mL, conc. : ~0,01 % as HAuCl₄, Sigma), Aluminum titanate (Nanopowder <25 nm (BET) %98,5, Sigma), laboratuvarımızda üretilen MnO₂ np ve Au-Fe₃O₄ korşel nano yapısı kullanılmıştır.

Biyo-katot elektrodun tasarımımda, enzim olarak lakkaz (*Trametes versicolor* kökenli, 21 U/mg, Sigma) kullanılmıştır. Elektrodun modifikasyonunda MWCNT (diam.=110-170 nm, length=5-9 micron, 90+%, Aldrich) kullanılmıştır.

GCPE hazırlanması için glassy carbon spherical powder (2-12 micron, %99,95, metal basis, Merck) mikro partikülleri ve pasta kıvamına getirmek için mineral yağ (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Çift hücreli BFC'de katyon değiştirici olarak kullanılan tuz köprüsünde potasyum klorür (KCL, %100,4 saflıkta, Kimetsan), agar-agar (Agar Powder, Kimetsan) ve u borusu kullanılmıştır.

İmmobilize GCE hazırlanması için, jelatin (Bovine skin kökenli Type B, Sigma) ve kitosan (Orta molekül ağırlığında, Aldrich) kullanılmıştır. Elektrodun çapraz bağlanmasında Glutaraldehit çözeltisi (Grade II %25, Sigma-Aldrich) ve parlatılmasında alüminyum tozu 0,05-0,3-1µ (CH Instruments, Inc) kullanılmıştır.

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması

3.4.1.1. Fosfat tamponu çözeltisinin (PBS) hazırlanması

Destek elektrolit olarak 100 mM PBS tamponu, KH₂PO₄'den gerekli miktarda tartım alınarak çözelti hacmi 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Destek elektrolite NaOH ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır.

3.4.1.2. Asetat tamponu çözeltisinin hazırlanması

Destek elektrolit olarak 100 mM asetat tamponu, CH₃COOH'tan gerekli miktarda tartım alınarak çözelti hacmi 250 mL olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Destek elektrolite NaOH ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır.

3.4.2. Reaktiflerin hazırlanması

3.4.2.1. Medyatör çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde kullanılmak amacıyla BQ çözeltisi, istenilen derişimlerde gerekli miktarda tartım alınarak çözelti hacmi 10 mL olacak şekilde tampon çözeltisi ve glikoz ilavesiyle hazırlanmıştır. Medyatör çözeltisi her kullanım için taze hazırlanmış, ölçüme kadar karanlık ve oksijensiz ortamda saklanmıştır.

3.4.2.2. Substrat çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde kullanılmak amacıyla 1M glikoz çözeltisi, gerekli miktarda tartım alınarak çözelti hacmi 10 mL olacak şekilde tampon çözeltisi ilavesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisi yarım saat karıştırıldıktan sonra kullanılmak üzere dolapta (+4°C) saklanmıştır.

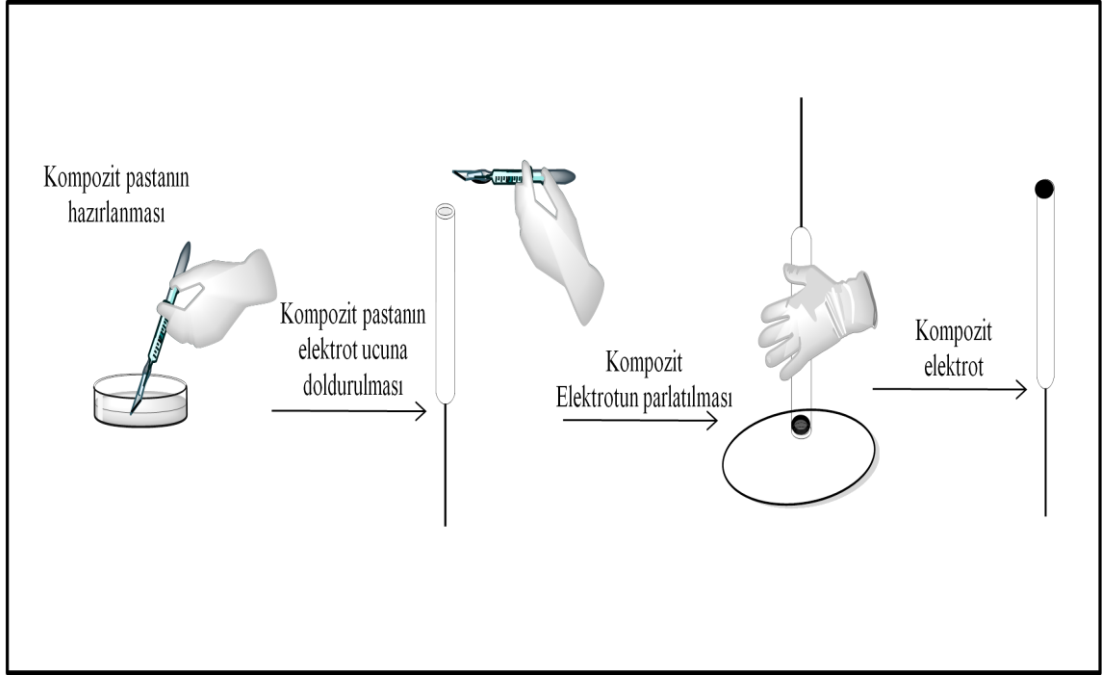
3.4.3. Çalışma hücresinde kullanılan çözeltinin hazırlanması

Daha önceden hazırlanmış olan reaktif ve destek tampon çözeltilerinden gerekli miktarlarda alınarak son hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.5. Enzimatik Elektrotların Hazırlanması

3.5.1. Kompozit elektrotların hazırlanması

Şekil 3. 6'da kompozit elektrotların hazırlama aşamaları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Kompozit elektrot hazırlama basamakları

3.5.1.1. Anot elektrotların hazırlanması

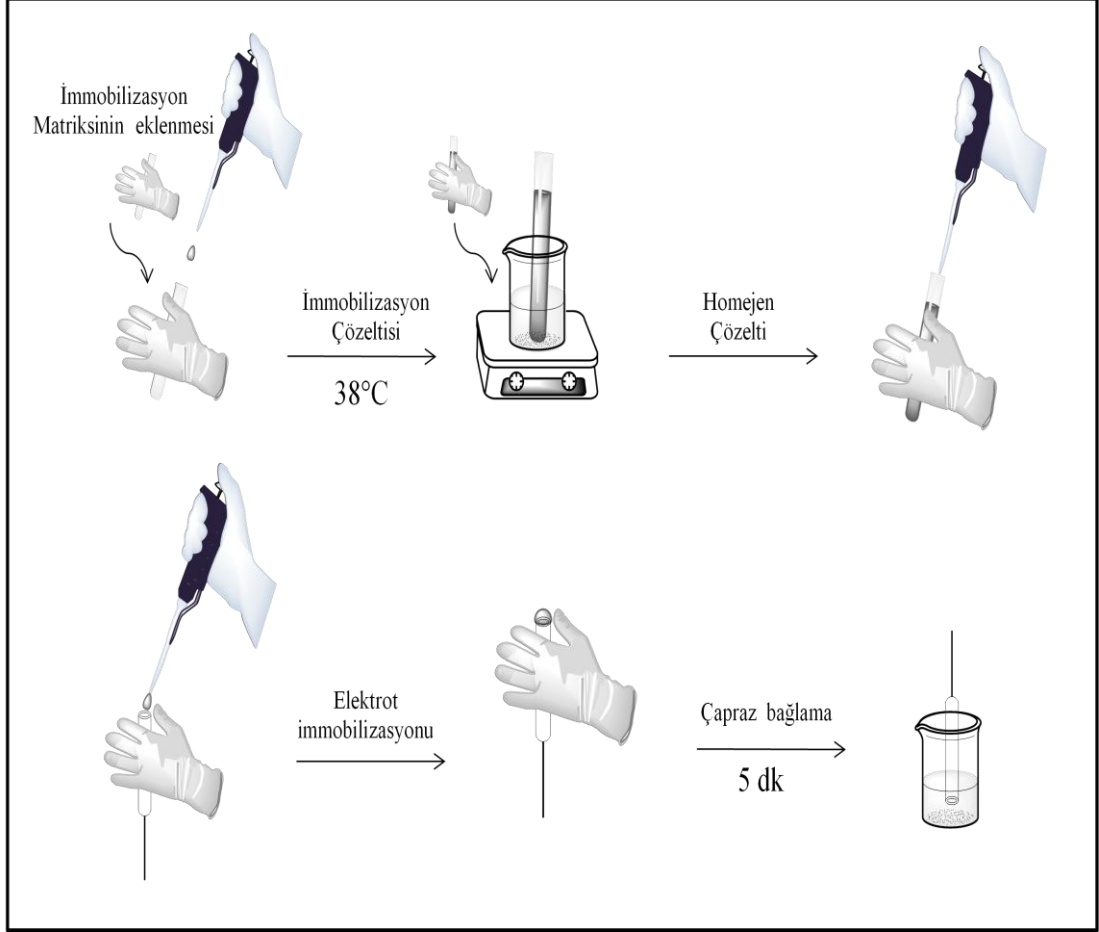
GCPE (80:20 (w/w) % katı malzeme (farklı kombinasyon ve miktarlarda, camımsı karbon mikropartikül + GOx, BQ, Al₂O₃-TiO₂)/mineral yağ (MnO₂ np, Au np ve Au-Fe₃O₄ eğer eklense, ilaveten katılmıştır) bir spatül yardımı ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan pasta, elektrot boşluğuna (4 mm çapında, 3 mm derinliğinde) iyice doldurulmuştur. Elektriksel bağlantı bir bakır tel yardımı ile sağlanmıştır. Ölçüm yapılmadan önce, elektrot yüzeyi uygun sürtme kağıdı ile düzeltilmiştir.

3.5.1.2. Katot elektrotların hazırlanması

GCPE (80:20 (w/w) % katı malzeme (farklı kombinasyon ve miktarlarda, camımsı karbon mikropartikül + Lakkaz, MWCNT)/mineral yağ, bir spatül yardımı ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan pasta, elektrot boşluğuna (4 mm çapında, 3 mm yüksekliğinde) iyice doldurulmuştur. Elektriksel bağlantı bir bakır tel yardımı ile sağlanmıştır. Ölçüm yapılmadan önce, elektrot yüzeyleri uygun kağıtlara sürtülerek parlatılmıştır.

3.5.2. İmmobilize elektrotların hazırlanması

Şekil 3.7’de immobilize elektrotların hazırlama aşamaları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.7. İmmobilize elektrot hazırlama basamakları

3.5.1.1. Anot elektrotların hazırlanması

GCE önce farklı boyutlardaki alümina tozunda parlatıldıktan sonra ultrasonik banyo içerisinde saf su ile temizlenmiştir. Daha sonra bu elektrot üzerine, uygun miktarlarda GOx, jelatin ve tampon çözeltisinin (Faklı kombinasyon ve miktarlarda BQ, Al₂O₃-TiO₂, MnO₂ np, Au np ve Au-Fe₃O₄ ilaveten katılmıştır) homejen karışımı (Su banyosunda enzim aktifliğini kaybetmeyecek sıcaklıkta hazırlanmıştır) bir mikropipet vasıtasıyla damlatılmıştır. Hazırlanan elektrot bir saat buz dolabında (+4°C) bekletildikten sonra çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için 5 dk GA

çözeltisine daldırılmıştır. İmmobilize GCE kullanılmak üzere tampon çözeltisinde buz dolabında (+4°C) saklanmıştır.

GCPE ise uygun miktarlarda GOx, jelatin ve tampon çözeltisinin (Farklı kombinasyon ve miktarlarda BQ, Al₂O₃-TiO₂, MnO₂ np, Au np ve Au-Fe₃O₄ ilaveten katılmıştır) homejen karışımı (Su banyosunda enzim aktifliğini kaybetmeyecek sıcaklıkta hazırlanmıştır) bir mikropipet vasıtasıyla damlatılmıştır. Hazırlanan elektrot bir saat buz dolabında (+4°C) bekletildikten sonra çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi için 5 dk GA çözeltisine daldırılmıştır. İmmobilize GCPE kullanılmak üzere tampon çözeltisinde buz dolabında (+4°C) saklanmıştır.

3.5.1.2. Katot elektrotların hazırlanması

GCE önce farklı boyutlardaki alümina tozunda parlatıldıktan sonra ultrasonik banyo içerisinde saf su ile temizlenmiştir. Sonra bu elektrot üzerine, 2 µL lakaz çözeltisi (42 U/ml) damlatılarak kurutulmuştur. Daha sonra bu elektrot üzerine 2 µL CS (50 ml, 2 M asetik asit çözeltisinde çözülmüş CS parçacıkları) damlatılarak, 2 µL CS damlatılıp sonra 2 µL GA damlatılarak ve 2 µL CS damlatılıp kurutulduktan sonra 2 µL GA damlatılarak olmak üzere 3 farklı elektrot hazırlanmıştır. Daha sonra bu elektrotlar kullanmadan önce buz dolabında 4 saat bekletilmiştir.

3.6. Elektrotların Performans Çalışmaları

Elektrotların performans çalışmaları LSV yöntemiyle 10 ml'lik voltammetrik hücrede metrohm 3'lü elektrot sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Anot ve katot elektrotlar farklı parametrelerde değerlendirilmiştir.

3.6.1. Anot elektrot performans çalışmaları

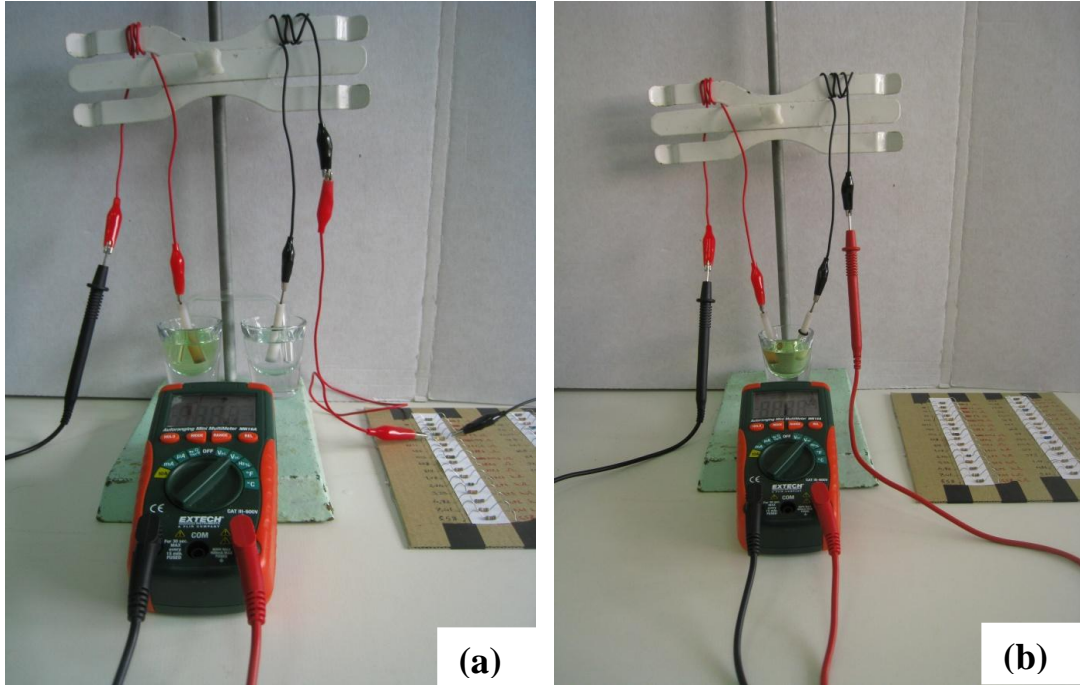
LSV ölçümleri destek elektrolit ve reaktif çözeltilerin varlığında, 10 mV/s tarama hızında, -200mV ile 1200mV potansiyel aralığında yürütülmüştür.

3.6.2. Katot elektrot performans çalışmaları

LSV ölçümleri destek elektrolit ve reaktif çözeltilerin varlığında, 10 mV/s tarama hızında, -100mV ile -1000mV potansiyel aralığında yürütülmüştür.

3.7. Biyo-Yakıt Hücre Çalışmaları

Elektrot performans çalışmaları sonucu optimize edilen biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar oluşturulan tek ve çift hücreli BFC'lerde bir multimetre yardımıyla ve farklı dirençlerin bağlanmasıyla test edilmiştir. Şekil 3.8'de tek hücreli (tuz köprülü) ve çift hücreli BFC'ler gösterilmiştir.



Şekil 3.8. (a) Tuz köprülü BFC, (b) Tek hücreli BFC

3.7.1. Biyo-yakıt hücre kurulumu

Optimize biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar tek ve çift hücreli BFC'lerde test edilmiştir. Elektriksel bağlantı bakır ile sağlanmıştır. Akım ve gerilim ölçümleri bir multimetre yardımıyla ve çeşitli dirençlerin bağlanmasıyla sağlanmıştır.

3.7.2. Biyo-anot

Tek ve çift hücreli BFC'lerde biyo-anot olarak GOx ile 4 farklı nanoyapı modifiye ve yalın GCPE kullanılmıştır. Bu elektrotlar için optimize edilen elektrolit ve tampon çözeltilerin varlığında çalışılmıştır.

3.7.3. Biyo-katot

Tek ve çift hücreli BFC'lerde biyo-katot olarak lakkaz modifiye yalın GCPE kullanılmıştır. Bu elektrotlar için optimize edilen elektrolit ve tampon çözeltilerin varlığında çalışılmıştır.

3.7.4. Açık devre potansiyeli

OCP, oluşturulan BFC'lerde elektronik devreden hiç akım geçmezken ölçülen gerilimdir. OCP yakıt hücrelerinin karakterize edildiği parametrelerden biridir.

3.7.5. Kısa devre akım yoğunluğu

Kısa devre akım yoğunluğu, oluşturulan BFC'lere farklı dirençler uygulanarak elde edilen en yüksek akımın birim elektrot yüzeyine düşen akım değeridir.

3.7.6. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Polarizasyon eğrisi, BFC performansı ve performans kayıplarının değerlendirildiği, uygulanan farklı dirençlerde hücre potansiyelinin akım yoğunluğuna karşı değişim eğrisidir.

Güç yoğunluğu, BFC'de elektrotların birim yüzey alan başına sağladığı güç miktarıdır. Bir BFC'de güç (P), akım (I) ve gerilim (V) çarpına eşit olduğundan güç yoğunluğu, gücün elektrot alanına bölümüne eşittir.

Güç yoğunluğu eğrisi ise güç yoğunluğunun değişen hücre potansiyeline karşı grafiğe geçirildiği eğridir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

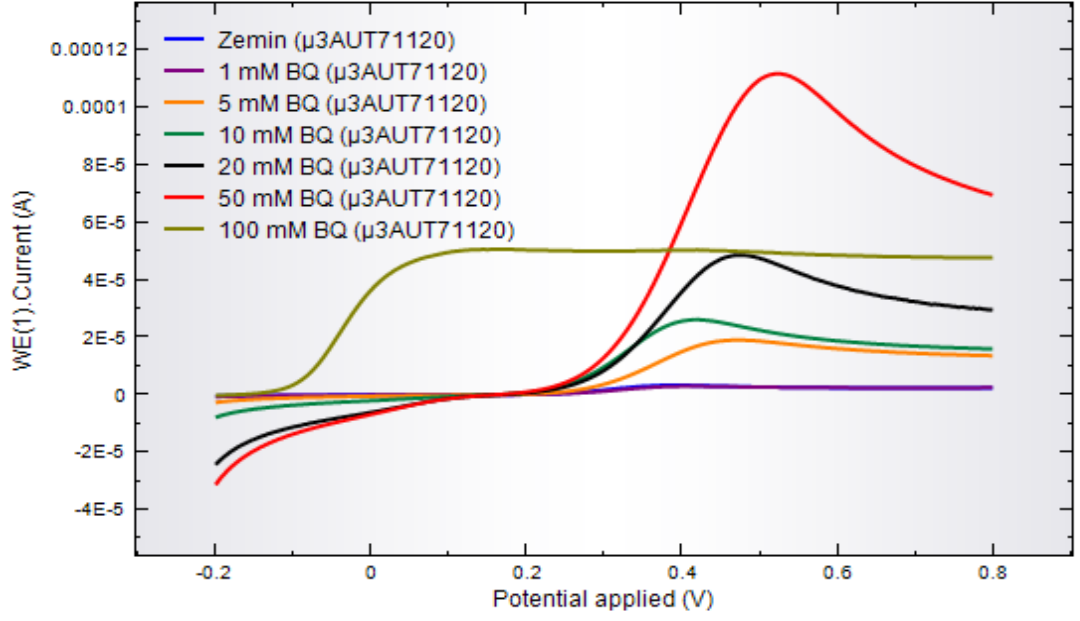
4.1. Uygun Biyo-Anot Elektrodun Belirlenmesi

Biyo-anot olarak kullanılmak üzere elektrot belirlerken GC ve GCP elektrotlar farklı modifikasyonlarla değerlendirilmiştir. Bu elektrotlar, medyatörün immobilize edildiği ve çözeltiye eklendiği sistemlerde denenmiştir. En uygun elektrot seçilerek optimizasyon işlemleri yapılmıştır.

BO immobilize GC elektrot: 1,2 mg GOx/4 mg jelatin ve 100 mM PBS'de farklı derişimlerde BQ içeren çözeltinin 80µL'si daha önce immobilize elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bu elektrot LSV yöntemiyle -0.2mV ile 0,8mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 20 mM glikoz içeren 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

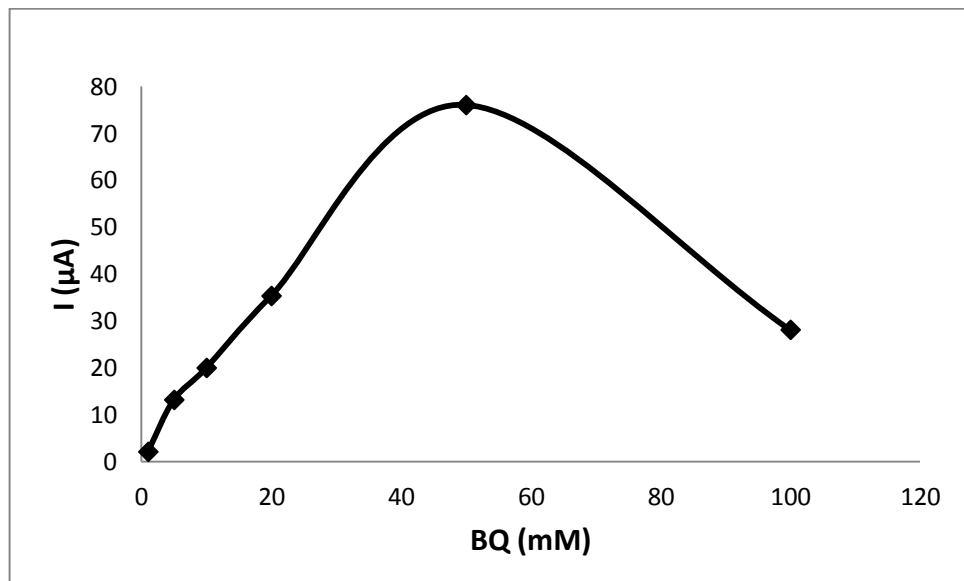
Şekil 4.1'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. BQ immobilize GCE'nin voltammogramları

Çizelge 4.1. BQ immobilize GCE

BQ (mM) imb.	GCE (μA)
100	28,066
50	75,988
20	35,29
10	19,942
5	13,131
1	2,058
Zemin	1,58



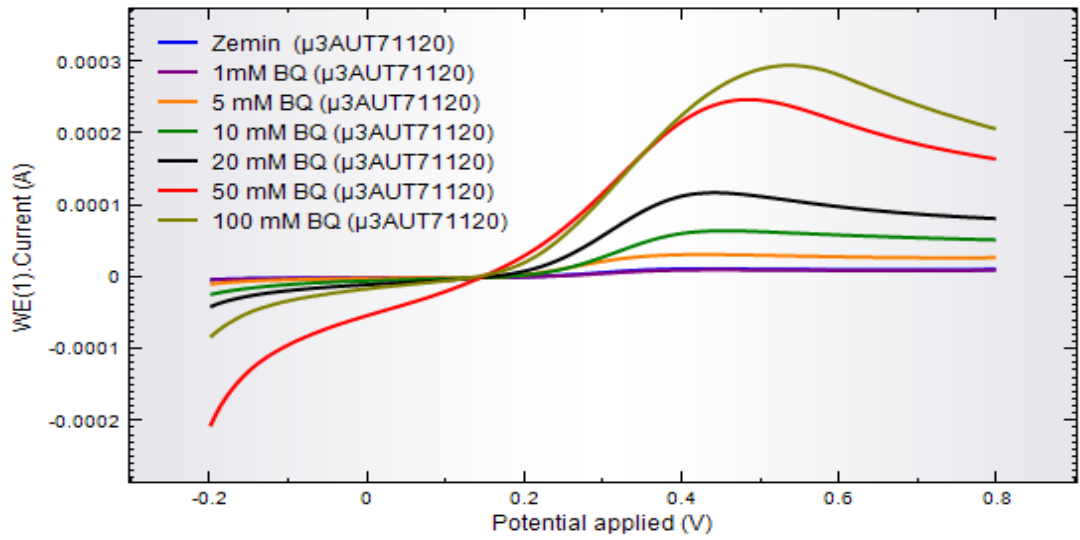
Şekil 4.2. BQ immobilize GCE

BQ ve GOx'in immobilize edildiği GCE ile glikoz ve medyatöre karşı yanıt alınmıştır.

BQ immobilize GCP elektrot: 1,2 mg GOx/4 mg jelatin ve 100 mM PBS'de farklı derişimlerde BQ içeren çözeltinin 80 μ L'si daha önce immobilize elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bu elektrot LSV yöntemiyle -0,2mV ile 0,8mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 20 mM glikoz içeren 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

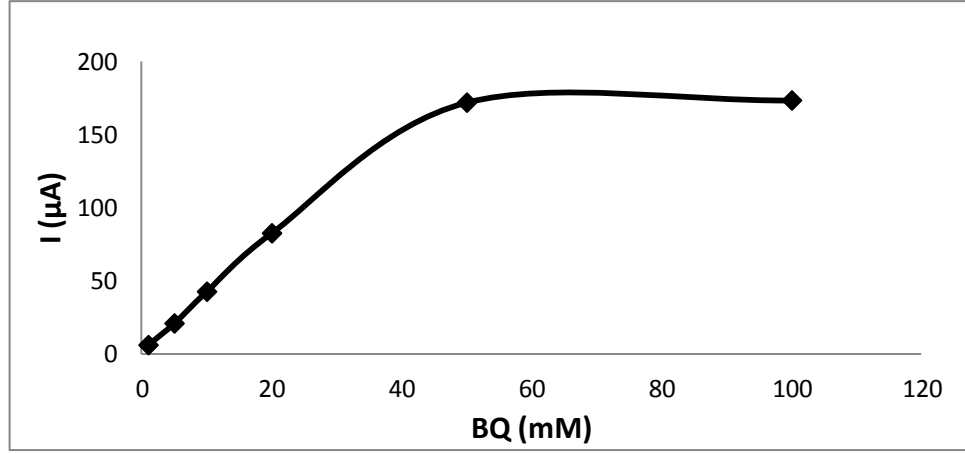
Şekil 4.3'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. BQ immobilize GCPE'nin voltammogramları

Çizelge 4.2. BQ immobilize GCPE

BQ (mM) imb.	GCPE (μA)
100	173,41
50	171,91
20	82,525
10	42,556
5	20,806
1	6,005
Zemin	4,648



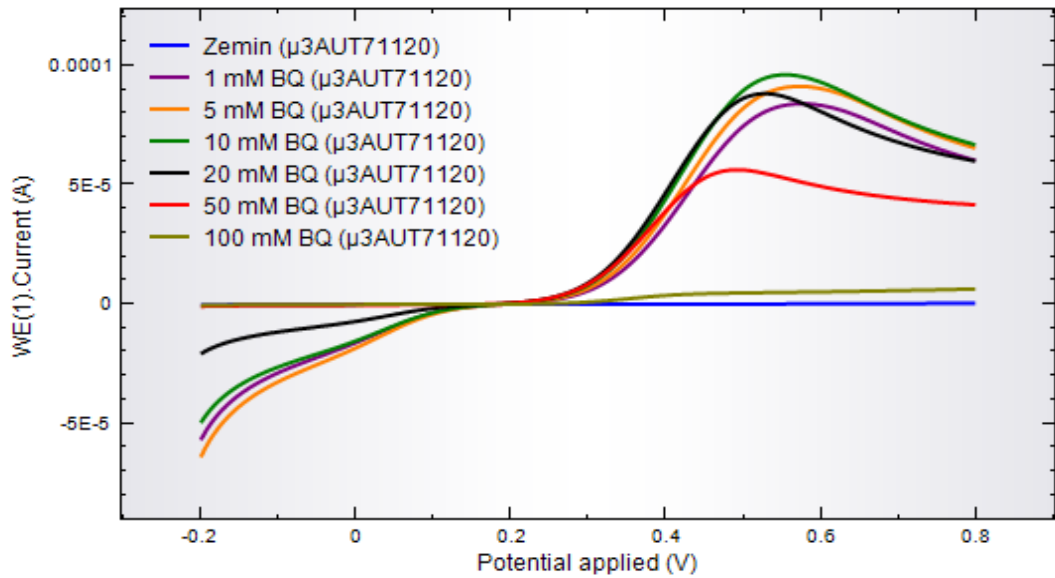
Şekil 4.4. BQ immobilize GCPE

BQ ve GOx'in immobilize edildiği GCPE ile glikoz ve medyatöre karşı yanıt alınmıştır.

BQ çözeltide GC elektrot: 100 mM PBS'de 1,2 mg GOx/4 mg jelatin içeren çözeltinin 80μL'si daha önce immobilize elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bu elektrot LSV yöntemiyle -0.2mV ile 0,8mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 20 mM glikoz ve BQ'nun farklı derişimlerini içeren 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

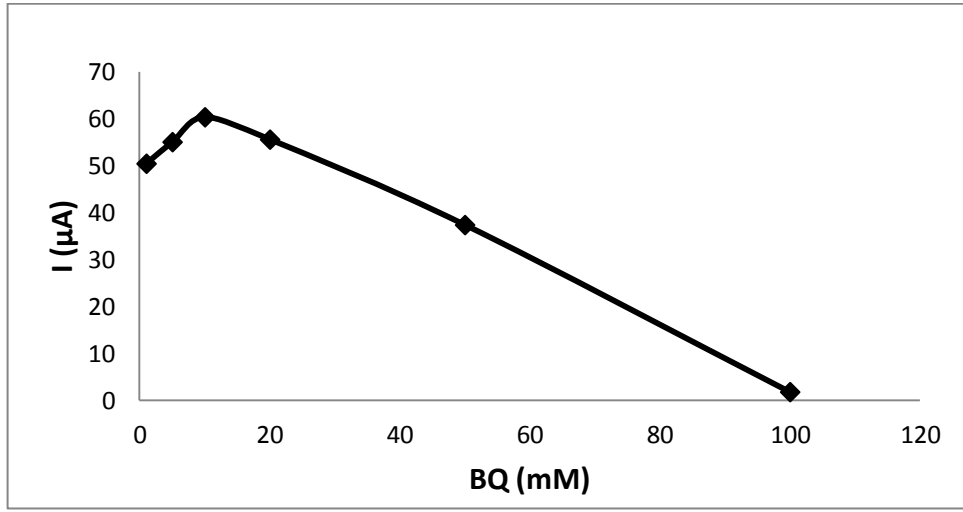
Şekil 4.5'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. BQ çözeltideyken GCE'nin BQ voltammogramları

Çizelge 4.3. BQ çözeltideyken GCE

BQ (mM) çözelti	GCE (μA)
100	1,75
50	37,336
20	55,527
10	60,24
5	54,995
1	50,389
Zemin	-



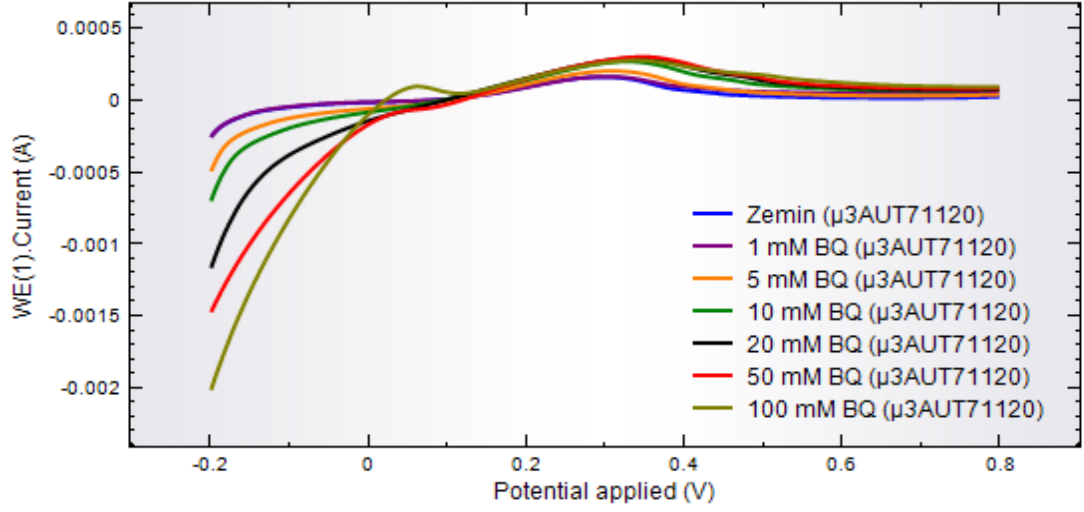
Şekil 4.6. BQ çözeltideyken GCE

BQ çözeltide iken GOx'in immobilize edildiği GCE ile glikoz ve medyatöre karşı yanıt alınmıştır.

BO çözeltide GCP elektrot: 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bu elektrot LSV yöntemiyle -0.2mV ile 0,8mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 20 mM glikoz ve BQ'nun farklı derişimlerini içeren 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

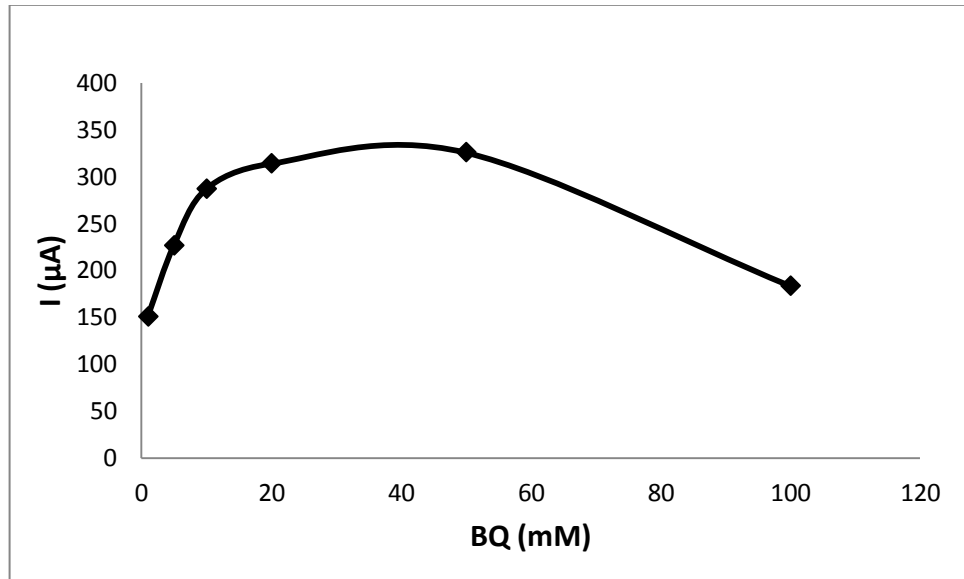
Şekil 4.7'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.4 ve Şekil 4.8'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7. BQ çözeltideyken GCPE'nin voltammogramları

Çizelge 4.4. BQ çözeltideyken GCPE

BQ (mM) çözelti	GCPE (μA)
100	183,42
50	325,84
20	313,93
10	286,81
5	226,42
1	150,61
Zemin	137,47



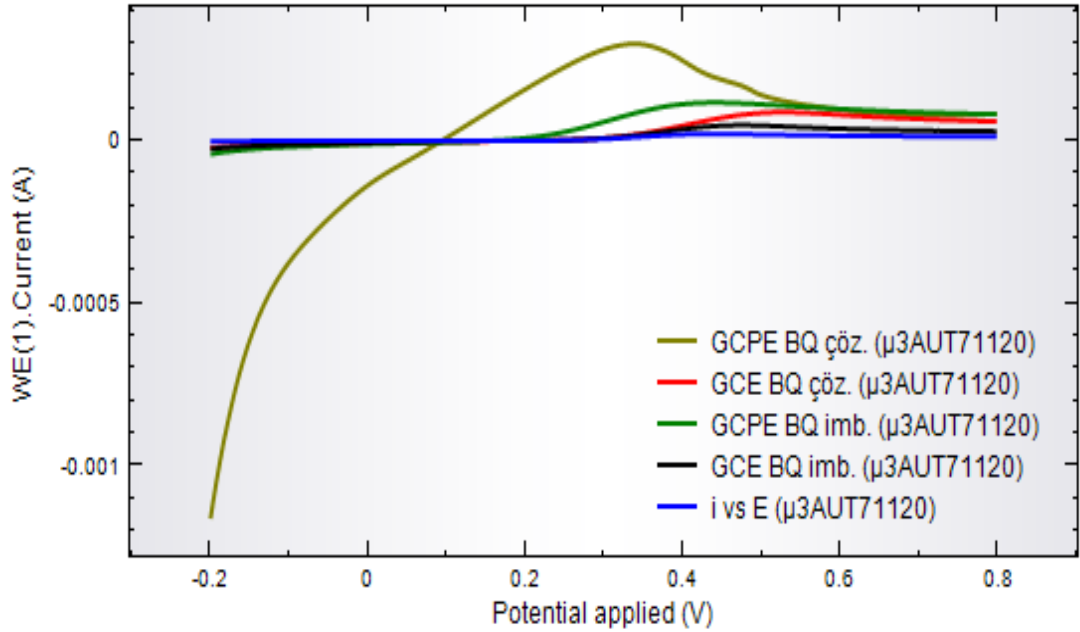
Şekil 4.8. BQ çözeltideyken GCPE

BQ çözültide iken GOx modifiye GCPE ile glikoz ve medyatöre karşı yanıt alınmıştır.

4.1.1. Uygun biyo-anot elektrotların karşılaştırması

Biyo-anot elektrot olarak kullanılmak üzere 4 farklı kombinasyonda hazırlanan elektrotlar nova programı yardımıyla üst üste çakıştırılmış ve akım değerleri karşılaştırılmıştır. Denemeler sonunda en uygun biyo-anot elektrot olarak BQ'nun çözültide olduğu 313,93 μA akımın elde edildiği GCPE seçilmiştir.

Şekil 4.9'da biyo-anot elektroda ait voltammogramların karşılaştırılması ve Çizelge 4.5'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Biyo-anot elektrotların voltammogramları

Çizelge 4.5. Biyo-anot elektrotların karşılaştırılması

Elektrotlar	GCPE (μA)
GCPE BQ imb.	82,525
GCE BQ imb.	35,29
GCE BQ çöz.	55,527
GCPE BQ çöz.	313,93
Zemin	8,65

4.1.2. Biyo-anot elektrodun çalışma koşullarının optimizasyonu

BFC’de kullanılmak üzere tercih edilen biyo-anot elektrot, farklı nano yapılar ile modifiye edilmiştir. Nanoyapı modifiye kompozit elektrotların optimize edilen parametreleri aşağıda verilmiştir.

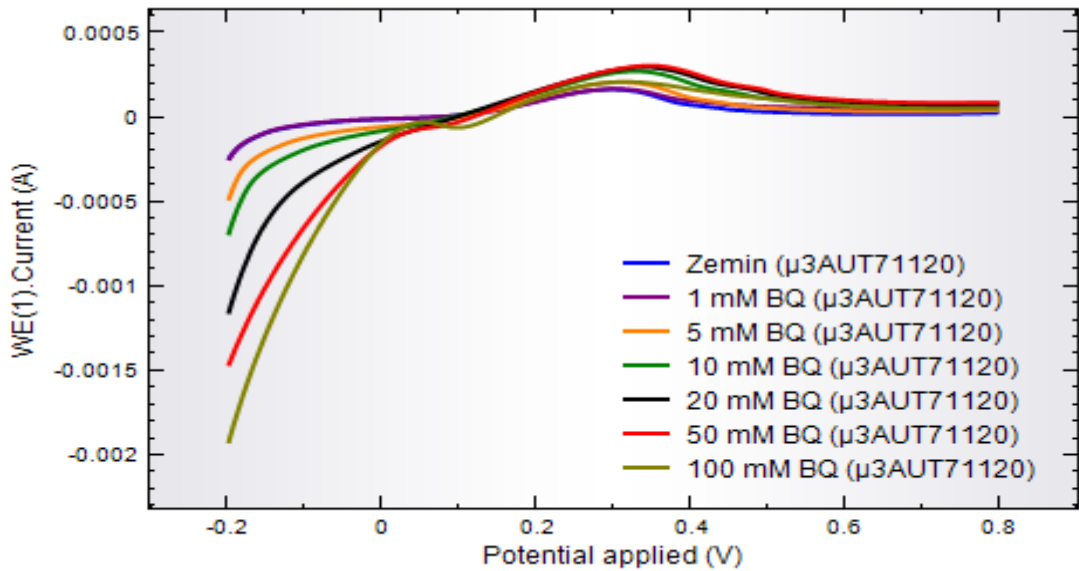
4.1.2.1. Medyatör derişimi optimizasyonu

Farklı nanoyapı modifiye kompozit elektrotların BQ derişim optimizasyonu LSV yöntemiyle -0.2mV ile 0,8mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 20 mM glikoz ve farklı derişimlerde BQ içeren 10 mL’lik hücrede 100 mM PBS’de (pH 7) çalışılmıştır.

Yalın elektrot: Yalın GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 20 mM BQ derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 20 mM BQ derişimi optimum medyatör derişimi olarak belirlenmiştir.

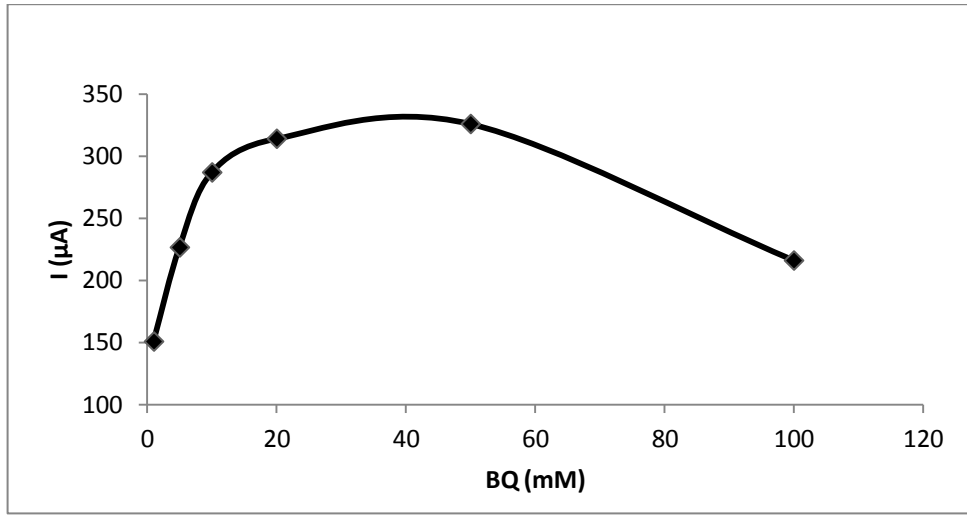
Şekil 4.10’da bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11’de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Yalın elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.6. Yalın elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri

BQ (mM)	GCPE (μ A)
100	215,85
50	325,84
20	313,93
10	286,81
5	226,42
1	150,61
Zemin	128,37

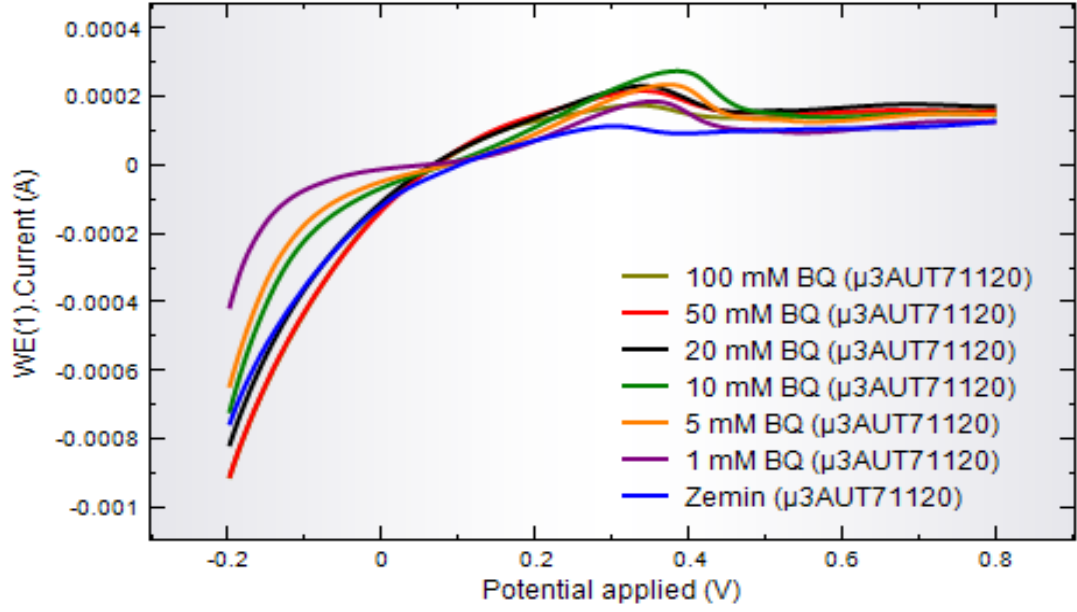


Şekil 4.11. Yalın elektrodun BQ optimizasyon grafiği

MnO₂ np modifiye kompozit elektrot: MnO₂ np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2 μ L MnO₂ np karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 10 mM BQ derişiminden sonra akım değerlerinde düşüş gerçekleştiğinden 20 mM BQ derişimi optimum medyatör derişimi olarak belirlenmiştir.

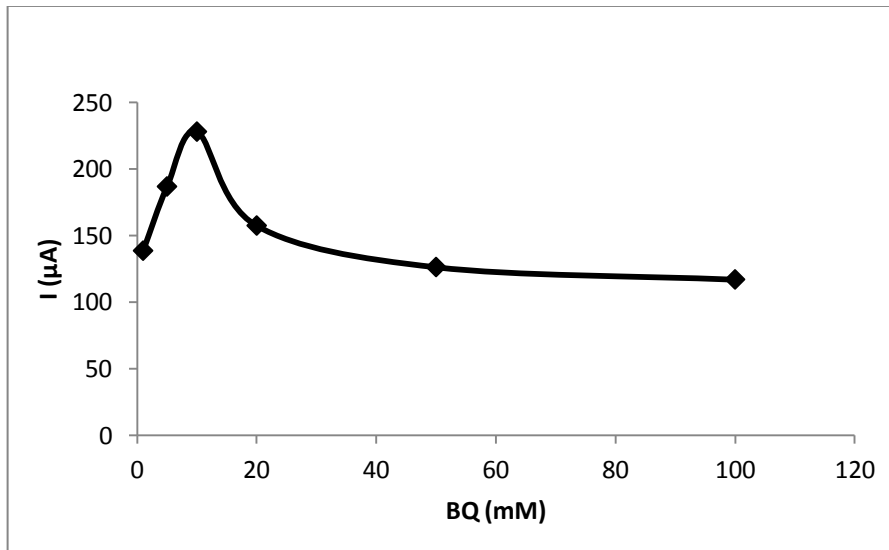
Şekil 4.12’de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.7 ve Şekil 4.13’de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.12. MnO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.7. MnO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri

MnO ₂ 'li BQ Çözeltide (mM)	GCPE (10 ⁻⁶ µA)
100	117,01
50	126,32
20	157,48
10	228,00
5	186,80
1	138,60
Zemin	48,58

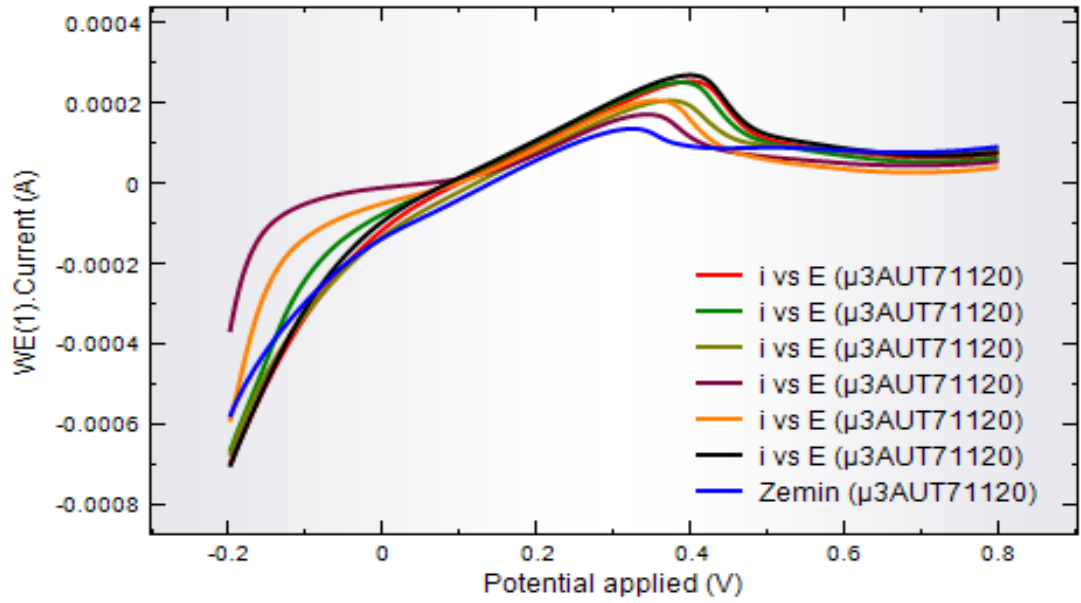


Şekil 4.13. MnO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği

Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrot: Au-Fe₂O₃ modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au-Fe₂O₃ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 10 mM BQ derişiminden sonra akım değerlerinde düşüş gerçekleştiğinden 10 mM BQ derişimi optimum medyatör derişimi olarak belirlenmiştir.

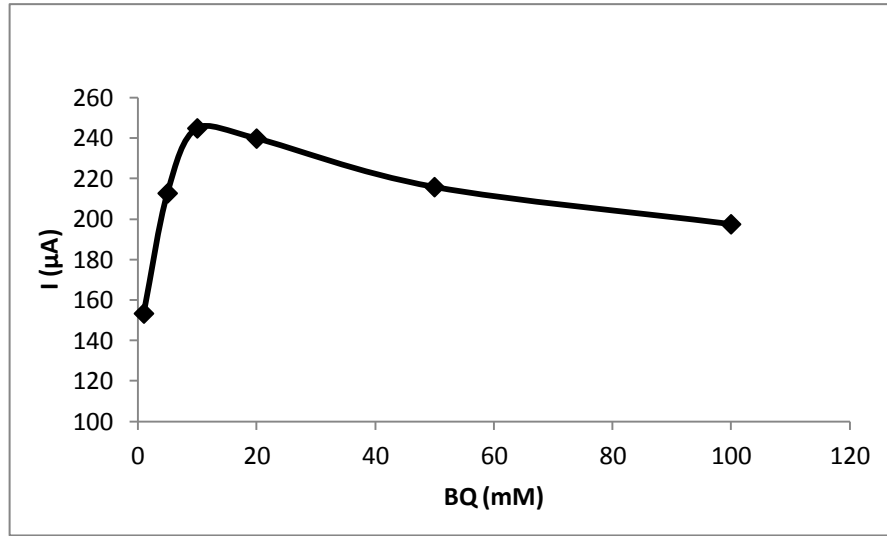
Şekil 4.14'te bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.8 ve Şekil 4.15'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.8. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri

Au-Fe ₃ O ₄ np BQ Çözeltide	GCPE (10 ⁻⁶ µA)
100	197,52
50	215,87
20	239,85
10	244,91
5	212,82
1	153,41
Zemin	115,39

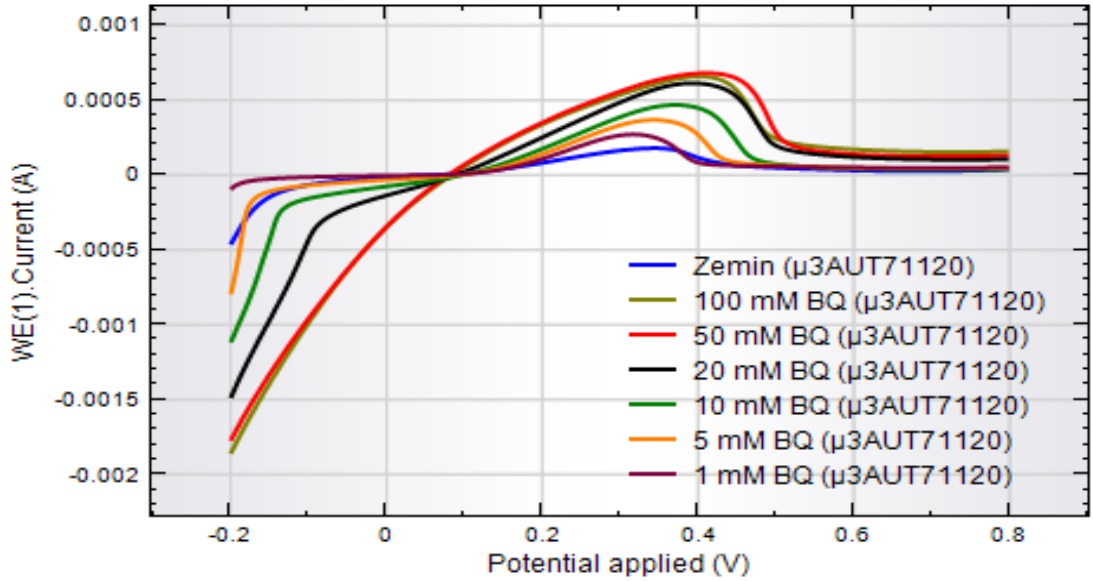


Şekil 4.15. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği

Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrot: Al₂O₃-TiO₂ modifiye GCPE, 46:14:20:20 (% w/w) GCP/GO_x/MY/Al₂O₃-TiO₂ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 20 mM BQ derişiminden sonra akım değerlerinde düşüş gerçekleştiğinden 20 mM BQ derişimi optimum medyator derişimi olarak belirlenmiştir.

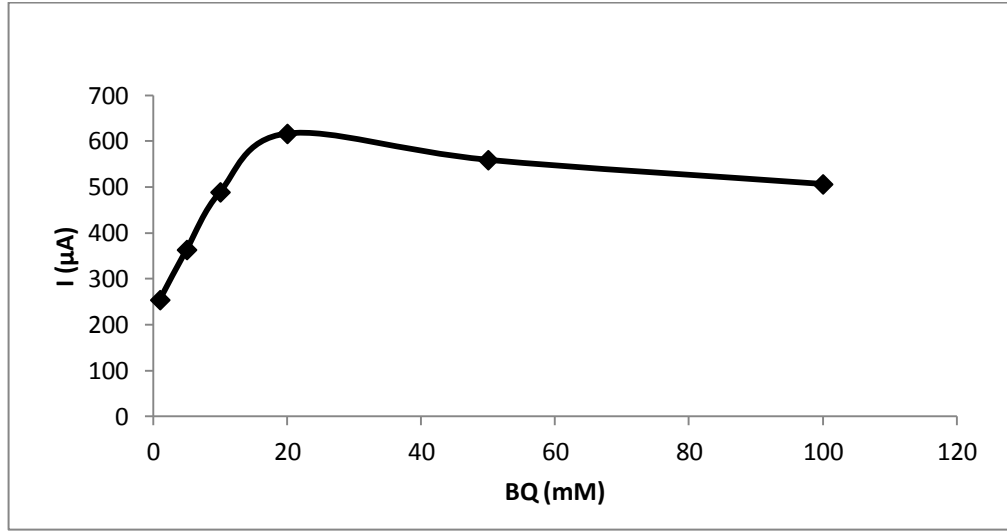
Şekil 4.16'da bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.9 ve Şekil 4.17'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.9. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri

Al-TiO ₂ np BQ Çözeltide (mM)	GCPE (µA)
100	506,2
50	558,9
20	616,15
10	488,84
5	363,24
1	254,02
Zemin	110,85

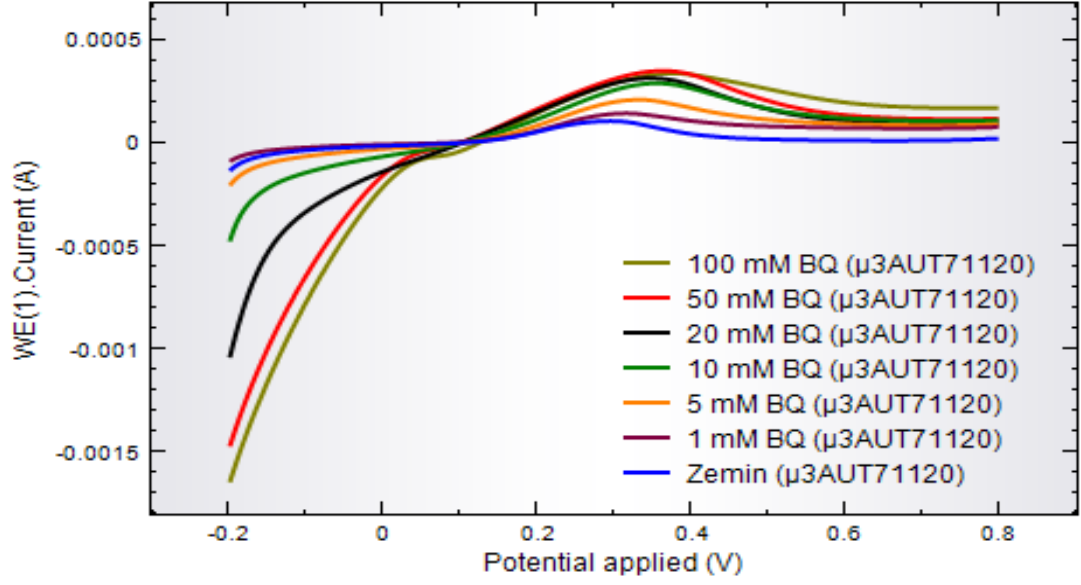


Şekil 4.17. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği

Au elektrot np modifiye kompozit elektrot: Au np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au np karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 20 mM BQ derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 20 mM BQ derişimi optimum medyatör derişimi olarak belirlenmiştir.

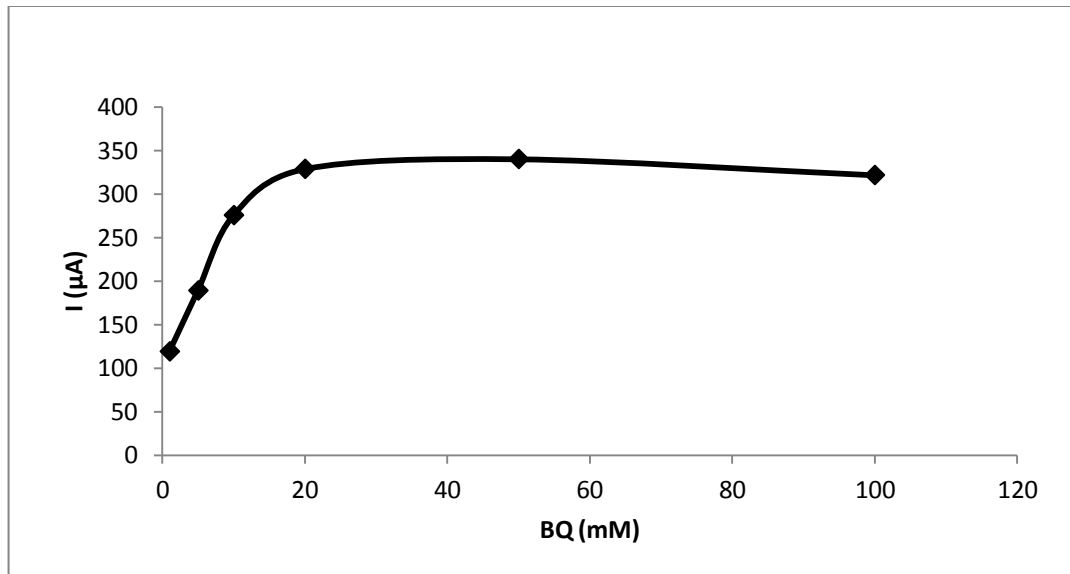
Şekil 4.18'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.10 ve Şekil 4.19'da buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.10. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon akım değerleri

Au,BQ Çözeltide (mM)	GCPE (μA)
100	321,56
50	339,97
20	328,63
10	275,5
5	188,94
1	118,91



Şekil 4.19. Au np modifiye kompozit elektrodun BQ optimizasyon grafiği

4.1.2.2. Enzim miktarı optimizasyonu

Daha önceki çalışmalarda optimize edilen GOx miktarı (55,7 Unit) bu çalışmada da optimum enzim miktarı olarak kullanılmıştır (Anık, 2012).

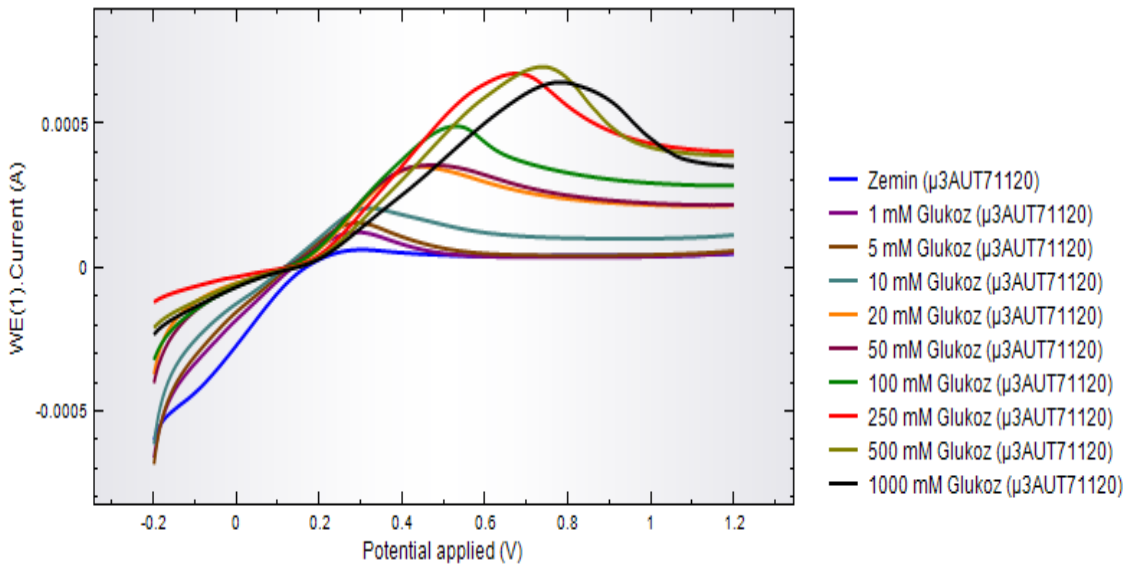
4.1.2.3. Substrat derişimi optimizasyonu

Medyatör derişimi optimizasyonundan sonra farklı nano yapı modifiye kompozit elektrotların substrat derişimleri LSV yöntemiyle -0.2mV ile 1,2mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında optimize edilmiştir. Bu amaçla optimum BQ derişimi ve farklı derişimlerde glikoz içeren 10 mL'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

Yalın elektrot: Yalın GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 250 mM glikoz derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 250 mM glikoz derişimi optimum substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

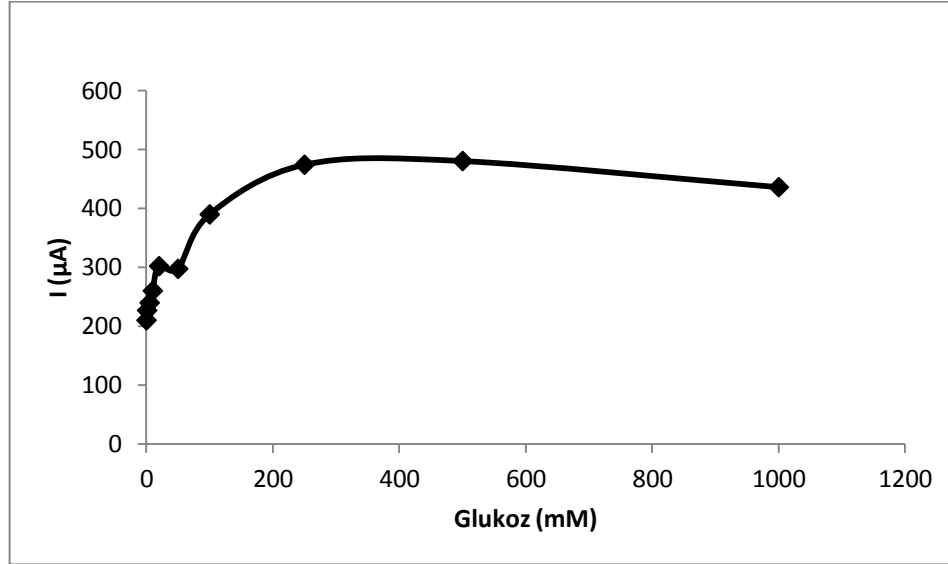
Şekil 4.20'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.11 ve Şekil 4.21'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Yalın elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.11. Yalın elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Glikoz Derişimi (mM)	Akım (μA)
Zemin	209,91
1	226,61
5	239,56
10	259,81
20	301,78
50	297,18
100	389,56
250	473,91
500	480,22
1000	435,88

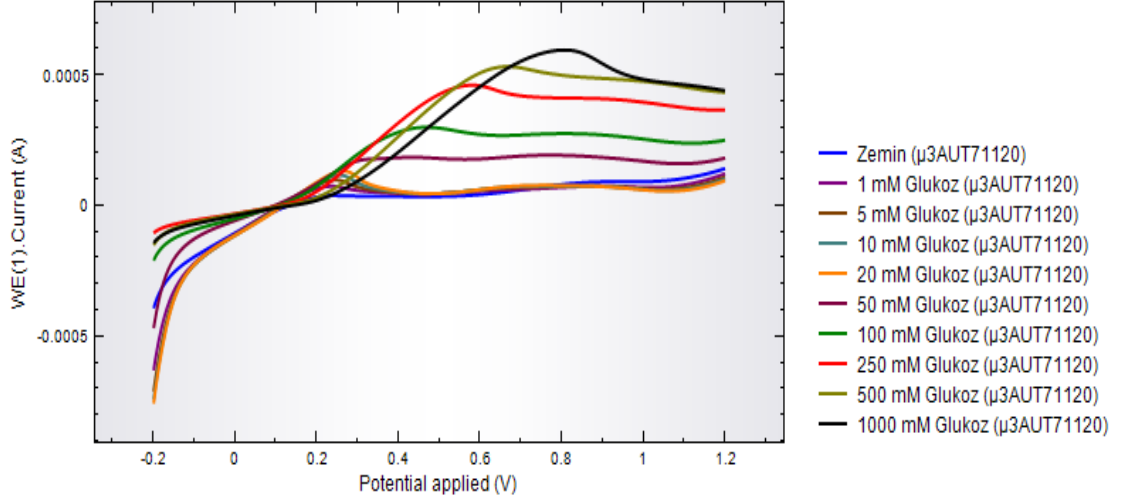


Şekil 4.21. Yalın elektrodun substrat optimizasyon grafiği

MnO₂ np modifiye kompozit elektrot: MnO₂ np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 250 mM glikoz derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 250 mM glikoz derişimi optimum substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

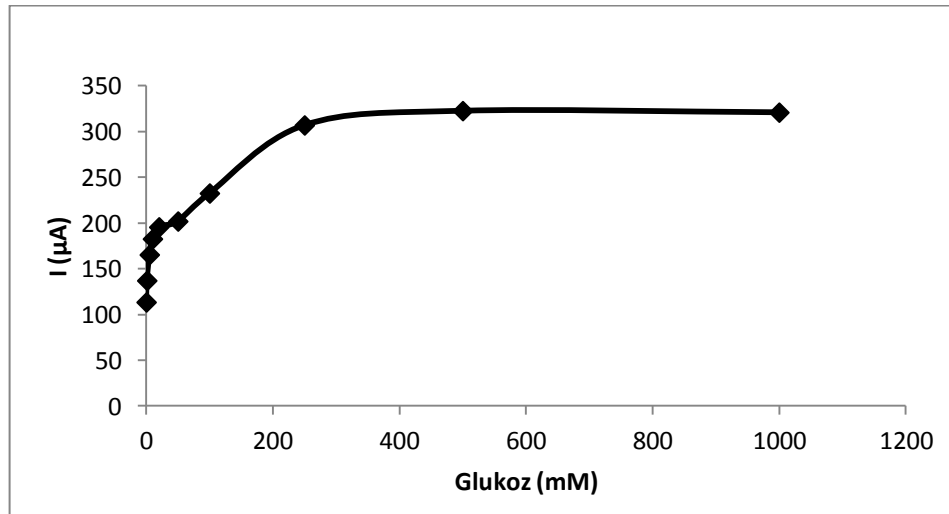
Şekil 4.22'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.12 ve Şekil 4.23'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.22. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.12. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Glikoz Derişimi (mM)	Akım (µA)
Zemin	113,47
1	137,06
5	165,32
10	182,64
20	195,54
50	201,9
100	232,5
250	306,87
500	322,56
1000	320,88

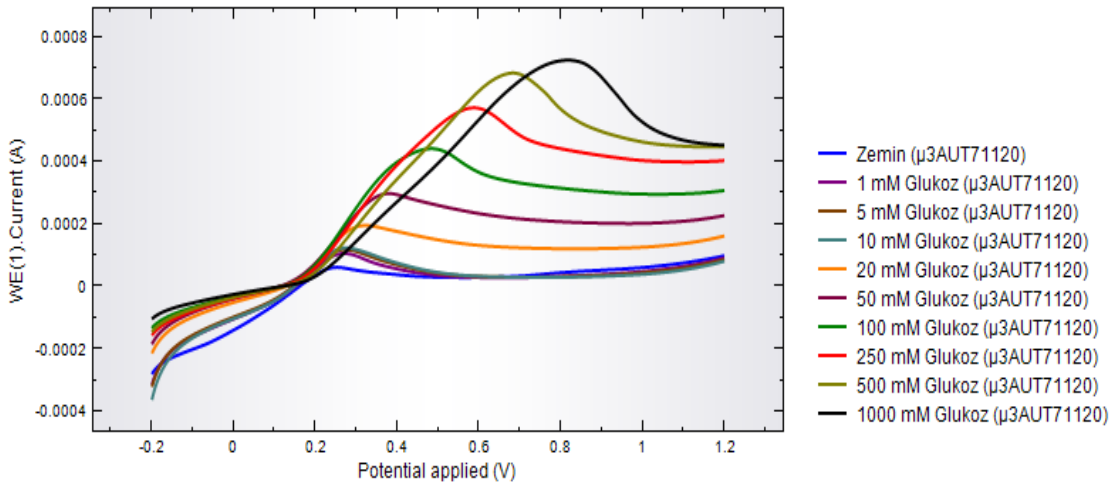


Şekil 4.23. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrot: Au-Fe₂O₃ modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au-Fe₂O₃ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 500 mM glikoz derişiminden sonra akım değerlerinde düşüş gerçekleştiğinden 500 mM glikoz derişimi optimum substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

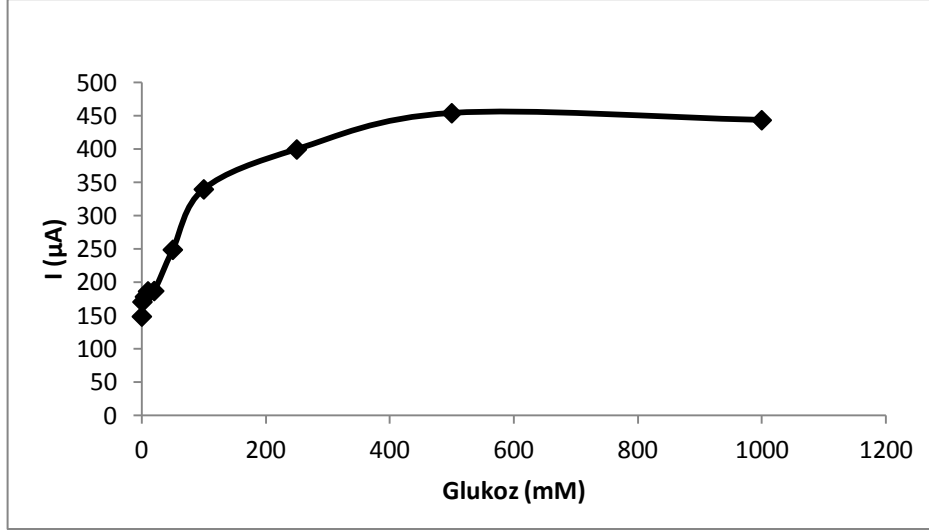
Şekil 4.24'te bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.13 ve Şekil 4.25'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.13. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Glikoz Derişimi (mM)	Akım (µA)
Zemin	148,68
1	170,61
5	178,42
10	186,5
20	187,02
50	248,95
100	339,79
250	399,74
500	454,2
1000	443,7

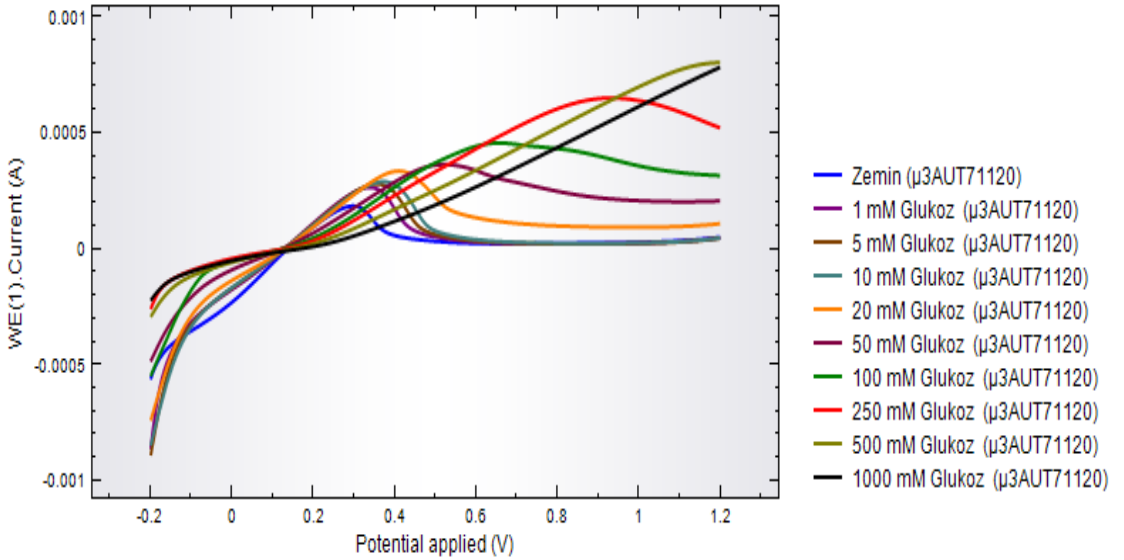


Şekil 4.25. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrot: Al₂O₃-TiO₂ modifiye GCPE, 46:14:20:20 (% w/w) GCP/GO_x/MY/Al₂O₃-TiO₂ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 20 mM glikoz derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 20 mM glikoz derişimi optimum substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

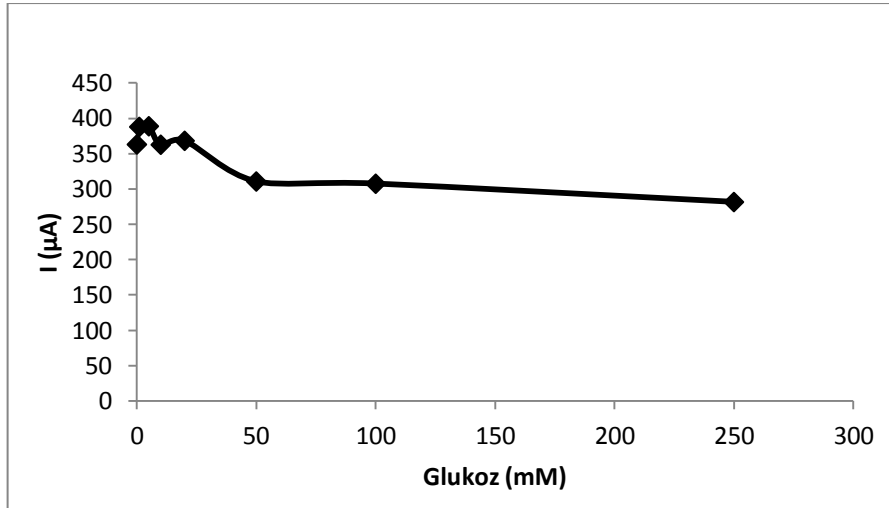
Şekil 4.26'da bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.14 ve Şekil 4.27'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.14. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Glikoz Derişimi (mM)	Akım (µA)
Zemin	363,03
1	387,92
5	388,84
10	362,66
20	368,2
50	310,64
100	307,48
250	281,57
500	-
1000	-

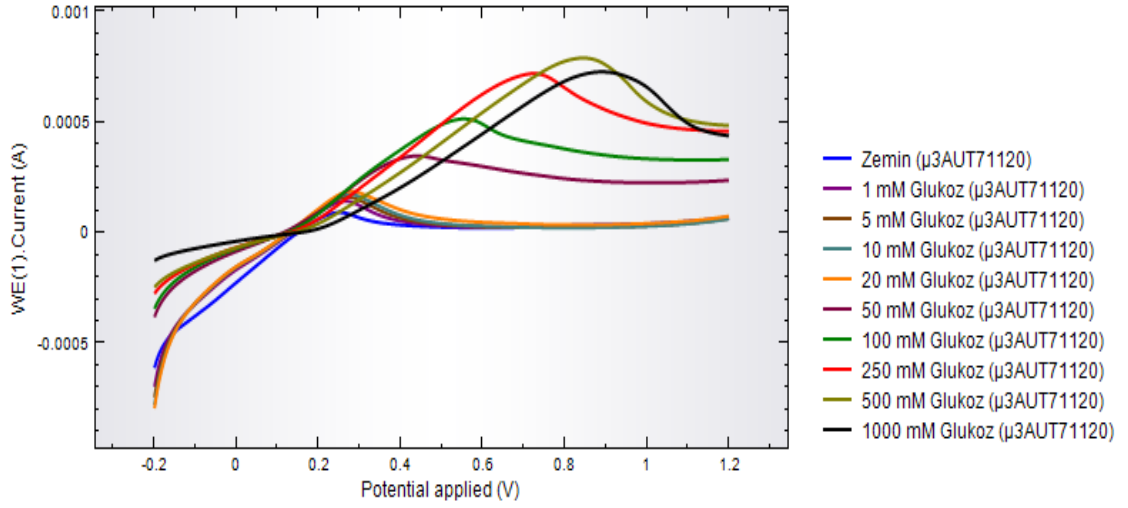


Şekil 4.27. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Au np modifiye kompozit elektrot: Au np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au np karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda 250 mM glikoz derişiminden sonra akım değerlerinde anlamlı bir artış olmadığından ve düşüş gerçekleştiğinden 250 mM glikoz derişimi optimum substrat derişimi olarak belirlenmiştir.

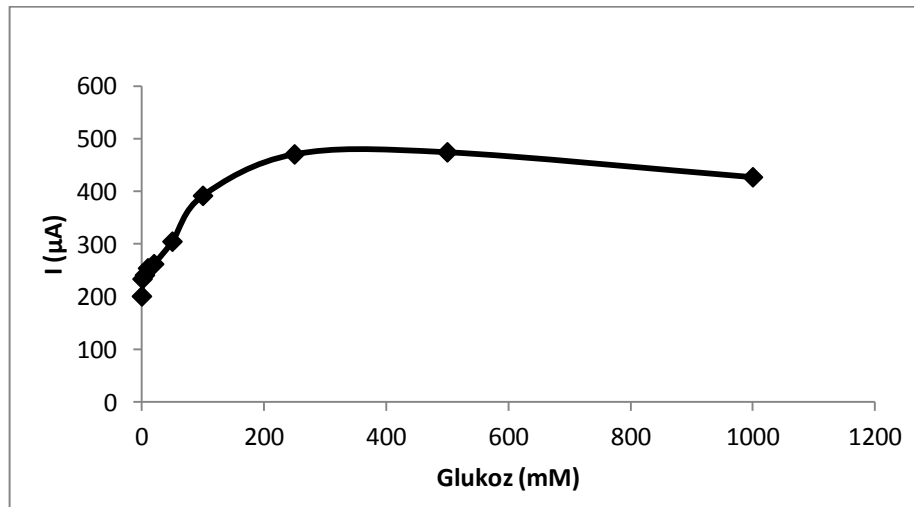
Şekil 4.28'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.15 ve Şekil 4.29'da buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.15. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Glikoz Derişimi (mM)	Akım (μA)
Zemin	200,88
1	233,65
5	241
10	254,06
20	261,96
50	304,72
100	391,69
250	470,36
500	474,3
1000	426,95



Şekil 4.29. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

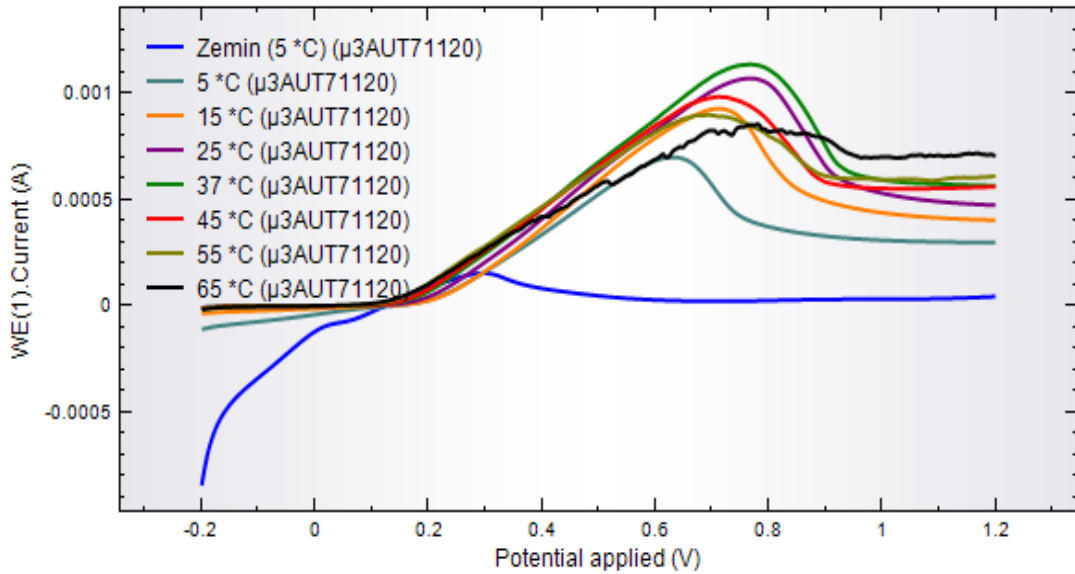
4.1.2.4. Sıcaklık optimizasyonu

Medyatör derişimi ve substrat derişimi optimizasyonlarından sonra farklı nanoyapı modifiye kompozit elektrotların LSV yöntemiyle -0.2mV ile 1,2mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla optimum BQ ve substrat içeren 10 mL'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7) farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır.

Yalın elektrot: Yalın GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri 37°C'de gözlenmiştir ancak çalışma koşullarının kolaylığından dolayı, oda sıcaklığı (25°C) optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

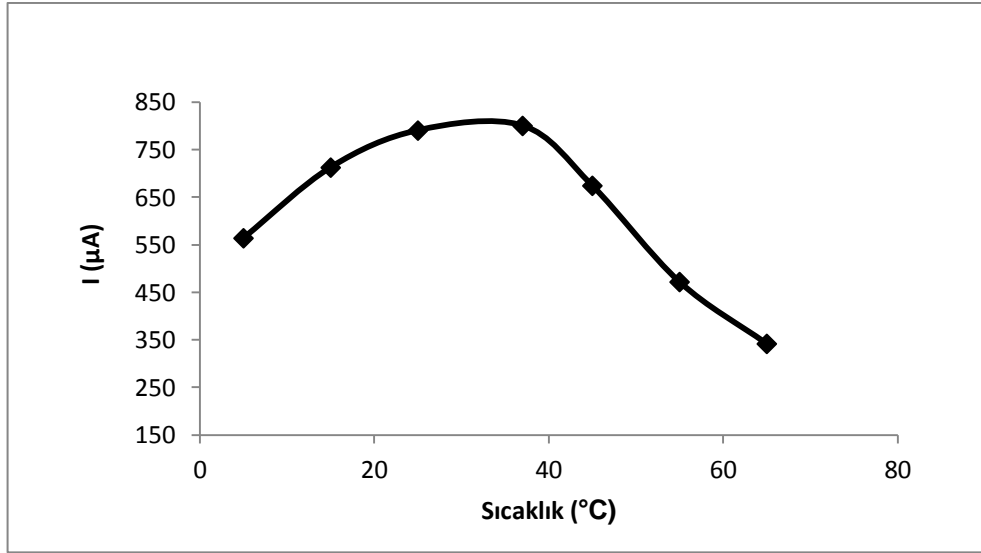
Şekil 4.30'da bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.16 ve Şekil 4.31'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Yalın elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.16. Yalın elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Sıcaklık (°C)	Akım (µA)
Zemin (5)	199,43
5	564,17
15	712,75
25	790,61
37	800,47
45	674,48
55	472,08
65	342,03

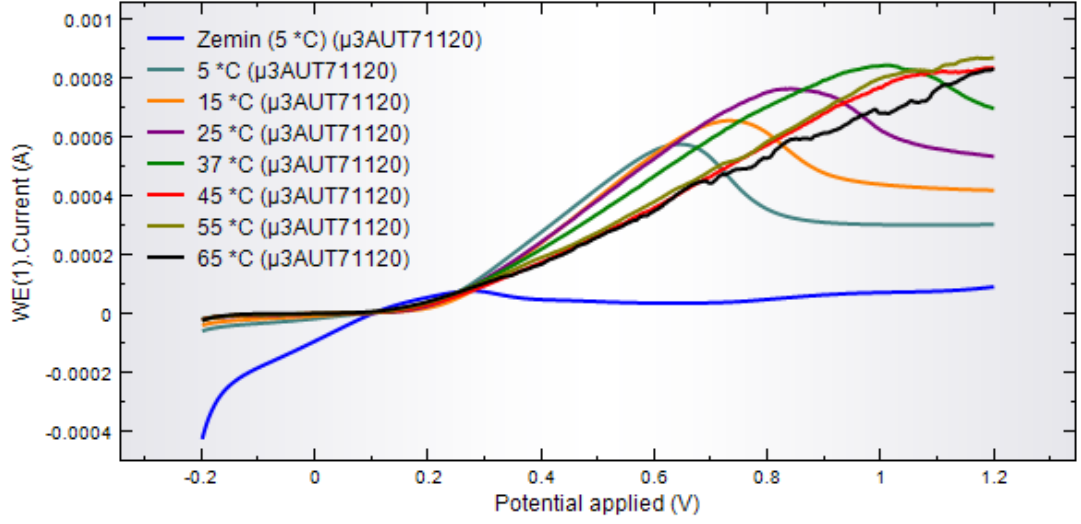


Şekil 4.31. Yalın elektrodun substrat optimizasyon grafiği

MnO₂ np modifiye kompozit elektrot: MnO₂ np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL MnO₂ np karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri 15°C'de gözlenmiştir ancak çalışma koşullarının kolaylığından dolayı, oda sıcaklığı (25°C) optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

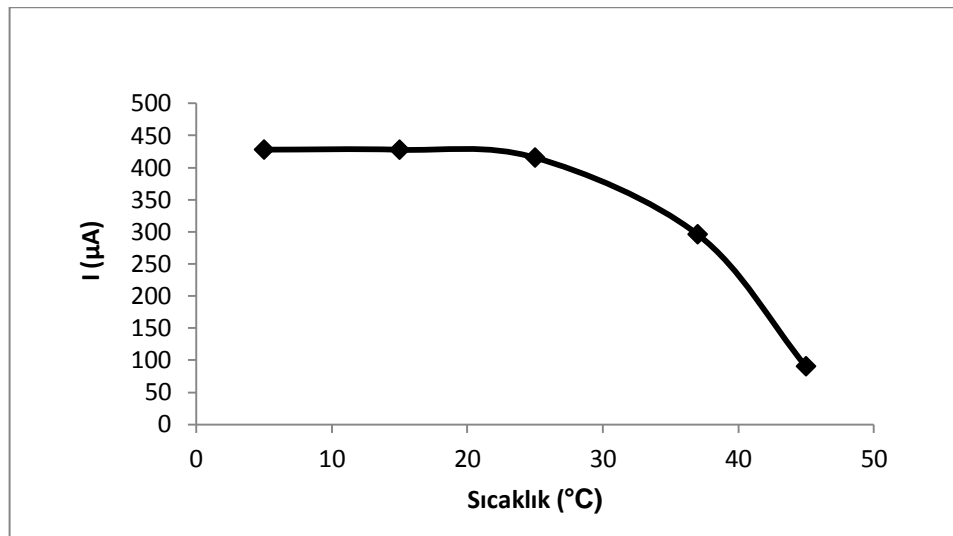
Şekil 4.32'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.17 ve Şekil 4.33'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.32. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.17. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Sıcaklık (°C)	Akım (μA)
Zemin (5)	106,17
5	427,71
15	427,52
25	415,27
37	295,82
45	90,19
55	-
65	-

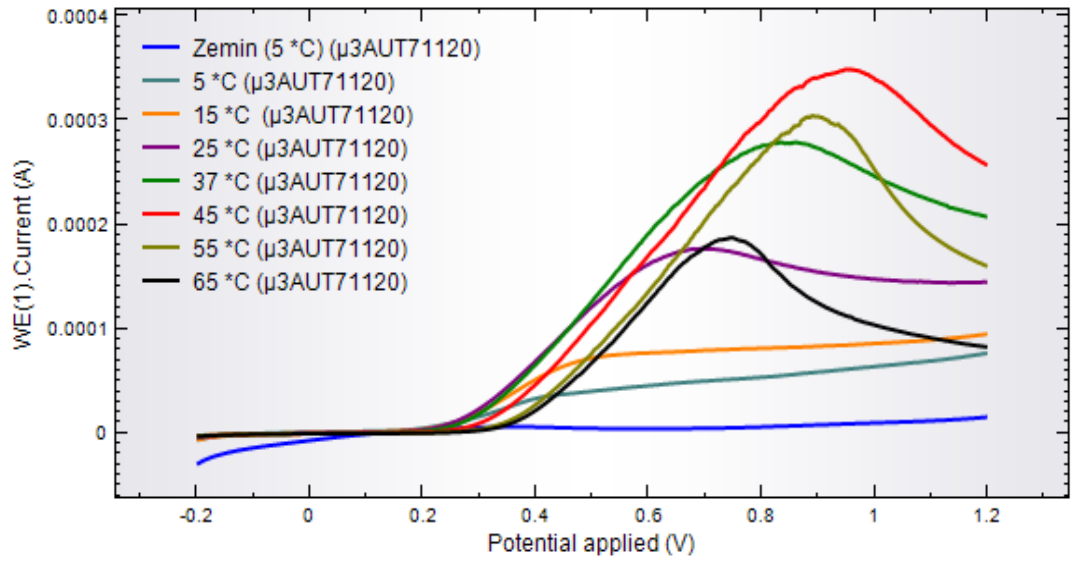


Şekil 4.33. MnO₂ np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrot: Au-Fe₂O₃ modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au-Fe₂O₃ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri 55°C’de gözlenmiştir ancak çalışma koşullarının kolaylığından dolayı, oda sıcaklığı (25°C) optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

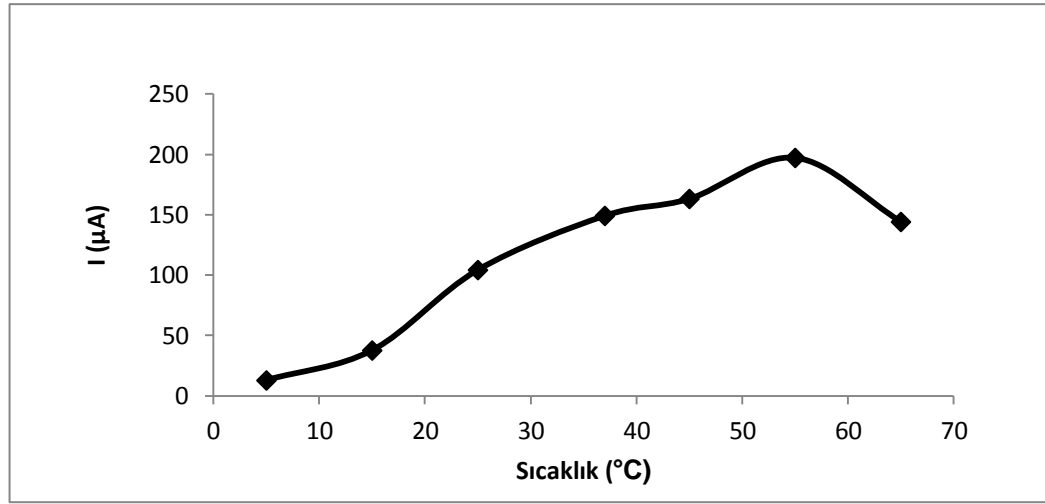
Şekil 4.34’te bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.18 ve Şekil 4.35’te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.18. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Sıcaklık (°C)	Akım (µA)
Zemin (5)	1,60
5	12,86
15	37,65
25	104,33
37	149,19
45	163,25
55	197,22
65	144,20

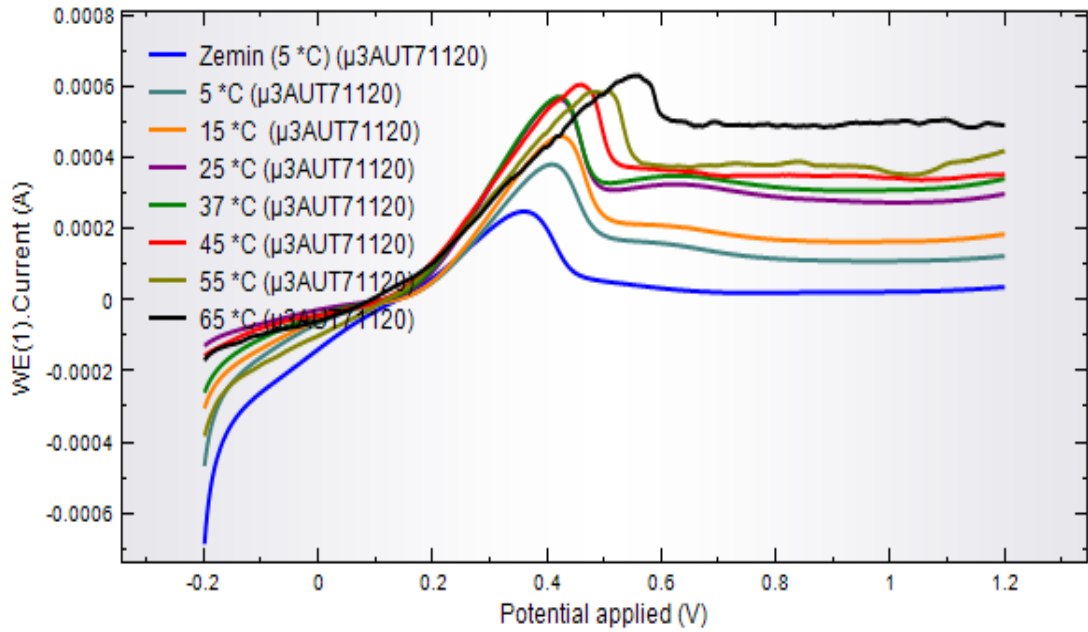


Şekil 4.35. Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrot: Al₂O₃-TiO₂ modifiye GCPE, 46:14:20:20 (% w/w) GCP/GOx/MY/Al₂O₃-TiO₂ karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri 25°C'de gözlemlendiğinden hemde çalışma koşullarının kolaylığından dolayı, oda sıcaklığı (25°C) optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

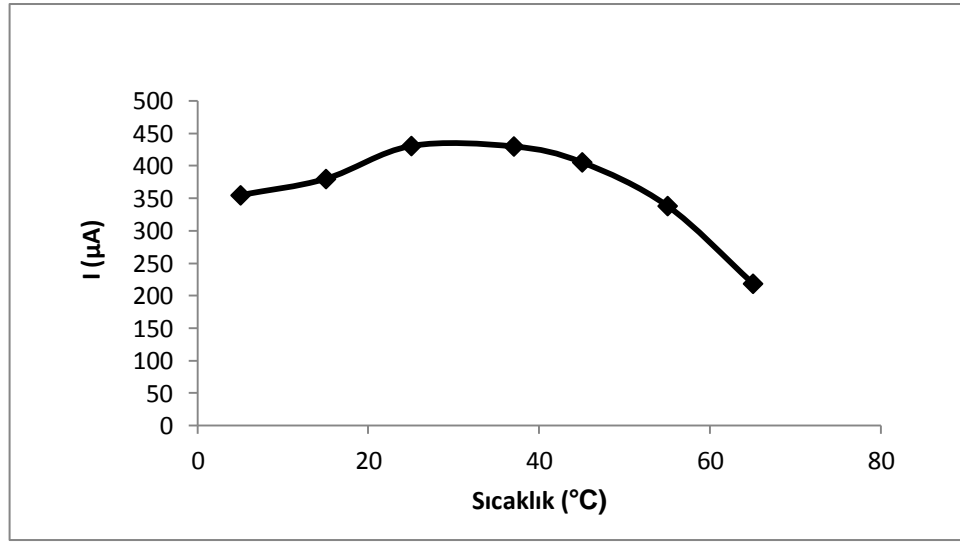
Şekil 4.36'da bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.19 ve Şekil 4.37'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.19. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Sıcaklık (°C)	Akım (µA)
Zemin (5)	260,08
5	354,76
15	379,86
25	430,67
37	429,99
45	405,55
55	338,23
65	218,59

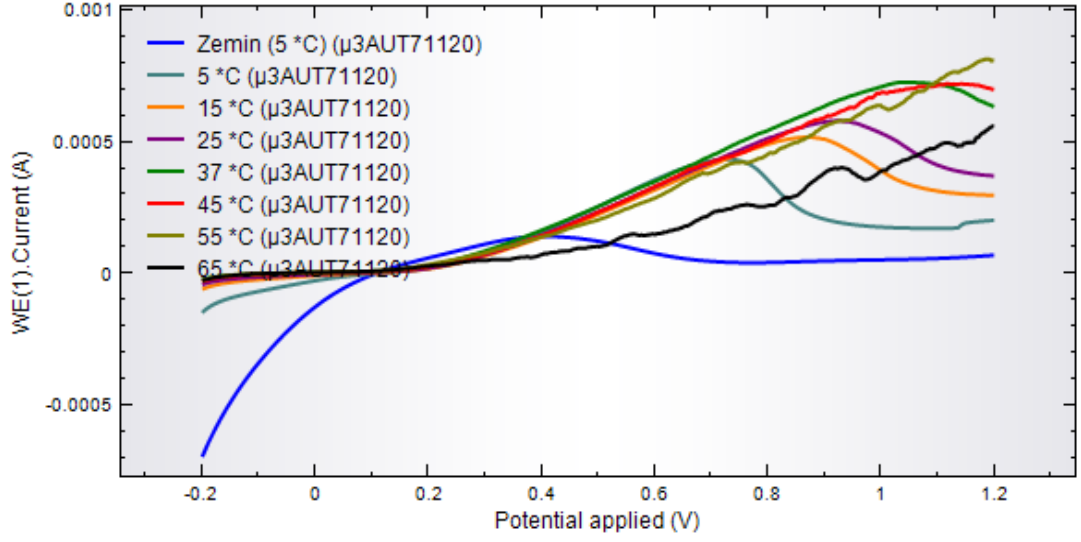


Şekil 4.37. Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

Au np modifiye kompozit elektrot: Au np modifiye GCPE, 66:14:20 (% w/w) GCP/GOx/MY ve 2µL Au np karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri 5°C'de gözlenmiştir ancak çalışma koşullarının kolaylığından dolayı, oda sıcaklığı (25°C) optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

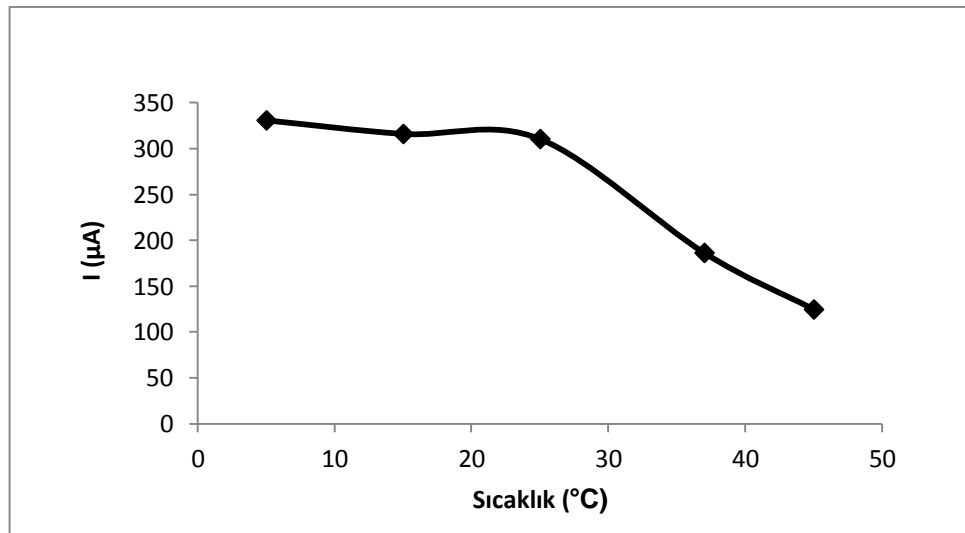
Şekil 4.38'de bu elektroda ait voltammogramlar, Çizelge 4.20 ve Şekil 4.39'da buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.20. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon akım değerleri

Sıcaklık (°C)	Akım (μA)
Zemin (5)	120,23
5	330,88
15	316,09
25	310,54
37	186,36
45	124,68
55	-
65	-

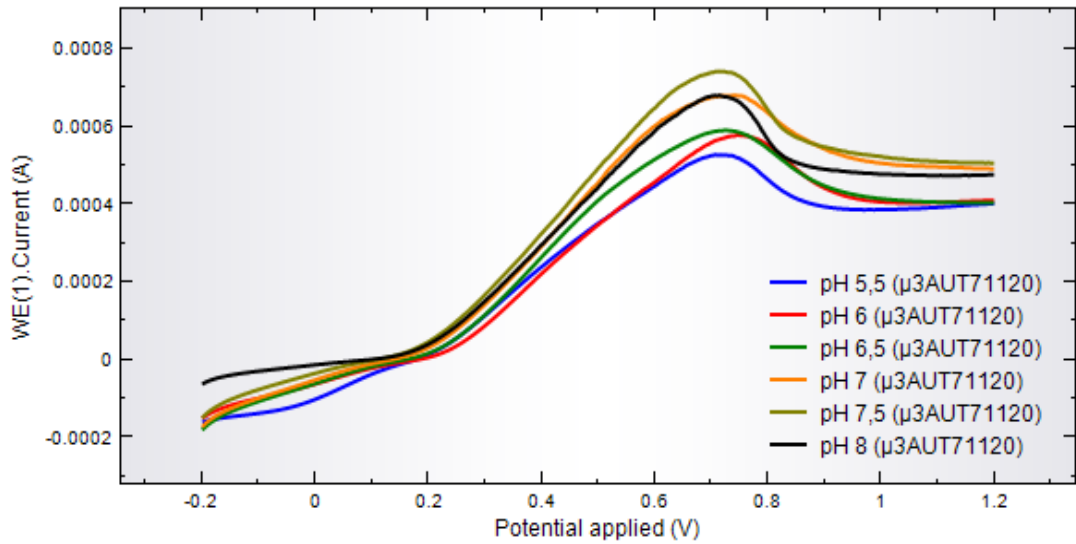


Şekil 4.39. Au np modifiye kompozit elektrodun substrat optimizasyon grafiği

4.1.2.5. pH optimizasyonu

Medyatör derişimi, substrat derişimi ve sıcaklık optimizasyonlarından sonra GCPE'nin pH'ı LSV yöntemiyle -0.2mV ile 1,2mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında optimize edilmiştir. Bu amaçla 20 mM BQ ve 250 mM glikoz içeren 10mL'lik hücrede yalın GCPE ile oda sıcaklığında (25 °C) farklı pH'lardaki 100 mM PBS'de çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonunda en yüksek akım değeri pH 7.5'de gözlenmiştir ancak bu pH'ta medyatörün kararlılığı düşük olduğundan dolayı pH 7, optimum pH olarak belirlenmiştir.

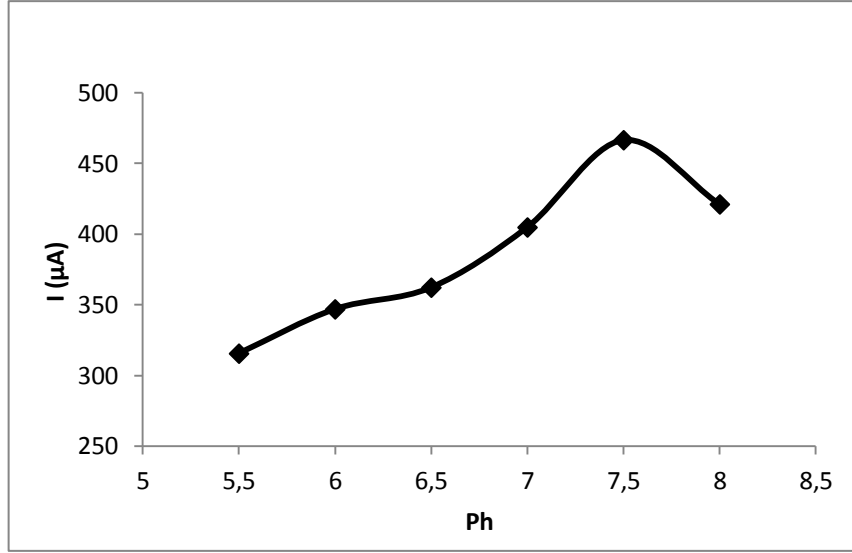
şekil 4.40'ta optimum elektrotlara ait farklı pH'taki voltammogramlar, Çizelge 4.21 ve şekil 4.41'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



şekil 4.40. pH optimizasyon voltammogramı

Çizelge 4.21. pH optimizasyon akım değerleri

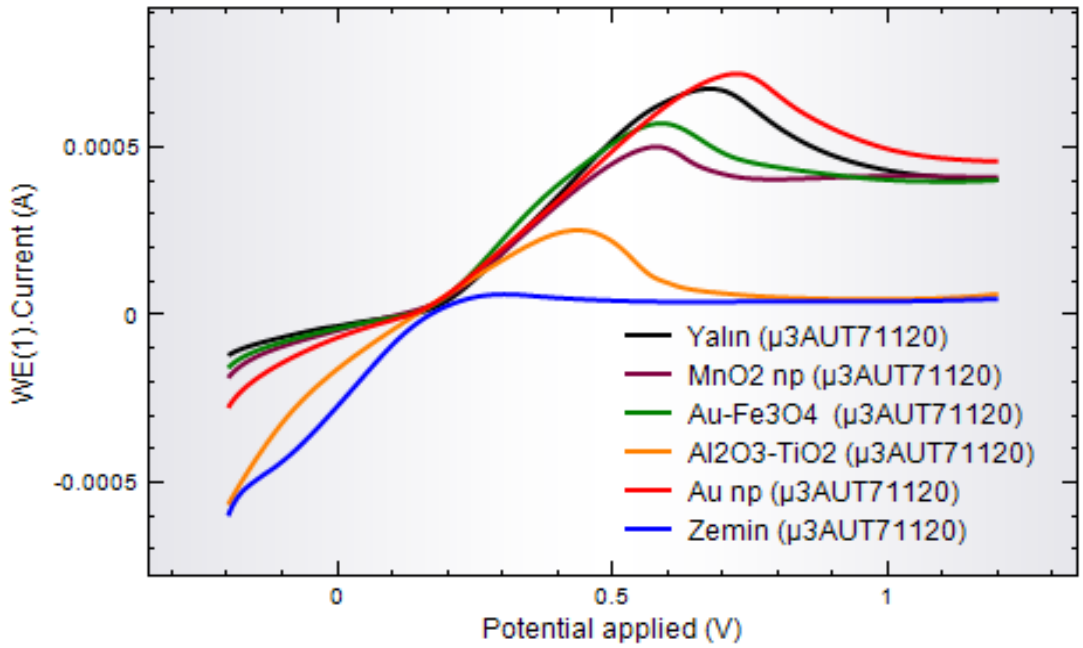
pH	Akım (μA)
5,5	315,58
6	346,91
6,5	362,24
7	404,85
7,5	466,58
8	421,17



Şekil 4.41. pH optimizasyon grafiği

4.1.3. Optimize edilmiş biyo-anot elektrotların karşılaştırılması

Optimize edilmiş tüm elektrotlar, performanslarını karşılaştırmak için nova programı yardımıyla üst üste çakıştırılmıştır. En yüksek akım değeri (470,36 µA) Au np modifiye GCPE'ta gözlenmiştir. Şekil 4.42'de optimum elektrotların voltammogramları karşılaştırılmıştır ve Çizelge 4.22'de buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Optimum elektrotların voltammogramları

Çizelge 4.22. Optimum elektrotların akım değerlerinin karşılaştırılması

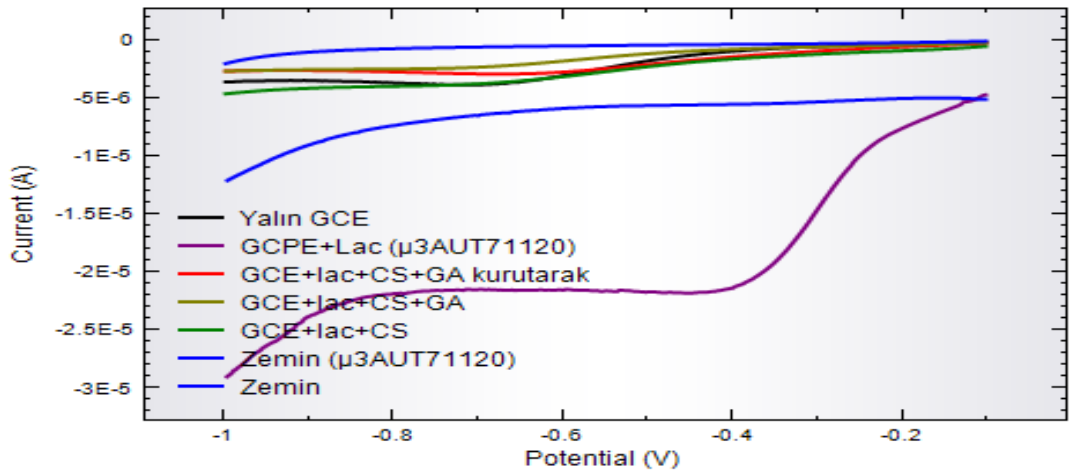
pH	Akım (μA)
Zemin	20,28
Yalın	431,73
Au np	470,36
MnO ₂ np	248,51
Au-Fe ₃ O ₄	399,74
Al ₂ O ₃ -TiO ₂	228,39

4.2. Uygun Biyo-Katot Elektrodun Belirlenmesi

Biyo-katot olarak kullanmak üzere elektrot belirlerken GC ve GCP elektrotlar farklı modifikasyonlarla değerlendirilmiştir. Bu amaçla Yalın GCE, Lakkaz modifiye GCPE ve immobilize katot elektrotların hazırlanmasında bahsedilen 3 farklı şekilde modifiye edilen lakkaz modifiye GCE'lar denenmiştir.

Bu elektrotlar LSV yöntemiyle -0.1 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7), O₂'nin varlığında ve ortamdan N₂ gazı geçirilerek çalışılmıştır. Uygun elektrot olarak en yüksek akımın gözlemlendiği (9,35 μA) lakkaz modifiye GCPE seçilerek optimizasyon işlemleri yapılmıştır.

Şekil 4.43'te biyo-katot olarak kullanılabilir elektrotların voltammogramları ve Çizelge 4.23'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Biyo-katot elektrotların voltammogramları

Çizelge 4.23. Biyo-katot elektrotların karşılaştırılması

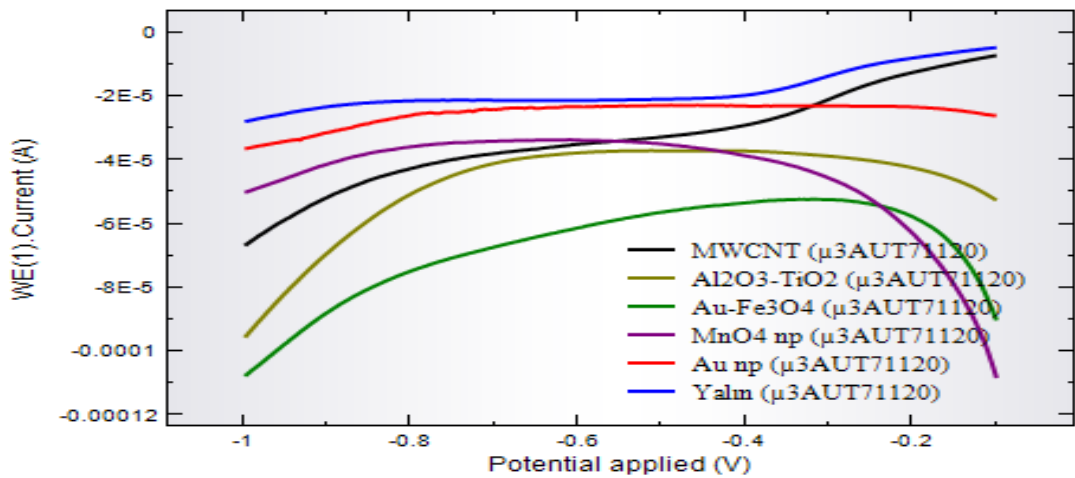
Elektrot	Akım (μA)
Zemin (N_2 'li ortam)	-
GCE + Lak. + Chi.	0,606
GCPE + Lak.	9,350
GCE + Lak. + Chi. + GA + kur.	1,158
GCE + Lak. + Chi. + GA	0,541
GCE (Yalın)	1,568

4.2.1. Farklı nanoyapı modifikasyonu

Biyo-anot elektrot optimizasyon çalışmalarında da kullanılan nanoyapıların aynı miktarları, GOx yerine lakkaz enzimi ile modifiye edilerek biyo-katod elektrot olarak denenmiştir. Burada ek olarak MWCNT (Karışıma %4 eklenmiştir) modifiye GCPE da kullanılmıştır.

Daha sonra bu elektrotlar LSV yöntemiyle -0.1 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7), O_2 'nin varlığında ve ortamdan N_2 gazı geçirilerek çalışılmıştır. Sadece yalın ve MWCNT modifiye GCPE'ta O_2 'nin indirgenmesine dayalı pik akımı gözlenmiştir. Daha yüksek akımın gözlemlendiği (7,78 μA) yalın (Lakkaz modifiye GCPE) elektrot BFC'nin biyo-katodu olarak seçilmiştir.

Şekil 4.44'te farklı nanoyapı modifiye elektrotların voltammogramları ve Çizelge 4.24'te buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.44. Farklı nanoyapı modifiye biyo-katod elektrotların voltammogramları

Çizelge 4.24. Farklı nanoyapı modifiye biyo-katot elektrotların akım değerleri

Modifiye	Akım (μA)
Lak.	7,78
Lak. + Au np	-
Lak. + MnO ₂ np	-
Lak. + Au-Fe ₃ O ₄	-
Lak. + Al ₂ O ₃ -TiO ₂	-
Lak. + MWCNT	6,32

4.2.2. Biyo-katot elektrotların çalışma koşullarının optimizasyonu

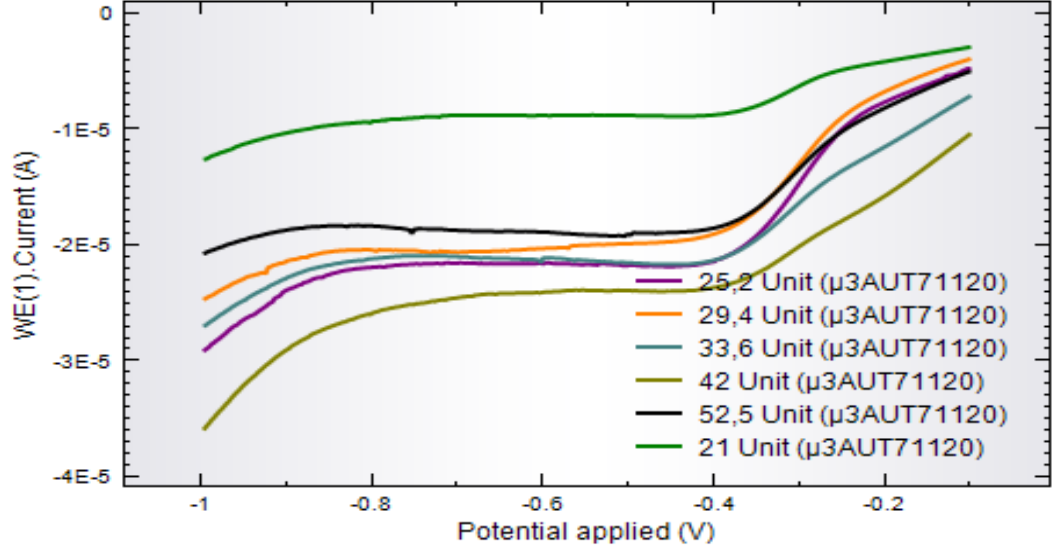
4.2.2.1. Enzim miktarı optimizasyonu

Elektrot: toplam 10mg, 8mg katı (enzim + GCP) + 2mg MY Lakkaz farklı miktarları ile çalışılmıştır.

Lakkaz modifiye GCPE: 80:20 (% w/w) GCP+Lakkaz/MY karışımı, lakkaz ve GCP oranları değiştirilerek daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra bu elektrot LSV yöntemiyle -0.1 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Bu amaçla 10 ml'lik hücrede 100 mM PBS'de (pH 7), O₂'nin varlığında ve ortamdaki N₂ gazı geçirilerek çalışılmıştır. Optimizasyon çalışması sonunda en yüksek akımın (9,35 μ A) elde edildiği 1,2 mg (25,2) lakkaz, optimum enzim miktarı olarak belirlenmiştir.

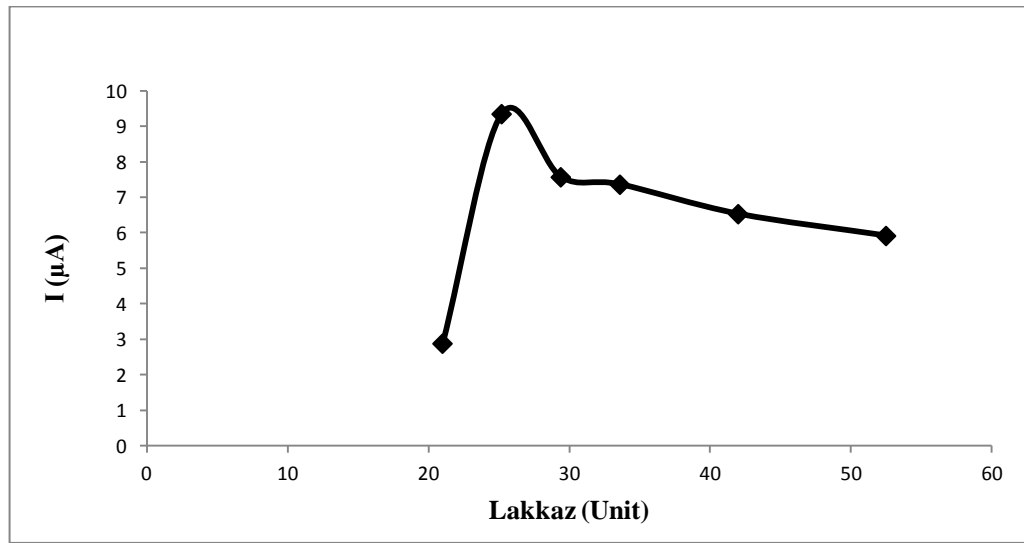
Şekil 4.45'te lac modifiye GCPE'nin enzim miktarı optimizasyon voltammogramları, Çizelge 4.25 ve Şekil 4.46'da buna ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.45. Biyo-katod elektrodun lac miktarı optimizasyon voltammogramları

Çizelge 4.25. Biyo-katod elektrodun lac miktarı optimizasyon akım değerleri

Enzim miktarı (Unit)	Akım (μA)
21	2.879
25,2	9,350
29,4	7,570
33,6	7,360
42	6,530
52,5	5,915



Şekil 4.46. Biyo-katod elektrodun lac miktarı optimizasyon grafiği

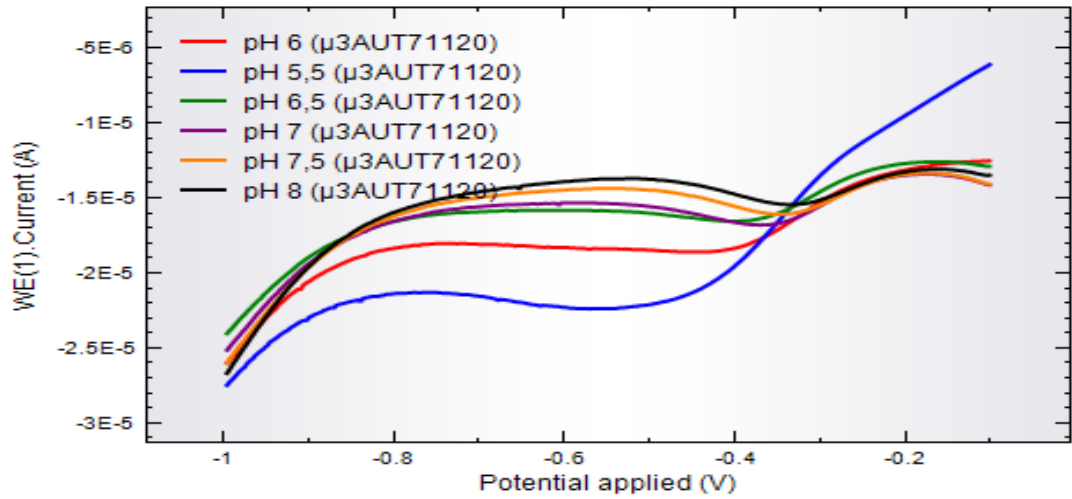
4.2.2.2. pH optimizasyonu

68:12:20 (% w/w) GCP/Lakkaz/MY karışımı daha önce kompozit elektrotların hazırlanmasında anlatıldığı gibi kullanıma hazır hale getirilmiştir.

pH optimizasyonu LSV yöntemiyle -0.1 mV ile -1000 mV potansiyel aralığında 10 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

Fosfat tamponunda: 10 ml'lik hücrede oda sıcaklığında (25 °C) farklı pH'lardaki 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonunda çalışılan pH aralığında, pH düştükçe pik akım değerlerinin yani enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.

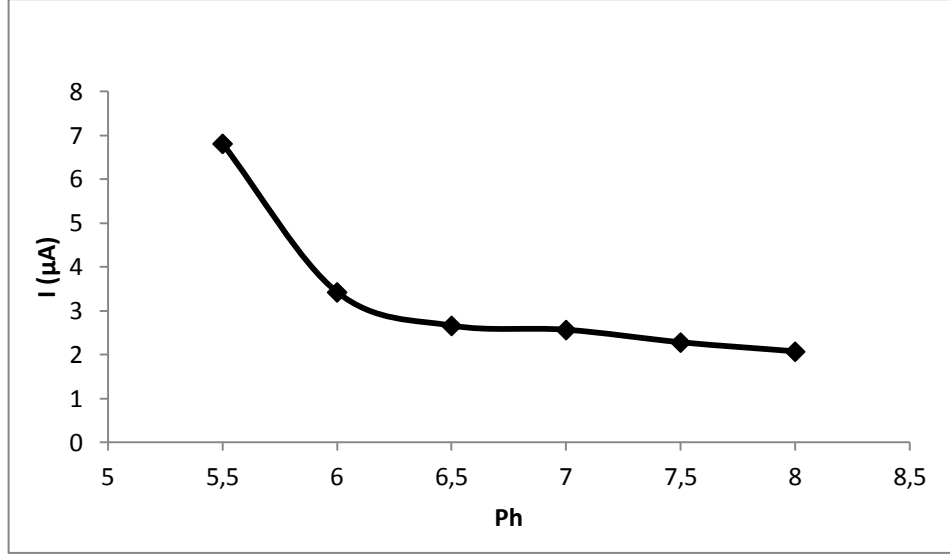
Şekil 4.47'te lac modifiye GCPE'nin PBS'de pH optimizasyon voltammogramları, Çizelge 4.26 ve Şekil 4.48'de ise bu voltammogramlara ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Biyo-katot elektrodun PBS'de pH optimizasyon voltammogramı

Çizelge 4.26. Biyo-katot elektrodun PBS'de pH optimizasyon akım değerleri

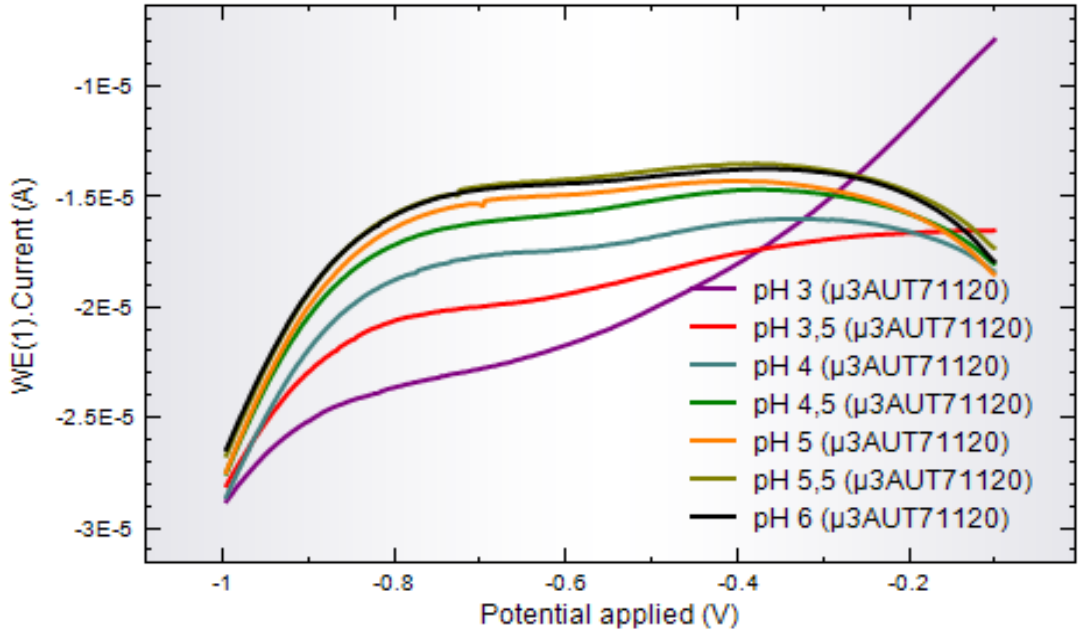
pH	Akım (μA)
5,5	6,810
6	3,423
6,5	2,658
7	2,564
7,5	2,278
8	2,070



Şekil 4.48. Biyo-katot elektrodun PBS'de pH optimizasyon grafiği

Asetat tamponunda: 10 ml'lik hücrede oda sıcaklığında (25 °C) farklı pH'lardaki 100 mM asetat tamponunda (pH 7) çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonunda çalışılan pH aralığında, pH 3,5'te en yüksek pik akımı (0,364 µA) gözlenmiştir.

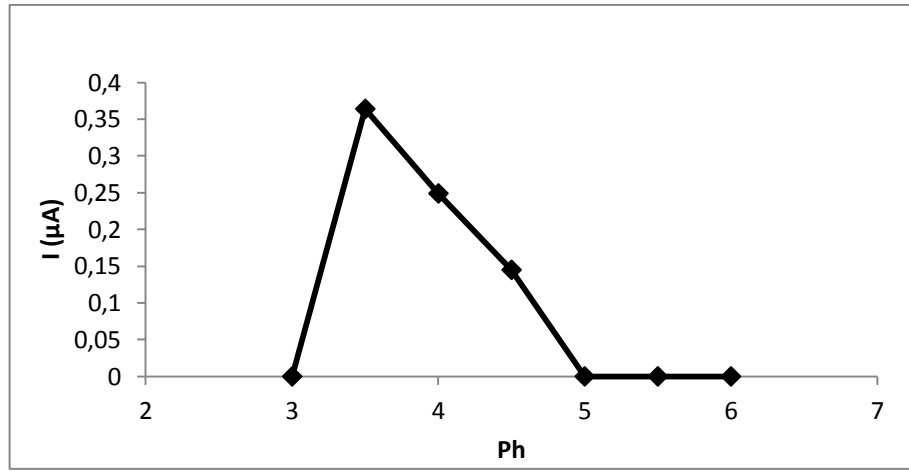
Şekil 4.49'da lac modifiye GCPE'nin asetat tamponunda pH optimizasyon voltammogramları, Çizelge 4.27 ve Şekil 4.50'de ise bu voltammogramlara ait akım değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.49. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon voltammogramı

Çizelge 4.27. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon akım değerleri

pH	Akım (μA)
3	-
3,5	0,364
4	0,249
4,5	0,145
5	-
5,5	-
6	-



Şekil 4.50. Biyo-katot elektrodun asetat tamponunda pH optimizasyon grafiği

4.3. Biyo-Yakıt Hücre Çalışmaları

Optimize edilen biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar, tek ve çift hücreli BFC'lerde elektriksel devre bakır tel ile tamamlanarak bir multimetre yardımıyla performansları incelenmiştir.

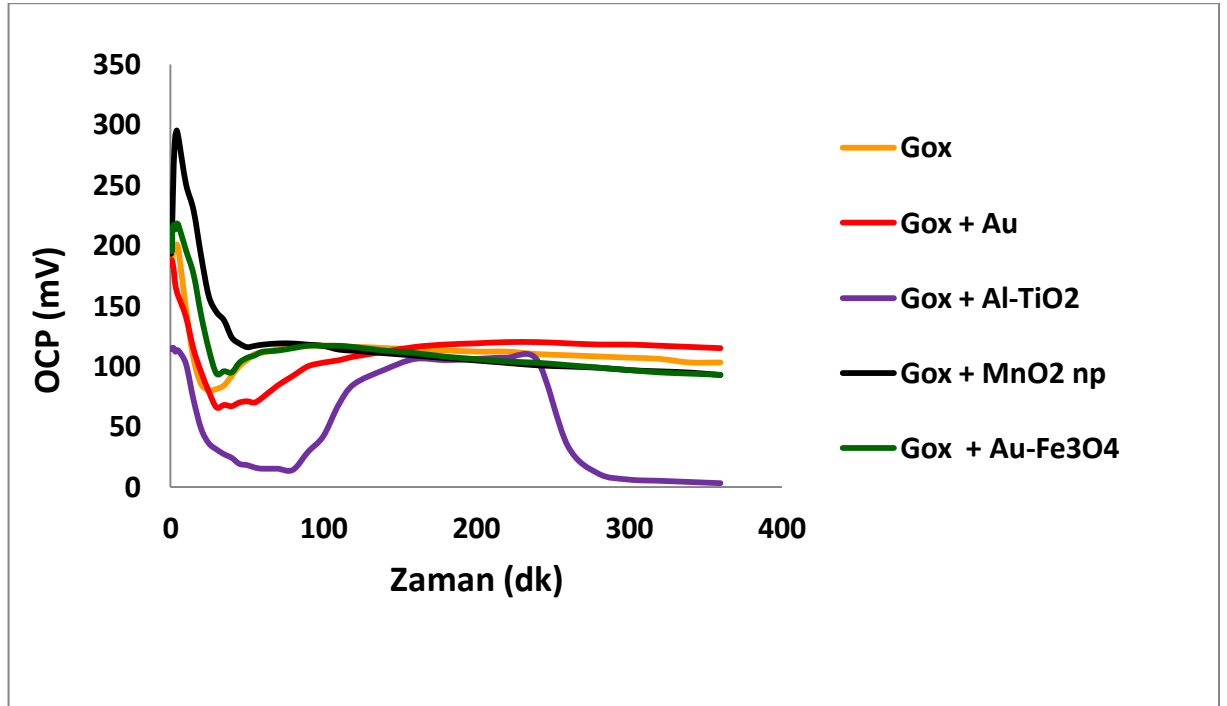
4.3.1. Optimize edilmiş biyo-anot biyo-katot sistemlerin tek-hücreli biyo-yakıt hücrede performanslarının incelenmesi

Optimize biyo-anot ve biyo-katot elektrotların her ikisinde aynı hücreye daldırılarak performanslarının izlendiği sistemdir. 10 ml'lik hücrede her bir anot elektrot için daha önce optimize edilen medyatör ve substrat derişimlerinde 100 mM PBS'de (pH 7) çalışılmıştır.

4.3.1.1. Açık devre potansiyeli

Oluşturulan 5 farklı tek hücreli BFC’de devreden hiç akım geçmezken OCP, 24 saat süreyle bir multimetre yardımıyla izlenmiştir. OCP ölçümün ilk anlarında hızlı bir yükseliş ve sonra düşüşten 2 saat kadar sonra her elektrot için sabit bir potansiyelde kaldığı gözlenmiştir. Al₂O₃.TiO₂ modifiye biyo-anot ile kurulan BFC’de 5 saatten sonra OCP gözlenmemiştir. BFC’ler arasında max OCP’si en yüksek (294 mV) olan MnO₂ np modifiye biyo- anot ile kurulan BFC’dir. Aşağıda her bir elektrodun max OCP verilmiştir. Şekil 4.51’de 24 saat boyunca izlenen OCP’nin ilk 6 saati verilmiştir, 6. saatten sonra önemli bir düşüş gözlenmemiştir.

- Yalın Biyo-anot maxVocp: **117mV**
- Au np Biyo-anot maxVocp: **188mV**
- Al₂O₃-TiO₂ Biyo-anot maxVocp: **115mV**
- MnO₂ np Biyo-anot maxVocp: **295mV**
- Au-Fe₃O₄ Biyo-anot maxVocp: **218mV**

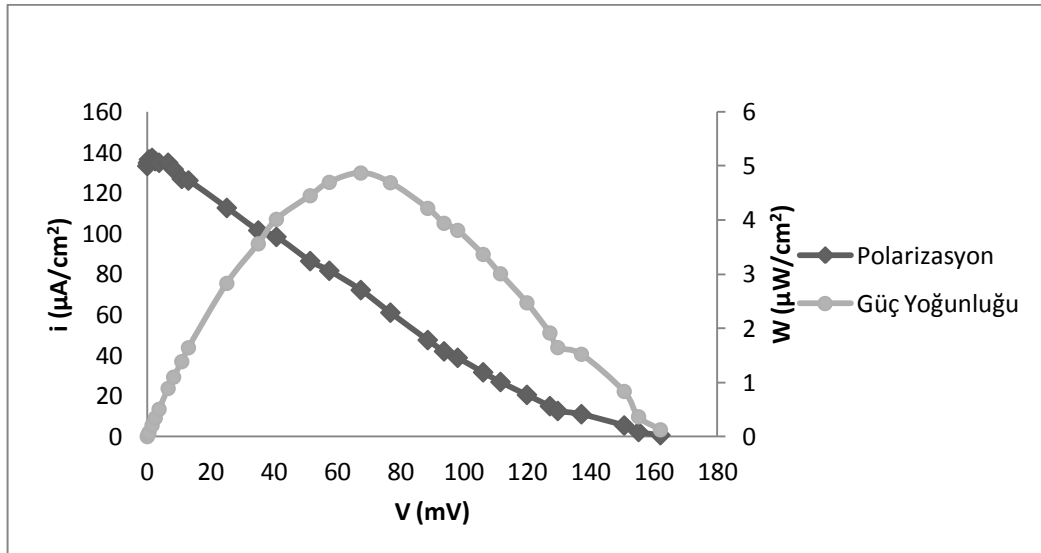


Şekil 4.51. Tek hücreli BFCs’nin OCPs’i

4.3.1.2. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan 5 farklı tek hücreli BFC'lere farklı dirençler (1 Ω -10 M Ω) uygulayarak akım değerleri bir multimetre yardımıyla ölçülmüştür. Uygulanan dirence karşılık ölçülen akım değerlerinden hücre potansiyeli ($V_{\text{hücre}}=I \times R$) hesaplanmıştır. Hücre potansiyeli ile akımın çarpımından ($P=V_{\text{hücre}} \times I$) güç hesaplanmıştır. Akım yoğunluğu ($i=I/A$) ve güç yoğunluğu ($W=P/A$) ise güç ve akım değerlerinin elektrodun birim alanına (0,126 cm²) bölünerek bulunmuştur. Hesaplanan bu değerlerden 5 farklı elektrot için polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri oluşturulmuştur.

Yalın elektrot: Şekil 4.52'de yalın biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans çalışması 10 ml'lik hücrede yalın biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM PBS'de (pH 7) gerçekleştirilmiştir.

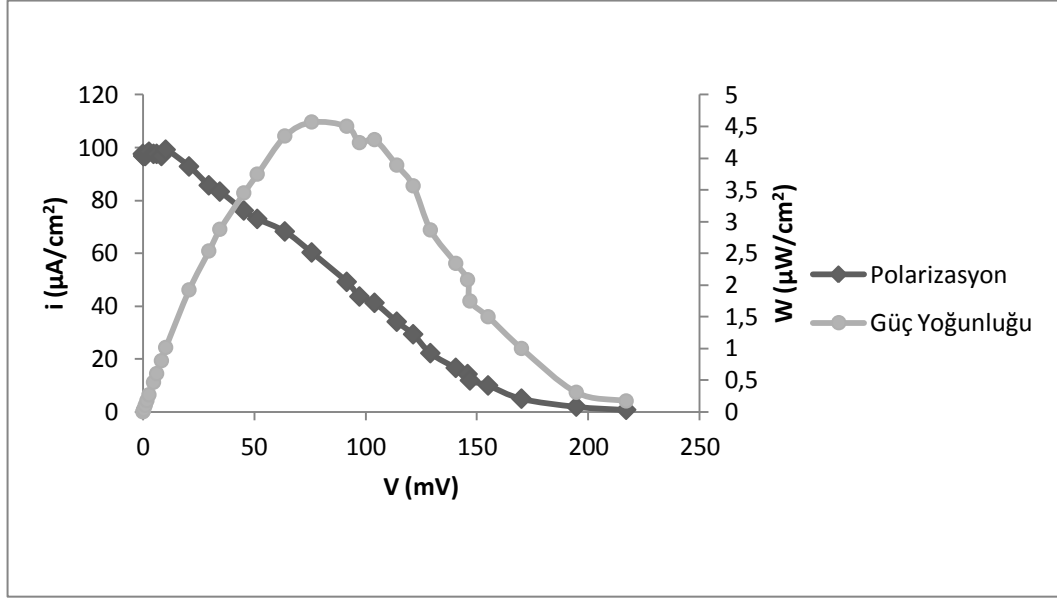


Şekil 4.52. Tek hücreli BFC'de yalın biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden 137,30 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve 4,87 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (67 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

MnO₂ np modifiye kompozit elektrot: Şekil 4.53'te MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans

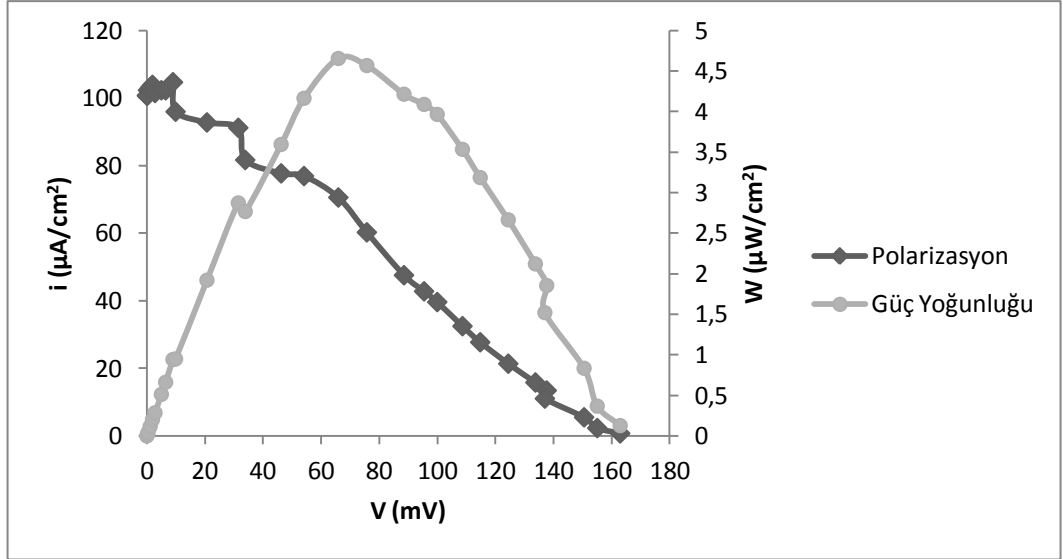
çalışması 10 ml'lik hücrede MnO_2 np modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM PBS'de (pH 7) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.53. Tek hücreli BFC'de MnO_2 np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden $99,21 \mu A/cm^2$ max akım yoğunluğu ve $4,57 \mu W/cm^2$ ($76 mV$) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

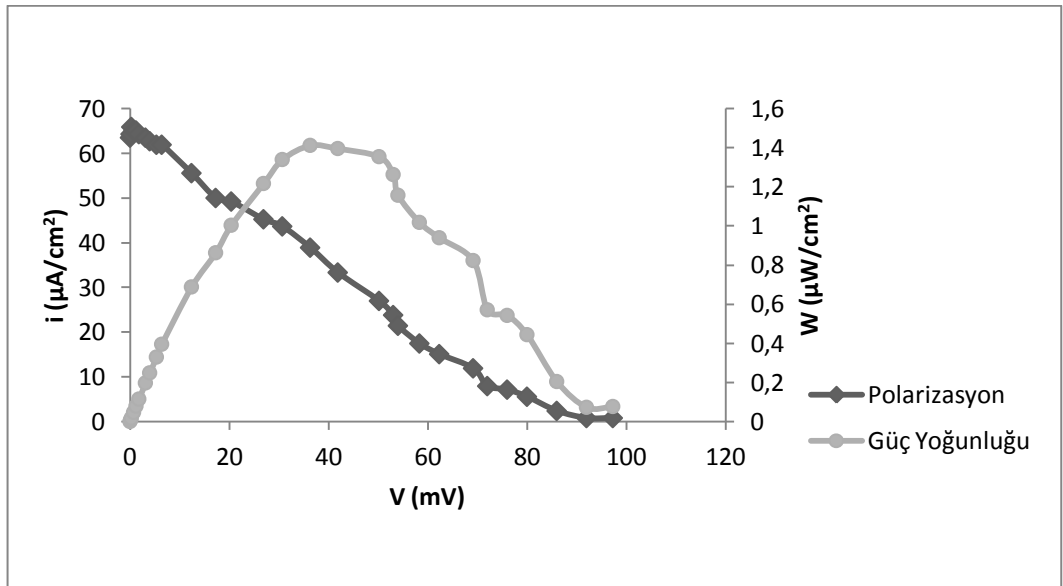
Au-Fe₂O₃ modifiye kompozit elektrot: Şekil 4.54'te Au-Fe₂O₃ modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans çalışması 10 ml'lik hücrede Au-Fe₂O₃ modifiye modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM PBS'de (pH 7) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.54. Tek hücreli BFC'de Au-Fe₂O₃ modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden 103,97 µA/cm² max akım yoğunluğu ve 4,66 µW/cm² (66 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

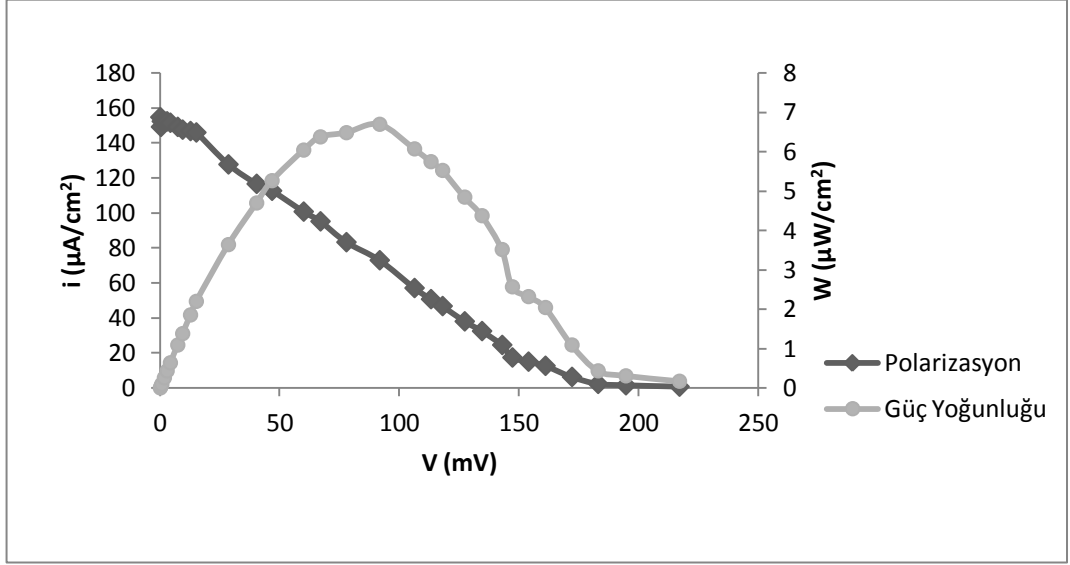
Al₂O₃-TiO₂ modifiye kompozit elektrot: Şekil 4.55'te Al₂O₃-TiO₂ modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katod elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans çalışması 10 ml'lik hücrede Al₂O₃-TiO₂ modifiye modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM PBS'de (pH 7) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.55. Tek hücreli BFC'de Al₂O₃-TiO₂ modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden $65,87 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve $1,41 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (36 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

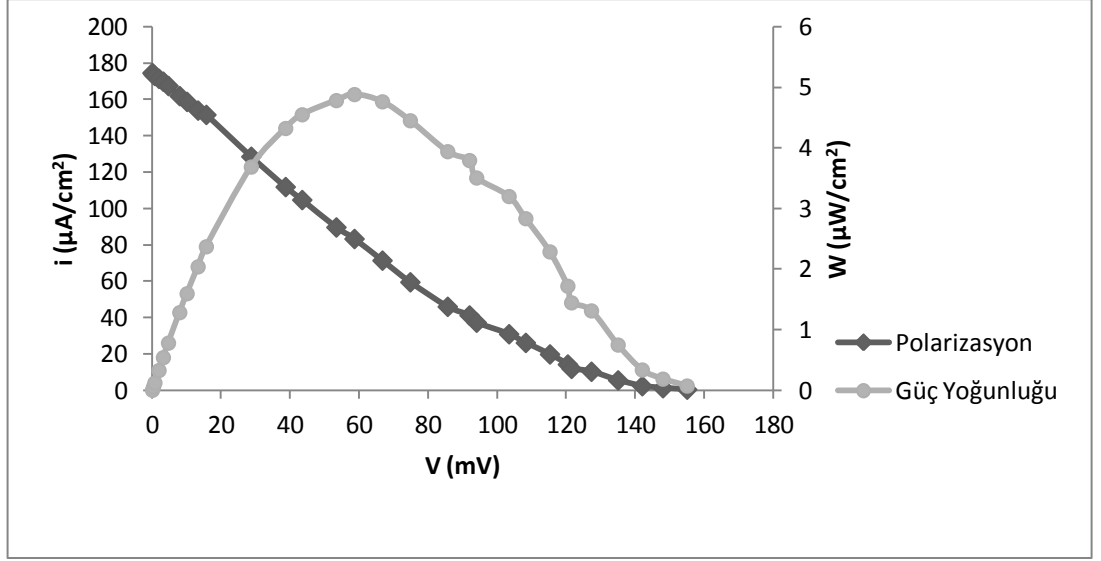
Au np elektrot np modifiye kompozit elektrot: Şekil 4.56'da Au np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans çalışması 10 ml 'lik hücrede Au np modifiye modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM PBS'de ($\text{pH } 7$) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.56. Tek hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden $154,76 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve $6,70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (92 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

Au elektrot Asetat Tamponunda pH 4: Şekil 4.57'de Au np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı tek hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Tek hücreli BFC performans çalışması 10 ml 'lik hücrede Au np modifiye modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 mM asetat tamponunda ($\text{pH } 4$) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.57. Tek hücreli BFC’de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin Asetat tamponunda polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

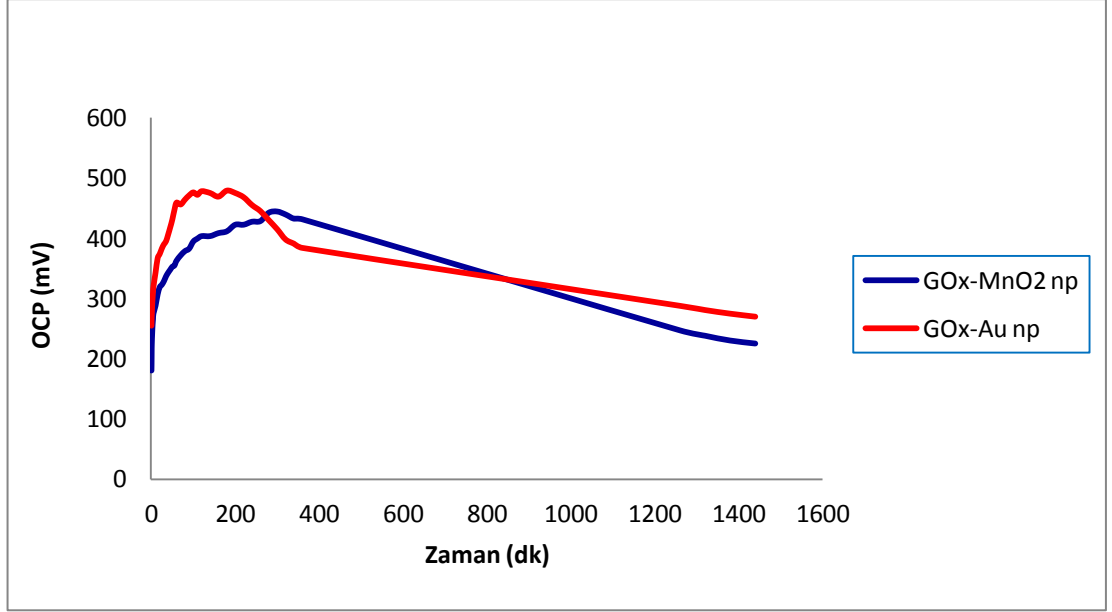
Oluşturulan sistemden $174,60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve $4,88 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (59 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

4.3.2. Optimize edilmiş biyo-anot biyo-katot sistemlerin çift-hücreli biyo-yakıt hücrede performanslarının incelenmesi

Optimize biyo-anot elektrot optimum medyatör ve substrat varlığında anot olarak ve biyo-katot elektrotların her ikisinde aynı hücreye daldırılarak performanslarının izlendiği sistemdir. 10 ml’lik hücrede her bir anot elektrot için daha önce optimize edilen medyatör ve substrat derişimlerinde 100 mM PBS’de (pH 7) çalışılmıştır.

4.3.2.1. Açık devre potansiyeli

Oluşturulan çift hücreli BFC’de devreden hiç akım geçmezken OCP, 24 saat süreyle bir multimetre yardımıyla izlenmiştir. OCP ölçümün ilk anlarından itibaren yavaş bir yükseliş 2 saat kadar sonra her elektrot için potansiyelde yavaş bir düşüş gözlenmiştir. MnO_2 np modifiye biyo-anot ile kurulan BFC’de max OCP 445 mV, Au np modifiye biyo-anot ile kurulan BFC’de max OCP 479 mV’tur. Şekil 4.58’de 24 saat boyunca izlenen OCP’leri verilmiştir.

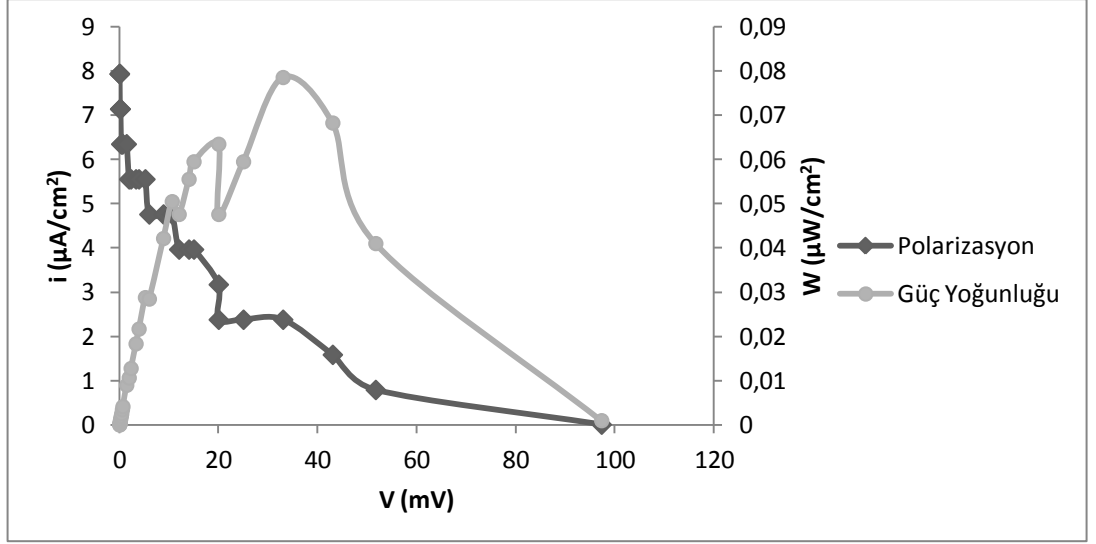


Şekil 4.58. Çift hücreli Au ve MnO₂ np modifiye biyo-anot içeren BFCs'nin OCPs'i

4.3.2.2. Polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan çift hücreli BFC'lere farklı dirençler (1 Ω-10 MΩ) uygulayarak akım değerleri bir multimetre yardımıyla izlenmiştir. Uygulanan dirence karşılık elde edilen akım değerlerinden hücre potansiyeli ($V_{\text{hücre}}=I \times R$) hesaplanmıştır. Hücre potansiyeli ile akımından ($P=V_{\text{hücre}} \times I$) güç hesaplanmıştır. Akım yoğunluğu ($i=I/A$) ve güç yoğunluğu ($W=P/A$) ise güç ve akım değerlerinin elektrodun birim alanına (0,126 cm²) bölünerek bulunmuştur. Hesaplanan bu değerlerden çift hücreli BFC'ler için polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri oluşturulmuştur.

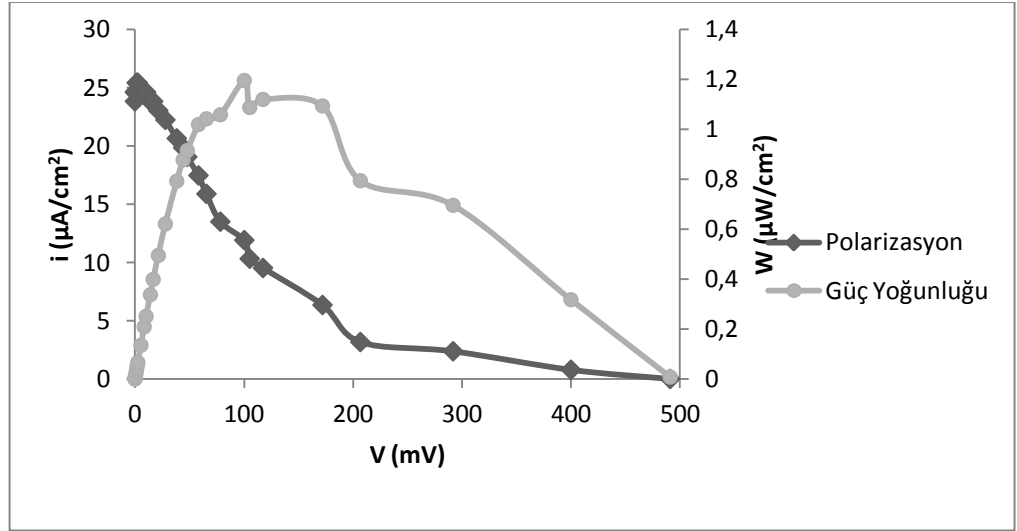
MnO₂ np modifiye elektrot PBS tampon pH 7: Şekil 4.59'da MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katod elektrodun kullanıldığı çift hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Çift hücreli BFC performans çalışması 10 ml'lik hücrelerde MnO₂ np modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 PBS'de (pH 7) ve biyo- katod sadece 100 mM PBS'ye (pH 7) daldırılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.59. Çift hücreli BFC'de MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katot PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden 7,94 µA/cm² max akım yoğunluğu ve 0,08 µW/cm² (33 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

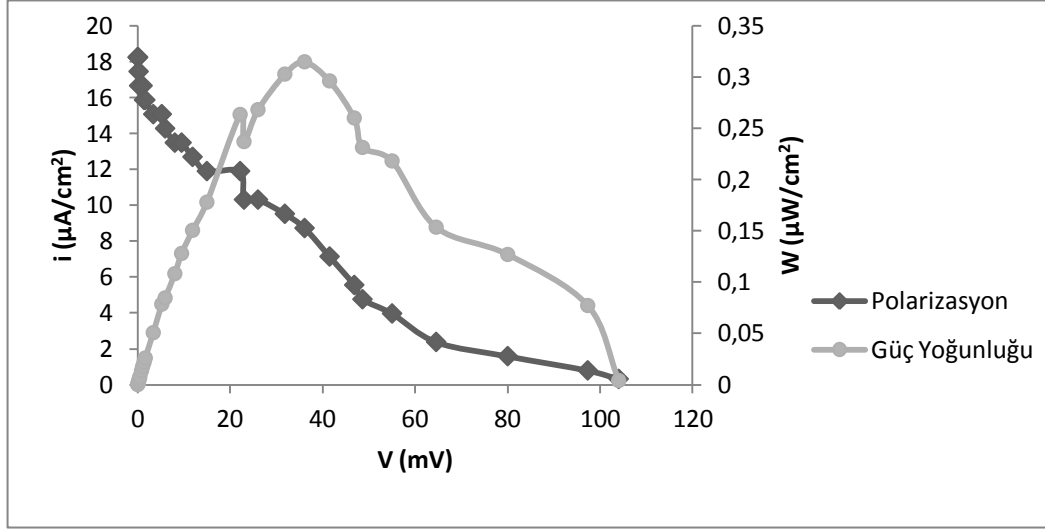
1 saat sonra: Şekil 4.60'da bir önceki çalışmada kullanılan aynı elektrotun 1 saat sonraki polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 4.60. Çift hücreli BFC'de MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katot PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden 25,40 µA/cm² max akım yoğunluğu ve 1,19 µW/cm² (100 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

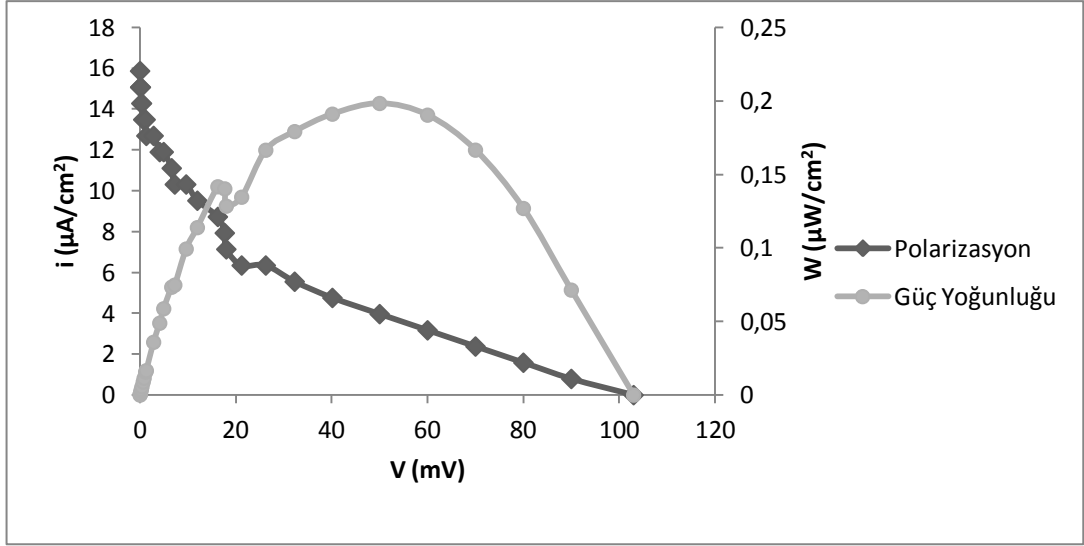
MnO₂ np modifiye elektrot Asetat tampon pH 4: Şekil 4.61’de MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı çift hücreli BFC’den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Çift hücreli BFC performans çalışması 10 ml’lik hücrelerde MnO₂ np modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 PBS’de (pH 7) ve biyo- katot için ise sadece 100 mM asetat (pH 4) tamponuna daldırılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.61. Çift hücreli BFC’de MnO₂ np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot PBS ve biyo-katotun asetat tamponundayken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden 18,25 µA/cm² max akım yoğunluğu ve 0,32 µW/cm² (36 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

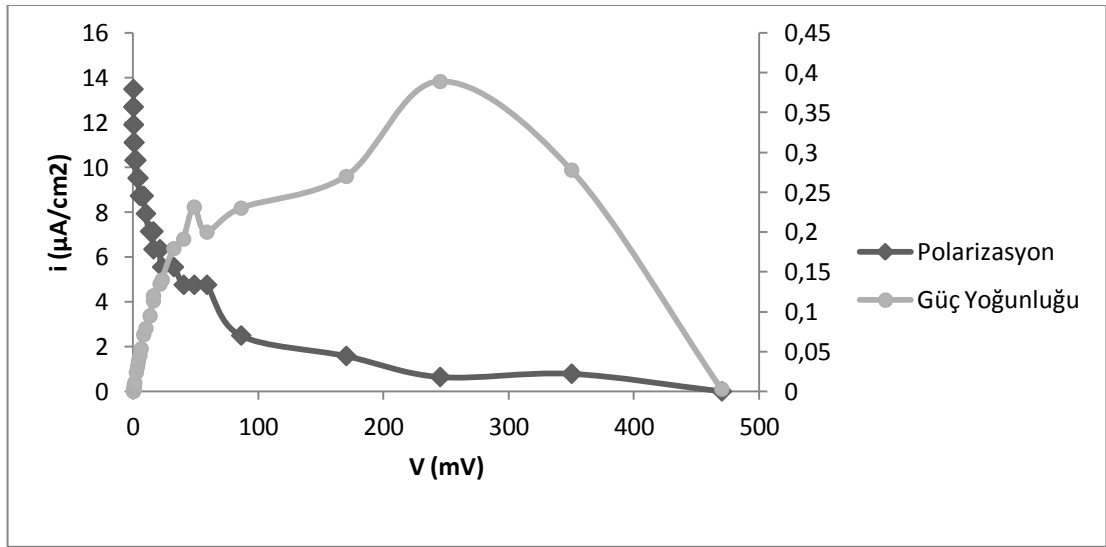
Au np modifiye elektrot PBS tampon pH 7: Şekil 4.62’de Au np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katot elektrodun kullanıldığı çift hücreli BFC’den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Çift hücreli BFC performans çalışması 10 ml’lik hücrelerde Au np modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 PBS’de (pH 7) ve biyo- katot sadece 100 mM PBS’ye daldırılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.62. Çift hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot ve biyo-katod PBS'de iken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden $15,87 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve $0,19 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (40 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

Au np modifiye elektrot Asetat tampon pH 4: Şekil 4.63'te Au np modifiye biyo-anot elektrot ve yalın biyo-katod elektrodun kullanıldığı çift hücreli BFC'den elde edilen polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri gösterilmiştir. Çift hücreli BFC performans çalışması 10 ml'lik hücrelerde Au np modifiye biyo-anot için optimum şartlarda 100 PBS'de (pH 7) ve biyo- katod için ise sadece 100 mM asetat (pH 4) tamponuna daldırılarak gerçekleştirilmiştir.



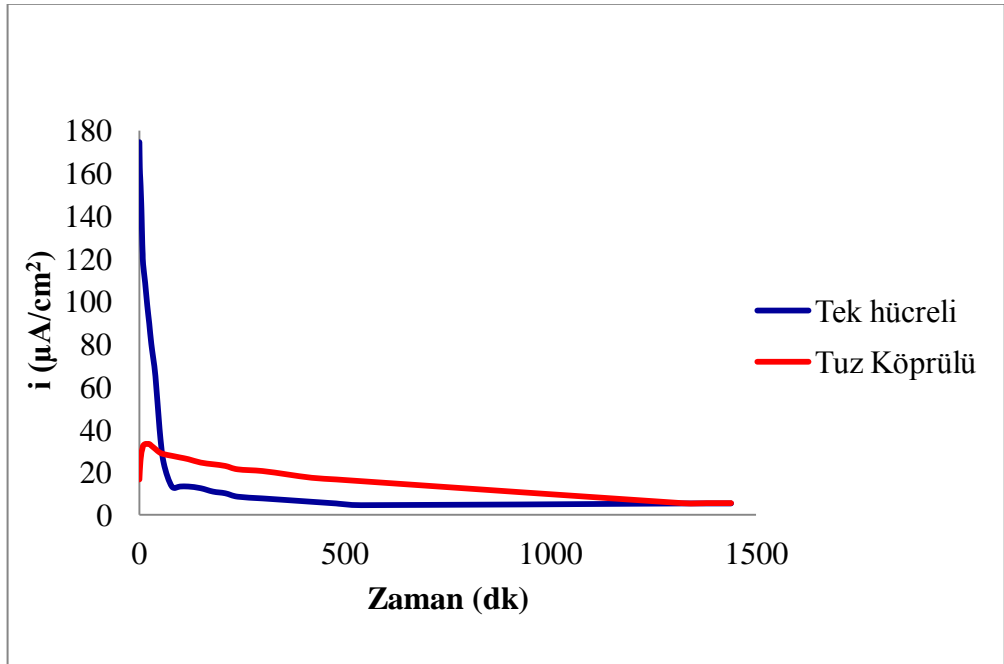
Şekil 4.63. Çift hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot elektrotlu sistemin biyo-anot PBS ve biyo-katodun asetat tamponundayken polarizasyon ve güç yoğunluğu eğrileri

Oluşturulan sistemden $13,49 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ max akım yoğunluğu ve $0,39 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (245 mV) max güç yoğunluğu elde edilmiştir.

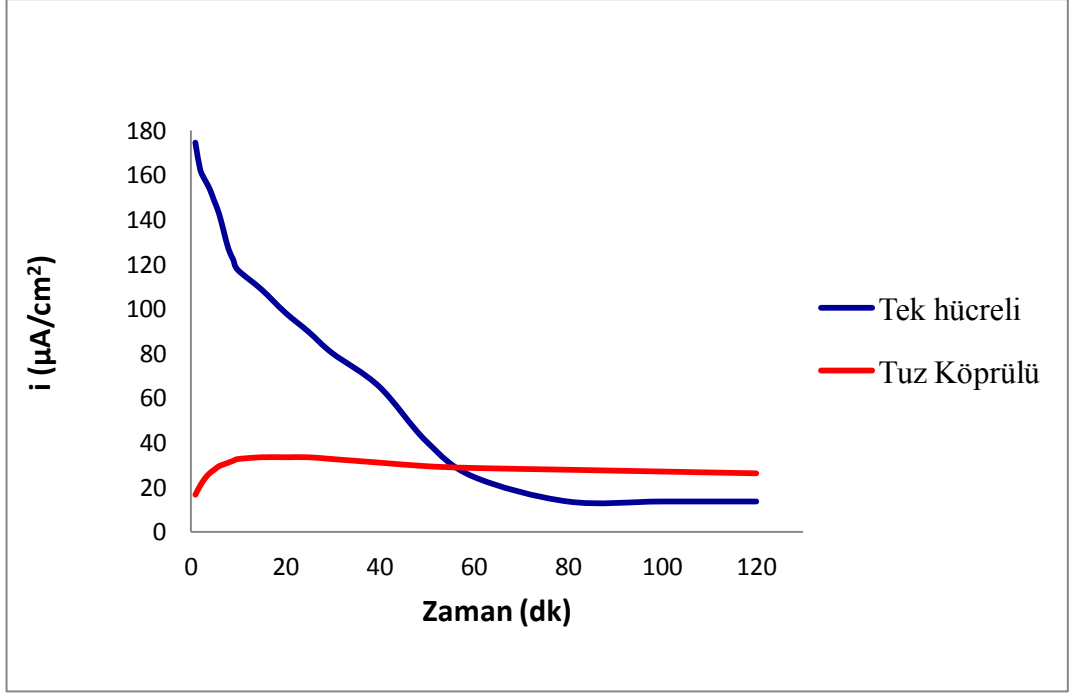
4.3.3. Biyo-yakıt hücrede elektrotların kararlılığı

En iyi performansların gözlemlendiği tek ve çift hücreli BFC'lerde sistemin kararlılığı 24 saat süreyle sabit bir dış direnç ($1 \text{ k}\Omega$) altında devreden geçen akım izlenerek belirlenmiştir. Bu amaçla tek hücreli BFC'de Au np modifiye biyo-anot ve yalın biyo-katot optimum koşullarda ve 100 mM PBS'de çalışma yapılmıştır. Çift hücreli BFC'de ise Au np modifiye biyo-anot elektrot 100 mM PBS'de ($\text{pH } 7$) ve yalın biyo-katot elektrot 100 mM asetat tamponunda ($\text{pH } 4$) iken çalışılmıştır. Şekil 4.64'te 24 saat ve şekil 4.65'te ise ilk 2 saat için zamana bağlı akım değişimi gösterilmiştir.

Tek hücreli BFC'nin akım yoğunluğunda sistem çalışmaya başladığı anda hızlı bir düşüş gerçekleşmiş ve birinci saatten sonra bu düşüş yavaşlamıştır. 24 saat sonunda aktivitesinin %96,8'ini kaybetmiştir. Çift hücreli BFC'de ise akım yoğunluğu, yavaş bir artıştan sonra yavaş bir düşüşe geçmiş ve baştaki çok düşük akım yoğunluğuna rağmen birince saatten sonra tek hücreli BFC'den daha yüksek bir değerde düşüşünü sürdürmüştür. 24 saat sonunda aktivitesinin %67,7'sini kaybetmiştir. 24 saat sonunda kurulan iki BFC'nin akım yoğunlukları eşitlenmiştir.



Şekil 4.64. Tek ve çift hücreli BFCs'de akım yoğunluğunun zamanla değişimi



Şekil 4.65. Tek ve çift hücreli BFCs'de akım yoğunluğunun zamanla değişimi

4.4. Sonuç

Bu çalışmada BFC'lerde kullanılmak üzere biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar geliştirilmiştir. Bu amaçla biyo-anot olarak kullanılmak üzere GOx modifiye, immobilize GC ve kompozit GCP elektrotların medyatör ve substrat derişimlerine olan yanıtları incelenmiştir. En iyi yanıtın alındığı GOx modifiye GCPE farklı nanoyapılar ile modifiye edilmiştir. GOx ve farklı nanoyapı modifiye GCPE'ların enzim miktarı, substrat derişimi, medyatör derişimi, sıcaklık ve pH gibi parametreleri optimize edilmiştir. Daha sonra biyo-katot elektrot olarak kullanılmak üzere Lac modifiye, immobilize GC ve kompozit GCP elektrotların O₂'yi indirgeme performansları incelenmiştir. En iyi yanıtın alındığı Lac modifiye GCPE farklı nanoyapılar ile modifiye edilmiş ve en iyi yanıtın Lac modifiye yalın GCPE ile alındığı gözlenmiştir. Lac modifiye GCPE'nin enzim miktarı ve pH'ı optimize edilmiştir. Optimizasyonlar sonucunda BFC'nin biyo-anodu olarak GOx ve farklı nanoyapılar ile modifiye GCPE'lar ve biyo-katot olarakta Lac modifiye yalın GCPE kullanılmıştır.

Oluşturulan tek hücreli BFC'lerde kullanılmak üzere seçilen bütün elektrotların performansları bir multimetre yardımıyla izlenmiştir. Bu amaçla her elektrodun OCP ölçülmüş ve çeşitli dış dirençlerin bağlanmasıyla, akım ve güç yoğunlukları hesaplanmıştır. Daha sonra katyon değiştirici olarak tuz köprüsünün kullanılmasıyla çift hücreli BFC oluşturulmuştur. Bu BFC'de anot ve katot hücrelerde aynı ve farklı pH'larda performanslar değerlendirilmiştir. Biyo-anot olarak Au ve MnO₂ np ile GOx modifiye GCPE, biyo-katot olarakta Lac modifiye yalın GCPE kullanılmıştır. En son olarakta en iyi performansların alındığı tek ve çift hücreli BFC'lerde kararlılık deneyi yapılmıştır. Çizelge 4.29'da BFC'den elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.28. Tek ve çift hücreli BFCs’de elektrot performanslarının karşılaştırılması

BFC	Biyo-anot Biyo-katot	OCP (mV)	Max Akım Yoğunluğu ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Max Güç Yoğunluğu ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)
Tek Hücreli BFC	GOx/GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7	117	137,30	4,87 (67 mV)
	GOx/MnO ₂ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7	295	99,21	4,57 (76 mV)
	GOx/Au-Fe ₂ O ₃ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7	218	103,97	4,66 (66 mV)
	GOx/Al ₂ O ₃ -TiO ₂ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7	115	65,87	1,41 (36 mV)
	GOx/Au/GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7	188	154,76	6,70 (92 mV)
	GOx/Au/GCPE Lac/GCPE 100 mM Asetat tamponu pH 4	-	174,60	4,88 (59 mV)
	Çift Hücreli BFC	GOx/MnO ₂ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7 100 mM PBS pH 7	445	7,94
GOx/MnO ₂ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7 100 mM PBS pH 7 (1 saat sonra)		-	25,40	1,19 (100 mV)
GOx/MnO ₂ /GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7 100 mM Asetat pH 4		-	18,25	0,32 (36 mV)
GOx/Au/GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7 100 mM PBS pH 7		479	15,87	0,19 (40 mV)
GOx/Au/GCPE Lac/GCPE 100 mM PBS pH 7 100 mM Asetat pH 4		-	13,49	0,39 (245 mV)

Yukarıdaki çizelge incelendiğinde tek hücreli BFC’de en yüksek OCP MnO₂/GOx modifiye GCPE ile elde edilirken en yüksek max akım yoğunluğu Au/GOx modifiye GCPE (Asetat tamponu pH 4) ve en yüksek max güç yoğunluğu Au/GOx modifiye GCPE (PBS pH 7) ile elde edilmiştir.

Çift hücreli BFC’de ise en yüksek OCP Au/GOx modifiye GCPE ile elde edilirken en yüksek max akım yoğunluğu MnO₂/GOx modifiye GCPE (PBS pH 7 || Asetat tamponu pH 4) ve en yüksek max güç yoğunluğu Au/GOx modifiye GCPE (PBS pH 7 || Asetat tamponu pH 4) ile elde edilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde tek hücreli BFC’lerde sistemden düşük OCP ile yüksek akım ve güç yoğunluğu sağlanmıştır. Ancak bu etkinliğini uzun süre sürdürememiştir. Çift hücreli BFC’lerde ise sistemden yüksek OCP ile düşük akım ve güç yoğunluğu elde edilmiştir. Bu sistemde ise zamanla etkinlik artarak dengeye gelmiştir. Bu değişimlerin, hazırlanan kompozit pasta elektrotlardaki enzimlerin çözeltiye geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kompozit pasta elektrotlara enzimler iletken polimerlerle tuzaklanarak bu sistemin daha etkili olması sağlanabilir.

Bu sonuçlar bize göstermiştir ki, enzim ile modifiye kompozit pasta elektrotlar BFC’lerin biyo-anot ve biyo katot elektrodu olarak kullanılabilir. Ayrıca bu elektrotlara kolay bir şekilde nanoyapılar modifiye edilebilerek daha pratik ve etkili biyo-anot ve biyo-katot elektrotlar elde edilebileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adeloju, S.B. ve Moline, A.N. (2001) Fabrication of ultra thin polypyrrole glucose oxidase film from supporting electrolyte free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose, *Biosens Bioelectron*, 16: 133-139.
- Agrawal, A.K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Prog Energy Combustion Sci*, 33: 233-71.
- Akers, N.L., Moore, C.M. ve Minteer, S.D. (2005) Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes, *Electrochim Acta*, 50: 2521 -2525.
- Aksoy, C. (2003) *Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 59s.
- Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Greb-Markiewicz, B. ve Peczyńska-Czoch, W. (2002) Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers, *Process Biochem*, 37: 1387-94.
- Allen, H. ve Hill, O. (1987) Bio-electrochemistry, *Pure and Applied Chemistry* 59 (6): 743-748.
- Allen, R.M. ve Bennetto, H.P. (1993) Microbial fuel-cells: electricity production from carbohydrates, *Appl Biochem Biotechnol*, 39 (40): 27-40.
- Anık Kırgöz, U., Mo J.V., S., Wang, J. ve Muck, A. (2001) Glassy carbon paste electrode, *Electrochem Commun*, 3: 203-208.
- Anık Kırgöz, U., Timur, S., Wang, J. ve Telefoncu, A. (2004) Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode, *Electrochem Commun*, 6 (9): 913-916.
- Anık, Ü., Çubukçu, M. ve Yavuz, Y. (2012) Nanomaterial-based composite biosensor for glucose detection in alcoholic beverages, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, doi:10.3109/10731199.2012.696071.

- Appleby, A.J. ve Foulkes, F.R. (2004) *Fuel cell handbook*, 7. Baskı, EG&G Technical Services, Inc., Morgantown, West Virginia, 352s.
- Ar, F.F. 1988 Yakıt hücreleri, *Kimya Mühendisliği Dergisi*, Ekim-Kasım-Aralık.
- Arechederra, R.L., Boehm, K. ve Minteer, S.D. (2009) Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications, *Electrochim Acta*, 54: 7268-73.
- Arechederra, R.L. ve Minteer, S.D. (2009) Complete oxidation of glycerol in an enzymatic biofuel cell, *Fuel Cells*, 9: 63-69.
- Arıca, M.Y. ve Hasırcı, V.N. (1987) Immobilization of glucose oxidase in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes, *Biomaterials*, 8 (6): 489-95.
- Aston, W.J. ve Turner, A.P.F. (1984) Applied aspects of bioelectrochemistry: Fuel cells, sensors, and bioorganic synthesis, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1: 89-120.
- Babkina, E., Chigrinova, E., Ponamoreva, O., Alferov, V. ve Reshetilov, A. (2006) Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by immobilized bacteria gluconobacter oxydans. Evaluation of water-insoluble mediator efficiency, *Electroanalysis*, 18: 2023–2029.
- Beilke, M.C., Klotzbach, T.L., Treu, B.L., Sokic-Lazic, D., Wildrich, J., W., Amend, L.M., Gebhard, L.M., Arechederra, R.L., Germain, M.N., Moehlenbrock, M.J. ve Minteer, S.D. (2009) Enzymatin biofuel cells-chapter 5, 179-241, Zhao, t. (editör), *Micro fuel cells: Principles and applications*, Acedamic pres, 320s.
- Barbir F. (2006) *PEM fuel cells*, Fuel cell technology reaching towards commercialization, Edited by. Nigel Sammes, Springer-Verlag, London, 298s.
- Barton, S.C., Gallaway, J. ve Atanassov, P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem Rev*, 104: 4867–86.
- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Moralez, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisan, J.M. ve Fernandes-Lafuante, R. (2006) Preparation of a very Stable Immobilized Biocatalyst of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*, *J Biotechnol*, 121: 284-89
- Bertrand, G. (1894) Sur Le Latex De L'arbre À Laque, *C.R. Hebd. Acad. Sci. (Paris)*, 118: 1215-18.

- Bilge, G., 2010, *Glikoz oksidaz bazlı enzim elektrotlarda elektriksel iletkenliğin geliştirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 105s.
- Bharathi, S. ve Nogami, M. (2000) A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme, *Analyst*, 126: 1919-22.
- Bugg, T. (2004) *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Wiley-Blackwell; 2nd Edition edition, 304s.
- Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B. ve Walsh, F.C. (2006) Biofuel cells and their development, *Biosens Bioelectron*, 21 (11): 2015-2045.
- Bıykoğlu, A., 2003, Yakıt Hücrelerinin Tarihsel Gelişimi, Çalışma Prensipleri ve Bugünkü Durumu, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 16 (3): 523-542.
- Bright, H.J. ve Porter, D.J.T. (1975) 7 Flavoprotein oxidases, 12: 421-505, *The Enzymes*, Boyer, P.D. (Editör), 647s.
- Büyüknohutçu, C. (2009) *Glikoz oksidaz tabanlı biyo-yakıt pili geliştirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 121s.
- Bourbonnais, R. ve Paice, M.G. (1992) Demethylation and Delignification of Kraft Pulp by *Trametes versicolor* Laccase in the Presence Of 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonate), *Appl Microbiol Biotechnol*, 36: 823-827.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P. ve Yaguchi, M. (1995) Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of The Mediator 2',2'-Azinobis(3-thylbenzthiazoline-6-Sulphonate) in Kraft Pulp Depolymerisation, *Appl Environ Microbiol*, 61 (5): 1876-1880.
- Cai, C. ve Chen, J. (2004) Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes, *Anal Biochem*, 332: 75-83.
- Call, H. ve Mucke, L. (1997) History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym process) *J. Biotechnol.*, 53: 163-202.

- Can, F. (2010) *Glikoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Antakya/Hatay, 92s.
- Carr, P.W. ve Bowers, L.D. (1980) *Support Considerations in Chemical Analysis*, Academic Press, New York, 480s.
- Chanp, P.C. ve Harvey, R.A. (1997) *Biyokimya*, 2. Baskı, Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 47-51.
- Chase, H., A. ve Yang, Y. (1998) Immobilization of α -amilase on poly(vinylalcohol)-coated perfluoro polymer supports for use in enzyme reactors, *Biotechnol Biochem*, 28: 145-154.
- Chen, T., Barton, S.C., Binyamin, G., Gao, Z.Q., Zhang, Y.C., Kim, H.H. ve Heller, A. (2001) A miniature biofuel cell. *J Am Chem Soc*, 123: 8630-31.
- Chen, P.Y., Vittal, R., Nien, P.C. ve Ho, K.C. (2009) Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, quercetin, and Nafion. *Biosens Bioelectron*, 24: 3504-3509.
- Clark, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B. ve Harrison, S.T.L. (2006) Location of Glucose Oxidase During Production by *Aspergillus Niger*, *Appl Microbiol Biochnol*, 70: 72-77.
- Cohen, B. (1931) The bacterial culture as an electrical half-cell, *J Bacteriol*, (21): 18-19.
- Cosnier, S. (1999) Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films, *Biosens Bioelectron*, 14 (5): 443-456.
- Cosnier, S., Novoa, A., Mousty, C. ve Marks, R.S. (2002) Biotinlated Alginate Immobilization Matrix in The Construction of an amperometric Biosensor: application for The Determination of Glucose, *Anal Chim Acta*, 453: 71-9.
- Cracknell, J.A., Vincent, K.A. ve Armstrong, F.A. (2008) Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis, *Chem Rev*, 108: 2439-61.

- Çavuşoğlu, A. (2006) *Yakıt Pilleri Ve Kullanım Alanları*, Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 130s.
- Çevik, S. (2009) *Fenolik bileşiklere yönelik enzimatik olmayan (non-enzimatik) sensörlerin geliştirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 57s.
- Çubukcu, M. (2008) *Nanokompozitler ve elektrokimyasal biyosensör uygulamaları*, Yüksek lisans tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 94s.
- D'Souza, S. F. ve Godbole, S. S. (2002) Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 52: 59-62.
- Dai, G., Li, J. ve Jiang, L. (2002) Difference in Enzyme Activity and Conformation of Glucose Oxidase before and after Purification, *Colloids and Surf, B*, 24: 171-6.
- Davis, F. ve Higson, S.P.J. (2007) Biofuel cells - Recent advances and applications, *Biosens Bioelectron*, 22 (7): 1224-35.
- Dejang, N., Watcharapasorn, A., Wirojapatump, S., Niranatlumpong, P. ve Jiansirisomboon, S. , 2010 Fabrication and properties of plasma-sprayed Al₂O₃/TiO₂ composite coatings: A role of nano-sized TiO₂ addition, *Surf Coat Technol*, 204: 1651-57.
- Delanoy, G. Li, Q. ve Yu, J. (2005) Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan, *Int J Biol Macromol*, 35: 89-95.
- Dijk, C.V., Laane, C. ve Veeger, C. (1985) Biochemical fuel cells and amperometric biosensors, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, 104 (10): 245-252.
- Dizge, M.G. (2007) *Trametes versicolor beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Gebze, 103s.
- Du, D., Tao, Y., Zhang, W., Liu, D. ve Li, H. (2011) Electrochemical aptasensor based on the dual-amplification of G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme and blocking reagent-horseradish peroxidase, *Biosens Bioelectron*, 26 (10): 4231-35.

- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. ve Davies, G.J. (1998) Crystal Structure Of The Type-2 Copper Depleted Laccase from *Coprinus cinereus* At 2.2 Å Resolution, *Nat Struct Biol*, 5: 310-316.
- Duma, R. ve Minteer, S.D. (2006) Development of bilirubin oxidase cathodes for ethanol/ oxygen biofuel cells, *Polymeric Materials, Sci Eng*, 94: 592-593.
- Dumitriu, S., Popa, M. ve Dumitriu, M. (1988) Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers, *J Bioact Compatible Polym*, 3: 243-312.
- Durán, N., Rosa, M.A., D'annibale, A. ve Gianfreda, L. (2002) Applications Of Laccases And Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized On Different Supports: A Review, *Enzyme Microb. Technol.*, 31: 907-31.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., De Luca, P., Bencivenga, U., Rossi, S., Di Martino, S., Grano, V., Diano, N. and Mita, D.G. (2004) Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*, *J Mol Catal B Enzym*, 27: 191-206.
- Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S. W., Spagnoli, C., Shafi, K. V. P. M., Ulman, A., Cowman, M. ve Gross, R. A. (2003) Activity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on γ -Fe₂O₃ Magnetic Nanoparticles, *J Am Chem Soc*, 125 (7): 1684-85.
- Edwards, P.P., Kuznetsov, V.L., David, W.I.F. ve Brandon, N.P., (2008) Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future, *Energy Policy*, 36: 4356–4362.
- Egi, Y. (2009) *Çapraz bağlı baskılanmış glikoz oksidazın hazırlanması ve karakterizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 118s.
- El-Enshasy, H.A. (1998) *Optimization of Glucose Oxidase production and excretion by recombinant Aspergillus niger*, PHD Thesis, Carolo-Wilhelmina Technical University, Brunswick, 161s.
- Energy Information Administration (EIA), International Energy Outlook 2008, DOE/EIA-0484.

- Erdal, E.Ü. (2008) *Protonik iletkenliği yüksek yeni bir polimer elektrolit membranın geliştirilmesi ve uygulaması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara 163s.
- Erwin, E., De Jong, E. ve Field, J. (1993) Stimulation of Lignolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in The White Rot Fungus *Bjerkandera Sp. Strain Bos55*, *Appl Environ Microbiol*, 59: 4031-36.
- Eryomin, A.N., Semashko, T.V. ve Mikhailova, R.V. (2006) Immobilization of Extracellular Glucose Oxidase from *Penicillium Funiculosum* 46.1 on Gels of Alluminum or Zinc Hydroxides, *Appl Biochem Microbiol*, 42 (2): 138-144.
- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yanez, E.E., Castillo, E.F. ve Almazan, O. (2009) Biofuels: environment, technology and food security, *Renew Sustain Energy Rev*, 13: 1275-87.
- Fan, Y., Hu, H. ve Liu, H. (2007) *J Power Sources*, 171: 348-354.
- Feng, Xu. (1996) Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as well as Halide Inhibition, *Biochemistry*, 35: 7608-14.
- Fernández-García, M., Martínez-Arias, A., Hanson, J.C. ve Rodriguez, J.A. (2004) *Chem. Rev.* 104: 4063.
- Fervel, V., Normand, B. ve Coddet, C. (1999) Tribological behavior of plasma sprayed Al₂O₃-based cermet coatings, *Wear*, 230 (1): 70-77.
- Freire, R.S., Pessoa, C.A., Mello, L.D. ve Kubota, L.T. (2003) Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *J Braz Chem Soc*, 14: 230-43.
- Gaffield, W., Jansen, E.F., Tomimatsu Y. and Olsan, A.C. (1979) Activation of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsinogen-A. Enzymatic activity and circular dichroism studies, *Arch Biochem Biophys*, 144, 394.
- Galvani, L. (1791) *De bononiensi scientiarum et artium instituto atque academia Comentarrii*, 7: 363-418.

- Gao, F., Yan, Y.M., Su, L., Wang, L. ve Mao, L.Q. (2007) An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum, *Electrochem Commun*, 9: 989-96.
- Garzillo, A.M.V., Di Paolo, S., Fenice, M., Petruccioli, M., Buonocore, V. ve Federici, F. (1995) Production, purification and characterization of glucose oxidase from *Penicillium variabile* P16, *Biotechnol Appl Biochem*, 22: 169-78.
- Gell, M., Jordan, E. H., Sohn, Y. H., Goberman, D., Shaw, L., Xiao, T. D. (2001) Development and implementation of plasma sprayed nanostructured ceramic coatings, *Surf Coat.Technol*, 146-147: 48-54.
- Ghindilis, A.L., Atanasov, P. ve Wilkins, E. (1997) Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications, *Electroanalysis*, 9: 661-74.
- Gianfreda, L. ve Bollag, J.M. (2002) Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutant, *Enzymes in the environment*, 495-538.
- Giroud, F., Gondran, C., Gorgy, K., Pellissier, A., Lenouvel, F., Cinquin, P. ve Cosnier S. (2011) A quinhydrone biofuel cell based on an enzyme-induced pH gradient, *J Power Sources*, 196: 1329-32.
- Goberman, D., Sohn, Y. H., Shaw, L., Jordan, E. ve Gell, M. (2002) Microstructure development of Al₂O₃-13wt. %TiO₂ plasma sprayed coatings derived from nanocrystalline powders, *Acta Mater*, 50 (5): 1141-52.
- Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G., Thakur, M.S. ve Karanth, N.G. (2003) Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using additives, *J Biol Chem*, 278: 24324-33.
- Govil, G. ve Saran, A. (1982) Biochemical fuel cells, *J Indian Chem Soc*, 59: 1226-28.
- Gökgöz, M. (2006) *Lakkazın poliakrilamit ve poliakrilamit-κ-karragenan jellerine immobilizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 56s.
- Gupta, S., Mukhopadhyay, L. ve Moulik, S.P. (2003) Kinetics in microemulsion V. Glucose oxidase catalyzed oxidation of beta-D-glucose in aqueous, micellar and water-in-oil microemulsion media, *J Biochem Biophys*, 40: 340-49.

- Guisseppi-Elie, A., Lei, C. ve Baughman, R.H. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes, *Nanotechnology*, 13: 559-64.
- Gullison, R.E., Frumhoff, P.C., Canadell, J.G., Field, C.B., Nepstad, D.C. ve Hayhoe, K. (2007) Tropical forests and climate policy, *Science*, 316: 985-6.
- Habrioux, A., Merle, G., Servat, K., Kokoh, K.B., Innocent, C., Cretin, M. ve Tingry, S. (2008) Concentric glucose/O₂ biofuel cell, *J Electroanal Chem*, 622: 97-102.
- Haouz, A., Glandieres, J.M. ve Alpert, B. (2001) Involvement of Protein Dynamics in Enzyme Stability The Case of Glucose Oxidase, *FEBS Lett*, 506: 216-220.
- Hayat, M.A. (1989) *Colloidal gold, principles, methods and applications*, Academic Press Inc., San Diego, 536s.
- He, Y., Wang S. ve Lai, K.K. (2010) Global economic activity and crude oil prices: A cointegration analysis, *Energy Econ*, 32 (4): 868-76.
- He, Q. ve Zeng, L. (2010) Antibody immobilization for biosensing on gold-coated magnetite nanoparticles surface, *3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, 412008 Zhuzhou, China, 1636-39.
- Heller, A. (2004) Miniature biofuel cells, *Phys Chem Chem Phys*, 6 (2): 209-16.
- Hestekin, J.A., Lin, Y.P, Frank, J.R., Snyder, S.W. ve Martin, E.J. (2002) Electrochemical Enhancement of Glucose Oxidase Kinetics: Gluconic Acid Production with Anion Exchange Membrane Reactor, *J Appl Electrochem*, 32: 1049-52.
- Hirsch, R., Katz, E. ve Willner, I. (2000) *J Am Chem Soc*, 122: 12053-54.
- Ieropoulos, I.A., Greenman, J., Melhuish, C. ve Hart, J. (2005) Comparative study of three types of microbial fuel cell, *Enzyme Microb Technol*, 37: 238-45.
- Illanes, A., 2008, *Enzyme biocatalysis principles and applications*, springer science + business media B.V., ISBN 978-1-4020-8360-0, 398p.

- Inamuddin, Shin K. M., Kim S.I., So I. ve Kim S.J. (2009) A conducting polymer/ferritin anode for biofuel cell applications, *Electrochim Acta*, 54: (16) 3979-83.
- Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P. ve Apblett, C. (2006) Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer, *Electrochem Commun*, 8: 1204-10.
- İçli, N. (2008) *İmmobilize glikoz oksidaz enziminin özellikleri ve enzim aktifliğinin artırılması*, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 82s.
- İnam, R., Çaykara, T. and Özyürek, C. (2001) Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels, *Sep Sci Technol*, 36 (7): 1451-61.
- Jan, U. and Husain, Q. (2004) Preparation of a highly stable, very active and high-yield multilayered assembly of glucose oxidase using carbohydrate-specific polyclonal antibodies, *Biotechnol Appl Biochem*, 39: 233-9.
- Kaetsu, I., Kumakura, M. ve Yoshida, M. (1979) Enzyme immobilization by radiation-induced polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate at low temperatures, *Biotechnol Bioeng*. 21 (5): 847-61.
- Kahn, K. (1999) Theoretical study of intermediates in the urate oxidase reaction, *Bioorg Chem*, 27: 351-62.
- Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T. ve Kano, K. (2007) Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Phys Chem Chem Phys*. 9: 1793-801.
- Kang, C., Shin, H., Zhang, Y. ve Heller, A. (2004) Deactivation of bilirubin oxidase by a product of the reaction of urate and O₂, *Bioelectrochemistry*, 65: 83-8.
- Karadağ, H. (2001) *Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 58s.
- Karmali, K., Karmali, A., Teixeira, A. ve MarceloCurto, M.J. (2004) Assay for glucose oxidase from aspergillus niger and penicillium amagasakiense by fourier transform infrared spectroscopy, *Anal Biochem* 333: 320-27.

- Katz E., Filanovsky B. ve Willner I. (1999a) A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *New J Chem*, 23: 481-7.
- Katz, E., Willner I. ve Kotlyar, A.B. (1999b) A non-compartmentalized glucose/O₂ biofuel cell, *J Electroanal Chem*, 479: 64.
- Katz, E., Willner, I. ve Kotlyar, A.B. (1999c) A non-compartmentalized glucose vertical bar O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces, *J Electroanal Chem*, 479: 64-8.
- Katz, E., Buchmann, A.F. ve Willner, I. (2001) Self-powered enzyme-based biosensors, *J Am Chem Soc*, 123 (43): 10752-53.
- Katz, E. ve Willner, I. (2002) Magneto-Stimulated Hydrodynamic Control of Electrocatalytic and Bioelectrocatalytic Processes, *J Am Chem Soc*, 124: 10290-91.
- Katz, E., Shipway, N.A. ve Willner, I. (2003) Biochemical fuel cells, 355-81, Vielstich A, Lamm A, Gasteiger HA, (editörler) *Handbook of fuel cells: Fundamentals, technology and application*. Chichester: JohnWiley and Sons Ltd., 3826s.
- Katz, E., Willner, I. ve Wang, J. (2004) Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles, *Electroanalysis*, 16: 19-26.
- Katz E. ve Willner, I. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44: 4791-94.
- Karam, J. ve Nicel, J.A. (1997) Potential applications of enzymes in waste treatment, *J Chem Technol Biotechnol*, 69: 141-53.
- Karube, I., Hirano, K.I. ve Suzuki, S. (1977) Glucose oxidase pellets, *Biotechnol Bioeng*, 19: 1233-8.
- Kelly, I. (2003) The design of a robotic predator: The SlugBot, *Robotica*, 21 (4): 399-406.
- Kelley, R.L. ve Reddy, C.A. (1986) Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *J Bacteriol*, 166: 269-74.

- Kendall, K. (2002) Fuel cell technology: A sweeter fuel, *Nat Mater*, 1: 211-212.
- Kicheol, H., Zhijian, W., Joune, L. ve Ik-Sung, A. (2005) Activity of glucose oxidase entrapped in mesoporous gels, *Biochem Eng J*, 22: 161-166.
- Kim, J.M. ve Schmid, R.D. (1991) Comparison of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase purified as glyco and aglycoproteins, *FEMS Microbiol Lett*, 78: 221-6.
- Kim, B.H., Kim, H.J., Hyun, M.S. ve Park, D.H. (1999) Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*, *J Microbiol Biotechnol*, 9: 127-31.
- Kim, H.J., Park H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M. ve Kim, B.H. (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium *Shewanellaputrefaciens*, *Enzyme Microb Technol*, 30: 145-52.
- Kim, H.H., Mano, N., Zhang, X.C. ve Heller, A. (2003) A miniature membrane-less biofuel cell operating under physiological conditions at 0.5 V, *J Electrochem Soc*, 150: 209-13.
- Kim, J., Jia, H. ve Wang, P. (2006) Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells, *Biotechnol Adv*, 24: 296-308.
- Klotzbach, T.L. ve Minter, S.D. (2007) Towards the Development of an Azure C Mediated Chitosan Membrane Based Bioanode, *Polym Prepr*, 48: 1008-09.
- Ko, J.H., Hahm, M.S., Kang, H.A., Nam, S.W. ve Chung, B.H. (2002) Secretory expression and purification of *Aspergillus niger* glucose oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in PMR1 gene, *Protein Expression Purif*, 25: 488-93.
- Kozhukharova, A., Kirova, N., Popova, Y. ve Batsalova, K. (1988) Properties of glucose oxidase immobilized in gel of polyvinylalcohol, *Biotechnol Bioeng*, 32: 245-48.
- Köklükaya, S.Z. (2008) *Poli(akrilamit-krotonik asit)/sodyum aljinat, poli(akrilamit-krotonik asit)/k-karragenan, poli(akrilamit sitrakonik asit)/sodyum aljinat, poli(akrilamit-sitrakonik asit)/k-karragenan hidrojellerinde lakkaz immobilizasyonu*, Yüksek lisans, Gazi Üniversitesi, Ankara, 140s

- Kulys, J.J. ve Samalius, A.S. (1984) Dependence of the efficiency of bioelectrocatalytic processes on the electrode surface-state, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 13: 163-9.
- Kurtcephe, C. (2006) Tek hücreli doğrudan metanol yakıt pili geliştirilmesi ve deneysel incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Niğde Üniversitesi, Niğde, 73s.
- Lau, K.T., de Fortescu, S.A.L., Murphy, L.J. ve Slater, J.M. (2003) Disposable glucose sensors for flow injection analysis using substituted 1,4-benzoquinone mediators. *Electroanalysis*, 15: 975-81.
- Larminie, J. ve Dicks, A. (2003) *Fuel Cell Systems Explained*, Wiley-Blackwell; 2nd Edition edition, 428s.
- Lee, J.Y., Shin, H.Y., Kang, S.W., Park, C. ve Kim, S.W. (2011) Application of an enzyme-based biofuel cell containing a bioelectrode modified with deoxyribonucleic acid-wrapped single-walled carbon nanotubes to serum, *Enzyme Microb Technol*, 48: 80-84.
- Levine, W.G. (1965) Laccase, A Review. In: *The Biochemistry Of Copper*, Academic Press Inc., New York: 371-85.
- Lewis, K. (1966) Biochemical fuel cells, *Bacteriol Rev*, 30: 101-13.
- Li, K., Xu, F. ve Eriksson, K.E. (1999) Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound *Appl Environ Microbiol*, 65 (6): 2654-60.
- Li, L., Chu, Y., Liu, Y. ve Dong, L. (2007) Synthesis and shape evolution of novel cuniform-like MnO₂ in aqueous solution, *Mater Lett*, 61: 1609-13.
- Li, J. ve Gao, H. (2008) Renewable Potentiometric Immunosensor Based on Fe₃O₄ Nanoparticles Immobilized Anti-IgG, *Electroanalysis*, 20: 881-887.
- Li, X.C., Zhou, H.J., Yu, P., Su, L., Ohsaka, T. ve Mao, L.Q. (2008) A miniature glucose/O₂ biofuel cell with single-walled carbon nanotubes-modified carbon fiber microelectrodes as the substrate, *Electrochem Commun*, 10: 851-54.
- Li, X., Zhang, L., Su, L., Ohsaka, T. ve Mao, L. (2009) A miniature glucose/O₂ biofuel cell with a high tolerance against ascorbic acid, *Fuel Cells*, 9: 85-91.

- Li, Y., Zhang, J., Zhu, H., Yang, F. ve Yang, X. (2010) Gold nanoparticles mediate the assembly of manganese dioxide nanoparticles for H₂O₂ amperometric sensing, *Electrochim Acta*, 55: 5123-28.
- Li, K., Lai, Y., Zhang, W. ve Jin, L. (2011) Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for Escherichia coli detection, *Talanta*, 84: 607-13.
- Lin, X., Zeng, Y., Zhou, X. ve Ding, C. (2003) Microstructure of alumina-3wt.% titania coatings by plasma spraying with nanostructured powders, *Mater Sci Eng, A*, 357: 228-34.
- Linden, D. (1984) *Handbook of Batteries and Fuel Cells*, McGraw Hill Higher Education; 2nd Ed edition, New York, 1088s.
- Liu, H. ve Logan, B.E. (2005) Power generation in Fed Batch MFC as a function of ionic strength and reactor configuration, *Environ Sci Technol*, 39: 5488-93.
- Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B. ve Dong, S. (2006) Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite, *Biosens Bioelectron*, 21: 2195-201.
- Liu, Y. ve Dong, S.J. (2007) A biofuel cell with enhanced power output by grape juice, *Electrochem Commun*, 9: 1423-27.
- Logan, B.E. (2005) Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation, *Water Sci Technol*, 52 (1-2): 31-37.
- Long, Y.M., Fu, Z.Q., Deng, K.J. ve Tu, Y.F. (2009) Study on a pyruvate oxidase biosensor based on cyclodextrin with ferrocene as electron-transfer mediator. *Anal Lett*, 42: 312-22.
- Mališić, M., Janošević, A., Šljukić, B., Stojković, I. ve Ćirić-Marjanović, G. (2010) Exploration of MnO₂/Carbon Composites and Their Application to Simultaneous Electroanalytical Determination of Pb(II) and Cd(II) *Electrochim Acta*, 74: 158-64.
- Mano, N., Mao, F. ve Heller, A. (2002) A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer, *J Am Chem Soc*, 124: 12962-3.

- Mano, N., Mao, F., Shin, W., Chen, T. ve Heller, A. (2003a) A miniature biofuel cell operating at 0.78 V. *Chem Commun*, 518–19.
- Mano, N., Mao, F., Shin, W., Chen, T. ve Heller, A. (2003b) A miniature biofuel cell operating at 0.78 V, *Chem Commun*, 518–519.
- Mano, N. ve Heller, A. (2003) A miniature membraneless biofuel cell operating at 0.36 V under physiological conditions, *J Electrochem Soc*, 150: 1136–38.
- Mano, N., Mao, F. ve Heller, A. (2004) A miniature membrane-less biofuel cell operating at +0.60 V under physiological conditions, *Chem Bio Chem*, 5: 1703–05.
- Mayer, A.M. ve Staple,s R.C. (2002) Laccases: New Functions for an Old Enzyme, *Phytochemistry*, 60: 551-65.
- Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P. ve Pingarrón, J.M. (2005) A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes, *Anal Biochem*, 336 (1): 20-27.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., Del Vale, M. ve Alegret, S. (2005) New Materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends Anal Chem*, 24 (9): 826-38.
- Mester, T. ve Tien, M. (2000) Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in The Degradation of Environmental Pollutants, *Int Biodet Biodegrad*, 46: 51-59.
- Min, B., Cheng, S. ve Logan, B.E. (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells, *Water Res*, 39: 1675-86.
- Minteer, S.D., Akers, N.L. ve Moore C.M. (2004) *Enzyme immobilization for use in biofuel cells and sensors*, U.S. Patent Application Publication US 2004/0101741 A1.
- Minteer, S.D., Liaw, B.Y. ve Cooney, M.J. (2007) Enzyme-based biofuel cells, *Curr Opin Biotechnol*, 18: 228-34.

- Miron, J., Gonzales, M.P., Pastrana, L. ve Murado, M.A. (2002) Diauxic Production of Glucose oxidase by *Aspergillus Niger* in Submerged Culture A Dynamic Model, *Enzyme Microb Technol*, 31: 615-20.
- Mislovicova, D., Michalkova, E. ve Vikartofska, A. (2007) Immobilized Glucose Oxidase on Different Supports for Biotransformation Removal of Glucose from Oligosaccharide Mixtures, *Process Biochem*, 42: 704-09.
- Mock, P. ve Schmid, S.A. (2009) Fuel cells for automotive powertrains-A techno-economic assessment, *J Power Sources*, 190: 133-40.
- Moehlenbrock, M.J. ve Minteer, S.D. (2008) Extended lifetime biofuel cells, *Chem Soc Rev*, 37: 1188-96.
- Mohan, Y., Kumar, S.M.M. ve Das, D. (2008) Electricity generation using microbial fuel cells, *Int J Hydrogen Energy*, 33: 423-26.
- Moore, C.M., Akers, N.L., Hill, A.D., Johnson Z.C. ve Minteer S.D. (2004) Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides, *Biomacromolecules* 5: 1241-47.
- Mosbach, K. (1976) *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 999s.
- Narayanan, S.R. ve Valdez, T.I. (2003) Portable direct methanol fuel cell system, 1133–41, Vielstich, W., Lamm, A., Gasteiger, H.A., (editörler), *Handbook of fuel cells- fundamentals technology and applications*, Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 3826s.
- Nazaruk, E., Smolinski, S., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., Fiedurek, J., Rogalski, J. ve Bilewicz, R. (2008) Enzymatic biofuel cell based on electrodes modified with lipid liquid-crystalline cubic phases, *J Power Sources*, 183: 533-8.
- Nien, P.C., Wang, J.Y., Chen, P.Y., Chen, L.C. ve Ho, K.C. (2010) Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: Application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells, *Bioresour Technol*, 101: 5480-86
- Niessen, J., Schroder, U., Rosenbaum, M. ve Scholz, F. (2004a) Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells, *Electrochem Commun*, 6: 571-5.

- Niessen, J., Schroder, U. ve Scholz, F. (2004b) Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation a bacterial fuel cell oper-ating on starch. *Electrochem Commun*, 6: 955-8.
- Nigam, P.S. ve Singh, A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog Energy Combust Sci*, 37: 52-68.
- Novotny, C, Svobodova, K, Kasinath, A. ve Erbanova, P. (2004) Biodegradation of Synthetic DyesBy *Irpex Lacteus* Under Various Growth Conditions, *Int Biodeterior Biodegrad*, 54: 215-23.
- Oğuz, A. E. (2006) *Hidrojen Yakıt Pilleri ve PEM Yakıt Piliinin Analizi*, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 98s.
- Oh, S., Min, B. ve Logan, B.E. (2004) Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells, *Environ Sci Technol*, 38:4900-4
- Onat T., Emerk K. ve Sözmen, E.Y. (2002) *İnsan Biyo-kimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, 674s.
- Osman, M.H., Shah, A.A. ve Walsh, F.C. (2010) Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial, *Biosens Bioelectron*, 26: 953-63.
- Osman, M.H., Shah, A.A. ve Walsh, F.C. (2011) Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells, *Biosens Bioelectron*, 26: 3087-102.
- Öncel, S.Ş. (2009) *Biyo-hidrojen üretimi ve yakıt hücrelerinde kullanılması*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 115s
- Öztaş, D. (2007) *Tirosinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 126s.
- Özcan, L. (2008) *Polipirol iletken polimerinin biyosensör olarak kullanımı*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 114s.
- Özyılmaz, G. (2005) *Glikoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 158s.

- Palmore, G.T.R. ve Whitesides, G.M. (1994) Microbial and enzymatic biofuel cells, *ACS Symp Ser*, 566: 271–90.
- Palmore, G.T.R., Bertschy, H., Bergens, S.H. ve Whitesides, G.M. (1998) A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD(+)-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials, *J Electroanal Chem*, 443: 155-61.
- Pas L.M. (2007) Alternative Energy: Enzyme-based Biofuel Cells, *MMG 445 Biotechnol*, 20073: 93-7.
- Petuccioli, M., Federici, F., Bucke, C. ve Keshavarz, T. (1999) Enhancement of Glucose Oxidase Production by *Penicillium Variabile*, *Enzyme Microb Technol*, 24: 397-401.
- Piontek, K., Antorinis, M. ve Choinowski, T. (2002) Crystal Structure of A Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* At 1.90-Å Resolution Containing A Full Complement Of Coppers, *J Biol Chem*, 277: 37663-69.
- Pitcher, W.H. (1978) *Immobilized lactase for whey hydrolysis; stability and operating strategy*, Enzyme Engineering, Ed. by Brown, G. B., Ganecke, Wingard, L. B., Jr., Plenum Press, New York, 4: 67-76.
- Pizzariello, A., Stred'ansky, M. ve Miertus, S. (2001) A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix. In Proceedings of the 16th International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Bratislava, Slovakia, 99-105s.
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N. ve Joshi, H.C. (2007) Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India, *Energy Fuels*, 21 (4): 2415-20.
- Prasad, S., Singh, A. ve Joshi, H.C. (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues, *Resour Conserv Recycling*, 50: 1-39.
- Qi, A., Peppley, B. ve Karan, K. (2007) Integrated fuel processors for fuel cell application: A review, *Fuel Process Technol*, 88: 3-22.

- Qiu, J. D., Xiong, M., Liang, R. P., Peng, H. P. ve Liu, F. (2009) Synthesis and characterization of ferrocene modified Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles and its application, *Biosens Bioelectron*, 24 (8): 2649-53
- Raba, J. ve Mottola, H.A. (1995) Glucose oxidase as an analytical reagent, *Critical Reviews in Analytical Chemistr*, 25 (1): 1-42.
- Rando, D., Kohring, G.W. ve Giffhorn, F. (1997) Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*, *Appl Microbio. Biotechnol*, 48: 34-40.
- Ramanavicius, A., Kausaite, A. ve Ramanaviciene, A. (2008) Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol, *Biosens Bioelectron*, 24: 761-66.
- Raouf, J.B., Ojani, R. ve Baghayeri, M. (2009) Sensors and Actuators B, *Elsevier*, 143-261
- Rauf, A., İhsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anvar, M.A. ve Khalid, A.M. (2006) Glucose Oxidase Immobilization on a Novel Cellulose Acetate-Polymethylmetacrylate, *J Biotechnol*, 121: 351-360.
- Richardson, T. ve Finley, J. W. 1985, Chemical Changes in Food during Processing, Springer (ed.), ISBN, 520s.
- Robert, F. (2002) Shrinking fuel cells promise power in your pocket, *Science*, 296: 1222-1224.
- Rodriguez-Nogales, J.M. (2004) Kinetic Behaviour and Stability of Glucose Oxidase Entrapped in Liposomes, *J Chem Technol Biotechnol*, 79: 72-78.
- Rodríguez, J.A. ve Hrbek, J. (2010) Inverse oxide/metal catalysts: A versatile approach for activity tests and mechanistic studies, *Surf Sci*, 604: 241-44.
- Rogalski, J., Dawidowicz, A., Jo'z'wik E. ve Leonowicz, A. (1999) Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass, *J Mol Catal B: Enzym*, 6: 29-39.
- Ross, D.R. (2006) Hydrogen storage: The major technological barrier to the development of hydrogen fuel cell cars, *Vacuum*, 80: 1084-89.

- Saburo, F. and Atsuo, T. (1985) Application of biocatalyst immobilized by polymer methods, *Enzyme Engineering*, Plenum Press, New York, 201-3.
- Sakai, H., Nakagawa, T., Tokita, Y., Hatazawa, T., Ikeda, T., Tsujimura, S. ve Kano, K. (2009) A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions, *Energy Environ Sci*, 2: 133-38.
- Sakurai, T. (1992) Anaerobic reactions of Rhus verniciferalaccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II), *Biochem J*, 284: 681-5.
- Sarıtaş, F. (2004) *Hidrojenin alternatif enerji kaynağı olarak gelecekte önemi, uygulama alanları ve yakıt hücrelerindeki kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 159s.
- Schroder U., Niessen J. ve Scholz F. (2003) A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude, *Angew Chem Int Ed*, 42: 2880-3.
- Schuhmann, W. (2002) Amperometric enzyme biosensors based on optimized electron-transfer pathways and non-manual immobilization procedures, *Rev Mol Biotechnol*, 82: 425-41.
- Semashko, T.V., Mikhailova, R.V. ve Eremin, A.N. (2003) Extracellular glucose oxidase of *Penicillium funiculosum*, *Appl Biochem Microbiol*, 39: 368-74.
- Shaw, L. L., Goberman, D., Ren, R., Gell, M., Jiang, S., Wang, Y., Xiao, T. D. ve Strutt, P. R. (2000) *Surf Coat Technol*, 130, 1-8.
- Shin, K.S., Youn, H.D., Han, Y.H., Kang, S.O. ve Hah, Y.C. (1993) Purification and characterisation of D-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Eur J Biochem*, 215: 747-52.
- Shukla, A.K., Avery, N.R. ve Muddle, B.C. (1999) Future cars: The electric option, *Curr Sci* 77 (9): 1141-1146.
- Shukla, K., Suresh, P., Berchmans, S. ve Rajendran, A. (2004) Biological fuel cells and their applications, *Curr Sci*, 87: 27-31.
- Smith, J.E. (1985) *Biotechnology Principles*, Van Nostran Reinhold Co. Ltd., U.K.

- Smitha, B., Sridhar, S. ve Khan, A.A. (2005) Solid polymer electrolyte membranes for fuel cell applications a review, *J Membr Sci* 259: 10-26.
- Singh, A., Pant, D., Korres, N.E., Nizami, A.S., Prasad, S. ve Murphy, J.D. (2010) Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives, *Bioresour Technol*, 101 (13): 5003-12.
- Singh, A., Smyth, B.M. ve Murphy, J.D. (2010) A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take, *Renew Sustain Energy Rev*, 14 (1): 277-88.
- Solomon, B., Lotan, N. ve Katchalski-Katzir, E. (1981) Interaction of glucose oxidase with blue dextran, *J Chromatogr*, 215: 121-129.
- Sokic-Lazic, D. ve Minter, S.D. (2009) Pyruvate/air enzymatic biofuel cell capable of complete oxidation, *Electrochem Solid-State Lett*, 12: 26-28.
- Soukharev, V., Mano, N. ve 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: 8368-69.
- Srere, P.A. ve Uyeda K. (1976) *Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices*, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York 1976s.
- Stoica, L., Dimcheva, N., Ackermann, Y., Karnicka, K., Guschin, D.A., Kulesza, P.J., Rogalski, J., Haltrich, D., Ludwig, R., Gorton, L. ve 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.
- Sulak, M.T. (2009) *Laccase enzimini temel alan amperometrik fenol biyosensörünün geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Gebze yüksek teknoloji enstitüsü, Gebze, 134s.
- Swoboda, B.E.P. (1969) The mechanism of binding of flavin-adenine dinucleotide to the apoenzyme of glucose oxidase and evidence for the involvement of multiple bonds, *Biochim Biophys Acta*, 75: 380-87.
- Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R. ve Noll, G. (2008) Highly efficient and versatile anodes for biofuel cells based on cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum*. *J Phys Chem*, 112: 13668-73.

- Tekman, Ş. ve Öner, N. (1994) *Genel Biyo-kimya*, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayını, İstanbul, 47-49s.
- Telefoncu, A. (1986) *İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri*, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyo-kimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 1-16, 193-249s.
- Telefoncu, A. ve Dinçkaya, E. (1997) *Enzimoloji*, 2. Baskı, Telefoncu, A. (editör) Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 3-12, 193-231s.
- Thurston, C.F. (1994) The Structure and Function Of Fungal Laccases, *Microbiology*, 140: 19-26.
- Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R. ve Telefoncu, A. (2004) Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix, *Sens Actuators, B*, 97: 132-36.
- Tomotani, E.J. ve Vitolo, M. (2005) Immobilized Glucose Oxidase as a Catalyst to The Conversion of Glucose into Gluconic Acid Using a Membrane Reactor, *Appl Biochem Biotechnol*, 121: 149-62.
- Topcagic, S., Treu, B.L. ve Minteer, S.D. (2004) Characterization/optimization of oxygen biocathodes for membraneless biofuel cells, *Proc Electrochem Soc*, 18: 230-242.
- Topcagic, S. ve Minteer, S.D. (2004) *Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell*, In Proceedings of the International Conference on Electrode Processes, Szczyrk, Poland, September, 2168-72s.
- Trean, M.D. (1980) *Techniques of immobilization, Immobilized Enzyme*, John Wiley and Sons, New York, 1-9.
- Traven, M.D. (1980) *Immobilized Enzyme: an introduction and applications in biotechnology*, John Wiley and Sons, New York, 138s.
- Tüzün, C. (1997) *Biyo-kimya*, Ankara Üniversitesi yayını, Ankara, 131-133s.
- Tzanov, T., Costa, S.A., Gübits, G.M. ve Cavaco-Paulo, A. (2002) Hydrogen Peroxide Generation with Immobilized Glucose Oxidase for Textile Bleaching, *J Biotechnol*, 93: 87-97.

- Varfolomeev, S.D., Kurochkin, I.N. ve Yaropolov, A.I. (1996) Direct electron transfer effect biosensors, *Biosens Bioelectron*, 11: 863-71.
- Wang, J. ve Musameh, M. (2003) Carbon Nanotube/Teflon Composite Electrochemical Sensors and Biosensors, *Anal Chem*, 75 (9): 2075-79.
- Wang, L. ve Wang, E. (2004) A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode, *Elektrochem Commun*, 6: 225-29.
- Weibel, M.K. ve Bright, H.J. (1971) Kinetic behaviour of glucose oxidase bound to porous glass particles, *Biochemical Journal*, 124: 801-07.
- Willner, I., Heleg-Shabtai, V., Blonder, R., Katz, E., Tao, G. ve Bueckmann, A.F. (1996) Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto au-electrodes, *J Am Chem Soc*, 118: 10321-2.
- Willner, I., Katz, E., Patolsky, F. ve Buckmann, A.F. (1998a) Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *J. Chem. Soc., Perkin Transact 2, Phys Org Chem*, 1817-22.
- Willner, I., Arad, G. ve Katz, E. (1998b) A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and MP-11 monolayer-functionalized electrodes, *Bioelectrochem Bioenerg*, 44 (2): 209-214.
- Willner, I., Katz, E., Patolsky, F. ve Buckmann, A.F. (1998c) Biofuel cell based on glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes. *J Chem Soc, Perkin Trans, 2*: 1817-22.
- Willner, I. ve Katz, E. (2003) *Angew Chem Int Ed*, 42: 4576-88.
- Wingard, L.B., Shaw, C.H. ve Castner, J.F. (1982) Bioelectrochemical Fuel Cells, *Enzyme Microb Technol*, 4 (3): 137-142.
- Wiseman, A. 1986 *Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.*, John Wiley&Sons Chicester, England, 452s.
- Wolhfarht, G., Trivic, S., Zeremski, J., Pericin, G. ve Leskovak, V. (2004) The Chemical Mechanism of Action of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*, *Mol Cell Biochem*, 260: 69-83.

- Wolhfarht, G., Trivic, S., Kandrak, J., Pericin, G. ve Leskovak, V. (2005) Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* :The Mechanism of Action With Molecular Oxygen, Quinones, and one-Electron Acceptors, *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 731-750.
- Wu, X., Zhao, F., Varcoe, J.R., Thumser, A.E., Avignone-Rossa, C. ve Slade, R.C.T. (2009) A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer, *Biosens Bioelectron*, 25: 326-31.
- Xiao, Y., Ju, H.X. ve Chen H.Y. (1999) Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer, *Anal Chim Acta*, 391: 73-82.
- Yahiro A.T., Lee S.M. ve Kimble D.O. (1964) Bioelectrochemistry I Enzymeutilizing biofuel cell studies, *Biochim Biophys Acta*, 88: 375-83.
- Yan, Y., Zhen, W., Su, L. ve Mao, L. (2006) Carbon-nanotube-based glucose/O₂ biofuel cells, *Adv Mater*, 18: 2639-2643.
- Yang, C. (2008) Hydrogen and electricity: Parallels, interactions, and convergence, *Int J Hydrogen Energy*, 33: 1977-1994.
- Yang, Y., Wang, Y., Tian, W., Zhao, Y., He, J.Q., Bian, H.M. ve Wang, Z.Q. (2009) *In situ* alumina/aluminum titanate bulk ceramic composites prepared by SPS from different structured composite powders, *J Alloys Compd*, 481: 858-62.
- Yao, S., Yuan, S., Xu, J., Wang, Y., Luo, L. ve Hu, S. (2006) A hydrogen peroxide sensor based on colloidal MnO₂/Na-montmorillonite, *Appl Clay Sci*, 33: 35-42.
- Yaropolov, A.I., Sukhomlin, T.K., Karyakin, A.A., Varfolomeev, S.D. ve Berezin, I.V. (1981) Possibility of electron tunneling transfer during enzymic catalysis of electrode processes, *Dokl Akad Nauk SSSR*, 260: 1192-5.
- Yavuz, Y. (2011) *Nanoyapı modifiye mikroorganizma/maya temelli elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 70s.
- Yıldırım, N. (2009) *Mikrobiyal hücrelerle hazırlanmış nanopartiküllerle modifiye medyatörlü bakteriyal sensörlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 79s.

- Yıldızbilir, F. (2006) *Yakıt Pili İle Elektrik Enerjisi Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 57s.
- Yoshimoto, M., Miyazaki, Y., Sato, M., Fukunaga, K., Kuboi, R. ve Nakao, K. (2004) Mechanism for high stability of liposomal glucose oxidase to inhibitor hydrogen peroxide produced in prolonged glucose oxidation, *Bioconjugate Chem*, 15: 1055-61.
- Zaborsky, O. (1973) *Adsorption Immobilized Enzyme*, Ed. by Weast, R. C., CRC Press, Ohio, 184s.
- Zhang, X., Cheng, S., Huang, X. ve Logan, B.E. (2009) *Biosens Bioelectron*, 11: 2177-80.
- Zebda, A., Renaud, L., Cretin, M., Innocent, C., Pichot, F., Ferrigno, R. ve Tingry, S. (2009) Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell, *J Power Sources*, 193: 602-606.
- Zegers, P. (2006) Fuel cell commercialization: The key to a hydrogen economy, *J Power Sources*, 154: 497-502.
- Zhao, J., Henkens, R.W., Stonehuerner, J., O'Daly, J.P. ve Crumbliss, A.L. (1992) Direct electron transfer at horseradish peroxidase colloidal gold modified electrodes, *J Electroanal Chem*, 327: 109-19.
- Zhao, Y.D., Zhang, W.D., Chen, H. ve Luo, Q.M. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase molecules adsorbed onto carbon nanotube powder microelectrode, *Anal Sci*, 18: 939-41
- Zhao, R., Bean, S.R., Wang, D., Park, S.H., Schober, T.J. ve Wilson, J.D. (2009a) Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain, *J Cereal Sci*, 49 (2): 230-8.
- Zhao, H.Y., Zhou, H.M., Zhang, J.X., Zheng, W. ve Zheng, Y.F. (2009b) Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite: A novel platform for glucose/O₂ biofuel cell, *Biosens Bioelectron*, 25: 463-468.
- Zhou, M., Deng, L., Wen, D., Shang, L., Jin, L.H. ve Dong, S.J. (2009c) Highly ordered mesoporous carbons-based glucose/O₂ biofuel cell *Biosens Bioelectron*, 24: 2904-08.

Zhaohui, W. (2010) Antibody immobilization for biosensing on gold-coated magnetite nanoparticles surface, *3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, 412008 Zhuzhou, China, 1636-39.

Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F. ve Wangc, N. (2008) A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell, *Chem Phys Lett*, 457: 381-85.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Murat TUTUM
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: İzmit (Kacaeli) 17/04/1987
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 555 234 3133
E-posta : tutummurat@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Pendik Lisesi, İstanbul	2004
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2012

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2006-2007	Muğla	Barboy
2008	İstanbul	Tekniker
2009	İstanbul	Reklam

Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

1. 6.Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Nanoyapı Modifiye Camımsı Karbon Pasta Elektrodun Biyo-anot Olarak Kullanımı”, 3-7 Eylül 2012 Hatay/Türkiye (poster).

Hobiler

1. Spor
2. Müzik
3. Aşçılık ve yemek pişirme
4. Kitap okumak